

PARECER

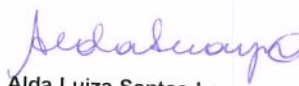
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE

Departamento de Tecnologia de Ali

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Ana Carolina Sampaio Dória Chaves**, aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de agosto de 2002.

Campinas, 09 de agosto de 2002


Dra. Alda Luiza Santos Lerayer
Presidente da Banca

**Engenharia metabólica de
Streptococcus thermophilus para produção
de acetaldeído em leites fermentados**

ANA CAROLINA SAMPAIO DÓRIA CHAVES

**DRA. ALDA LUIZA SANTOS LERAYER
ORIENTADORA**

**TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.**

Campinas, julho de 2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

UNIDADE 80
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C3986
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 50845
PROC 16-837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 12/09/02
Nº CPD _____

CMO0172894-4

BIB ID 256591

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Departamento de tecnologia de Alimentos

Engenharia metabólica de *Streptococcus thermophilus* para produção de acetaldeído em leites fermentados

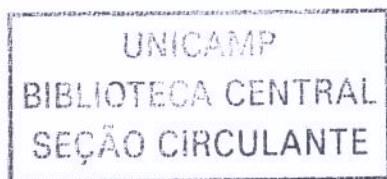
ANA CAROLINA SAMPAIO DÓRIA CHAVES

Engenheira de alimentos – Mestre em tecnologia de alimentos

DRA. ALDA LUIZA SANTOS LERAYER

ORIENTADORA

**TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.**



Campinas, julho de 2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C398e Chaves, Ana Carolina Sampaio Dória
Engenharia metabólica do *Streptococcus thermophilus* para
produção de acetaldeído em leites fermentados / Ana Carolina
Sampaio Dória Chaves. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Alda Luiza Santos Lerayer
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Acetaldeído. 2.*Streptococcus thermophilus*. 3.Treonina.
4.Iogurte. 5.Ácido fólico. I.Lerayer, Alda Luiza Santos.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

DRA. ALDA L. S. LERAYER – ORIENTADORA

PROF. DRA. YOKO B. ROSATO - BIO / UNICAMP
(MEMBRO DA BANCA)

PROF. DR. VASCO AZEVEDO – UFMG
(MEMBRO DA BANCA)

PROF. DR. SALVADOR R. MASSAGUER FEA/UNICAMP
(MEMBRO DA BANCA)

DRA. ELZA T. GRAEL-MARASCA- ITAL
(MEMBRO DA BANCA)

PROF. GLÁUCIA PASTORE FEA/UNICAMP
(SUPLENTE)

PROF. MIRNA GIGANTE FEA/UNICAMP
(SUPLENTE)

SE PODES OLHAR, VÊ. **SE** PODES VER, REPARA.

LIVROS DOS **C**ONSELHOS

À minha querida avó

AGRADECIMENTOS

- ⇒ A minha orientadora Dra. Alda Lerayer pelo incentivo e pela amizade, e sobretudo, por ter acreditado em mim e me aceitado como orientada num momento tão difícil!!
- ⇒ Aos meus extra-oficiais “Co-orientadores” holandeses, o Dr. Jeroen Hugenholtz, Dr. Michael Kleerebezem e Dr. Willem de Vos que me deram a oportunidade de trabalhar em sua excelente equipe no NIZO Food Research. Thank you very much for give me the chance to learn so much and also for your friendship!! Bedankt voor het enthousiasme waarmee je mijn werk begeleid hebt!!!
- ⇒ A todos os membros da banca Prof. Yoko B. Rosato, Prof. Vasco Azevedo, Prof. Salvador R. Massaguer, Dra. Elza T. Graef-Marasca, Prof. Mirna Gigante e Prof. Gláucia Pastore pela valiosa contribuição na correção desta tese e em especial a Dra. Elza pela cuidadosa correção e sugestões na versão final da tese.
- ⇒ Ao Dr. A. Tamime, pelas lindas fotos das bactérias de iogurte e por ter me inspirado a estudar mais os leites fermentados Thank you very much!!
- ⇒ A todos os membros do departamento de genética do NIZO Food Research “Flavour and Natural Ingredients”, os permanentes (Pesquisadores e técnicos) e aos inúmeros temporários (“The International team”), que me ensinaram tudo sobre o misterioso mundo da genética das bactérias lácticas!!
 - ✓ Marjo, bedankt for taking so good care of me!! I learned a lot from you, all about the microbiology of LAB and about the enzymatic assays!! Also thank you very much for the folic acid measurements!!!
 - ✓ Marke, bedankt for helping with the “clean knockout” constructions and for all the useful discussions and suggestions!!!
 - ✓ Ger, bedankt for being so nice and friendly, giving me so useful advises, and sharing things with me your solutions and apparatus!!! Iris, Roger, Ingrid, Bert, Saskia and Tanja bedankt for all help and friendship!!
 - ✓ Richard, Ingeborg and Marja my nice PhD colleges’ bedankt for all your help, discussions and suggestions!!!

- ✓ Patrick and Peter, bedankt for the funniest time in the noise “Wisserlab” for your patience and thanks a lot for teaching me the famous protocol of “Colony PCR” and Good zo!!!!
 - ✓ Hélène and Maria, my good friends and my first Professors in this molecular biology world, thank you very much all your help and your friendship!!
 - ✓ Patricia my good friends thank you very much all your help with growth curves experiments and your friendship you were always there ready to help me!!
 - ✓ All foreigners PhD and post-doc students: Mar, Marice, Erika, Marta, Birgit, Funny, Irena, Natasha, Li and Funing for the friendship, the great International dinners and parties that made my time in the Netherlands so nice and unforgettable!!!
- ⇒ Also thanks to all my great Dutch friends for being good and supporting me in the difficult moments and also in the happy ones!!!!
 - ⇒ A minha família, meus pais e irmãos que sempre me deram força, obrigada pelo carinho e incentivo!!!
 - ⇒ A todos os meus amigos que estiveram sempre presentes comparecendo nas minhas festas de chegadas e despedidas pra Holanda!!
 - ⇒ A FAPESP pela bolsa de doutorado.
 - ⇒ E ao NIZO Food research e WCFS (Wageningen Centre for Food Science) pelas excelentes condições de trabalho oferecidas, assim como também, pela possibilidade de participar em congressos, seminários e palestra internacionais.

MUITO OBRIGADO A TODOS VOCÊS!!!!

ANA CAROLINA

RESUMO

O processo de formação de acetaldeído pela bactéria láctica *Streptococcus thermophilus* foi investigado nesta tese. O acetaldeído responsável pelo sabor e aroma característicos de iogurte, é produzido por diferentes vias metabólicas pelas diversas bactérias lácticas. Neste trabalho, a atenção foi focada especificamente na reação para a formação de acetaldeído, catalisada pela enzima serina hidroximetil transferase (SHMT), codificada pelo gene *glyA*. A enzima SHMT cataliza diversas reações e no caso da bactéria *S. thermophilus*, ela exerce também a atividade característica da enzima treonina aldolase (TA), definida como a interconversão do aminoácido treonina em glicina e acetaldeído. Neste estudo, 34 linhagens selvagens de *S. thermophilus* da coleção do NIZO Food Research foram avaliadas quanto à produção de acetaldeído na presença e na ausência do aminoácido L-treonina. A suplementação do meio com L-treonina levou ao aumento da produção de acetaldeído. Foi detectada uma clara diferença na quantidade de acetaldeído formado pelas diversas linhagens; enquanto algumas produziram pouco ou não produziram quantidades detectáveis, outras formaram quantidades consideráveis de acetaldeído. A capacidade de produção de acetaldeído durante a fermentação foi correlacionada com a atividade da enzima treonina aldolase. Com o objetivo de se estudar a função da enzima SHMT, foi construída uma linhagem com o gene *glyA* interrompido. A inativação deste gene resultou em acentuada redução da atividade TA assim como também na perda completa da capacidade de produção de acetaldeído durante a fermentação. Subseqüentemente, foi construída uma linhagem de *S. thermophilus* na qual o gene *glyA* foi clonado sob o controle de um forte promotor (P_{LacA}). Quando esta linhagem foi cultivada em meio M17 e em leite foi observada a super expressão do gene *glyA*, constatada por meio do aumento da atividade TA, da produção de acetaldeído e ácido fólico. Estes resultados mostraram que, em *S. thermophilus*, a enzima SHMT apresenta atividade de treonina aldolase, sendo esta a principal via para a formação de acetaldeído nas condições destes experimentos.

Palavras chaves: Acetaldeído; *Streptococcus thermophilus*; treonina aldolase; serina hidroximetil transferase (SHMT); gene *glyA* e ácido fólico.

SUMMARY

The process of acetaldehyde formation by the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* is described here. The typical yogurt flavor is caused by acetaldehyde produced through many different pathways by the yogurt starter bacteria *Lactobacillus bulgaricus* and *S. thermophilus*. In this thesis, the attention was focused on one specific reaction for acetaldehyde formation catalyzed by serine hydroxymethyltransferase (SHMT), encoded by the *glyA* gene. In *S. thermophilus*, this enzyme SHMT also plays the typical role of the enzyme threonine aldolase (TA) that is the interconversion of threonine into glycine and acetaldehyde. In this work, 34 wild type *S. thermophilus* strains from the NIZO Food Research Collection were screened for acetaldehyde production in the presence and absence of L-threonine. Supplementation of the growth medium with L-threonine led to an increase in acetaldehyde production. A clear difference in the amount of acetaldehyde formed could be detected among the different strains. While some strains produce very small or no detectable amounts other strains produce a considerable high amount of acetaldehyde. Furthermore, acetaldehyde formation during fermentation could be correlated to threonine aldolase activity of SHMT. To study the physiological role of SHMT, a *glyA* mutant was constructed by gene disruption. Inactivation of *glyA* resulted in a severe reduction of TA activity and complete loss of acetaldehyde formation during fermentation. Subsequently, a *S. thermophilus* strain was constructed in which the *glyA* gene was cloned under control of a strong promoter (P_{LacA}). When this strain was used for fermentation it was possible to observe that *glyA* gene was overexpressed through the increase in TA activity, in acetaldehyde and folic acid production. These results show that, in *S. thermophilus*, SHMT, displaying threonine aldolase activity, constitutes the main pathway for acetaldehyde formation under our experimental conditions. These findings can be used to control and improve acetaldehyde and folic acid production in fermented (dairy) products with *S. thermophilus* as starter culture.

Key words: Acetaldehyde; *Streptococcus thermophilus*; *glyA* gene; threonine aldolase; serine hydroxymethyltransferase and folic acid.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Importância das bactérias lácticas na fermentação do leite.....	3
2.2. Leites fermentados e iogurte.....	5
2.3. Engenharia genética de bactérias lácticas	12
2.3.1. Tecnologia do DNA recombinante.....	12
2.3.2. Expressão de proteínas em <i>L. lactis</i> utilizando o “NICE SYSTEM®”	13
2.4. Caracterização da bactéria láctica <i>S. thermophilus</i>	19
2.4.1. Histórico.....	19
2.4.2. Genética	20
2.4.3. Aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos.....	25
2.5. Aroma de leites fermentados e acetaldeído.....	27
2.5.1. Teor de acetaldeído.....	28
2.5.2. Fatores que afetam a produção de acetaldeído.....	30
2.5.3. Vias de formação de acetaldeído.....	31
2.6. Serina hidroximetil transferase & treonina aldolase.....	35
2.6.1. Serina hidroximetil transferase.....	39
2.7. Ácido fólico.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Soluções e meios de cultura.....	41
3.2. Microrganismos.....	42
3.3. Condições de cultivo e manutenção dos microrganismos.....	42
3.4. Plasmídeos, vetores e oligonucleotídeos construídos e utilizados.....	43
3.5. Determinação da concentração de acetaldeído	51
3.6. Determinação da atividade enzimática treonina aldolase (TA).....	52
3.7. Determinação da atividade da serina hidroximetil transferase (SHMT).....	54
3.8. Determinação da concentração de proteína.....	56
3.9. Determinação da concentração de ácido fólico.....	56
3.10. Manipulações de DNA.....	56

3. 10.1. Isolamento purificação, transformação e hibridização de DNA.....	57
3. 10.2. Reações de <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR.....	58
3. 10.3. Sequenciamento de DNA.....	59
3. 10.4. Programas e web sites utilizados.....	60
3.11. Estudo da função do gene <i>glyA</i> em <i>S. thermophilus</i>	61
3. 12. Identificação do gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i>	61
3. 13. Construções plasmidiais.....	63
3. 13.1. Construções plasmidiais derivadas do pNZ8148 (NICE SYSTEM®).....	64
3. 13.2. Construções de plasmídeos para complementação.....	65
3. 13.3. Construções de plasmídeos para expressão do gene <i>glyA</i>	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1. Avaliação da produção de acetaldeído por <i>S. thermophilus</i>	67
4.2. Caracterização da enzima treonina aldolase de <i>S. thermophilus</i>	75
4.2.1. Avaliação da enzima treonina aldolase submetida ao congelamento.....	75
4.3. Estudo da relação entre a produção de acetaldeído e atividade TA.....	76
4.4. Identificação do gene que codifica a enzima treonina aldolase.....	81
4.5. Interrupção do gene <i>glyA</i>	89
4.6. Construção de linhagens com superexpressão do gene <i>glyA</i>	107
4.6.1. Superexpressão gene <i>glyA</i> no NICE SYSTEM®	117
5. CONCLUSÕES.....	127
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
7. ANEXOS:	
Anexo 1: Figuras dos mapas utilizados nas construções em Material e Métodos.....	143
Anexo 2: Publicação em anais de congressos, apresentações de pôster e palestras.....	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Fotografia das duas bactérias do iogurte, <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> , cultivadas em leite.....	7
Figura 2.2. Ilustração do funcionamento do sistema NICE SYSTEM [®] utilizado para expressão de proteínas. A indução deste sistema é controlada por nisina.....	17
Figura 2.3. Construção de uma linhagem de <i>S. thermophilus</i> por engenharia genética.....	21
Figura 2.4. Diferentes vias metabólicas levando à formação do composto aromático acetaldeído em bactérias lácticas. Fonte: Ott <i>et al.</i> (2000).....	33
Figura 2.5. Esquema ilustrando as funções das enzimas treonina aldolase (EC.4.1.2.5.) e serina hidroximetil transferase (EC.2.1.2.1.) no metabolismo dos aminoácidos serina, glicina e treonina. Fonte: Ogawa <i>et al.</i> (2000).....	37
Figura 3.1. Mapa do vetor comercial pGEM [®] -T (Promega) com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.	143
Figura 3.2. Mapa do plasmídeo pG ⁺ host9 (Maguin <i>et al.</i> , 1996) com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.....	145
Figura 3.3. Mapa do plasmídeo pORI280 (Leenhouts <i>et al.</i> , 1996) com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.....	147
Figura 3.1. Mapa do plasmídeo pUC19 (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) com as seguintes indicações para os genes <i>lacZ</i> , <i>lacI</i> , <i>amp^r</i> = gene de resistência ao antibiótico ampicilina, <i>ori</i> = origem de replicação, <i>P_{lac}</i> = promotor de <i>Lac</i> e Polycloning site = sítio múltiplo para clonagem com diferentes enzimas de restrição.....	149
Figura 3.5. Mapa do plasmídeo pACC1 obtido trocando-se o promotor da nisina (<i>P_{Nis}</i>) no vetor pNZ8148 (Nizo) pelo promotor do gene que codifica a enzima lactato desidrogenase (<i>P_{Ldh}</i>); com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.	151
Figura 3.6. Mapa do plasmídeo pACC2, onde o gene <i>gusA</i> foi clonado no pACC1 (sob controle do <i>P_{Ldh}</i>), com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.....	153
Figura 3.7. Mapa do vetor pJIM2246 com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.	155
Figura 3.8. Mapa do vetor pNZ273 com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.	157
Figura 3.9. Mapa do vetor pNZ275 com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.	159
Figura 3.10. Mapa do vetor pNZ276 com indicações dos genes e dos sítios de ação de diversas enzimas de restrição.	161
Figura 4.1. Esquema geral deste trabalho com as principais etapas e resultados obtidos.....	69
Figura 4.2. Esquema geral da estratégia utilizada para superexpressão do gene <i>glyA</i>	71

Figura 4.3. Esquema geral da estratégia utilizada para interrupção do gene <i>glyA</i>	73
Figura 4.4. Determinação da produção de acetaldeído nas linhagens de <i>S. thermophilus</i> da coleção do NIZO Food Research (todas estas linhagens da coleção tem NIZO nos seus nomes) em leite com e sem a suplementação de L-treonina.....	77
Figura 4.5. Comportamento da enzima treonina aldolase nas linhagens B103 (=NIZOB103) e B130 (=NIZOB130) com o tempo de reação. Ao lado de cada uma das retas encontram-se a sua equação e o coeficiente de correlação	79
Figura 4.6. Relação entre a produção de acetaldeído em meio LM17 a 42°C e a atividade enzimática TA em 10 linhagens de <i>S. thermophilus</i> . Onde os números: 1 = NIZOB103; 2 = NIZOB129; 3 = B130D <i>glyA</i> ; 4 = AO54D <i>glyA</i> ; 5 = NIZOB125; 6 = AO54-T; 7 = NIZOB1122; 8 =AO54; 9 = NIZOB130; 10 = NIZOB130 e T indica suplementação com 25mM de treonina.....	79
Figura 4.7. Múltiplo alinhamento com diversas seqüências de aminoácidos que codificam a enzima treonina aldolase (EC.4.1.2.5.).....	83
Figura 4.8. Alinhamento múltiplo com cinco diferentes seqüências de aminoácidos de GlyA.....	85
Figura 4.9. Seqüência parcial do gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i> com 1000pb da região inicial.....	87
Figura 4.10. Gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i> B130. Seqüência com 1250 pares de bases nitrogenadas (416 aminoácidos).....	87
Figura 4.11. Plasmídeo pNZ2310 derivado do vetor pG ⁺ host9 (Maguin <i>et al.</i> , 1996), contendo o fragmento interno de 505pb do gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i>	91
Figura 4.12. A autoradiografia mostra o resultado de hibridização pela técnica <i>Southern Blot</i>	93
Figura 4.13. Crescimento microbiano avaliado pela determinação da densidade óptica (D.O. = 600nm) e pH das linhagens B130D <i>glyA</i> , AO54D <i>glyA</i> , NIZOB130 e AO54 cultivadas LM17 com e sem glicina.....	97
Figura 4.14. Plasmídeo pACC2St derivado do pACC1, construído para a complementação. Com o gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i> sob controle do promotor da enzima lactato desidrogenase (P _{Ldh}). Com indicações: repA = origem de replicação; repC = repressor, cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, T terminador	101
Figura 4.15. Mapa do plasmídeo pACC5, derivado do pJIM2246, construído para promover a complementação. Com as seguintes indicações: <i>glyA</i> = gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i> ; Eri = gene de resistência ao antibiótico eritromicina, genes de origens de replicação repD, repE, repF, repG e repC = repressor e colE1 = promotor.....	101
Figura 4.16. Plasmídeo pACC10 derivado do pORI280 (Leenhouts <i>et al.</i> , 1996) construído para promover a recombinação homóloga dupla.....	105
Figura 4.17. Organização dos genes em torno do gene <i>glyA</i> em três diferentes microrganismos <i>S. thermophilus</i> , <i>S. pyogenes</i> e <i>Lactococcus lactis</i>	105

Figura 4.18. Plasmídeo pACC6, derivado do vetor pNZ273, para promover a expressão do gene <i>glyA</i> com seu próprio promotor.....	109
Figura 4.19. Plasmídeo pACC8, derivado do vetor pNZ275, para promover a superexpressão do gene <i>glyA</i> sob controle do P _{USP45} = promotor.....	109
Figura 4.20. Plasmídeo pACC9, para superexpressão do gene <i>glyA</i>	109
Figura 4.21. Comparação da atividade TA entre as linhagens de <i>S. thermophilus</i> B130, AO54, StACC7, StACC9, StBCC7 e StBCC9.	113
Figura 4.22. Crescimento microbiano em LM17 (log de UFC/mL) das linhagens B130, AO54, StBCC9 e StACC9.....	113
Figura 4.23. Curva de pH durante crescimento em LM17 das linhagens NIZOB130, AO54, StBCC9 e StACC9.....	113
Figura 4.24. Comparação da produção de acetaldeído em diferentes linhagens de <i>S. thermophilus</i> NIZOB130, AO54, StBCC9, StACC9 (linhagens com superexpressão do gene <i>glyA</i>), B130D <i>glyA</i> e AO54D <i>glyA</i>	115
Figura 4.25. Comparação da atividade de treonina aldolase em diferentes linhagens de <i>S. thermophilus</i> NIZOB130, AO54, StBCC9, StACC9 (linhagens com superexpressão do gene <i>glyA</i>), B130D <i>glyA</i> e AO54D <i>glyA</i>	115
Figura 4.26. Comparação da produção de ácido fólico em diferentes linhagens de <i>S. thermophilus</i> NIZOB130, AO54, StBCC9, StACC9 (linhagens com superexpressão do gene <i>glyA</i>), B130D <i>glyA</i> e AO54D <i>glyA</i>	115
Figura 4.27. Plasmídeo pACC4, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) e construído para promover a superexpressão do gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i> B130 sob controle do P _{NIS} , em <i>L. lactis</i> NZ9000.....	119
Figura 4.28. Plasmídeo pACC3, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) e construído para promover a superexpressão do gene <i>glyA</i> de <i>B. subtilis</i> sob controle do P _{NIS} , em <i>L. lactis</i> NZ9000.	119
Figura 4.29. Plasmídeo pACC11, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) e construído para promover a superexpressão do gene <i>glyA</i> de <i>L. lactis</i> MG1363 sob controle do P _{NIS} , em <i>L. lactis</i> NZ9000.	119
Figura 4.30. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando a superprodução da enzima SHMT em <i>L. lactis</i> NZ9000 contendo o gene <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i> B130 sob controle do promotor da nisina.....	121
Figura 4.31. Atividade da serina hidroximetil transferase da linhagem <i>LltglyACC3</i> nos diferentes níveis de indução com nisina.....	123
Figura 4.32. Produção de ácido fólico nos diferentes níveis de indução com nisina pela linhagem <i>LltglyACC3</i>	123
Figura 4.34. Ilustração do gene <i>glyA</i> no NICE SYSTEM (NIZO Food Research), sob o controle do P _{NIS} com superprodução da enzima SHMT.....	125

Abreviações

- *S. thermophilus*: *Streptococcus thermophilus*
- *S. salivarius*: *Streptococcus salivarius*
- *L. lactis*: *Lactococcus lactis*
- *L. bulgaricus*: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- SHMT: enzima serina hidroximetil transferase EC.2.1.2.1.
- TA: treonina aldolase EC.4.1.2.5.
- Atividade TA = interconversão de treonina em acetaldeído e glicina.
- Gene *ItaE*: gene que codifica enzima treonina aldolase
- Gene *glyA*: gene que codifica enzima serina hidroximetil transferase
- B130DglyA: linhagens B130 de *S. thermophilus* com interrupção do gene *glyA*
- AO54DglyA: linhagens AO54 de *S. thermophilus* com interrupção do gene *glyA*
- ORF: Open Reading Frame - região aberta de leitura.
- RBS: sítio de ligação do ribossomo
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- MTHF: 5,10-metileno tetrahidrofolato
- THF: tetrahidrofolato
- Eri: Eritromicina
- Clor: Cloranfenicol
- Amp: Ampicilina
- Clor^r = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol
- Amp^r = gene de resistência ao antibiótico ampicilina
- Eri^r = gene de resistência ao antibiótico eritromicina
- BSA: (Bovine Serum Albumin) = soro de albumina bovino
- rpm = rotações por minuto
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- pb: pares de bases
- kb: = 10³bp
- kDa: kilo Daltons
- m = mili = 10⁻³
- μ = micro = 10⁻⁶
- η = nano = 10⁻⁹
- L = litro
- g = grama
- m = metro
- M = molar
- min. = minuto
- h = horas
- U = unidade
- Dig = digoxigenine
- D.O. = densidade óptica
- ufc = unidades formadoras de colônias
- P_{Nis} = promotor de nisina

1. INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

Devido à importância do acetaldeído, principal composto aromático responsável pelo sabor e aroma característicos de iogurte é fundamental entender as suas diversas vias de formação para, deste modo, poder controlar sua produção. Durante a fermentação do leite, as duas bactérias do iogurte, *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), produzem acetaldeído por diferentes vias metabólicas. Existem diversas enzimas envolvidas na formação deste composto, porém, até o presente momento, não existem estudos conclusivos com relação à importância de cada uma delas na produção de acetaldeído.

Na literatura existem diversos trabalhos sugerindo que a via treonina aldolase deva ser importante na formação de acetaldeído durante a fabricação de iogurte. A enzima treonina aldolase catalisa a conversão reversível do aminoácido treonina em glicina e acetaldeído.

Tem havido no mundo todo e também, no Brasil, um aumento na preferência dos consumidores por um iogurte *Mild* com menos acidez, sobretudo, para o tipo branco, ou seja, sem adição de frutas ou açúcar. Com o objetivo de se diminuir a pós-acidificação do iogurte ao longo de sua vida-de-prateleira e garantir o sabor desejado pelo consumidor existem, atualmente, duas alternativas: (1) manipular a proporção entre as bactérias do iogurte, aumentando o número de *S. thermophilus* em relação ao *L. bulgaricus*, uma vez que este último é o principal responsável pela produção de ácido láctico ao final do processo de fermentação ou (2) utilizar uma linhagem de *L. bulgaricus* que não possua a enzima β -galactosidase, interrompendo-se, deste modo, a via metabólica que leva à formação de ácido láctico. Porém, este iogurte *Mild*, quando comparado ao produto tradicional, além de apresentar menor acidez, também tem a sua produção de acetaldeído reduzida, fazendo com que este produto não apresente o aroma e sabor característicos de iogurte.

Na produção industrial de alimentos em larga escala, uma constante preocupação é a otimização de formação dos compostos aromáticos, uma vez que o aroma é a característica mais importante na aceitabilidade dos produtos alimentícios por parte dos consumidores.

Em iogurtes comerciais, os níveis de acetaldeído variam consideravelmente e a falta do sabor característico do produto é um defeito comumente julgado pelos painéis sensoriais.

A engenharia genética é um conjunto de técnicas que vêm sendo cada vez mais utilizadas para se estudar vias metabólicas de diferentes compostos, assim como também para a obtenção de linhagens microbianas com modificação, que podem melhorar, intensificar ou conferir propriedades desejáveis aos alimentos. As bactérias lácticas, extensamente utilizadas na indústria alimentícia e, em especial, no setor de laticínios, constituem-se em um alvo ideal para a utilização de engenharia genética porque possuem: (1) um metabolismo relativamente simples, basicamente convertendo o açúcar em ácido láctico; (2) vias metabólicas relativamente bem conhecidas; (3) genomas de algumas espécies já seqüenciados e vários outros em andamento e (4) uma longa história de uso seguro na indústria de alimentos.

Considerando (1) a importância do acetaldeído no aroma característico de leites fermentados; (2) a literatura indicar a via treonina aldolase como uma das principais na formação deste composto aromático e (3) a engenharia genética ser uma interessante ferramenta para melhoramento de linhagens microbianas visando atender às demandas dos consumidores, este trabalho teve como principal objetivo estudar a importância da via metabólica catalisada pela treonina aldolase na formação de acetaldeído. Dessa forma, futuramente, seria possível a construção de linhagens com superprodução de acetaldeído que poderiam ajudar na solução dos problemas tecnológicos acima mencionados. Para se atingir esse objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- ✓ Avaliação da produção de acetaldeído em diferentes linhagens de *S. thermophilus*;
- ✓ Estudo do efeito da adição do aminoácido treonina na produção de acetaldeído;
- ✓ Determinação da relação entre atividade da enzima treonina aldolase e produção de acetaldeído;
- ✓ Identificação do gene que codifica a enzima treonina aldolase em *S. thermophilus*;
- ✓ Construção de linhagens de *S. thermophilus* com superexpressão do gene que codifica a enzima treonina aldolase, para estudar o impacto destas na produção de acetaldeído.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância das bactérias lácticas na fermentação de leite

As bactérias lácticas estão amplamente distribuídas na natureza, possuem várias funções importantes na vida dos seres humanos e têm sido tradicionalmente utilizadas para a conservação de diferentes tipos de alimentos, tais como leite, carnes, peixes e vegetais. A fermentação é um dos mais antigos e disseminados métodos de preservação de alimentos, particularmente no caso do leite. A história dos alimentos suplementados com microrganismos vivos remonta há milhares de anos, havendo, inclusive, menções sobre o uso de leites fermentados no Velho Testamento (Gênesis 18:8). Apesar de possuírem um uso tradicional, os leites fermentados estão cada vez mais populares, em especial, nos últimos 40 anos quando a sua produção passou de uma escala tradicional para industrial (Curic, 1998).

Os efeitos benéficos do iogurte tiveram sua base científica no final do século XIX, com Metchnikoff (1910), que correlacionou a longevidade e saúde dos povos conhecidos como Balcãs, com uma dieta rica em leites fermentados. No produto consumido por este povo foi identificada uma linhagem de *Lactobacillus*, inicialmente denominada *Bulgarican bacillus* e, posteriormente, *Lactobacillus bulgaricus*, sendo, provavelmente, o microrganismo atualmente conhecido como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Metchnikoff desenvolveu a teoria de que a microflora intestinal não só controla as infecções causadas por patógenos entéricos, como também regula a toxicidade crônica natural, tendo papel fundamental sobre o envelhecimento e a mortalidade. Desde então, muitas pesquisas e estudos têm sido realizados visando a um melhor conhecimento destes microrganismos utilizados na produção dos leites fermentados, assim como também para esclarecer os efeitos destas bactérias no metabolismo humano e no animal.

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de leites fermentados traz benefícios à saúde. Provavelmente, estas vantagens advêm, inicialmente, da viabilidade dos microrganismos ingeridos, que induzem a mudanças e influenciam positivamente o ambiente intestinal e, subsequentemente, dos metabólitos produzidos durante a

fermentação; também têm sido investigados os efeitos secundários como anticancerígeno e hipocolesterolêmico.

Dentre os diversos microrganismos probióticos, os mais comumente usados para consumo humano são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus*. A seguir serão enumeradas algumas das aplicações terapêuticas atribuídas a esses microrganismos: promoção de crescimento, aumento da absorção de minerais, produção de fatores antimicrobianos, produção de fatores anticarcinogênicos, redução da incidência de tumores intestinais, estímulo da redução dos níveis de colesterol e triglicérides, auxílio na digestão da lactose, balanceamento da microflora intestinal (prevenção de diarreias e constipação), estímulo do sistema imunológico, aumento da resistência a infecções gastrintestinais, redução de efeitos colaterais causados por antibióticos, síntese de vitaminas e indução de enzimas digestivas (Leeds & Rowland, 1996; Tamine & Robinson, 1999; Gilliland, 1990).

O valor nutricional de um produto não depende somente do conteúdo de nutrientes, mas também da sua biodisponibilidade. Os leites fermentados e o leite, de maneira geral, contêm quantidades iguais de nutrientes; entretanto, a fermentação torna alguns deles mais disponíveis para absorção (Alm, 1982). O valor nutritivo de leites fermentados é superior em relação ao conteúdo de vitaminas do complexo B, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e vitamina B₁₂, quando comparado ao do leite (Reddy *et al.*, 1976; Shahani *et al.*, 1962).

A fermentação do leite resulta em diversos tipos de produtos, todos com vida-de-prateleira superior à do leite fresco. Várias bactérias lácticas são capazes de desdobrar a lactose para produção de energia, resultando no acúmulo de ácido láctico e ácidos orgânicos (que auxiliam na preservação do produto), além de outros metabólitos como o álcool, CO₂, diacetil e acetaldeído, conferindo características específicas aos diferentes produtos fermentados. O ácido láctico é o principal metabólito dos processos homo e heterofermentativos e a forma deste composto irá modular o valor nutritivo do leite

fermentado. Alguns microrganismos como bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *S. thermophilus* produzem o ácido láctico na forma L(+), que é mais facilmente metabolizada pelo organismo humano (Ferreira, 1997).

As fermentações lácticas realizadas de maneira tradicional utilizam uma microflora indefinida constituída, basicamente, por bactérias lácticas. As linhagens atualmente utilizadas na indústria foram selecionadas do ambiente, de acordo com propriedades metabólicas e tecnológicas desejadas. As espécies e linhagens são escolhidas de acordo com o tipo de produto que se deseja formular e com as características desejadas neste produto (Curic, 1998).

2.2. Leites fermentados e iogurte

Durante o processo de fermentação do leite as duas bactérias lácticas do iogurte, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, são pelos seguintes fenômenos: (1) transformação da lactose em ácido láctico, conferindo o sabor ácido, abaixando o pH e levando à coagulação do leite; (2) produção de diversos compostos aromáticos, sendo acetaldeído o principal deles e (3) formação de diversos compostos, tais como exopolissacarídeos, melhorando e/ou aumentando a viscosidade, além de ácido fólico e bacteriocinas (Tamime & Robinson, 1999).

Na Figura 2.1. é possível se observar as duas bactérias do iogurte, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, cultivadas em leite e a produção de exopolissacarídeos.



Figura 2.1. Fotografia das duas bactérias do iogurte, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, cultivadas em leite nos quadros A e B e a produção de exopolissacarídeos por *L. bulgaricus* em iogurte. As fotos A e B foram feitas nos laboratórios de Tamime e Kalab (Escócia e Canadá) e as fotos C e D por Bottazi (Itália). Fonte: Tamime & Robinson (1999). Estas fotos foram gentilmente cedidas por A. Tamime e reproduzida com a permissão de Woodhead Publishing, Cambridge, Inglaterra.

A legislação brasileira sobre leites fermentados segue a Resolução nº 5 (13 de novembro de 2000). Foram oficializados os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados de acordo com deliberação do Grupo de Trabalho SGT-3/MERCOSUL. Os leites fermentados produzidos no mercado nacional e destinados à comercialização nos países integrantes do MERCOSUL devem seguir rigorosamente as especificações técnicas da Resolução GMC nº 47/97 que fornece as seguintes definições:

2.1. Leites Fermentados: “Entende-se por leites fermentados os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios. Os fermentos lácticos aludidos nesse item devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. O leite utilizado na fabricação de leites fermentados poderá ser em natureza ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos de origem láctea, bem como de outras substâncias alimentícias recomendadas pela tecnologia atual de fabricação de leites fermentados, nos termos do presente Padrão de Identidade e Qualidade, e que não interfiram no processo de fermentação do leite pelos fermentos lácticos empregados.”

2.1.1. Iogurte: “Entende-se por iogurte o produto incluído na definição 2.1., cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final.”

2.1.2. Leite Fermentado ou Cultivado: “Entende-se por leite fermentado ou cultivado o produto incluído na definição 2.1 cuja fermentação se realiza com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *S. thermophilus* e/ou outras bactérias lácticas que por sua atividade contribuam para a determinação das características do produto final.”

2.1.2.1. Leite acidófilo: “Entende-se por leite acidófilo o produto incluído na definição 2.1.2. cuja fermentação se realiza exclusivamente com cultivos de *Lactobacillus acidophilus*.”

2.1.3. Kefir: “Entende-se por Kefir o produto incluído na definição 2.1. cuja fermentação se realiza com cultivos acidolácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *S. thermophilus*.”

2.1.4. Kumys: “Entende-se por Kumys o produto incluído na definição 2.1. cuja fermentação se realiza com cultivos de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Kluyveromyces marxianus*.”

2.1.5. Coalhada: “Entende-se por Coalhada o produto incluído na definição 2.1., resultante da ação de fermentos lácticos mesofílicos individuais ou mistos produtores de ácido láctico sobre o leite pasteurizado ou esterilizado.”

A International Dairy Federation (IDF, 1988) define: “Leite fermentado como um produto preparado a partir de leite desnatado ou não, com culturas específicas; a microflora é mantida viva até chegar ao consumidor e não deve conter qualquer microrganismo patogênico.”

Segundo a FAO/WHO (1977), o iogurte é definido como “Um produto de leite coagulado, obtido através da fermentação láctica pela ação do *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. A matéria-prima utilizada, deve ser, leite pasteurizado ou concentrado, com ou sem a adição de leite em pó integral ou desnatado, ou soro de leite. Os microrganismos no produto final devem ser viáveis e abundantes.”

A Tabela 2.1 possui alguns exemplos dos diversos tipos de leites fermentados existentes no mundo, indicando os microrganismos utilizados e as propriedades destes diferentes produtos.

Tabela 2.1. Diferentes leites fermentados e os microrganismos utilizados.

Nome ou marca comercial do produto	Microrganismos utilizados	Propriedades
Leite Acidificado	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Terapêutica
Butter Milk	<i>Streptococcus</i> <i>Leuconostoc</i> spp.	Tecnológica
Creme fermentado	<i>Streptococcus</i> <i>Leuconostoc</i> spp.	Tecnológica
Bioghurt®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Terapêutica
Bioghurt®	<i>S. thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Terapêutica
Cultura	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Terapêutica
Kefir	Grãos de Kefir	Tecnológica
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	Terapêutica
Iogurte (incluindo Labneh)	<i>L. bulgaricus</i> e <i>S. thermophilus</i>	Terapêutica

Fonte: Tamime & Robinson (1999) e Marshall (1987).

Segundo Rasic & Kurmann (1978), quando cultivadas conjuntamente em leite, as linhagens de *L. bulgaricus* estimulam o crescimento do *S. thermophilus* devido à liberação de diversos aminoácidos, provenientes da caseína, sendo a valina, o mais importante deles. Como consequência deste estímulo, o tempo de geração das células de *S. thermophilus* é menor e, no início da fermentação, esta bactéria cresce mais rapidamente. No estágio posterior, o crescimento de *S. thermophilus* torna-se mais lento devido ao efeito adverso da queda do pH e, nesta etapa, o número de células de *L. bulgaricus* aproxima-se gradualmente daquele de *S. thermophilus*, sendo considerada como ótima uma taxa de 1:1 ou 1:2 (*L. bulgaricus* : *S. thermophilus*). Também foi observado que, quando as duas

bactérias do iogurte são cultivadas conjuntamente, o tempo de coagulação é menor e a produção de acetaldeído é maior.

Atualmente, as indústrias não utilizam mais as proporções de 1:1 ou 1:2 entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, uma vez que tais taxas resultam em um produto com elevada acidez, não agradando ao consumidor de maneira geral e, em especial, o brasileiro. Segundo Antunes (2002), observa-se uma preferência em todo o mundo, por um iogurte *Mild* (com sabor suave e menor acidez). Com o objetivo de diminuir a pós-acidificação do iogurte ao longo da sua vida-de-prateleira, garantindo um sabor pouco ácido, pode-se manipular a proporção entre as bactérias do iogurte, aumentando-se o número de *S. thermophilus* em relação ao *L. bulgaricus*. Atualmente, as indústrias de modo geral, utilizam taxas que variam de 1:7 a 1:10 (*L. bulgaricus* : *S. thermophilus*).

Apesar da legislação de vários países da Europa determinar que, ao final da vida-de-prateleira do iogurte deva existir uma quantidade elevada de *L. bulgaricus*, isto tende a mudar. No momento, na Comunidade Européia, existe uma solicitação para a alteração da legislação referente ao iogurte, permitindo a fabricação de tal produto sem a bactéria *L. bulgaricus* (Antunes, 2002).

A produção de leites fermentados vem crescendo a taxas substancialmente altas em todo o mundo como também no Brasil. Atualmente, o país tende a migrar para um mercado de maior maturidade, com um aumento constante na oferta de produtos fermentados. Neste mercado segmentado e extremamente competitivo, torna-se vital, para as empresas que nele atuam, possuir produtos capazes de satisfazer às necessidades do consumidor e sobrepujar os concorrentes na guerra das prateleiras (Oliveira, 1997).

2.3. Engenharia genética

2.3.1. Tecnologia do DNA recombinante em bactérias lácticas

A engenharia genética é um conjunto de diferentes técnicas que oferecem a possibilidade de expressar novos genes (heterólogos) ou de aumentar a expressão dos genes da própria bactéria (homólogos), que codificam as características desejadas. É possível também a inativação de genes que codifiquem funções indesejáveis como, por exemplo, genes que codificam enzimas que não sejam necessárias em certas vias metabólicas, permitindo, deste modo, o redirecionamento da atividade metabólica (Johansen, 1999). Eficientes ferramentas têm sido desenvolvidas para as manipulações genéticas em bactérias lácticas e o seu grau de sofisticação tem aumentado continuamente (de Vos & Simons, 1994).

A transformação genética é um dos processos de troca de material genético que ocorre naturalmente entre as células. Neste processo em questão, a célula receptora capta o DNA exógeno, liberado pela célula doadora, podendo, desta forma, incorporar ao seu genoma características vantajosas para a sua sobrevivência. Para que esta transformação ocorra, as células devem possuir um estado fisiológico denominado competência. Como as bactérias lácticas não são naturalmente competentes, para que elas permitam a entrada de um DNA exógeno, faz-se necessário a utilização da eletroporação, técnica pela qual a mistura de DNA e de células competentes é submetida a um campo elétrico; a descarga elétrica abre poros na membrana celular, permitindo a entrada do DNA.

No melhoramento genético de bactérias lácticas são utilizados vetores de clonagem. O vetor é uma molécula de DNA constituído a partir de um replicon presente na célula bacteriana, destinado a transportar fragmentos de DNA nele inserido (por meio de uma reação de ligação) que se deseja transmitir a outra bactéria denominada hospedeira. Este replicon pode ser derivado de um fago ou de um plasmídeo e deve se replicar na célula hospedeira (Newton, 1987).

Para se ampliar a expressão de um determinado gene que se encontra no cromossomo de uma determinada bactéria, este deve ser colocado sob o controle de um forte promotor de transcrição em um plasmídeo que possua um grande número de cópias. Existem diversos vetores disponíveis para manipulações genéticas das bactérias lácticas, utilizados para

clonagens, em geral, seleção de promotores, terminadores e sinais de secreção, expressão gênica, secreção de proteínas e para promover a integração no cromossomo (interrupção ou disrupção gênica). Estes vetores foram construídos por plasmídeos naturais ou provenientes de outras bactérias. Vários plasmídeos de ocorrência natural possuem aplicações potenciais como vetores de clonagem e o estudo de seus mecanismos de replicação tem causado grande progresso (Lerayer *et al.*, 2000).

Para que as bactérias lácticas manipuladas geneticamente possam ser utilizadas na indústria de alimentos, foi necessário o desenvolvimento de vetores *Food grade* (com marcadores de grau alimentar). Estes vetores basearam-se em sistemas de complementação ou de resistência, tais como o sistema de complementação da lactose (de Vos *et al.*, 1990) e a exploração do gene de resistência à nisina (Froseth & Mackay, 1991), ou seja, de genes já existentes nas bactérias lácticas.

Bactérias lácticas manipuladas geneticamente podem ser potencialmente utilizados na indústria de laticínios para: (1) controlar a produção de aroma característico de manteiga por meio da produção de diacetil (Curic, 1998); (2) produzir leites fermentados, iogurte, bebidas lácteas com adoçante natural através da produção de alanina e (3) melhorar as características reológicas de alimentos produzindo exopolissacarídeos (Kleerebezem *et al.*, 2000). Como a bactéria *L. lactis* é o microrganismo-modelo entre as bactérias lácticas, sendo o mais bem estudado, já existem diversas ferramentas e protocolos estabelecidos para se manipular geneticamente esse microrganismo.

No momento, os genomas de bactérias lácticas várias já são conhecidos com essas informações, as manipulações genéticas nestas bactérias aumentarão muito nos próximos anos. Atualmente, o maior problema consiste em analisar toda esta informação gerada e agora disponível. Os pesquisadores estão discutindo os “proteomas” (conjunto de proteínas codificadas pelos diversos genes) e “metabolomas” (conjunto de metabólitos produzidos pelas diversas proteínas codificadas pelos diferentes genes). Para analisar tais informações, será necessário o desenvolvimento de programas de informática.

2.3.2. Expressão de proteínas em *L. lactis* utilizando o sistema “NICE SYSTEM®”

O sistema NICE SYSTEM® foi desenvolvido pelo NIZO Food Research para expressão de diferentes proteínas em *L. lactis*. Neste sistema o gene de interesse é inserido no vetor pNZ8148, sob o controle do promotor de nisina (P_{Nis}). Subseqüentemente, células competentes da linhagem NZ9000 de *L. lactis* são transformadas por meio de eletroporação com o plasmídeo construído a partir do pNZ8148. Neste sistema, a regulação da expressão do gene de interesse é realizada por meio de indução com diferentes concentrações de nisina segundo Ruyter *et al.* (1996).

A Figura 2.3 mostra uma ilustração da expressão dos genes no NICE SYSTEM®, a etapa 1 pode-se observar a indução controlada (pela presença de nisina no meio) do gene X sob controle do P_{Nis} , o gene X é superexpresso, ocorrendo, então, conseqüentemente, a superprodução da proteína X (codificada pelo gene X). A segunda etapa ilustra um exemplo da indução controlada dos genes *lytH* e *lytA*, responsáveis pela lise celular em *L. lactis*, permitindo, assim, a liberação do produto do gene clonado no sistema (secreção).

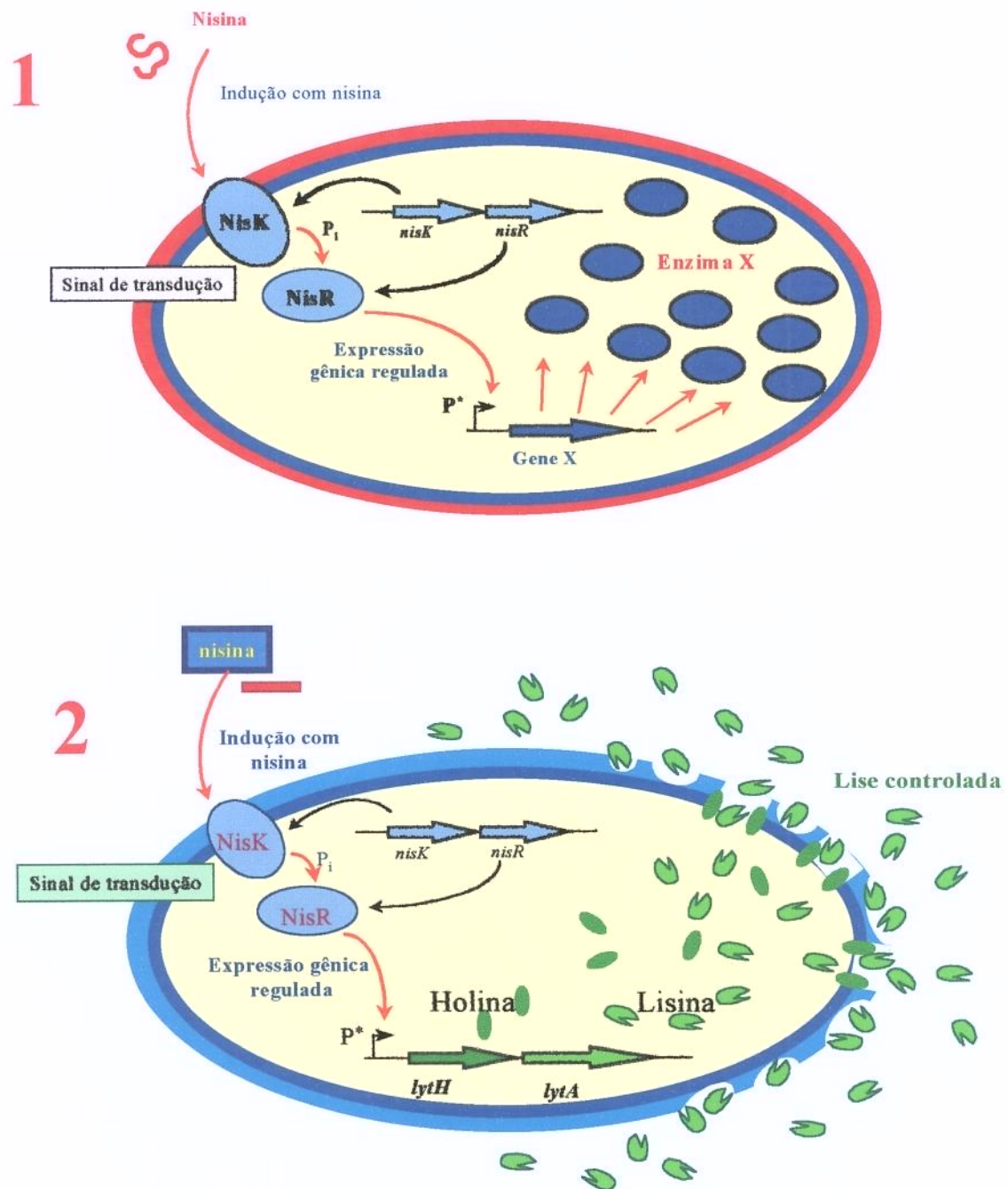


Figura 2.2. Ilustração do funcionamento do sistema NICE SYSTEM[®] utilizado para expressão de proteínas. A indução deste sistema é controlada por nisina. **Fonte:** NIZO Food Research - Holanda

2.4. Caracterização da bactéria láctica *S. thermophilus*

2.4.1. Histórico

Apesar da bactéria *S. thermophilus* ser muito importante e utilizada tanto na fabricação de leites fermentados como na produção de queijos, tais como Mussarela, Emmental, Gruyère, Parmegiano e Grana, ela foi muito pouco estudada, se comparada com *L. lactis*. Somente em 1980 começaram a ser estudadas as suas características bioquímicas mais profundamente (Hutkins & Morris, 1987).

A bactéria láctica *S. thermophilus* foi identificada pela primeira vez em iogurte, recebendo diversos nomes, até ser finalmente denominada *S. thermophilus*. As diferentes denominações, por ordem cronológica, são: em 1905, *Micrococcus B*; no ano seguinte, em 1906, *Streptococcus lebens*; em 1907, passou a ser chamada de *Streptococcus* e, subseqüentemente, em 1908, *Diplostreptococcus*. Finalmente, em 1919, este microrganismo recebeu a classificação de *Streptococcus thermophilus* (Orla-Jensen, 1919). Algumas outras denominações, tais como *Streptococcus lactis thermophilus* (1933) e *Diplostreptococcus yogurt* (1948) provavelmente também se referem ao atual *S. thermophilus* (Rasic & Kurmann, 1978).

Embora existam muitas diferenças fenotípicas e bioquímicas entre *S. thermophilus* e *Streptococcus salivarius*, foi proposta uma taxonomia baseada em estudos de homologia de ácidos nucleicos e similaridades de cadeias longas de ácidos graxos que ocorrem entre essas duas espécies. Com esta nova classificação proposta, a bactéria *S. thermophilus* foi considerada como uma subespécie de *S. salivarius*, recebendo, então, o nome de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Marshall, 1987). No entanto, Schleifer *et al.* (1991) constataram, por meio de estudos de hibridização, que a bactéria *S. thermophilus* não era uma subespécie de *S. salivarius* e, portanto, o seu nome voltou a ser somente *Streptococcus thermophilus*.

A espécie *S. thermophilus* pode ser facilmente isolada a partir de leite, assim como também dos utensílios utilizados no manuseio deste produto, não sendo encontrada em outras fontes como vegetais verdes e materiais clínicos, como ocorre com as outras espécies de *estreptococos* (Hutkins & Morris, 1987).

2.4.2. Genética

Apesar da grande importância da bactéria *S. thermophilus* como cultura láctica, extensamente utilizado nas indústrias de laticínios, ela foi objeto de poucos estudos, sendo a maioria deles relacionados com as suas características fisiológicas ou bioquímicas. A primeira revisão sobre a genética desta bactéria só foi publicada em 1989 por Mercenier & Lemonier, seguida por outra de Mercenier em 1990.

A falta de estudos básicos sobre a genética de *S. thermophilus* deve-se, parcialmente, a não existirem ferramentas eficientes ou protocolos disponíveis para a manipulação genética desta bactéria, tais como vetores, transposon, métodos para transformação, para inativação gênica, assim como também para inserção mutagênica randômica (Baccigalupi *et al.*, 2000). Uma outra razão para justificar a existência de poucos trabalhos publicados nesta área deve-se ao fato da maioria das funções em *S. thermophilus* serem codificadas por genes localizados no cromossomo, dificultando os estudos genéticos (Zourari *et al.*, 1992).

Os plasmídeos, em bactérias lácticas, codificam diversas características importantes para tecnologias de produtos lácteos como, por exemplo, o metabolismo de carboidratos, atividades proteolíticas, utilização do citrato para produção de diacetil, produção de bacteriocinas e de exopolissacarídeos, bacteriófagos e resistência a antibióticos (Mckay, 1983; Vedamuthu & Nevile, 1986; van Kranenburg *et al.*, 1999). As linhagens de *S. thermophilus* raramente possuem plasmídeos e, quando existem, são somente um ou dois (Somkuti & Steinberg, 1986; Mollet *et al.*, 1993) e muitos deles são crípticos, ou seja, com função desconhecida (Mercenier, 1990).

Mercenier & Lemonier (1989) verificaram que vários vetores desenvolvidos para linhagens de *Lactococcus*, *Streptococcus sanguis* e/ou para *Streptococcus faecalis* podiam ser utilizados para a transformação de células de *S. thermophilus*. Também constataram que o gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol era mais adequado para a seleção de transformantes de *S. thermophilus* que o de eritromicina. Para se transferir material genético para *S. thermophilus*, os melhores resultados foram obtidos por meio de electroporação. A clonagem de um determinado gene em *S. thermophilus* pode ser realizada segundo o esquema apresentado na Figura 2.3.

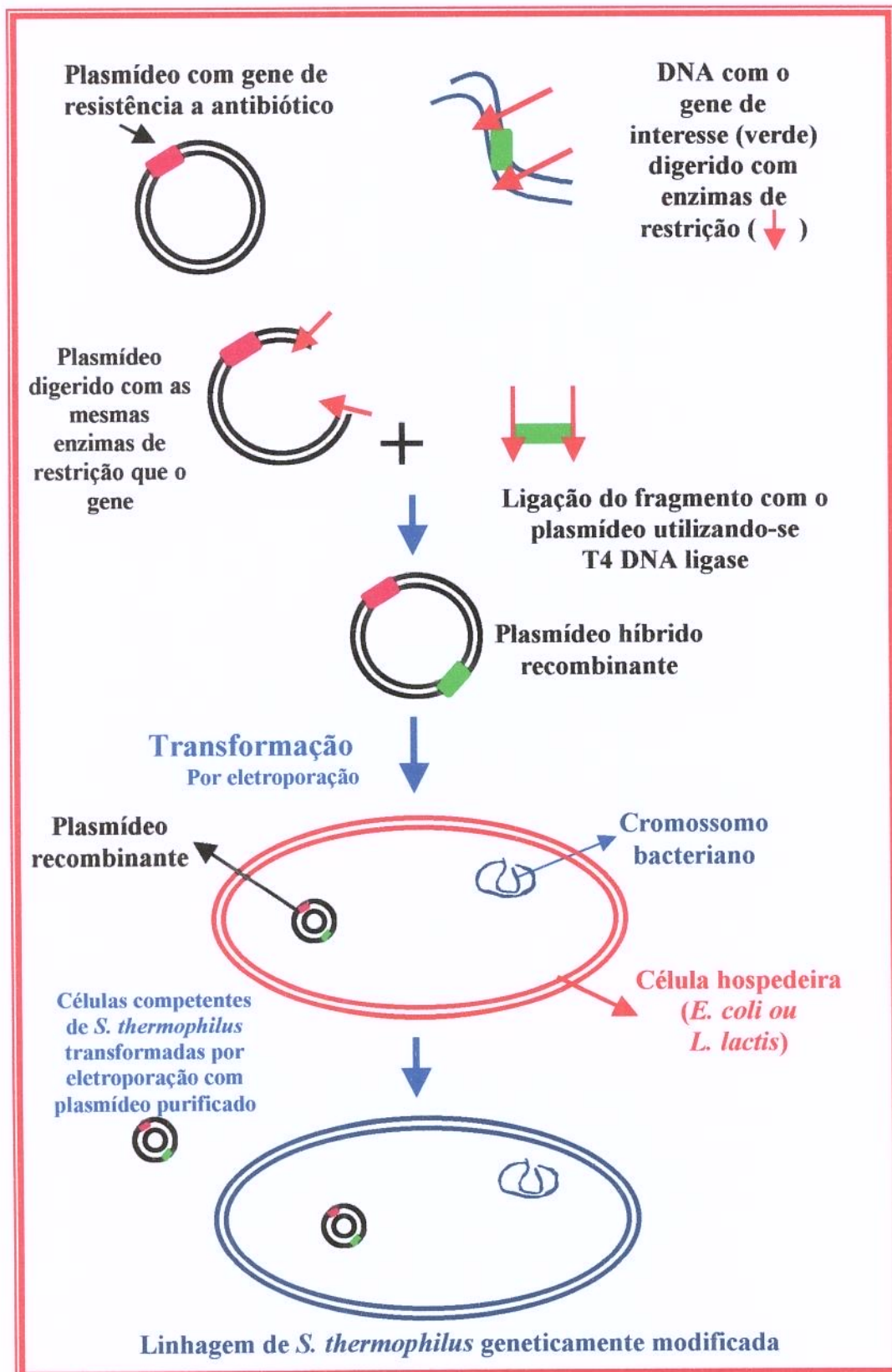
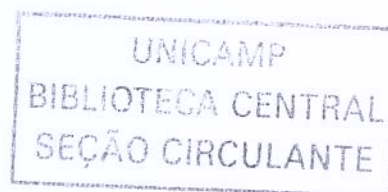


Figura 2.3. Construção de uma linhagem de *S. thermophilus* por engenharia genética. **Fonte:** Lerayer *et al.* (2000).

A transformação de linhagens de *S. thermophilus* apresenta uma baixa eficiência, sendo uma das possíveis razões para isto a presença de nucleases extracelulares. Foi observado que, quando o DNA entrava em contacto com as células competentes de *S. thermophilus*, ele era degradado (Sieg *et al.* (1995), citado por Heller *et al.*, 1995). Uma outra razão que dificulta a transformação deste microrganismo é a instabilidade estrutural do DNA nele inserido. Observou-se que certas partes de DNA (como as seqüências repetidas diretas ou invertidas) eram sempre degradadas (Solaiman & Somkuti, 1992).

Kleinschmidt *et al.* (1993), estudando a estabilidade de DNAs heterólogos em *S. thermophilus*, constataram que a eficiência de transformação do plasmídeo pNZ18 (proveniente de *L. lactis*) era baixa. Esses pesquisadores também observaram que quanto maior a temperatura de incubação dos transformantes maior foi a instabilidade do plasmídeo na linhagem mutante. A estabilidade dos plasmídeos em *S. thermophilus* aumentou quando estes transformantes foram cultivados conjuntamente com linhagens de *L. bulgaricus*. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, para assegurar a manutenção dos plasmídeos nas linhagens de *S. thermophilus*, sugere-se que: (1) a inoculação seja do tipo *direct-vat* (adição da cultura liofilizada diretamente ao tanque de fermentação) e (2) se cultivem as linhagens de *S. thermophilus* mutantes juntamente com linhagens de *L. bulgaricus* a baixas temperaturas (30 a 32°C).

Os avanços na biologia molecular das bactérias lácticas termofílicas têm ocorrido rapidamente e em diversas direções; tanto no metabolismo primário como no secundário, na utilização dos açúcares e proteínas do leite, na resposta a diferentes tipos de estresses, assim como também na produção dos exopolissacarídeos (Delcour *et al.*, 2000). O *operon* dos genes que codificam a bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* foi clonado e expresso em *S. thermophilus*; a clonagem deste operon em um vetor de grau alimentar (*Food grade*) permitiria a utilização desta linhagem em alimentos, onde poderia agir como conservante, impedindo a proliferação de contaminantes inclusive, da *Listeria monocytogenes* (Coderre *et al.*, 1999). Foram clonados e expressos em *S. thermophilus* o gene que codifica a enzima colesterol oxidase (Somkuti *et al.*, 1991a) e o gene *galK* que codifica a enzima galactoquinase (Mustasha *et al.*, 1995).



Levander *et al.* (2002), estudando a produção de exopolissacarídeos em *S. thermophilus* LY03, verificaram ser possível aumentá-la pela alteração na expressão de algumas enzimas que atuam no metabolismo central dos açúcares. Também foram construídas linhagens mutantes de *S. thermophilus* com resistência ao ataque de bacteriófagos (Stalen *et al.*, 2000).

Para a utilização de linhagens geneticamente modificadas de *S. thermophilus* se faz necessário o desenvolvimento de um vetor de grau alimentar (*Food grade*), ou seja, composto somente por seqüências de microrganismos de grau alimentício e onde o gene de resistência ao antibiótico seja substituído por genes que permitam outra forma de seleção, como genes do metabolismo de carboidrato, por exemplo (Mercenier & Lemoine, 1989).

No Brasil, qualquer Organismo Geneticamente Modificado (OGM) deve ser submetido à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), vinculada ao Ministério da Ciência e Tecnologia. Em janeiro de 1995 foi promulgada a Lei de Biossegurança nº 8974 que estabelece as diretrizes para o controle das atividades e produtos originados pela tecnologia do DNA recombinante. Entre as competências da CTNBio estão a emissão de parecer técnico sobre qualquer liberação de OGM no meio ambiente e também acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico na biossegurança e áreas afins, com o objetivo de fornecer segurança aos consumidores. Desta forma, além do controle habitual que sofrem os produtos produzidos por outras tecnologias, os geneticamente modificados ("transgênicos") estarão sujeitos a um controle adicional feito pela CTNBio, sob o aspecto biossegurança. Esses procedimentos garantirão que, ao serem colocados no mercado, esses produtos tenham as mesmas características de segurança, inocuidade e eficácia exigidas também para os produtos convencionais.

2.4.3. Aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos

A bactéria *S. thermophilus*, pertencente ao grupo dos cocos Gram positivos, é móvel, suas células têm formato que varia de esférico a ovóide, com diâmetro entre 0,7 a 0,9 μm e, normalmente, encontram-se agrupadas em pares ou em longas cadeias, podendo ainda apresentar segmentos irregulares e células isoladas, quando cultivadas a 45°C. Estes microrganismos são altamente adaptados ao leite, sendo este o melhor meio para o seu crescimento (Sneath *et al.*, 1986).

As linhagens de *Streptococcus* crescem rapidamente a 45°C e são incapazes de crescer a 10°C. Tanto a temperatura quanto o valor nutricional do meio influenciam a sua morfologia; elas crescem bem em leite a 45°C, formando pequenas cadeias, enquanto a 30°C, muitas linhagens aparecem como diplococos, e em leite com alta acidez, podem formar longas cadeias. A morfologia das células pode ser acentuadamente afetada pela presença de antibióticos, quimioterápicos e/ou sanitizantes eventualmente presentes no leite (Rasic & Kurmann, 1978).

Ao contrário do que sugere o nome, *S. thermophilus* não é uma bactéria termófila. Uma vez que não cresce a 55°C, ele é considerado um microrganismo termodúrico por sobreviver às temperaturas de pasteurização. Certas linhagens são capazes de sobreviver a um tratamento térmico de 80°C por 15 min ou mesmo 85°C por 20 a 30 min (Rasic & Kurmann, 1978). Com relação à temperatura ótima de crescimento existem diferentes opiniões; segundo Sneath *et al.* (1986) e Robinson (1987) ela varia de 40 a 45°C, sendo o crescimento limitado em temperaturas inferiores a 19°C; porém, de acordo com Mercenier & Lemoine (1989), a temperatura seria de 42 a 44°C.

Assim como as demais bactérias lácticas, *S. thermophilus* é homofermentativa, transformando 85 a 98% da lactose em ácido láctico, além de produzir pequenas quantidades de outros metabólitos. Em geral, quando cultivada em leite, produz de 0,6 a 0,8% de ácido láctico, podendo, em algumas linhagens, chegar até 1% (Rasic & Kurmann, 1978).

As proporções e a composição de metabólitos gerados por *S. thermophilus* dependem das condições de crescimento e das propriedades intrínsecas das linhagens. Em meio glicosado, com pH controlado, ela produz, anaerobicamente, ácidos acético e fórmico, CO₂, etanol e acetoína, além do ácido láctico. Quando cultivada em leite produz ácidos voláteis, tais como: fórmico, acético, propiônico, butírico, isovalérico e capróico, além de acetoína, pequenas quantidades de acetaldeído, acetona, etanol e butanona-2; algumas linhagens ainda, podem produzir diacetil. Este microrganismo apresenta fraca atividade proteolítica, quando cultivado em leite, sendo a maior parte dos aminoácidos consumidos durante o crescimento logarítmico (Rasic & Kurmann, 1978).

A bactéria *S. thermophilus* fermenta a sacarose e a lactose, sendo os dissacarídeos metabolizados preferencialmente em relação aos monossacarídeos. Em meio contendo a lactose como fonte de carboidrato, o tempo de fermentação pode ser de 3 a 4 vezes maior do que naquele contendo glicose. Quando o crescimento ocorre a partir da lactose, a glicose é utilizada pela via glicolítica enquanto a galactose acumula-se no meio (Sneath *et al.*, 1986; Davis & Law, 1984; Hutkins & Morris, 1987; Fox, 1987). A maior parte das linhagens de *S. thermophilus* só é capaz de fermentar três açúcares: lactose, glucose e sacarose. Em alguns casos, alternativamente, a rafinose pode ser usada como fonte energética (Mercenier & Lemoine, 1989). O metabolismo de carboidratos em *S. thermophilus* é mais semelhante àquele encontrado em *Escherichia coli* do que em bactérias lácticas, uma vez que a lactose é hidrolisada via β -galactosidase (Mustapha *et al.*, 1995).

Durante a fabricação do iogurte, a maior transformação ocorre com a lactose, porém, os outros constituintes do leite também são afetados e influenciam nas propriedades organolépticas e dietéticas do produto final (Rasic & Kurmann, 1978).

2.5. Aroma de leites fermentados e acetaldeído

Na produção industrial de alimentos em larga escala, uma constante preocupação é a otimização de formação dos compostos aromáticos, uma vez que o aroma é a característica mais importante para a aceitabilidade dos produtos alimentícios e das bebidas, por parte dos consumidores (Gonzalez *et al.*, 1994).

As culturas lácticas são as principais responsáveis pela produção dos compostos aromáticos em iogurte. Estes compostos podem ser divididos em quatro categorias: (1) ácidos não-voláteis; (2) ácidos voláteis; (3) compostos carbonílicos e (4) compostos diversos como aminoácidos e/ou constituintes formados pela degradação térmica (pasteurização) de proteína, lactose ou gordura (Tamime & Robinson, 1999).

Durante a fabricação do iogurte ocorre produção de ácido láctico (produto principal) e alguns subprodutos, tais como ácidos graxos voláteis, etanol e compostos carbonílicos (acetaldeído, diacetil, acetoína, acetona e butanona-2). O ácido láctico confere o sabor ácido e refrescante, enquanto o conjunto dos subprodutos resulta no aroma característico e agradável de iogurte. Alguns desses compostos voláteis têm papel fundamental no sabor e aroma de iogurte, enquanto outros contribuem apenas para o balanço global (Rasic & Kurmann, 1978). Apesar de mais de 100 diferentes compostos químicos terem sido identificados em leites fermentados, somente quatro deles: o acetaldeído, diacetil, acetona e etanol possuem alto impacto no sabor característico e encontram-se presentes em quantidades detectáveis por técnicas tradicionais (Tamime & Robinson, 1999).

Dentre os diversos compostos aromáticos produzidos, o que mais se destaca é o acetaldeído. Acredita-se que este composto seja o principal responsável pelo aroma característico de iogurte (Tamime & Robinson, 1999; Law, 1981; Ott *et al.*, 1997). Em avaliações sensoriais do aroma de iogurte, o acetaldeído é o responsável pela nota de “fruta-fresca”; esta associação deve-se, provavelmente, à formação de acetaldeído no processo de amadurecimento de frutas.

A quantidade de acetaldeído requerida para o desenvolvimento de aroma desejado varia bastante e depende do tipo de produto lácteo. Enquanto as altas concentrações de acetaldeído estão associadas ao sabor típico de iogurte, em outros produtos como queijos,

manteiga fermentada e *buttermilk*, somente uma pequena quantidade deste composto é necessária. Nestes produtos, onde se deseja uma produção reduzida de acetaldeído, a elevada formação deste metabólito é considerada um defeito, estando associada a um sabor indesejado, chamado de “verde” ou “sabor de iogurte” (Keenan & Bills, 1968). Em iogurte encontram-se altas concentrações de acetaldeído, provavelmente, porque as bactérias do iogurte não possuem a enzima álcool desidrogenase responsável pela conversão de acetaldeído em etanol (Lees & Jago, 1978).

2.5.1. Teor de acetaldeído

Foi observada, na literatura, uma grande variação na concentração ideal de acetaldeído para iogurte, isto provavelmente deve-se ao fato de serem utilizados diferentes métodos para a determinação do conteúdo deste composto aromático.

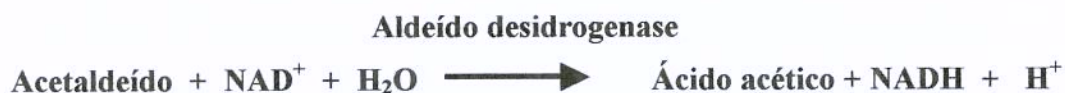
Apesar da importância dos compostos aromáticos: acetaldeído, diacetil e acetona em iogurte já estar bem estabelecida, é muito difícil avaliar a contribuição dos diversos compostos voláteis, uma vez que o seu limite de detecção sensorial varia consideravelmente (Dumont & Adda, 1973).

O acetaldeído foi identificado como o mais proeminente participante no sabor típico de iogurte; painéis sensoriais classificaram iogurtes com menos de 10 ppm de acetaldeído, como tendo “sabor fraco” (estas amostras também apresentaram pouca acidez). Com base neste experimento, o acetaldeído foi indicado como um importante composto aromático em iogurte, porém, tanto a acidez quanto os produtos de degradação de proteínas também podem influenciar o seu sabor (Kneifel *et al.*, 1992). Segundo Schmidt *et al.* (1983), a concentração ideal de acetaldeído para que o iogurte tenha o seu sabor típico varia de 10 a 15 ppm.

Bottazzi & Vescovo (1969), avaliando a produção de acetaldeído em diferentes culturas de iogurte, constataram que culturas que produziram cerca de 8 ppm resultaram em um iogurte com sabor agradável e típico, enquanto nas que produziram por volta de 4 ppm, o produto não tinha um sabor completo (*full*), e quando a produção de acetaldeído foi inferior a 1 ppm, o iogurte foi classificado como tendo sabor inadequado.

Dentre os métodos químicos utilizados para a determinação do teor de acetaldeído, a cromatografia gasosa HSGC (Head Space Gas Chromatography) tem se destacado e vem sendo muito utilizada para a detecção de compostos aromáticos, em produtos lácteos como o iogurte (Ulberth, 1991). A cromatografia líquida HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) também tem sido utilizada com sucesso para a avaliação de compostos aromáticos em bebidas fermentadas (Marsili, 1981).

Também é possível avaliar o conteúdo de acetaldeído espectrometricamente, esta determinação baseia-se no princípio de que, na presença da enzima aldeído desidrogenase, o composto NAD oxida o acetaldeído quantitativamente a ácido acético e a quantidade do composto NADH formado durante esta reação pode ser determinada espectrofotometricamente (OD_{340nm}) e corresponde, estequiometricamente, à quantidade de acetaldeído presente na amostra.



Segundo Hunger (1985) e Eberhard *et al.* (1995), os consumidores têm mostrado uma preferência por um iogurte com menos acidez (*Mild*), porém quando avaliado por painéis sensoriais em comparação ao iogurte tradicional, este tipo de iogurte foi classificado como menos saboroso (Kneifel *et al.*, 1992). Este iogurte *Mild* pode ser fabricado utilizando-se uma linhagem de *L. bulgaricus* que não possui a enzima β -galactosidase (lac^-) e, portanto, não ocorre uma acentuada produção de ácido láctico por parte deste microrganismo (que é o principal responsável pela pós-acidificação do iogurte). Porém, neste tipo de produto, foi detectada também menor produção de acetaldeído (Ott *et al.*, 1999). Ott *et al.* (2000),

analisando os resultados de seus diversos trabalhos nesta área, concluíram que a percepção da intensidade do aroma de iogurte está diretamente relacionada com o pH, ou seja, em um leite fermentado pouco ácido, o acetaldeído é menos detectado do que em um produto com acentuada acidez.

2.5.2. Fatores que afetam a produção de acetaldeído.

O acetaldeído é um metabólito produzido por quase todos os organismos estando envolvido no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos e compostos aromáticos, para os quais fornece um mecanismo de troca de carbono entre eles (Lees & Jago, 1978).

A capacidade de produzir acetaldeído é comum nas bactérias lácticas durante a fermentação do leite e a formação deste composto ocorre por meio de diferentes vias. Ele é produzido pelas duas bactérias lácticas utilizadas na fabricação do iogurte sendo observado que a sua produção aumenta quando os microrganismos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são cultivados conjuntamente (Hamdan & Kunsman 1971).

A produção de acetaldeído depende da linhagem utilizada e a treonina esta envolvida na regulação da atividade da enzima treonina aldolase (Lees & Jago, 1978; Shankar, 1977). A suplementação do meio de crescimento com os aminoácidos: treonina, metionina e glicina afeta a produção de acetaldeído, sendo que os dois primeiros aminoácidos aumentam a produção e o terceiro inibe sua formação (Wilkins *et al*, 1986a). Segundo Marranzine *et al.* (1989), a adição de treonina induz a um aumento na produção de acetaldeído e na atividade da enzima treonina aldolase, enquanto a glicina provoca redução em ambas.

O acetaldeído é produzido em quantidade significativa, em comparação com os demais compostos voláteis e sua produção está diretamente relacionada com a formação de ácido láctico. Ele só começa a ser produzido quando o pH do meio de crescimento encontra-se ao redor de 5, quando, então, a sua produção aumenta até pH = 4,3 e, em

seguida, a formação deste composto diminui, sendo estabilizada em pH = 4,0 (Bottazzi *et al.*, 1973).

O tipo de leite utilizado na fabricação do iogurte também afeta a produção de acetaldeído, sendo que os maiores níveis observados foram obtidos com o leite de vaca e os menores com leite de ovelha (Varnam & Sutherland, 1994).

2.5.3. Vias de formação de acetaldeído

Segundo Tamime & Robinson (1999), em bactérias lácticas, o acetaldeído é formado por diferentes vias metabólicas, sendo provável que mais que uma destas reações ocorra simultaneamente como ilustrado na Figura 2.4. Segundo Shakar (1977), em culturas mistas, a bactéria *S. thermophilus* tem maior importância do que *L. bulgaricus* na produção de acetaldeído.

Em iogurte, o acetaldeído pode ser produzido diretamente a partir do metabolismo da lactose, como resultado da descarboxilação do piruvato pela ação da piruvato descarboxilase ou piruvato oxidase, ou ainda indiretamente, pela formação de um composto intermediário, o acetil-fosfato, pela ação da enzima piruvato desidrogenase ou piruvato formato liase. Também pode ser formado pela via da deoxiriboaldolase, que hidrolisa a timidina em acetaldeído e gliceraldeído-3-fosfato. Vários aminoácidos ainda podem ser convertidos em acetaldeído via piruvato como um metabólito intermediário, enquanto a treonina pode ser diretamente convertida a acetaldeído pela ação da enzima treonina aldolase. Na Figura 2.4, a via da treonina aldolase (TA), enzima que catalisa a conversão reversível de treonina em acetaldeído e glicina, encontra-se destacada em vermelho.

O composto 2-desoxirribose-5-fosfato, produto de degradação de DNA, também parece ser um precursor de acetaldeído por meio da ação da enzima desoxiriboaldolase porém, apesar de ter sido detectada a presença desta enzima em *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* (Lees & Jago, 1977; Raya *et al.*, 1986), a sua contribuição para a formação de acetaldeído parece ser pouco significativa, uma vez que a degradação de DNA durante a fase exponencial de crescimento nestas bactérias deve ser mínima.

Na literatura existem controvérsias com relação à importância das diversas vias envolvidas na formação de acetaldeído. Avaliando-se as propriedades e atividades relativas de todas as enzimas envolvidas na formação de acetaldeído em bactérias lácticas, foi sugerido que o aminoácido treonina (pela via treonina aldolase) deveria ser o principal precursor na formação de acetaldeído durante a produção de iogurte (Lees & Jago, 1978). Outros trabalhos também sugerem a importância da via treonina aldolase na formação de acetaldeído pelas bactérias do iogurte porém, até o presente momento, esta hipótese não foi provada (Ott *et al.*, 2000; Wilkins *et al.*, 1986a).

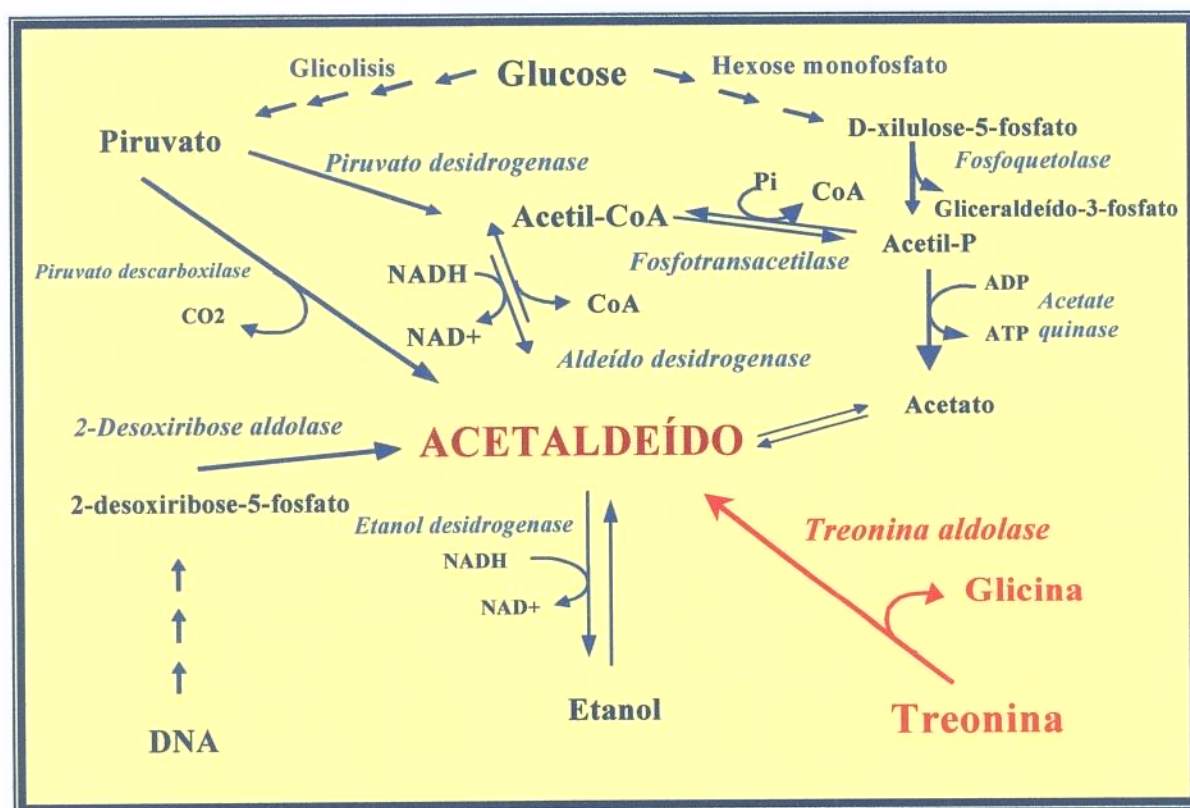


Figura 2.4. Diferentes vias metabólicas levando à formação do composto aromático acetaldeído em bactérias lácticas. **Fonte:** Ott *et al.* (2000).

2.6. Serina hidroximetil transferase (SHMT) e Treonina aldolase (TA)

Constatou-se que, na literatura, existe uma falta de consenso em relação à nomenclatura da enzima treonina aldolase em bactérias lácticas. Segundo Weeb (1992), do comitê de nomenclatura e classificação das enzimas (IUBMB), existem duas diferentes enzimas comumente chamadas de treonina aldolase: (1) EC.4.1.2.5., a verdadeira treonina aldolase (nome sistemático: L-treonina acetaldeído liase) e (2) EC.2.1.2.1., serina hidroximetil transferase (nome sistemático: 5,10-metilenotetrahidrofolato: glicina hidroximetil transferase), também chamada de serina aldolase ou ainda serina hidroximetilase.

A duplicidade da nomenclatura desta enzima ocorreu porque a enzima SHMT possui diversas funções e, entre elas, em alguns organismos, também pode exercer a atividade característica da TA (catalisar a conversão reversível de treonina em glicina mais acetaldeído). Ogawa *et al.* (2000) fizeram de uma extensa revisão bibliográfica a respeito destas duas enzimas e com este trabalho ficou evidenciada a existência de duas enzimas distintas: a treonina aldolase (EC.4.1.2.5), codificada pelo gene *ItaE* e a serina hidroximetil transferase (EC.2.1.2.1), codificada pelo gene *glyA* (Liu *et al.*, 1998a).

O problema com relação à nomenclatura desta enzima tem como origem um estudo realizado com a enzima SHMT proveniente de fígado de coelho, que também possui a atividade TA. Com base neste estudo acreditou-se que, por muitos anos, essas duas enzimas eram idênticas. Apesar de em alguns organismos a enzima SHMT exibir atividade TA como, por exemplo, no caso de fígado de coelho; em *Escherichia coli*, rato e feijão isso não ocorre, ou seja, a atividade de hidrolisar a treonina em acetaldeído e glicina não é uma função comum da enzima SHMT (Ogawa *et al.*, 2000). A Figura 2.4 ilustra claramente as funções de cada uma dessas enzimas.

Para ilustrar o problema, com respeito à nomenclatura da enzima treonina aldolase, a seguir, serão fornecidos alguns exemplos de citações encontradas na literatura sobre bactérias lácticas. Lees & Jago (1976), falando a respeito da treonina aldolase (EC.4.1.2.5.), dizem que esta enzima só foi encontrada em duas bactérias: *E coli* e *Clostridium pasteurianum*, porém, quando se referem à treonina aldolase em bactéria láctica eles usam

EC.2.1.2.1. Segundo Wilkins *et al.*, (1986a), a enzima treonina aldolase (EC.2.1.2.1) encontra-se presente na maioria das bactérias lácticas, estando envolvida diretamente na conversão de treonina em glicina e acetaldeído. Ott *et al.* (2000) comprovaram que, durante a fermentação do leite por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, o acetaldeído é formado a partir de treonina (que foi marcada radiotivamente, ^{13}C), pela atividade da enzima treonina aldolase (EC.2.1.2.1).

Acredita-se que a principal função da enzima treonina aldolase seja a produção de glicina (Contestabile *et al.*, 2001). A observação de que a linhagem Z8 de *L. lactis* não possui atividade de treonina aldolase e requer glicina para seu crescimento fornece suporte a esta hipótese (Reiter & Oran, 1962).

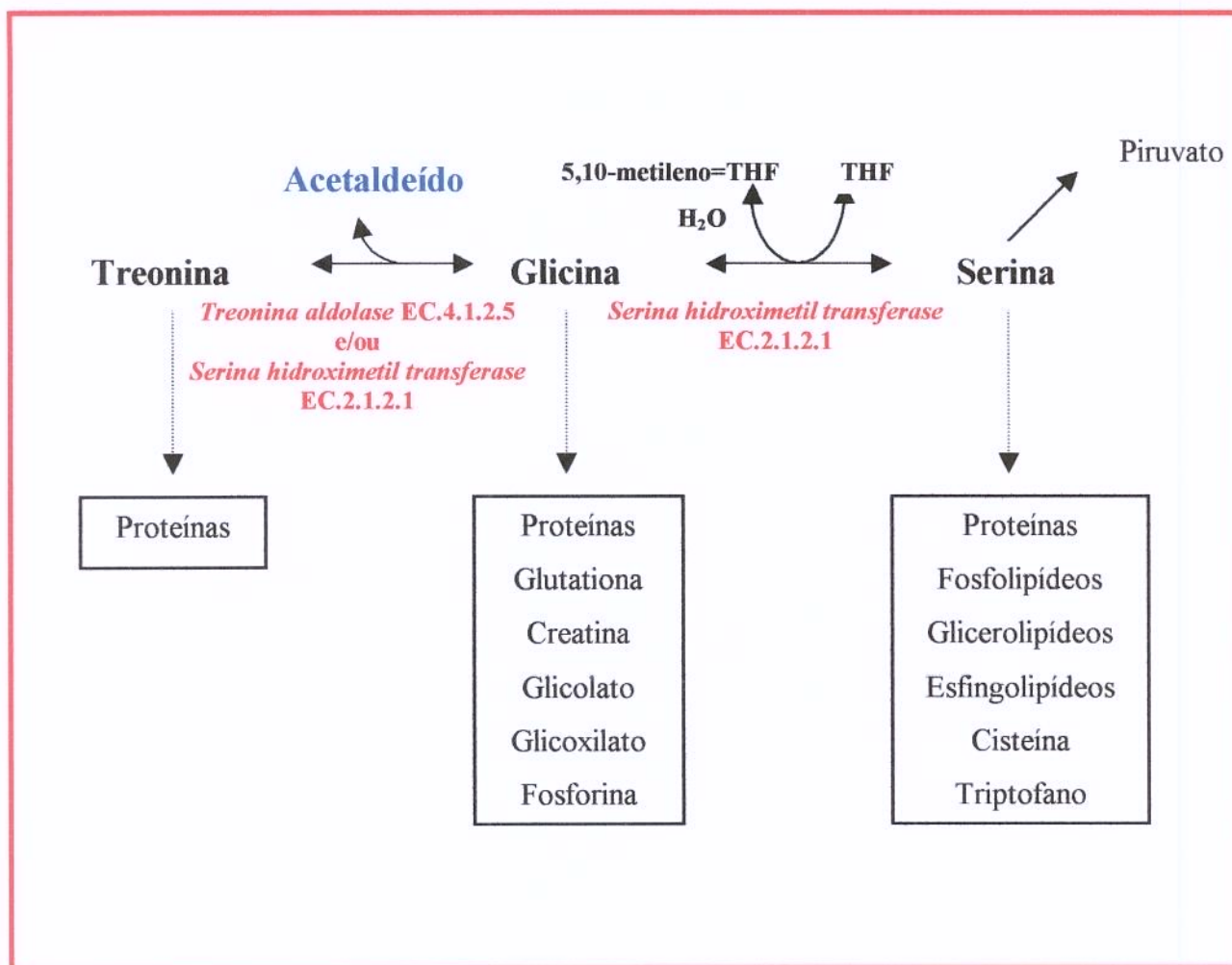


Figura 2.5. Esquema ilustrando as funções das enzimas treonina aldolase (EC.4.1.2.5.) e serina hidroximetil transferase (EC.2.1.2.1.) no metabolismo dos aminoácidos serina, glicina e treonina.

Fonte: Ogawa *et al.* (2000).

2.6.1. Serina hidroximetil transferase

Serina hidroximetil transferase é a principal enzima presente na biossíntese de glicina em animais, plantas e microrganismos e é importante, não somente por estar envolvida no metabolismo de glicina e serina, mas por também estar envolvida no metabolismo de ácido fólico em todos os organismos (Ogawa *et al.*, 2000). Segundo Blakley (1969), essa enzima é essencial na regeneração do composto tetrahydrofolato, a partir da sua forma metilada (5,10-metileno tetrahydrofolato) e catalisando a síntese de glicina e 5,10-metileno tetrahydrofolato, a partir de serina e tetrahydrofolato (THF).



Esta reação é muito importante pois é a maior fonte dos grupos de carbonos primários (C₁), fundamental para diversas reações. O composto 5,10-metileno tetrahydrofolato e as suas formas reduzida e oxidada são requeridos em reações nas quais existe a necessidade de transferência de carbonos primários, como por exemplo: na biossíntese de compostos contendo grupos metil, anéis biossintéticos de purinas, *de novo* timidilato, metionina, lipídeos e outros compostos especiais (Blakley, 1969).

Diferentes enzimas SHMT provenientes de procariontes e eucariontes foram purificadas, assim como a da bactéria láctica *L. bulgaricus* YOP₁₂, (Manca de Nandra *et al.*, 1987). Os genes *glyA* de *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii*, entre outros, foram clonados e caracterizados (Liu *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 1997; Moschau *et al.*, 1998). As bactérias *E. coli*, *S. typhimurium* e *Bradyrhizobium japonicum*, com mutações no gene *glyA*, tornaram-se auxotróficas para glicina (Rossbach & Hennecke, 1991; Umbarger *et al.*, 1963).

2.7. Ácido fólico

O ácido fólico (ou vitamina B9) pode ser encontrado em diversos alimentos tais como: folhas verdes, espinafre, couve-de-bruxelas, ervilha, milho, batata, feijão preto, grãos, banana, carnes, aves, fígado, levedo de cerveja, cenoura, gema de ovo, queijo branco, leite e iogurte (Lin & Young, 2000).

Esta vitamina possui diversas funções, atua na divisão celular e na transmissão de traços hereditários assim como também, na formação e maturação dos eritrócitos e leucócitos. Ela é muito importante durante a gravidez, pois favorece o desenvolvimento do bebê; combate à anemia e problemas gastrointestinais, contribui para a regeneração celular e melhora a insuficiência cardiovascular. Esta vitamina também tem um importante papel na redução da incidência de câncer, devido a sua atuação como cofator em reações envolvendo transferência os carbonos primários segundo Collins (citado por Lin & Young, 2000).

A deficiência desta vitamina pode ocasionar diminuição no crescimento, causar anemia megaloblástica, assim como também outros distúrbios sangüíneos, glossites, distúrbios gastrointestinais, amnésia, fadiga, insônia, fraqueza, irritação e absorção deficiente de outros nutrientes essenciais.

Durante a fermentação do leite, algumas bactérias lácticas, como por exemplo *S. thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* são capazes de produzir ácido fólico, enquanto que, *L. bulgaricus* o consome. As bactérias lácticas podem ser utilizadas para aumentar o valor nutricional dos leites fermentados, por meio do aumento da produção desta importante vitamina (Lin & Young, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Parte do trabalho prático desta tese (manipulação genética) foi realizada no NIZO Food Research em Ede, na Holanda, na seção Flavour and Natural Ingredients, sob a supervisão dos doutores Jeroen Hugenholtz, Michael Kleerebezem e Willem de Vos.

3.1. Soluções e meios de cultura

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas conforme indicado por Sambrook *et al.* (1989), ou como descritas na referência citada no texto. Os reagentes empregados no preparo das soluções foram de qualidade analítica e de procedência de alguns dos seguintes fabricantes: Sigma, Pharmacia, BDH AnalaR, Merck ou Gibco-BRL. Os meios de crescimento utilizados nos experimentos estão descritos a seguir:

- **Litmus milk.** (Difco Laboratories, Inglaterra). Este meio foi preparado conforme as instruções dos fabricantes e utilizado para verificar o crescimento das linhagens de *S. thermophilus*. Houve suplementação com CaCO_3 (BDH), quando este meio foi utilizado para a manutenção das culturas congeladas (-20°C). Quando necessário, foi suplementado com extrato de levedura (Difco).
- **LYG FR-135.** Meio formulado pelo NIZO, contendo 0,075g/L de *Litmus milk* em pó, 5 g/L de extrato de levedura e glicerol (agente crioprotetor). Utilizado para manutenção das linhagens de *Streptococcus thermophilus* da coleção do NIZO a -145°C .
- **M17** (Difco). Meio utilizado para crescimento de *S. thermophilus* e *L. lactis*. Foi preparado conforme as instruções dos fabricantes. Composição: 10g/L de lactose, 5g/L de triptona; 5g/L de peptona de soja; 5g/L de carne digerida; 2,5g/L de extrato de levedura; 0,5g/L de ácido ascórbico; 0,25g/L de sulfato de magnésio e 19g/L de glicerol fosfato dissódico. Quando necessário, foram adicionados 2,0% de ágar para a obtenção de meio sólido.
- **GM17.** Meio M17, no qual a lactose foi substituída por 1% de glucose, utilizado para cultivo de *L. lactis*.

- **SM17.** Meio M17, no qual a lactose foi substituída por 1% de sacarose, utilizado no procedimento de interrupção gênica.
- **YT (Difco).** Meio utilizado para crescimento de *E. coli* e preparado segundo instruções do fabricante. Composição: 0,8% de triptona, 0,5% de cloreto de sódio e 0,5% de extrato de levedura. Para a obtenção de meio sólido adicionaram-se 2,0% de ágar.
- **Folic Acid Casei Medium (Difco).** Meio preparado conforme as instruções dos fabricantes, foi utilizado para o cultivo de linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* usadas no ensaio microbiológico para a determinação da quantidade de ácido fólico.
- **Leite.** Leite em pó desnatado (Promex-Holanda), reconstituído a 11,8% em água destilada e pasteurizado (90°C por 5 min).

Quando indicado, o meio foi suplementado com 10 mM ou 25 mM do aminoácido L-treonina (Sigma, Alemanha) ou com glicina (Sigma, Alemanha). Os antibióticos foram utilizados, quando necessário, nas seguintes concentrações:

- ✓ **Eritromicina (Eri):** 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli* e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. thermophilus*;
- ✓ **Cloranfenicol (Clor):** 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli*, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. thermophilus* e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. lactis*
- ✓ **Ampicilina (Amp):** 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli*.

3.2. Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.1, incluindo tanto os tipos selvagens (provenientes da coleção do NIZO Food Research ou de outros laboratórios) quanto às linhagens geneticamente modificadas.

3.3. Condições de cultivo e manutenção dos microrganismos

As linhagens de *S. thermophilus* foram cultivadas a 42°C em caldo M17, as de *L. lactis* em caldo GM17 a 30°C e as de *E. coli* a 37°C, em caldo YT com aeração (Sambrook *et al.*, 1989).

As 34 linhagens de *S. thermophilus* provenientes da coleção do NIZO (mantidas a 10% em LYG FR-135, a -145°C) foram descongeladas (a 20°C) e incubadas a 42°C por 12h. Subseqüentemente, inocularam-se 100 µL de cada uma das culturas em 10 mL de *Litmus milk* suplementado com 0,1% de extrato de levedura. Após incubação a 42°C por 2h este inóculo foi dividido em tubos estéreis, que foram posteriormente congelados e armazenados a -20°C até o momento de sua utilização. A cada experimento um novo tubo de inóculo foi descongelado, garantindo-se, assim, a pureza destas linhagens.

3.4. Plasmídeos, vetores e oligonucleotídeos construídos e utilizados

Todos os vetores comerciais utilizados neste trabalho assim como também os plasmídeos construídos encontram-se na Tabela 3.2. Para realizar as construções apresentadas nesta Tabela 3.2, foram desenhados diversos oligonucleotídeos para amplificação de fragmentos de DNA por reações de PCR. As suas seqüências encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.1. Microrganismos utilizados neste trabalho

Linhagens de microrganismos	Origem/referências
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
NIZOB103 a NIZO109; NIZO115 a NIZOB118; NIZO121	Iogurte Holanda
NIZOB110 e NIZOB111	Leite pasteurizado
NIZOB114	Iogurte australiano
NIZOB1191	“Spray dryer”
NIZOB123 a NIZOB125	Queijo
NIZOB126 e NIZOB127	Leite
NIZOB128	Queijo Cheddar
NIZOB129	Leite pasteurizado
NIZOB130	Culturas de iogurte - Finlândia
NIZOB131 a NIZOB133	Queijo italiano
NIZOB883, NIZOB885 e NIZOB886	Culturas de queijos termofílicas
NIZOB1122 e NIZOB1128	Culturas de iogurte
AO54 linhagem industrial	Mercenier <i>et al.</i> (1989)
B130DglyA (B130 com gene <i>glyA</i> interrompido)	Este trabalho
AO54DglyA (AO54 com gene <i>glyA</i> interrompido)	Este trabalho
StBCC2 (<i>S. thermophilus</i> B130 com plasmídeo pACC2St)	Este trabalho
StACC2 (<i>S. thermophilus</i> AO54 com plasmídeo pACC2St)	Este trabalho
StBCC7 (<i>S. thermophilus</i> B130 com plasmídeo pACC7)	Este trabalho
StACC7 (<i>S. thermophilus</i> AO54 com plasmídeo pACC7)	Este trabalho
StBCC9 (B130 contendo pACC9)	Este trabalho
StACC9 (AO54 contendo pACC9)	Este trabalho
<i>Lactococcus lactis</i>	
MG1363 (linhagem sem plasmídeos derivada da NCDO 712)	Gasson (1983)
NZ9000 (MG1363; pepN::nisRK)	Kuipers <i>et al.</i> (1998)
StglyACC3 (NZ9000 contendo pACC4)	Este trabalho
BsglyACC3 (NZ9000 contendo pACC3)	Este trabalho
LltglyACC3 (NZ9000 contendo pACC11)	Este trabalho
LtACC2St (NZ9000 contendo pACC2St)	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>	
DH5 α	Hanahan (1983)
<i>Bacillus subtilis</i>	
BS168	Coleção do NIZO

Todas as linhagens com a palavra NIZO no começo do nome pertencem à Coleção do NIZO Food Research.

Tabela 3.2. Vetores comerciais e plasmídeos construídos e utilizados neste trabalho

Plasmídeos / Vetores	Origem/referências
pG ⁺ host9 (Eri ^r , vetor com replicon termossensível)	Maguin <i>et al.</i> , 1996
pGEM [®] -T (Amp ^r , vetor para clonagem de produto de PCR)	Promega, Madison/EUA
pUC 19 (Amp ^r , 2,69 kb)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
pORI280 (Eri ^r)	Leenhouts <i>et al.</i> , 1996
pNZ273 (Clor ^r ; 4,7 kb vetor sem promotor)	Platteuw <i>et al.</i> , 1994
pNZ275 (Clor ^r , P _{USP45} ligado ao RBS)	NIZO Food Research
pNZ276 (Clor ^r , P _{LacA} ligado ao RBS)	NIZO Food Research
pNZ8148 (Clor ^r , gene clonado sob controle do P _{Nis})	NIZO Food Research
pJIM2246 (Clor ^r , P _{glyA} com 600pb acima do RBS)	NIZO Food Research
pNZ9530 (Eri ^r , contém os genes <i>nisK</i> e <i>nisR</i>)	NIZO Food Research
pNZ2300 (Amp ^r , pGEM [®] -T + 505pb do gene <i>glyA St</i>)	Este trabalho
pNZ2310 (Eri ^r , pG ⁺ host9+ 505pb do gene <i>glyA St</i>)	Este trabalho
pACC1 (Clor ^r pNZ8148 onde P _{Nis} foi substituído por P _{Ldh})	Este trabalho
pACC2 (Clor ^r , pACC1: <i>gusA</i>)	Este trabalho
pACC2St (Clor ^r , pACC1: <i>glyA</i> de <i>St</i>)	Este trabalho
pACC3 (Clor ^r , pNZ8148: <i>glyA</i> de <i>B. subtilis</i>)	Este trabalho
pACC4 (Clor ^r , pNZ8148: <i>glyA</i> de <i>St</i>)	Este trabalho
pACC5 (Clor ^r , pJIM2246: <i>glyA</i> de <i>St</i>)	Este trabalho
pACC6 (Clor ^r , pNZ273: fragmento com 300pb acima de <i>glyA</i> de <i>St</i>)	Este trabalho
pACC7 (Clor ^r , pNZ273: fragmento com 600pb acima de <i>glyA</i> de <i>St</i>)	Este trabalho
pACC8 (Clor ^r , pNZ275: <i>glyA St</i>)	Este trabalho
pACC9 (Clor ^r , pNZ276: <i>glyA St</i>)	Este trabalho
pACC10 (Eri ^r , pORI280 + fragmentos do gene <i>glyA</i> e regiões laterais)	Este trabalho
pACC11 (Clor ^r , pNZ8148 : <i>glyA</i> de <i>L. lactis</i>)	Este trabalho

Abreviações: *St*, para *S. thermophilus*; Clor^r (gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol); Amp^r (gene de resistência ao antibiótico ampicilina) e Eri^r (gene de resistência ao antibiótico eritromicina).

Tabela 3.3. Oligonucleotídeos desenhados para reações de PCR

Oligonucleotídeos	Fragmento de DNA amplificado
ACC1: 5'-GANYTNNGNWSNGAYACNKTNAC-3'	Fragmento interno do gene <i>ItaE</i>
ACC2: 5'-CCNSHYTGNCNNNCCNCCNCC-3'	Fragmento interno do gene <i>ItaE</i>
ACC3: 5'-ACNAAYAARTAYGCNGARGG-3'	Degenerado - Fragmento interno do gene <i>glyA</i>
ACC4: 5'-GGNCCNCKNARNSWYTTTRTG-3'	Degenerado - Fragmento interno do gene <i>glyA</i>
ACC3': 5'-GCAGCATTGGCTTGGCTA-3'	Fragmento interno 505pb do gene <i>glyA</i>
ACC4': 5'-CTTCAGCATACTCACGTA-3'	Fragmento interno 505pb do gene <i>glyA</i>
ACC5 5'-CGTCTAGAGGTGAGGCCGTTGTTCTCCC-3'	Fragmento com parte inicial do gene <i>glyA</i>
ACC6 5'-GCGCTGCAGGCTGCTGCCATGGCGGACG-3'	Fragmento com parte final do gene <i>glyA</i>
ACC7 5'-GGTCGTGATGGATGATGG-3'	Deteção do primeiro evento de integração
ACC8 5'-ATGGAAAAGATCTATAATATTATACCATAAAA-3'	Promotor Ldh
ACC9 5'-GCAGCCATGGTCTAAACATCTCCTT-3'	Promotor Ldh
ACC10 5'-ATCTGTCTAGATTAATAATCTAAT--3'	Início gene <i>glyA B. subtilis</i>
ACC11 5'-GGCATCTGTCATGAAACATTTACCTGCGC-3'	Final gene <i>glyA B. subtilis</i>
ACC12 5'-GGCATCTGTCATGATTTTGTATAAAGAAGATT-3'	Início gene <i>glyA S. thermophilus</i>
ACC13 5'-TATCTGTCTAGATATTAATAGAGTGGGAAAGC-3'	Final gene <i>glyA S. thermophilus</i>
ACC14 5'-GAATTCATCATGATATTCGATAAGGAGGACTTT-3'	Início gene <i>glyA L. lactis</i>
ACC15 5'-TATCTGTCTAGAAATTCAGAGGGGGAAGTGGCGCGTGAATTGC-3'	Final gene <i>glyA L. lactis</i>
ACC16 5'-GCGAAAACGTCAGCCAAACCATCCCGTA-3'	Início 300pb acima gene <i>glyA</i>
ACC17 5'-TATCTGTCTAGATATTAATAGAGTGGGAAAGC-3'	Final 300pb acima gene <i>glyA</i>
ACC18 5'-GCGAAAACGTCAGCCAAGGCTTTGGATGAGA-3'	Início 600pb acima gene <i>glyA</i>
ACC19 5'-TATCTGTCTAGATATTAATAGAGTGGGAAAGC-3'	Final 600pb acima gene <i>glyA</i>
ACC20 5'-GCGAAAACGTCAGCCTATTAGACCTCAAAG-3'	Início gene <i>glyA</i>
ACC21 5'-TATCTGTCTAGATATTAATAGAGTGGGAAAGC-3'	Final gene <i>glyA</i>

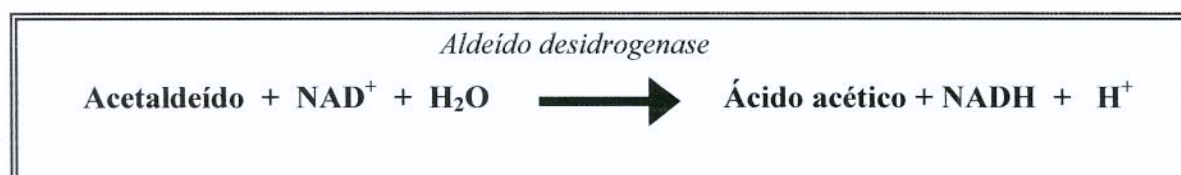
Abreviações foram utilizadas: A = adenosina; C = citosina; G = guanina; T = timidina; N = A, C, G, ou T; Y = C ou T; R = A ou G; K = G ou T; W = A ou T; S = G ou C.

3.5. Determinação da concentração de acetaldeído

A análise da quantidade de acetaldeído produzida pelas diferentes linhagens de *S. thermophilus* foi realizada da seguinte forma:

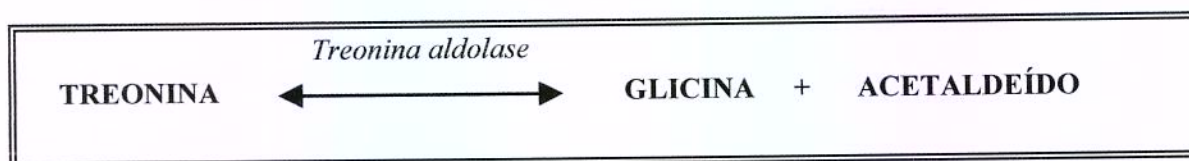
- ✦ O inóculo foi descongelado, com a finalidade de se avaliar o crescimento, as bactérias foram inoculadas em *Litmus milk* a 1% e incubadas por 8h a 42°C;
- ✦ 100 µL deste inóculo foram adicionados a 10 mL de leite (com 0,5% de extrato de levedura) ou 10 mL do meio M17 e incubados por mais 20h a 42°C;
- ✦ Após a incubação as amostras foram centrifugadas (7000rpm/10min/4°C) e o sobrenadante foi coletado e filtrado (Millipore 42 µm) para a obtenção de uma solução límpida;
- ✦ A concentração de acetaldeído foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se um *kit* para determinação de acetaldeído em alimentos e bebidas da Boehringer Mannheim, (Alemanha), de acordo com as instruções dos fabricantes;
- ✦ As determinações da concentração de acetaldeído foram realizadas em triplicata.

Este kit baseia-se no seguinte princípio: na presença da enzima aldeído desidrogenase, o composto NAD oxida o acetaldeído quantitativamente a ácido acético. A quantidade do composto NADH formado durante esta reação foi determinada espectrofotometricamente (OD_{340nm}) e corresponde, estequiometricamente, à quantidade de acetaldeído presente na amostra.



3.6. Determinação da atividade da enzima treonina aldolase (TA)

A atividade da treonina aldolase foi monitorada utilizando-se L-treonina como substrato, conforme a metodologia descrita por Wilkins *et al.* (1986a), com algumas modificações para assegurar o término da reação. Neste método mede-se a quantidade de acetaldeído formado a partir de treonina na reação catalisada pela enzima treonina aldolase. Com o objetivo de simplificar o entendimento, a atividade da treonina aldolase determinada por esta metodologia foi chamada de “Atividade de TA” (Treonina Aldolase).



- ✦ Inicialmente, as bactérias foram inoculadas a 1% em *Litmus milk* e incubadas por 8h a 42°C;
- ✦ Preparou-se um pré-inóculo, inoculando-se 10 mL de LM17 com 100 µL de *Litmus milk* fermentado, seguido de incubação a 42°C por 6 h;
- ✦ Realizou-se, então, uma segunda inoculação, utilizando-se 2% do pré-inóculo em 250mL de LM17, que foi mantido a 42°C por um período de 8-12h (dependendo da linhagem utilizada);
- ✦ As células foram coletadas por centrifugação a 7000 rpm por 10 min;
- ✦ O precipitado de células foi lavado duas vezes em uma solução tampão de fosfato de potássio dibásico anidro (0.15 M, pH 7.0). Na primeira lavagem foram utilizados 100mL de solução tampão e na segunda 10mL e, a seguir, procedeu-se à centrifugação (7000rpm/10min/4°C);
- ✦ As células foram, então, suspensas em 3 mL de solução de fosfato de potássio;
- ✦ As células suspendidas foram lisadas por extrusão, utilizando-se uma prensa francesa (French Pressure Cellpress – SLM Aminco Spectronic Instruments - Holanda) com pressão constante e igual a 900 Psi. A extrusão foi realizada duas vezes para garantir

uma extração eficiente e, a partir deste ponto, os extratos foram mantidos em banho de água e gelo durante todo o processo, até a determinação da atividade enzimática.

- ⤴ Após desintegração, a suspensão foi centrifugada (6000rpm/10min/4°C) para eliminação das células inteiras e dos restos celulares.
- ⤴ O sobrenadante, extrato enzimático livre de células, foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e para a determinação da concentração de proteína.

Reação para a determinação da atividade enzimática

- ⇒ A reação enzimática foi realizada em tubos plásticos de 10 mL e a mistura de reação consiste nos seguintes componentes: 300 µL de solução de L-treonina 0,5M, 23 µL de solução tampão de fosfato de potássio dibásico anidro 1M (pH = 7,0), 977 µL de água destilada e 100 µL do extrato enzimático (último componente a ser adicionado, antes de se iniciar a contagem do tempo de reação);
- ⇒ Os tubos foram fechados hermeticamente e a mistura de reação foi colocada em banho de água a 42°C por 30 min. No controle, adicionaram-se todos os componentes da reação, exceto o extrato enzimático, que foi substituído por 100 µL de solução de fosfato de potássio (0.15M; pH = 7,0).
- ⇒ Após 30 minutos de reação, os tubos foram transferidos para gelo e, com o objetivo de garantir a paralisação desta reação, foram adicionados 600 µL de HCl (1M).
- ⇒ A quantidade de acetaldeído formado durante os trinta minutos de reação foi determinada conforme descrito no item 3.5.
- ⇒ A determinação da atividade TA foi realizada em triplicata, calculada segundo a fórmula a seguir e o resultado fornecido em unidades de atividade TA.

Fórmula para o cálculo da atividade enzimática:

$$\text{Atividade de T A} = \frac{K \times (\text{quantidade de acetaldeído formado em ppm}) \times F}{[\text{concentração de proteína no extrato em mg/ml}] \times [\text{tempo de reação em min.}]}$$

onde:

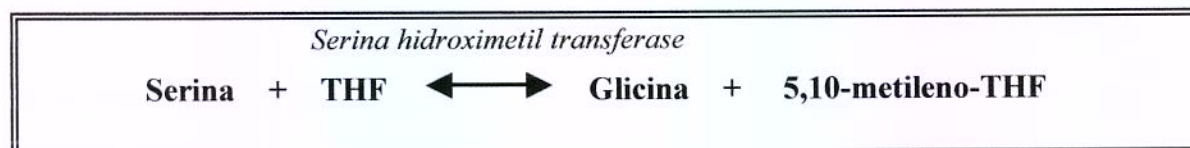
K representa a constante utilizada para a conversão de unidades, $K = 22,7$

F representa o fator de diluição que pode variar e, neste caso específico, ele foi igual a 20, pois foram utilizados 100 μL de extrato em um volume final de 2 mL (mistura de reação).

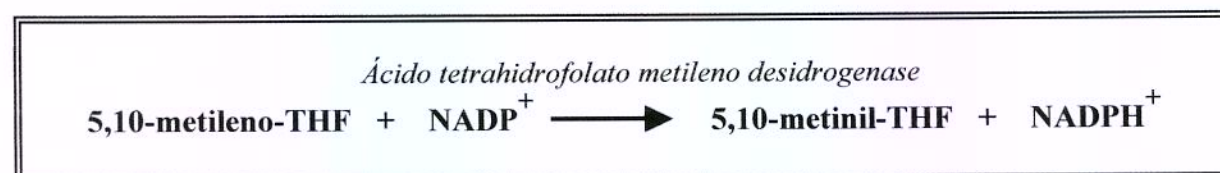
Definição de uma unidade (U): uma unidade corresponde à formação de um ηmol de acetaldeído por minuto de reação por miligrama de proteína no extrato enzimático.

3.7. Determinação da atividade da serina hidroximetil transferase (SHMT)

A atividade da enzima SHMT foi monitorada utilizando-se serina como substrato, conforme as metodologias descritas por Willetts & Turner (1971) e por Schirch (1983), com algumas modificações indicadas a seguir. A atividade da enzima SHMT foi determinada por meio da conversão de serina e glicina.



A conversão de serina em glicina pode ser verificada pela reação indicada a seguir, na qual observa-se a oxidação do produto 5,10-metileno tetrahydrofolato a 5,10-metnil tetrahydrofolato pelo composto NADP^+ e pela enzima ácido tetrahydrofolato metileno desidrogenase. Nesta reação, foi medido o aumento de absorbância a 340nm devido à formação dos compostos NADPH^+ e 5,10-metnil tetrahydrofolato.



A preparação dos extratos enzimáticos foi realizada como descrito a seguir:

- ⇒ As linhagens de *S. thermophilus* foram cultivadas e coletadas da mesma forma como descrito no item 3.6.
- ⇒ O precipitado de células foi lavado com 20mL de solução de Tris-HCl (50mM/pH 8) e centrifugado (4500rpm/10min/4°C).
- ⇒ O precipitado foi suspenso em 1mL de solução Tris-HCl (50mM/pH 8) e as células foram desintegradas, utilizando-se uma prensa francesa como no item 3.6.
- ⇒ A suspensão foi centrifugada (4500rpm/5min/4°C) para eliminação das células inteiras e dos restos celulares.
- ⇒ O sobrenadante, extrato enzimático livre de células, foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e a para determinação da concentração de proteína.

Reação para a determinação da atividade enzimática

- A reação enzimática foi realizada a 30°C em uma cubeta (para espectrofotômetro de 1mL) misturando-se: 0,55 mL de solução Tris-HCl (50mM/pH 8), 100 µL de solução de serina 0,5M (preparada em solução Tris-HCl, 50mM/pH 8), 100 µL de solução NADP (preparada misturando-se 37,17 mg de NADP em 1 mL de solução Tris-HCl 50mM/pH 8), 50 µL de solução piridoxal-5-fosfato (preparada misturando-se 24,8 mg piridoxal-5-fosfato em 10 mL Tris-HCl 50mM/pH 8), 10 µL da enzima ácido tetrahydrofolato metileno desidrogenase (concentração = 1U em 900 µL) e, por último, adicionaram-se 100 µL de extrato enzimático.
- Após 2 min de reação, a densidade óptica foi medida (D.O. $_{340nm}$).
- Adicionaram-se 100 µL de solução de ácido tetrahydrofólico, [preparado dissolvendo-se 25 mg de ácido tetrahydrofólico em 5,61 mL de solução Tris-HCl (50mM/pH 8) e em 0,1% de mercaptoetanol].
- Após 5 min de reação, a densidade óptica foi medida. (D.O. $_{340nm}$).

- A unidade (U) da atividade SHMT corresponde à formação de 1 μ mol de glicina por minuto de reação por miligrama de proteína no extrato enzimático

3.8. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína dos extratos foi determinada utilizando-se um método colorimétrico que muda de cor, de acordo com a concentração de proteína presente no extrato enzimático. Para tal determinação foi utilizado o *Kit Protein Assay* da Bio-Rad (BIO-RAD Laboratories GmbH, Alemanha). Este método baseia-se na observação de que a absorbância máxima de uma solução acidificada de *Coomassie Brillante Blue G-250* muda de 465nm para 595nm, quando se liga à proteína. Este *kit* baseia-se no método de Bradford, utilizando o BSA como padrão (Bradford, 1976).

3.9. Determinação da concentração de ácido fólico

A concentração de ácido fólico presente nas células (no meio intra e extracelular) foi medida em diversas linhagens selvagens de *S. thermophilus* e *L. lactis* assim como também nos mutantes, visando avaliar a importância da SHMT no metabolismo de ácido fólico.

Para esta determinação foi utilizado um ensaio microbiológico, com a linhagem B236 (ATCC7469) de *Lactobacillus rhamnosus*, auxotrófica para ácido fólico. O crescimento deste microrganismo depende da quantidade de ácido fólico produzido anteriormente pelas linhagens selvagens ou pelos mutantes. Este método foi otimizado por Marjo Starrenburg do Nizo Food Research com base nos métodos de Moloy & Scott, (1997), Horne & Patterson, (1988) e Phillips & Wrigth (1982 e 1983).

3.10. Manipulações de DNA

As diversas enzimas de restrição, Taq e PWO polimerase, T4 DNA ligase e outras enzimas modificadoras de DNA foram usadas segundo as recomendações dos fornecedores Boehringer Mannheim, Life Technologies, Pharmacia ou Gibco/BRL.

3.10.1. Isolamento, purificação, transformação e hibridização de DNA

As técnicas padrão de recombinação de DNA rotineiramente utilizadas em laboratórios de genética foram realizadas de acordo com protocolos estabelecidos por Sambrook *et al.* (1989).

O isolamento e a purificação do DNA plasmidial em grande escala foram realizados utilizando-se um *kit* JetStar columns (Genomed GmbH, Alemanha), de acordo com as instruções dos fabricantes.

A purificação dos produtos de PCR e das bandas de gel de agarose foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes, utilizando-se o *kit* Jet Quick Spin Column Technique (Genomed, Alemanha). Algumas vezes, a purificação de plasmídeo em grande escala foi realizada utilizando-se o protocolo com cloreto de cério e brometo de etídeo, segundo Birnboim & Doly (1979).

O DNA plasmidial e cromossômico de *S. thermophilus* e *L. lactis* foram isolados de acordo com o protocolo desenvolvido para *L. lactis* (Vos *et al.*, 1989), no caso de *S. thermophilus*, as amostras foram digeridas por 1h a 50°C.

Linhagens de *E. coli*, *S. thermophilus* e *L. lactis* foram transformadas por meio de eletroporação (Eletroporador Gene Pulser II - Bio-Rad) segundo o protocolo do manual deste equipamento. As linhagens de *E. coli*, segundo Sambrook *et al.* (1989); *L. lactis*, de acordo com o método de Holo & Nes (1989) e *S. thermophilus*, segundo Mollet *et al.* (1993), com a modificação de que as células foram previamente incubadas em solução tamponada de eletroporação por 4h a 4°C.

A hibridização de fragmentos de DNA foi realizada segundo Southern (1975), utilizando-se o *kit* The Dig System for Filter Hybridization (Boehringer Mannheim), para marcação e detecção, de acordo com as instruções dos fabricantes. Neste procedimento, utilizado na detecção de determinadas seqüências de DNA no cromossomo, o DNA foi extraído, imobilizado numa membrana de náilon e incubado na presença de uma sonda marcada a frio com digoxigenina que complementou a seqüência de DNA do cromossomo, detectando-a.

3.10.2. Reações de Polymerase Chain Reaction - PCR

Com a técnica Polymerase Chain Reaction (Erlich & Bell, 1989) foi possível a amplificação de segmentos de DNA entre regiões de sequência conhecidas. Esta amplificação foi realizada pela reação em cadeia da enzima DNA polimerase que utiliza um par de oligonucleotídeos, os quais flanqueiam a região do DNA amplificada. PCR consiste de três ciclos básicos: (1) a desnaturação a 94°C por 1 minuto, separação da dupla fita do DNA; (2) ligação (anelamento) dos oligonucleotídeos ao DNA alvo em fitas opostas, ocorre em uma temperatura por volta dos 50°C por 1,5 minutos (nesta etapa o tempo e temperatura devem ser otimizados para cada oligonucleotídeo utilizado) e (3) extensão a 72°C por 2 minutos, etapa na qual a enzima termo-resistente DNA polimerase estende os oligonucleotídeos sintetizando duas novas fitas de DNA na região flanqueada. Este ciclo de variação de temperatura foi repetido 30 a 40 vezes; desta forma, a quantidade de DNA amplificada aumentou exponencialmente a cada ciclo.

Esta técnica possui diversas aplicações e foi utilizada, nesta tese, para amplificar genes ou fragmentos de DNA para clonagem em diferentes vetores, para a criação de sítios de restrição (possibilitando digestão com diferentes enzimas de restrição), para caracterização direta de clones recombinantes (“PCR de colônias”), para PCR inverso e para detecção de deleção de genes ou parte destes.

As reações de PCR foram otimizadas para cada caso, em geral, para amplificação de genes para clonagem. Foram conduzidas em um volume final igual a 50 µL contendo: 10mM Tris/HCl (pH 8,55); 25mM KCl; 5mM (NH₄)₂SO₄; 2mM MgSO₄; 0,1mM de dNTP; 20 ng de cada um dos oligonucleotídeos; 1 µg de DNA genômico e 0,5 unidades da enzima polimerase PWO (Roche).

O equipamento de PCR utilizado foi Mastercycler gradient (Eppendorf-Hamburgo/Alemanha). Para a amplificação de genes para clonagem com a enzima PWO, este equipamento foi programado da seguinte forma: 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 min num total de 35 ciclos. Durante os experimentos preliminares, para se otimizar as condições destas reações e para “PCR de colônias”, utilizou-se a enzima Taq polimerase em vez da PWO. Os oligonucleotídeos desenhados para amplificar

fragmentos de DNA foram produzidos pela Pharmacia Biotech, que também fornece sugestões de diferentes temperaturas ótimas de anelamento, calculadas de acordo com a composição dos oligonucleotídeos utilizados na reação.

PCR de colônias

Protocolo rotineiramente utilizado no Departamento de Genética do Nizo Food Research (Kleerebezem, Comunicação Pessoal), encontra-se detalhadamente descrito a seguir. Para realizar desta técnica, colônias (possíveis transformantes) foram coletadas com palitos e repicadas em meio M17 líquido (para cultivo e extração do DNA plasmidial) e em um tubo *ependorf* (tubo plástico para reação de PCR). Esses foram levados a um forno de microondas por 3 minutos na potência máxima. Nos *ependorf* adicionou-se a mistura de reagentes para a reação de PCR juntamente com dois oligonucleotídeos, sendo que um deles deveria se ligar ao fragmento DNA clonado e outro em alguma região plasmídeo.

Essa técnica foi utilizada para a caracterização direta de clones recombinantes, em especial, no caso de *S. thermophilus*, cujas manipulações genéticas foram muito trabalhosas. Porém esta técnica foi posteriormente confirmada por mini-preparações de DNA plasmidial para se realizar um perfil de digestão com enzimas de restrição e, subsequente, seqüenciamento.

3.10.3. Seqüenciamento de DNA

As seqüências dos fragmentos inseridos em diferentes vetores e/ou plasmídeos foram determinadas utilizando-se o seqüenciador automático ALFred (Automatic Laser Fluorescent DNA Sequencer da Pharmacia Biotech, Roosendaal, Holanda). Neste método realizam-se quatro reações e os fragmentos obtidos são separados em 4 canaletas adjacentes; os fragmentos marcados (com Cy5 marcador universal e reverso) migraram através do gel, sendo excitados por meio de um raio laser; a luz emitida é detectada, gerando uma imagem do gel e das bandas. Um programa acoplado a este instrumento fornece a seqüência de bases nitrogenadas do fragmento seqüenciado. As reações de

seqüenciamento foram realizadas com um Kit comercial (Autoread Sequencing, Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante.

O vetor comercial pGEM[®]-T (Figura 3.1, Anexo 1) foi utilizado para a clonagem de produtos de reações de PCR, segundo as recomendações dos fabricantes. Células competentes de *E. coli* foram transformadas com os plasmídeos construídos e os fragmentos clonados foram, então, seqüenciados e analisados.

3.10.4. Programas e web sites consultados

As seqüências de DNA foram analisadas com o auxílio do programa CLONE (Clone Manager, versão 4.0 para Windows), que também foi utilizado para construir todos os plasmídeos apresentados, verificar os sítios de restrição, planejar as digestões, clonagens, procurar por ORF, proteínas, etc. Para se verificar a homologia com outros genes, foram utilizados os programas EMBL/Genbank e BLAST (Altschul *et al.*, 1997). O método CLUSTALW (Higgins, 1989) foi usado para comparação entre diversas seqüências de proteínas ou aminoácidos por meio de múltiplos alinhamentos. Para informações sobre enzimas, genomas e seqüências os seguintes web sites foram consultados:

- * Página da Universidade de Groeningem com links para sites interessantes de genética e bactérias lácticas: <http://molgen.biol.rug.nl/molgen/index.htm>
- * Para BLASTS: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> ou <http://www.blast.genome.ad.jp/>
- * Para alinhamentos: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>
- * Para informação sobre enzimas: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/enzyme-search-ec> e/ou <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- * Genoma de *S. thermophilus* – UCL/Bélgica: <http://www.biol.ucl.ac.be>
- * Genoma de *L. lactis* – INRA/França: <http://www.spock.jouy.inra.fr>

3.11. Estudo da função do gene *glyA* de *S. thermophilus*.

A interrupção do gene *glyA* em *S. thermophilus* foi realizada com a finalidade de estudar a sua função. Para tal procedimento duas técnicas foram utilizadas:

(1) O protocolo estabelecido por Maguin *et al.* (1996), onde foi utilizado o vetor pG⁺host9 (Figura 3.2, Anexo 1) que contém um replicon termossensível. Nesta técnica, ocorre a interrupção do gene de interesse, quando a temperatura passa de 28°C para 42°C e para que este vetor possa se replicar ele deve se integrar ao cromossomo no locus do gene em questão.

(2) O protocolo desenvolvido para *L. lactis* por Leenhouts *et al.* (1996), onde foi usado o vetor pORI280 (Figura 3.3; Anexo 1). Esta técnica visa promover a retirada de um determinado gene por meio de uma recombinação homóloga dupla, tendo sido utilizada com sucesso em *L. lactis* e *E. coli*.

Para a confirmação da integração do plasmídeo construído no correto locus do gene *glyA*, foi realizada hibridização pelo método de Southern Blot. Utilizou-se um fragmento do gene *glyA* como uma sonda marcada com o sistema Dig.

A seguir, as linhagens mutantes foram caracterizadas; inicialmente, estes microrganismos foram cultivados em leite e/ou em LM17, nas condições descritas no item 3.3. e depois os seguintes parâmetros foram avaliados: (1) produção de acetaldeído; (2) atividade TA, (3) produção de ácido fólico e (4) crescimento, pela medida da densidade óptica (OD_{660nm}) e da curva de pH (produção de ácido láctico).

3.12. Identificação do gene *glyA* de *S. thermophilus*

Com a finalidade de se isolar o gene *glyA* de *S. thermophilus*, duas estratégias foram seguidas, cujas metodologias estão descritas a seguir:

(1) **Técnica tradicional.** Por meio da técnica de hibridização *Southern Blotting*, um fragmento interno do gene *glyA* foi marcado com o sistema fluorescente Dig, a fim de ser utilizado como uma sonda para a identificação do gene *glyA* no cromossomo de *S. thermophilus*. O DNA cromossômico foi digerido com as seguintes enzimas de restrição:

AluI, *Sau3A*, *RsaI*, *TaqI*, *HpaII*, *EcoRI*, *HincII*, *ClaI* e *HindIII*, por cerca de 16h a 37°C, sendo selecionadas as enzimas que, após a digestão, resultassem em fragmentos (contendo o gene *glyA*) com cerca de 5kb.

A digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* produziu fragmentos do tamanho desejado. As bandas com cerca de 5kb foram excisadas do gel de agarose (na realidade foram cortadas quatro fatias de gel em torno da banda de 5kb) e cada banda foi eluída isoladamente. Utilizando-se uma técnica de hibridização *Dot Blotting*, foi determinada a banda que continha o gene *glyA*.

Procedeu-se à ligação desta banda no vetor comercial pUC19 (Figura 3.4, Anexo 1) e, posteriormente, transformaram-se células competentes de *E. coli* com esta mistura de ligação. Os clones transformantes (colônias brancas) que cresceram em meio ágar seletivo YT suplementado com ampicilina, foram transferidos para tubos de ensaio contendo caldo seletivo YT com ampicilina e incubados por 16h sob agitação. Após este período, foi realizada a extração de DNA plasmidial destes transformantes e, em seguida, foram realizadas as digestões com as enzimas de restrição *EcoRI* ou *HindIII*. O DNA digerido foi, então, submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% e as bandas transferidas para uma membrana de náilon. Foi, então, realizada a hibridização com uma sonda marcada com o fragmento interno do gene *glyA* para se identificar o clone desejado (ou seja, colônia de *E. coli* contendo o vetor pUC ligado a fragmento com o gene *glyA*). Este clone foi seqüenciado usando-se oligonucleotídeos universais para pUC19.

(2) **PCR Inverso.** Este protocolo é rotineiramente utilizado no Departamento de Genética do NIZO Food Research (Kleerebezem, Comunicação Pessoal) onde é conhecido como “*Inverse PCR*” e encontra-se detalhadamente descrito a seguir. Nesta técnica 10µg de DNA cromossômico foram digeridos por 16h a 37°C, usando-se 10 unidades das diferentes enzimas: *AluI*, *Sau3A*, *RsaI*, *TaqI*, *HpaII*, *EcoRI*, *HincII*, *ClaI* e *HindIII*. Esta digestão foi realizada na presença de BSA (0,1 mg/mL). O DNA digerido foi precipitado com etanol e suspenso em 30 µL de água bidestilada. As enzimas de restrição foram inativadas por tratamento térmico. O DNA foi ligado por meio da enzima T₄ DNA ligase (para promover a

circularização) por 16h a 12°C em um volume final de 40 µL (a mistura de ligação permaneceu diluída para facilitar a circularização). Este DNA circular foi precipitado com etanol e suspenso em 10 µL de água bidestilada. Procedeu-se uma reação de PCR utilizando-se 5 µL deste DNA circular, e os oligonucleotídeos (ACC3' e ACC4') foram desenhados com base na sequência conhecida do fragmento interno do gene *glyA* para amplificar o fragmento em direção a extremidade do mesmo, o inverso de que seria em um PCR normal e por esta razão o nome, "PCR inverso". O produto desta reação foi monitorado em gel de agarose, em seguida purificado, e inserido no vetor comercial pGEM®-T para seqüenciamento.

3.13. Construções plasmidiais

Foram construídos diferentes plasmídeos com a finalidade de: (1) promover a complementação das linhagens onde o gene *glyA* foi interrompido e (2) obter a superexpressão do gene *glyA*, visando a uma possível superprodução de acetaldeído.

Como as manipulações genéticas com *S. thermophilus* são muito trabalhosas, desde um simples isolamento de DNA plasmidial a uma digestão com enzimas de restrição, as construções foram obtidas, inicialmente, em *E. coli* e/ou *L. lactis*. Em *E. coli* e/ou *L. lactis* a estrutura das diferentes construções foram verificadas por meio de um perfil de digestão com diferentes enzimas de restrição (uma delas foi usada para linearizar o plasmídeo e duas outras para digeri-lo separando o fragmento clonado do vetor), os produtos foram conferidos em gel de agarose 1% e, então, o fragmento clonado foi seqüenciado. Após esta avaliação, as construções foram cultivadas em grande escala (200mL) em *E. coli*; o DNA plasmidial extraído e purificado com o *kit* JetStar columns (Genomed GmbH, Alemanha). Caso necessário este plasmídeo ainda passou por um tratamento com fenol e clorofórmio para retirar proteínas e/ou outras impurezas. Células competentes das linhagens NIZOB130 e AO54 de *S. thermophilus* foram transformadas por meio de eletroporação com o plasmídeo puro e em altas concentrações variando de 1 a 10µg. Os clones de *S. thermophilus* foram avaliados, inicialmente, por "PCR de colônias" seguidos por extração de DNA plasmidial e perfil de digestão e seqüenciamento do fragmento clonado.

3.13.1. Construções plasmidiais derivadas do pNZ8148 (NICE SYSTEM[®])

O Sistema NICE (NICE SYSTEM[®]) desenvolvido e patenteado pelo NIZO Food Research (Kuipers *et al.*, 1997) foi utilizado para verificar a possibilidade de superexpressão dos genes *glyA* provenientes de linhagens de *B. subtilis*, de *S. thermophilus* e de *L. lactis*.

- O gene *glyA* de linhagens de *B. subtilis* foi amplificado, utilizando-se os oligonucleotídeos ACC10 e ACC11; o de *S. thermophilus* com ACC12 e ACC13 e o de *L. lactis* usando os ACC14 e ACC15. Todos os oligonucleotídeos desenhados continham seqüências que possibilitaram a digestão com as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI* (ou *RcaI*);
- O vetor pNZ8148 (Figura 3.5, Anexo 1) foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *XbaI* e os diferentes genes *glyA* com *NcoI* e *BamHI*. Após digestão, os fragmentos foram colocados em gel de agarose 1%, separados e, subsequëntemente, purificados. Os diferentes genes *glyA* foram inseridos no pNZ8148 sob o controle do promotor de nisina (P_{Nis}) por meio de uma reação de ligação por 12h a 12°C, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase;
- Células competentes da linhagem NZ9000 de *L. lactis* foram transformadas por meio de eletroporação com esta mistura de ligação e, em seguida, plaqueadas em meio ágar GM17 com cloranfenicol;
- Após a incubação a 30°C por 48h, as colônias foram transferidas, uma a uma para tubos de ensaio com caldo de GM17 e incubadas por 24h a 30°C.
- O DNA plasmidial foi extraído e conferido por meio de um perfil de digestão e, subsequëntemente, pelo seqüenciamento.
- As linhagens de *L. lactis* mutantes foram cultivadas em caldo GM17 com cloranfenicol por 16h a 30°C.
- Após crescimento por este período, as culturas foram diluídas vinte vezes em GM17 e incubadas até atingirem densidade óptica $D.O._{660nm} = 0,5$

- Quando as culturas atingiram densidade óptica D.O. $_{660\text{nm}} = 0,5$ procedeu-se à indução com diferentes concentrações de nisina, tais como: 0; 0,01; 0,1; 0,5; 1 e 5 $\eta\text{g/mL}$;
- Após a adição de nisina, as culturas foram mantidas a 30°C por cerca de 1:45h;
- Determinou-se a densidade óptica e as células foram coletadas por meio de centrifugação (4°C/4500rpm/10min);.
- As células precipitadas foram suspensas em solução tampão fosfato e lisadas, utilizando-se uma prensa francesa com pressão constante;
- As paredes e restos celulares foram removidos por centrifugação (4°C/4500rpm/10min);
- Os extratos intracelulares foram utilizados nas determinações das atividades enzimáticas como descrito nos itens 3.6. e 3.7. Esses extratos também foram submetidos à eletroforese (Laemmli, 1970), sendo possível observar a superprodução da enzima em géis de poliacrilamida (SDS PAGE). O padrão de massa molecular utilizado nos géis de poliacrilamida foi BenchMark™ Protein Ladder (GibcoBRL/Life Technologies).

3.13.2. Construção de plasmídeos para complementação

Com a finalidade de se promover a complementação das linhagens onde o gene *glyA* foi interrompido, foram construídos os plasmídeos nos quais o gene *glyA* de *S. thermophilus* foi inserido sob o controle de diferentes promotores fortes nos vetores pACC1 (Figura 3.6, Anexo 1). e pJIM2246 (Figura 3.7, Anexo 1). O pACC1 é uma construção derivada do pNZ8148 onde o promotor da nisina foi trocado pelo promotor da enzima lactato desidrogenase.

3.13.3. Construções de plasmídeos para expressão do gene *glyA*

Com a finalidade de se promover a superexpressão do gene *glyA* e verificar o seu impacto na produção de acetaldeído, diferentes fragmentos de DNA contendo este gene

foram amplificados e clonados em diferentes plasmídeos, sob o controle de diferentes promotores.

Os seguintes pares de oligonucleotídeos foram desenhados com o objetivo de se amplificar a região promotora do gene *glyA* (caso exista):

- ✓ ACC16 & ACC17: para amplificar um fragmento de 1500pb contendo o gene *glyA* e mais 300pb acima do início do gene;
- ✓ ACC18 & ACC19: para amplificar fragmento com 1800pb contendo o gene *glyA* e mais 600pb acima do RBS (sítio de ligação do ribossomo).

Esses produtos de PCR foram purificados, digeridos com as enzimas de restrição *PstI* e *XhoI* e inseridos no vetor pNZ273 (Figura 3.8, Anexo 1), previamente digerido com as mesmas enzimas. Este vetor pNZ273 não apresenta uma região promotora e só expressa os genes caso tenham suas próprias regiões promotoras.

Os oligonucleotídeos ACC20 e ACC21 foram desenhados para amplificar um fragmento o gene *glyA*, iniciando no RBS. O produto desta reação de PCR foi purificado, digerido com as enzimas de restrição *PstI* e *XhoI* e inserido nos vetores pNZ275 (Figura 3.9, Anexo 1) e pNZ276 (Figura 3.10, Anexo 1) contendo, respectivamente, os promotores USP45 (P_{USP45}) e LacA (P_{LacA}). Procedeu-se à ligação destes fragmentos nos diferentes vetores por meio da enzima T4 DNA ligase e estas misturas de ligação foram utilizadas para transformar células competentes de *E. coli*. Para, posteriormente, transformar células competentes de *S. thermophilus* com esses plasmídeos avaliados e purificados.

A caracterização destas linhagens mutantes foi realizada cultivando-as em meio LM17 suplementado com cloranfenicol, por 24h a 42°C e avaliando-se: (1) a atividade treonina aldolase (TA); (2) a queda do pH do meio, monitorado continuamente por um microprocessador do tipo *pH/ION Metro* (MTW, Weiheim, Alemanha); (3) o crescimento microbiano determinado por meio de contagem de células viáveis, retirando-se amostras ao longo do período de incubação, diluindo e plaqueando em profundidade em M17 ágar. As placas foram incubadas por 48h a 42°C e as bactérias contadas e expressas como o log de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) e (4) a produção de acetaldeído e de ácido fólico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho desta tese foi dividido em duas partes: na primeira a enzima treonina aldolase de *S. thermophilus* foi estudada e caracterizada e na segunda essa enzima foi manipulada geneticamente, com a finalidade de avaliar o impacto na produção de acetaldeído e ácido fólico. A Figura 4.1 mostra um esquema geral desse trabalho com as principais etapas e resultados. A manipulação genética consistiu na: (1) superexpressão do gene que codifica a enzima treonina aldolase de *S. thermophilus* em diferentes organismos sob o controle de diversos promotores (Figura 4.2) e (2) interrupção deste gene para estudar sua função (Figura 4.3).

4.1. Avaliação da produção de acetaldeído por *S. thermophilus*

A produção de acetaldeído foi avaliada em todas as linhagens de *S. thermophilus* da coleção do NIZO Food Research após 20h de crescimento em leite, com e sem a adição de L-treonina (10mM e 25mM). Foi observado que aumentando a quantidade de L-treonina adicionada no meio de crescimento, aumentava-se proporcionalmente a produção de acetaldeído (Figura 4.4), exceto no caso das linhagens NIZOB103 e NIZOB129, nas quais não foi detectada a produção de acetaldeído.

Com esse experimento foi possível constatar que a taxa de indução da treonina depende da linhagem e a produção de acetaldeído foi regulada pela presença deste aminoácido no meio de crescimento. Esses resultados sugerem que a treonina tenha envolvimento na regulação da atividade da enzima treonina aldolase, como já havia sido previamente indicado por outros pesquisadores, tais como Lees & Jago (1978), Shankar (1977) e Wilkins *et al.*, (1986a).

É interessante observar que nas linhagens NIZOB103 e NIZOB129, também foram observadas as menores taxas de produção de ácido fólico entre todas as linhagens de *S. thermophilus* da coleção do NIZO Food Research (Woulters *et al.*, 2002). O ácido fólico atua como cofator da enzima SHMT (Blakey, 1969).

Produção de acetaldeído pelas linhagens de *S. thermophilus* da coleção do NIZO Food Research em leite com e sem adição de treonina



Treonina esta envolvida na regulação da atividade da Treonina Aldolase (TA)

Atividade TA : treonina ⇔ acetaldeído + glicina

Correlacionou-se a formação de acetaldeído durante fermentação com a atividade TA



Constatada a importância da atividade TA na produção de acetaldeído em *S. thermophilus*

Enzima treonina aldolase em *S. thermophilus* refere-se:

à enzima EC4.1.2.5. (gene *ItaI*) ou à EC2.1.2.1. (gene *glyA*) ??



Foi possível amplificar por PCR o gene *glyA*, porém não o gene *ItaI* porque ou ele tem uma sequência diferente das enzimas TA de outros organismos já sequenciados ou esse gene não existe em *S. thermophilus*

Desenharam-se oligonucleotídeos degenerado

com base no alinhamento de sequência de GlyA de diferentes organismos



Reação de PCR



amplificou-se fragmento interno de gene *glyA* com 550pb



Interrupção do gene *glyA*

Para estudar a função deste gene



Obtenção a sequência completa do gene *glyA*

Para superexpressão em *S. thermophilus*

Interrupção do gene *glyA*



- ✓ Extinção da atividade de TA
- ✓ Drástica redução na formação de acetaldeído
- ✓ Redução de 6 vezes no crescimento dos mutantes



Superexpressão do gene *glyA* em *S. thermophilus*



- ✓ Aumento na atividade de TA
- ✓ Aumento na formação de acetaldeído
- ✓ Aumento na produção de ácido fólico

OS RESULTADOS SUGEREM:

- ⚡ Em *S. thermophilus*, a enzima SHMT possui a atividade de TA
- ⚡ SHMT é fundamental na formação de acetaldeído durante a fermentação de leite
- ⚡ Será possível controlar e aumentar a produção de acetaldeído na fabricação de iogurte

Figura 4.1. Esquema geral deste trabalho com as principais etapas e resultados obtidos.

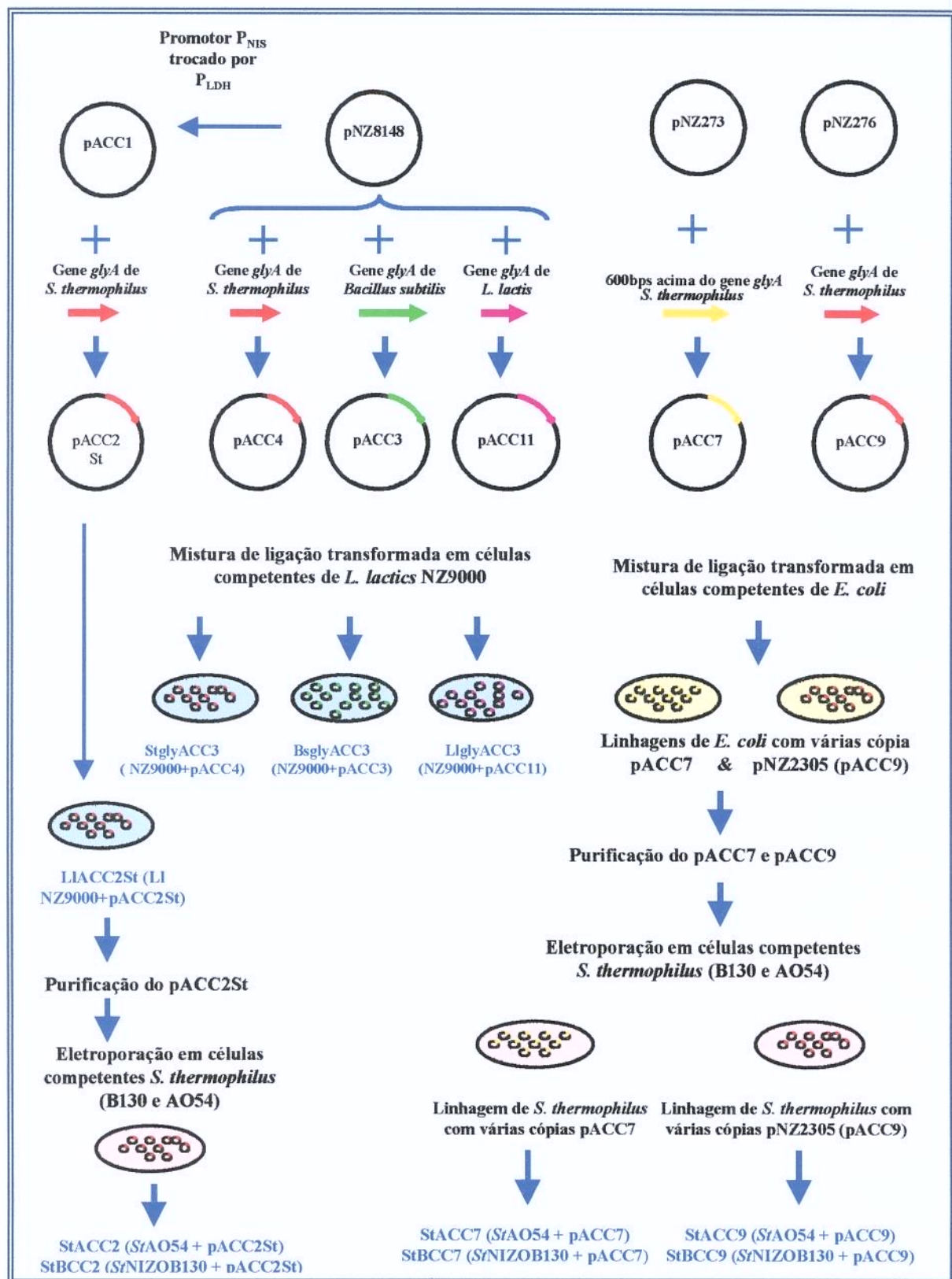


Figura 4.2. Esquema geral da estratégia utilizada para superexpressão do gene *glyA* em *S. thermophilus*

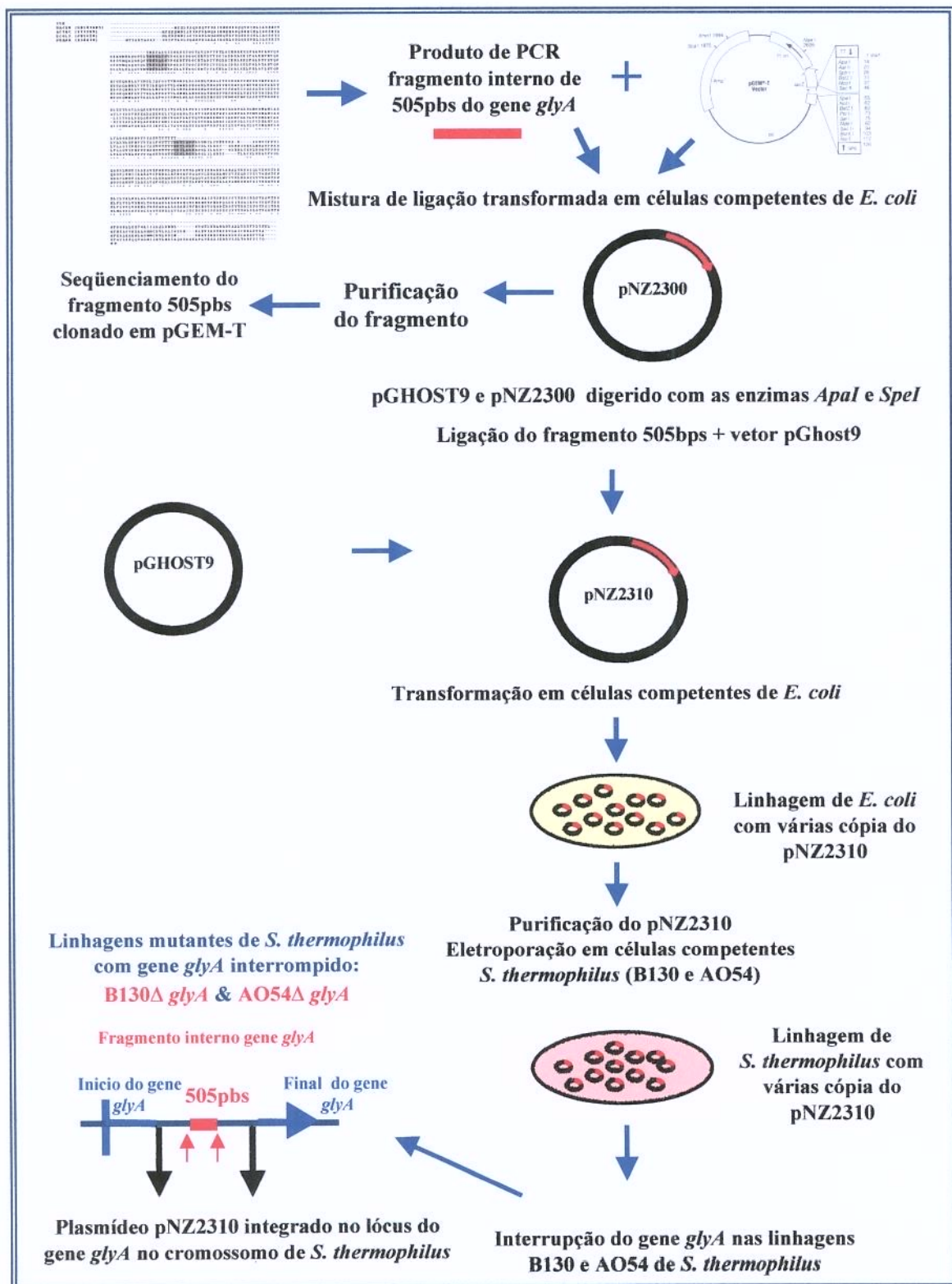


Figura 4.3. Esquema geral da estratégia utilizada para interrupção do gene *glyA* em *S. thermophilus*

4.2. Caracterização da enzima treonina aldolase de *S. thermophilus*

O comportamento da atividade de treonina aldolase (TA) proveniente de duas linhagens de *S. thermophilus*, NIZOB130 e NIZOB103 (respectivamente, com maior e com menor produção de acetaldeído) foi estudado. Com este experimento, foi possível verificar que essa enzima possui um comportamento linear com o tempo de reação, ou seja, o aumento da atividade treonina aldolase foi proporcional ao tempo em que as amostras permaneceram incubadas a 42°C. A Figura 4.5 ilustra o comportamento linear da enzima com o tempo de reação nas linhagens NIZOB130 e NIZOB103.

A atividade enzimática de treonina aldolase foi avaliada durante o cultivo das linhagens de *S. thermophilus* em LM17. Verificou-se que ela aumentou ao longo da fase exponencial de crescimento e foi estabelecido que o final da fase exponencial de crescimento era o melhor momento para a determinação da atividade TA, uma vez que neste ponto observou-se a maior atividade desta enzima.

4.2.1. Avaliação da enzima treonina aldolase submetida ao congelamento

Com o objetivo de realizar experimentos com diversas amostras (a fim de permitir a comparação entre os resultados) e como a preparação dos extratos enzimáticos é trabalhosa e demorada, foi estudado o comportamento da atividade TA frente ao congelamento com nitrogênio líquido e armazenamento a -80°C.

Observou-se que este congelamento provocava um decréscimo em torno de 10% na atividade enzimática, quando comparada às amostras recém-preparadas. Deste modo foi possível planejar experimentos com o número desejado de amostras, uma vez que todos os extratos eram preparados e congelados nas mesmas condições e, portanto, sofreriam o mesmo decréscimo na atividade enzimática.

4.3. Estudo da relação entre a produção de acetaldeído e atividade TA

A atividade enzimática da treonina aldolase foi determinada em dez linhagens de *S. thermophilus*. Estudando-se a relação entre a produção de acetaldeído e a atividade da treonina aldolase, constatou-se que as linhagens com baixa atividade enzimática produziram pouco ou não produziram acetaldeído durante a fermentação, enquanto aquelas com alta atividade TA também foram as maiores produtoras de acetaldeído.

Foi possível estabelecer uma relação direta entre a produção de acetaldeído durante a fermentação e a atividade enzimática treonina aldolase (Figura 4.6). Estes resultados deram suporte para dar início à etapa seguinte, a manipulação genética. Para as modificações genéticas, foram escolhidas duas linhagens de *S. thermophilus*: NIZOB130, por ter a maior atividade de treonina aldolase e também ser a maior produtora de acetaldeído e AO54, por ser facilmente transformável.

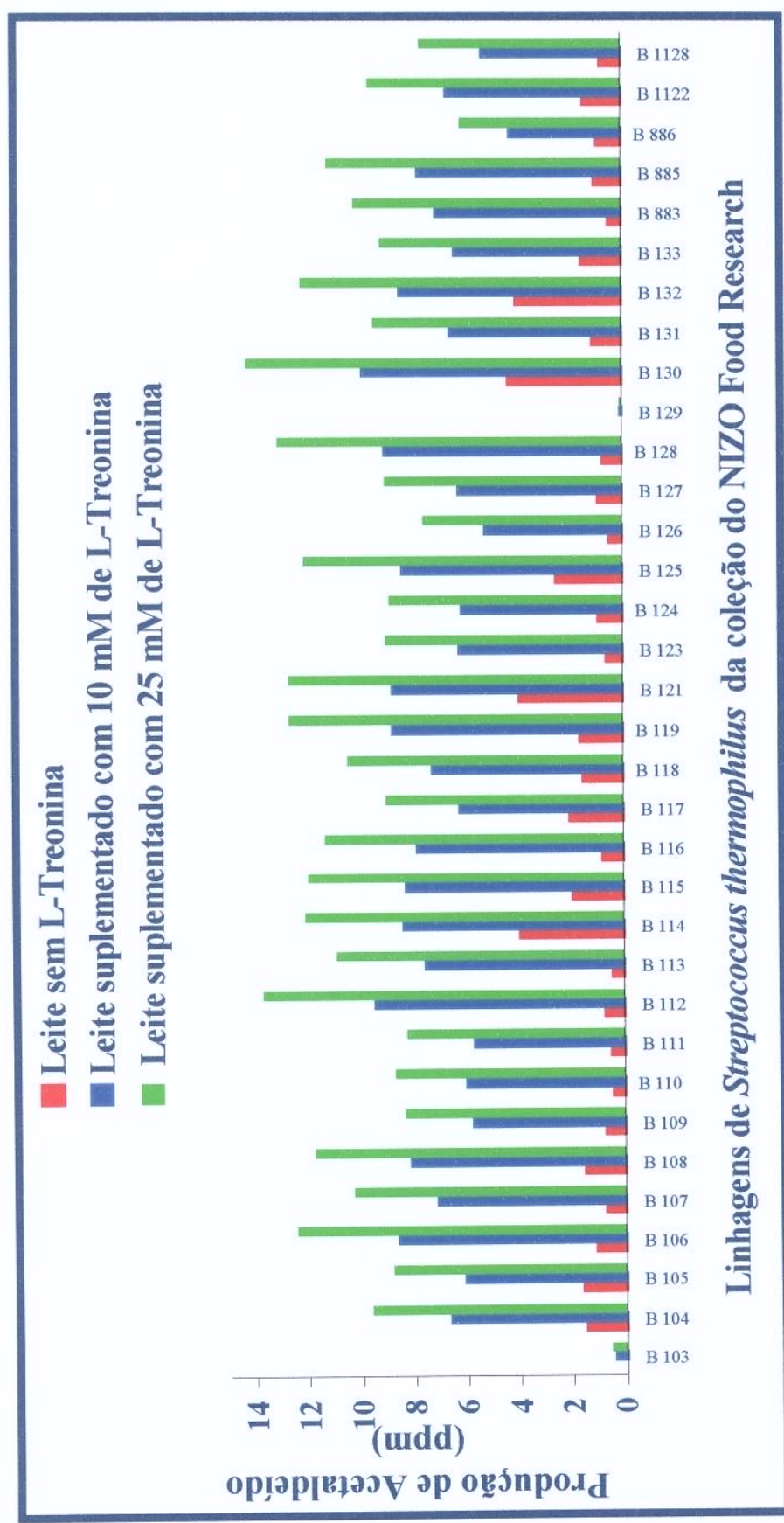


Figura 4.4. Determinação da produção de acetaldeído nas linhagens de *S. thermophilus* da coleção do NIZO Food Research (todas estas linhagens da coleção tem NIZO nos seus nomes) em leite com e sem a suplementação de L-treonina (10mM e 25mM).

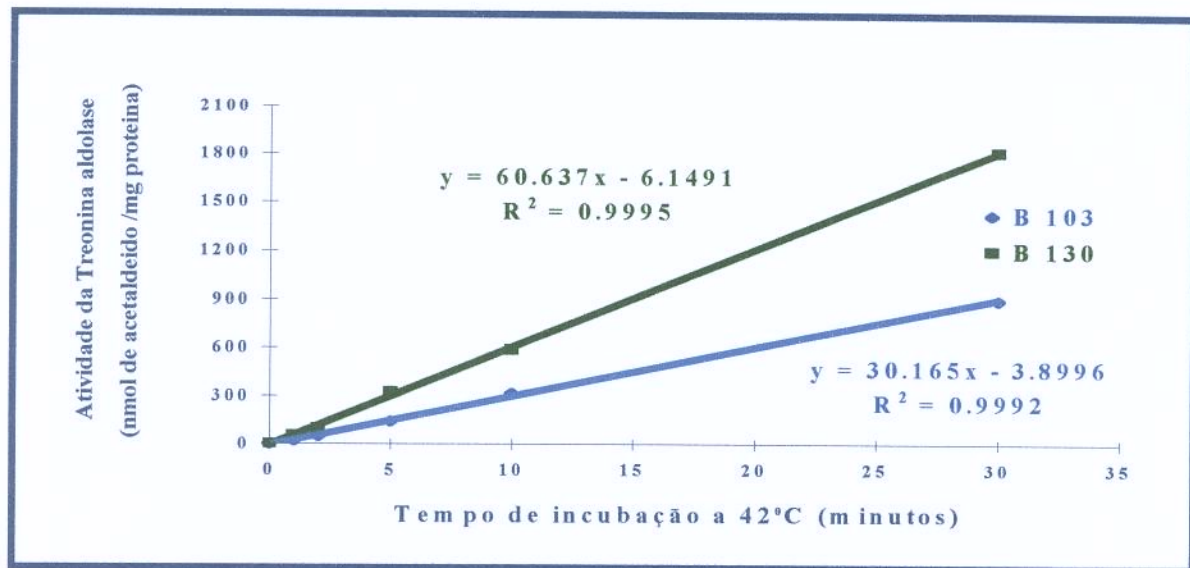


Figura 4.5. Comportamento da enzima treonina aldolase nas linhagens B103 (=NIZOB103) e B130 (=NIZOB130) com o tempo de reação. Ao lado de cada uma das retas encontram-se a sua equação e o coeficiente de correlação (R^2).

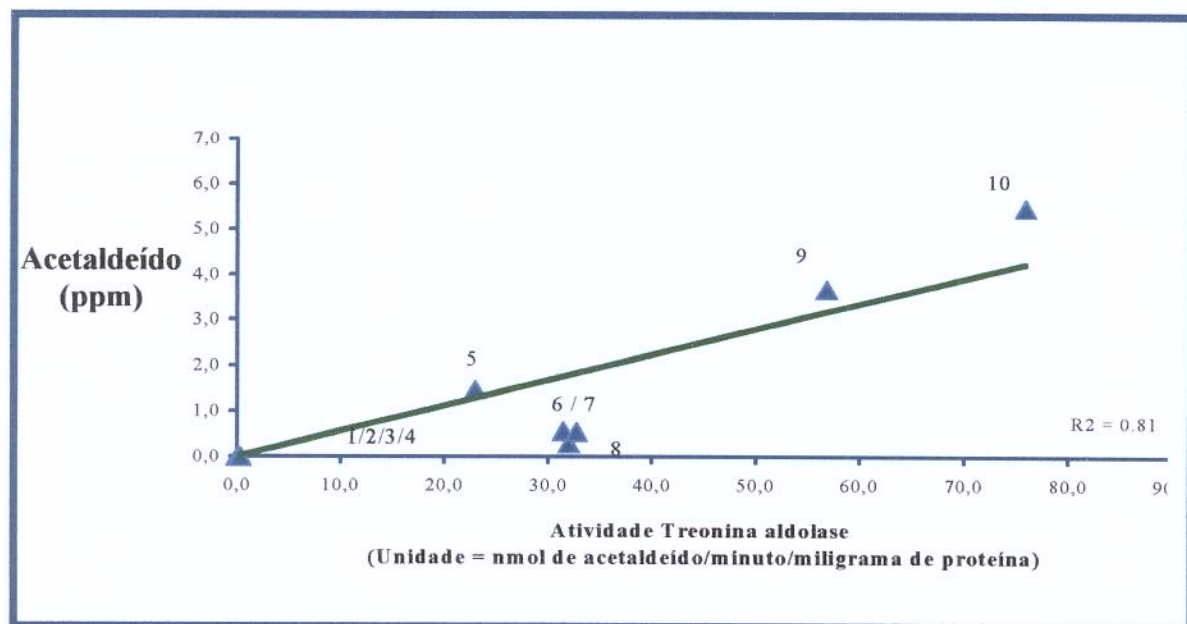


Figura 4.6. Relação entre a produção de acetaldeído em meio LM17 a 42°C e a atividade enzimática TA em 10 linhagens de *S. thermophilus*. Onde os números: 1 = NIZOB103; 2 = NIZOB129; 3 = B130DgLyA; 4 = AO54DgLyA; 5 = NIZOB125; 6 = AO54-T; 7 = NIZOB1122; 8 = AO54; 9 = NIZOB130; 10 = NIZOB130 e T indica suplementação com 25mM de treonina.

4.4. Identificação do gene que codifica a enzima treonina aldolase

Durante a revisão de literatura a respeito da enzima treonina aldolase em bactérias lácticas, foi constatada uma falta de consenso com relação à sua nomenclatura, uma vez que algumas publicações referiam-se à treonina aldolase como a enzima EC.2.1.2.1. e outras como a EC.4.1.2.5. Devido à duplicidade da nomenclatura e por não existir informação disponível na literatura, no início deste trabalho não se sabia qual destas duas enzimas encontrava-se presente em *S. thermophilus* e, portanto, tentou-se identificar o gene *ItaE* que codifica a verdadeira treonina aldolase (EC.4.1.2.5.).

Por meio de um múltiplo alinhamento (Figura 4.7), realizado com o auxílio do programa CLUSTAL W observou-se uma grande variação nas seqüências de aminoácidos que codificam a enzima treonina aldolase em bactérias. Os oligonucleotídeos degenerados desenhados para amplificar uma parte interna do gene *ItaE* tinham um grau de degeneração considerável (pois não existe uma região bem conservada entre as diferentes seqüências). Inúmeras reações de PCR foram realizadas e diversas condições testadas mas, não foi possível amplificar o gene *ItaE*.

Em 2001, quando cerca de 95% do seqüenciamento do genoma de *S. thermophilus* já havia sido concluído e disponibilizado para consulta na Internet, realizou-se uma pesquisa, utilizando-se o programa BLAST, procurando por homologia com alguma das seqüências conhecidas de treonina aldolase. Não foi encontrada homologia significativa para nenhuma delas, resultados estes também confirmados por Pascal Hols, coordenador do projeto genoma de *S. thermophilus* e que tem acesso a toda a seqüência deste microrganismo, inclusive regiões ainda não disponíveis para domínio público (Comunicação pessoal, 2001). A partir destes resultados conclui-se que, ou a enzima treonina aldolase não existe neste microrganismo ou é muito distinta das enzimas já seqüenciadas até o presente momento.

Por outro lado, uma região interna com 505pb do gene *glyA*, que codifica a enzima serina hidroximetil transferase (EC.2.1.2.1.), foi prontamente amplificada por meio de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos degenerados que foram desenhados com base no múltiplo alinhamento com diferentes seqüências de aminoácido codificando esta enzima (Figura 4.8). Este múltiplo alinhamento apresenta algumas seqüências da SHMT de diferentes organismos, incluindo também a do fragmento interno de 505pbs do gene *glyA* de *S. thermophilus*. Por meio deste alinhamento foi possível observar que entre os diferentes genes *glyA* existem regiões extremamente bem conservadas nos mais diversos organismos (os oligonucleotídeos foram desenhados nestas regiões).

Com o objetivo de isolar este gene *glyA* da linhagem NIZOB130 de *S. thermophilus*, por meio da técnica de hibridização *Southern Blot*, um fragmento interno do gene *glyA* foi marcado com digoxigenine, para ser utilizado como uma sonda. O DNA cromossômico de *S. thermophilus* foi digerido com 10 diferentes enzimas de restrição (16h a 37°C). As enzimas *EcoRI* e *HindIII* produziram fragmentos do tamanho desejado (5kb). Procedeu-se a ligação desta banda no vetor comercial pUC19. Células competentes de *E. coli* foram transformadas com esta mistura de ligação. Os clones transformantes (colônias brancas) foram selecionados por hibridização com uma sonda marcada e, subsequente avaliados. Após seqüenciamento dos fragmentos contendo o gene *glyA*, constatou-se que ambas as enzimas escolhidas cortavam a parte final deste gene, sendo possível somente o seu seqüenciamento parcial, cerca de 1000pb da parte inicial (Figura 4.9). O restante da seqüência deste gene poderia ser obtido repetindo-se esta técnica e utilizando-se, desta vez, outras enzimas de restrição, porém, como esta técnica é trabalhosa e demorada, optou-se por tentar “PCR inverso”, técnica pela qual foi obtido o restante da seqüência do gene *glyA* de *S. thermophilus*.

O gene *glyA* de *S. thermophilus* NIZOB130 foi amplificado por PCR e o produto desta reação foi clonado no vetor comercial pGEM-T para ser seqüenciado. A Figura 4.10 apresenta a seqüência completa do gene *glyA* de *S. thermophilus* NIZOB130 com 1248pb em uma ORF (*Open Reading Frame*). É interessante notar que esse gene apresentou uma altíssima homologia (constatada por meio do programa BLAST, comparação em termos de bases nitrogenadas) com o gene *glyA* de *Streptococcus pyogenes* (87% de identidade) e de *L. lactis* (89% de identidade).

Scerevisae	-----MTFELPPKY ITAANDLRSDTFTTPTAEMMEA-ALEASIGDAVYGEDVDTVRLRLE	53
Calbicans	-----MTADEE--ETFTTFNEFRSDTFTVPTRAMVEDGFMNATFGDSVYQEDDTLRLRLE	52
Tmaritma	-----MIDLRSDTVTRPSRAMLEA-MAAAPVGDVYGGDPTVNALQ	40
Pseudomona	-----MPVIDLRSDTVTQPTAGMREA-MAAAELGDDVYGEDPTVNRLE	42
Vcholeriae	-----MRIFVGENMDFRSDTFTQPTDAMRQA-MAQAPVGDVYGGDPTVNELE	47
Ajandei	-----MRYIDLRSDTVTQPTDAMRQC-MLHAELVGDVYGGDPTVNALE	42
Ecoli	-----MIDLRSDTVTKPTTEEMRKA-MAQAEVGDVYGGDPTVNELE	40
Bhalodur	-----MRQA-MAAEVGDVYGGDPTVNRLE	25
Dradiodur	-----MVCAMTRPPLIADLRSDTVTKPTPAMREA-MATAEVGDVYGGDPTVNALQ	50
Dmelanco	-----MT-THSVVDLRSDTVSQPTDKMRAR-MATAVVGDDVYGGDPTVNELE	45
Halobacter	MFRNVTGRMTFPPGGGCFMDILRSDTVATPTEAMREA-AAQAPVEHGEHGDPAVAAVE	59
Mloti	-----MNESKQTRPRGFTSDNIAGVSPVIAAITACASGQALPYGNDELTHTVE	49
Ccrescent	-----MTQTAPRYDFASDNVAGAMPEVMEALIAANAGTASGYGTDHVSRAAA	47
Scerevisae	QTVARMAGKEAGLFCVSGTLSNQIAIRTHLMQPPYSILCDYRAHVYTHEAGGLATLSQAM	113
Calbicans	SKMCEITGKPAALFCVSGTMSNQIGLRANLVQPPYSILCDYRAHVYTHEAGGLATLSQAM	112
Tmaritma	DYAAELSGKEAIFLPTGTQANLVALLSHC-ERGEYIVGQAHHNYLFEAGGAVALGSIQ	99
Pseudomona	AELARLGFAAALFVPTGTMNLLGLMAHC-ERGDEYIVGQAHTYKYEGGAVALGSIQ	101
Vcholeriae	QWAAERHGFEEALFTTSGTQANLLGLLAHC-ERGDEYLCGQAHHNYRYEAGGAVALGSIQ	106
Ajandei	AYGADLLGKEAALFVPSGTMNLLAVMSHC-QRGEAVLGSAHHYRYEAGGSVALGSIQ	101
Ecoli	RLAAETFGKEAALFVPSGTMNQSVAIHT-QRGEVILEADSHIFWYEVGMAVALGSIQ	99
Bhalodur	ERAELTGKEAALFVTSQTQNGQVAVATHC-VPGQEIILEADAHFLYEGGAVALGSIQ	84
Dradiodur	NELAAITGFEAGLFVPSGTMNQSVAIHT-RRGEVILEADSHIFWYEVGMAVALGSIQ	109
Dmelanco	ARTAAIFGKEAALFVPSGTMNLLAVMSHC-RRGEVILEADSHIFWYEVGMAVALGSIQ	105
Halobacter	ATAADAVGMAAAVFPSTRMANQIQAQVHT-ARGQSVLVERASHSYRRSGGLAQHAGVQ	118
Mloti	HQLAEVFEHADVFLVSTGSAANALALAAITPPWGSILSHADAHNRDECGAPEFTTAGA	107
Ccrescent	DRIRAAADADAQVRFTASGTAANAFALTLLAQPEHVALHEHAHICTDETGAPEFGGVQ	109
Scerevisae	VVPVPSNGDYLTLIEDIKSHYVDD--GD IHGAPTRLISLENTLH--GIVVPLEELVRK	169
Calbicans	VHEVRPSNGNYLTFEDVLGNVYDDGD IHAAPTKVISLENTLH--GIIPIIEELVRK	169
Tmaritma	PQPIDAAAGDTLPLDKVAMKIPDD--IHFAKTLKLSLENTIN--GKVLPREYLRKAW	153
Pseudomona	PQPIDGADGSLHLDKVAIAIKADD--HFHARTLLALENTMQ--GKVLPLDYLAAR	155
Vcholeriae	PQPIDNEPDGTLDFAKLKAATKIPDD--AHFAKTLKLSLENTIN--GKVLPLSYLAKAR	160
Ajandei	LQPVEMQADGSLALADVRAAIAFDD--VHFTPTRLVCLNTIN--GKVLPLPYLRMR	155
Ecoli	PHEVP--GKNGAMDPPDVRAIAIRPN--IHFPRTSLIAIENTHNRSGGRVPLENKEIC	155
Bhalodur	TYAIK--GTNGMFSAEQVRAIRPED--DHDDETGLICLIENTHNRAGGAVISPEQMKDVY	140
Dradiodur	PREVP--APLGVSPEDVRLAVRRS--VHQSPDTGLISLENTINRAGGTVIPLAVLRMR	164
Dmelanco	LATLKNEQDGTFSLQDLRRIRHED--CHEPITSLVVEQTHNICGGKVVPLAFLDELA	162
Halobacter	ARAFDGGGTGCTAEQVAEITAGG--GHRPEVGLACVLAHGANGGVVAFVDAFAAV	175
Mloti	KLVQLPGEAGKIDIDALANAMRMV--GD IHSVQPSVSIITQATEMGSVYALDEIKAIS	166
Ccrescent	GLIGLPGASGKMEALALEA-ALAQP--DVSYRQPAALSLTTATEYGTVYSEDHRLALI	163
Scerevisae	ANCMENG-----LKLHCDGARIWNAQAQSG--VPLKQYGEIFDSISICLSKSMGAPIG	220
Calbicans	EFCREND-----IRLHLDGARLWNASVATG--ISIKYCSYFDSVSLCLSKSLGAPIG	220
Tmaritma	EFTRENR-----LALHVDGARIFNAVVAAG--CELKEITQYCDSTICLSKGLTPVG	204
Pseudomona	AFTRRAG-----LALHLDGARLYNAAVKLG--VDASEITRHFDSVSVCLSKGLGAPVG	206
Vcholeriae	EFVVDQH-----LQLHLDGARVYNAVALD--VDVKEIAQYFDSITVCLSKGLAAPVG	211
Ajandei	ELVDEHG-----LQLHLDGARLFNAVVAAG--HTVRELVAFFDSVSVCLSKGLGAPVG	206
Ecoli	TIKEHG-----INVHIDGARLFNASIASG--VPVKEYAGYADSVMFCLSKGLCAPVG	206
Bhalodur	DVAKAYN-----VPVHLDGARLFHAAVALG--QPLSSPTQYTDVQVCLSKGLGAPVG	191
Dradiodur	AVADAEH-----LPLHLDGARVFNAAVKLG--VDVREITRCFTVSVCLSKGLGAPVG	215
Dmelanco	ALVRQPGVGTGNARIALHMDGARVFNAAATLG--VGVERICRDFS--VSICLSKGLSAPVG	219
Halobacter	ETAHEHD-----VPVHVDGTRVFSAAATLG--VDAATLLSEVDSVAVCLSTGLGAPMG	226
Mloti	HICRSAN-----LPLHMDGARFANALVTRCSPAEMTWKAGVDLVSFGATKNGTFFGVD	219
Ccrescent	APVKAKG-----YGVHLDGARLANAVAGG--FDLKSIAKMGVDILVMGTRAGSTPTE	214
Scerevisae	SVLVGNLKFVKKATHEFRKQGGGIRQSGMAR--MALVNIINNDWKSLLYSHSLAHELA	278
Calbicans	SVLVGDEKFIKANKHFKKQSGGGIRQAGIMSAA--MAITHAIDYN--LSKLELSHNYAKQIGD	277
Tmaritma	SLLVGNRDYIKRAIRWRKMTGGGMRQSGILAA--AGIYALRNNVARLQEDHDNAA--MAEQ	261
Pseudomona	SVLCGSVELIGKARRWRKMGGMQRQAGILAA--AGLYALDHQVARIADHDHANAARLDG	264
Vcholeriae	SLLLGSKDFIAKARRWRKMGGMQRQAGILAA--AGKLALTEQVMQLKTDHNDHARLALG	269
Ajandei	SLLVGSHAFIARARLRKMGGMQRQAGILAA--AGLFALQHVVRADDHRRARQLAEG	264
Ecoli	SVVVGDRTFIERARKKRLMGGMQRQAGVLA--AGI IALTVMVRLKEDHENARFLALK	264
Bhalodur	SILAGDASFIRARKWRKRLGGGWRQAGVLA--PALIALNTMVERLAEDHEHAKILADG	249
Dradiodur	SVLVGSAQAIRQAHRYRKLGGGMRQAGILAA--AARVALREGPARLADHRLTRRLARA	273
Dmelanco	SVLVGSKAFISEAHLRLKRLGGGMRQVGVLA--AGLVALDEVVPLLSKDHERTNKIANA	277
Halobacter	AVLAGSESVASARRVQEMYGGMQAGVMAA--AGVCALENR--HRVIEDHENARFLAED	283
Mloti	AVVSFRGDLASTIAFRQKRAQLSSKMRFMMAQMDGYLRDGVVLRNAVHANAMASALARG	279
Ccrescent	AVVFLNPDHAKRLDARLKHAGQLISKGRFLAAPVLGLLGENGQTAPWAARAAHANAMAQK	274

Figura 4.7. Múltiplo alinhamento com diversas seqüências de aminoácidos que codificam a enzima treonina aldolase (EC.4.1.2.5.). Onde Scerevisae = *Sacharomices cerevisiae*; Calbicans = *Caulobacter crescentus*; Tmaritma = *Thermotogaa maritma*; Pseudomona = *Pseudomonas aeruginosa*; Vcholeriae = *Vibrium cholerae*; Ajandei = *Aeromonas jandaei*; Ecoli = *Escherichia coli*; Bhalodur = *Bacillus halodurans*; Dradiodur; *Deinococcus raio*durans ; Halobacter = *Halobacterium* sp NRC-1; Mloti = *Mesorhizobium loti* e Ccrescent = *Caulobacter crescentus*. Para indicar similaridade entre as seqüências usou-se o * = quando todos os aminoácidos são iguais e : = para semelhança entre os diversos aminoácidos.

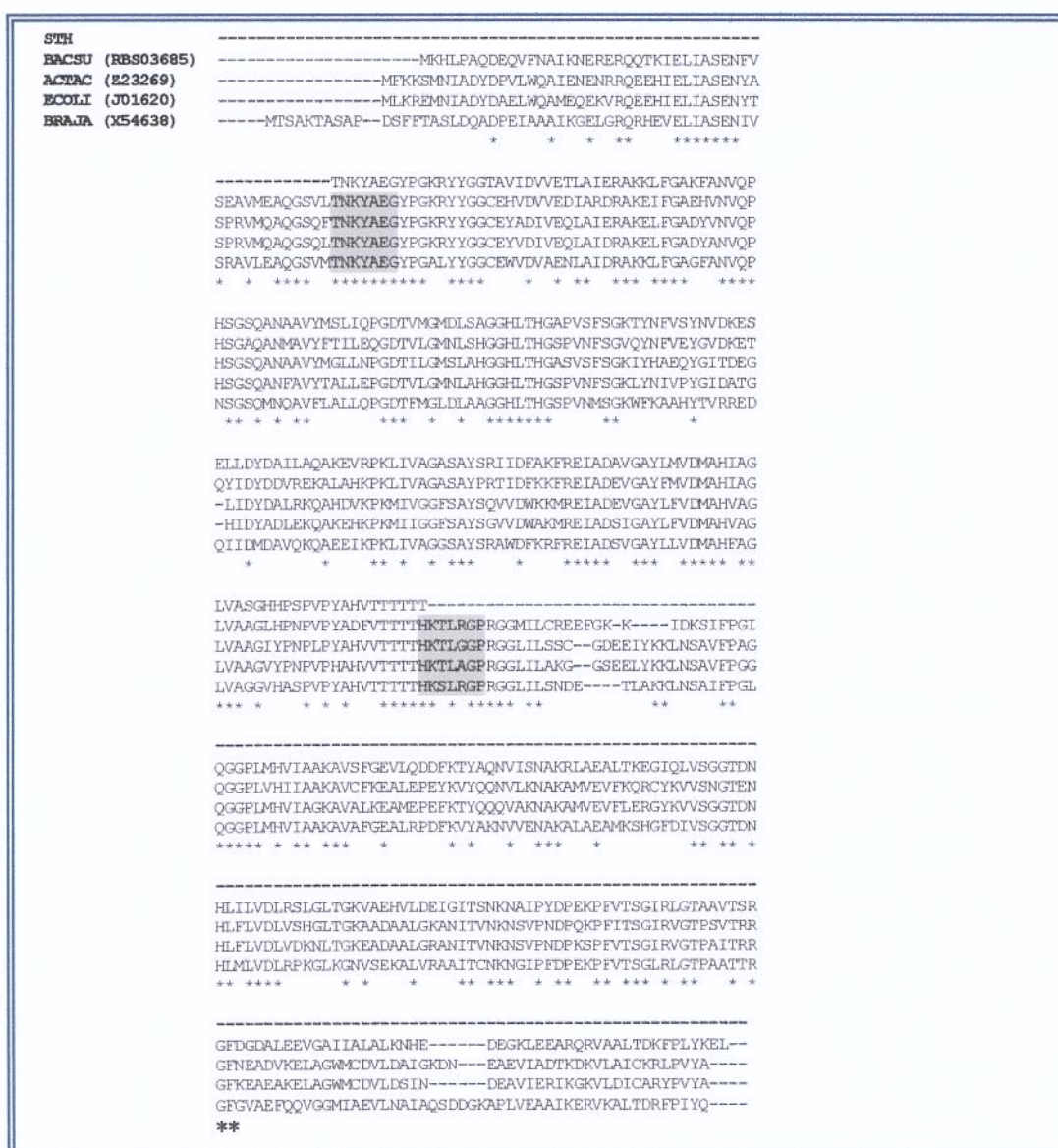


Figura 4.8. Alinhamento múltiplo com cinco diferentes seqüências de aminoácidos de GlyA. Onde STH = *S. thermophilus*, seqüência parcial (com 178 aminoácidos); BACSU = *Bacillus subtilis*; ACTAC = *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; BRAJA = *Bradyrhizobium japonicum* e ECOLI = *Escherichia coli*; * = indicam aminoácidos conservados entre todas as seqüências e as seqüência usadas para desenhar os oligonucleotídeos degenerados para obter o fragmento interno do gene *glyA* de *S. thermophilus* estão destacados em cinza.

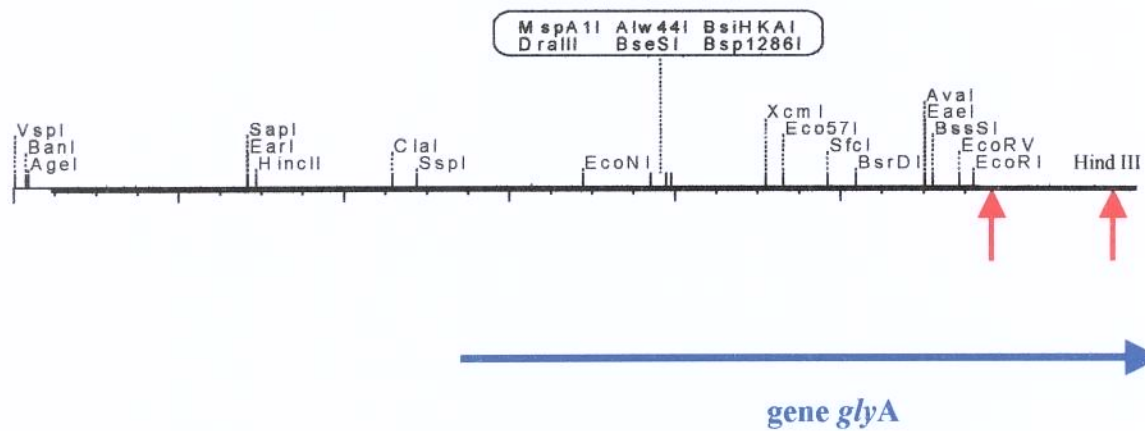


Figura 4.9. Sequência parcial do gene *glyA* de *S. thermophilus* com 1000pb da região inicial. As flechas vermelhas destacam os sítios onde as enzimas *EcoRI* e *HindIII* cortaram este gene.

```

tca AAG GAG acc tca ATG att ttt gat aaa gaa gat tac aaa gca ttt gac cct gaa cta tgg
aac gcc atc gat gct gag gca gaa cgc caa caa aat aat att gaa ttg att gcc tct gaa aac
gtg gtt tct aaa gcc gtt atg gct gct caa gga acg ctc ttg act aac aaa tac gca gaa ggc
tat cca ggt aaa cgt tac tat ggt ggt aca gcc gtt att gat gtg gtt gag act ctt gcc att
gaa cgt gct aag aaa ctt ttt ggg gta aaa ttt gct aac gtg caa cct cac tca ggt agc caa
gcc aat gct gct gtt tac atg tct tta atc caa cct ggt gat aca gtt atg ggg atg gat ttg
tca gcg ggt ggt cac ttg aca cat ggt gca cca gtt agt ttc tct ggt aag acc tat aac ttt
gtg tct tac aat gtt gat aag gaa agt gaa ctt ctt gat tat gat gct atc ctt gct caa gca
aaa gaa gtg aga ccc aaa ctt atc gtg gca ggg gct tca gca tac tca cgt atc att gat ttt
gct aaa ttc cgt gaa atc gct gat gct gta ggt gct tac ctc atg gta gat atg gct cac att
gca ggt ctt gta gcc tct ggt cat cat cca agt ccg gtt cct tat gca cat gtg aca act aca
aca acc cac aag aca ctt cgt gga cct cgt ggt ggt ttg att ttg act gat gat gaa gat atc
gct aag aaa ttg aat tct gcg gtc ttc cct ggt ttg caa ggt ggc cca ctg gaa cac gtt att
gct gcc aag gct gtc gct ctt aaa gaa gca ctt gac cct gcc ttt aag gaa tac ggt gaa aat
gtt atc aag aat gct gct gcc atg gcg gac gtt ttc aac caa cat cca gat ttc cga gta atc
tca ggt gga act aat aat cat ctc ttc ttg gtt gat gtt act aaa gtt gtc gaa aat ggt aag
gtt gcg caa aac gtt ctt gaa gaa gta aat att act ttg aac aaa aat agt att cct tat gag
cag tta tct cca ttc aaa aca tct ggt att cgt gtc ggt agt cca gca att aca agc cgt ggt
atg ggt gaa gct gag agc cgt cag att gca gag tgg atg gtt gaa gct ttg gaa aat cac gat
aaa cct gaa gtt ttg gaa cgc att cgt gga gac gtt aaa gtt ctt aca gat gct ttc cca ctc
tat taa TAA

```

Figura 4.10. Gene *glyA* de *S. thermophilus* B130. Sequência com 1250 pares de bases nitrogenadas (416 aminoácidos) - uma ORF (*Open Reading Frame* - janela aberta de leitura). Os caracteres em vermelho destacam uma possível RBS (*Ribosome Binding Site*): **AAAGGAG**; códon de iniciação (metionina): **ATG** e o códon de terminação: **TAA**.

4.5. Interrupção do gene *glyA*

Com a finalidade de se estudar a função do gene *glyA*, o fragmento interno de 505 bp foi inserido em pGEM[®]-T para seqüenciamento e, subsequente, este fragmento foi inserido no vetor pG⁺host9, originando o plasmídeo pNZ2310 (Figura 4.11). Esse plasmídeo foi purificado e as linhagens NIZOB130 e AO54 de *S. thermophilus* foram transformadas, por meio de eletroporação, com esta construção. A interrupção deste gene resultou nas seguintes linhagens mutantes B130D*glyA* e AO54D*glyA* e foi realizada conforme descrito a seguir:

- ✓ As linhagens de *S. thermophilus* contendo este plasmídeo foram cultivadas em meio SM17 suplementado com o antibiótico Eri, a 28°C por 16h;
- ✓ Após este período de incubação, elas foram diluídas 100 vezes em SM17 sem antibiótico e novamente incubadas a 28°C por cerca de 2h (atingindo, assim, a fase logarítmica de crescimento);
- ✓ As linhagens foram, então, transferidas à temperatura de 42°C, onde foram cultivadas por três horas, tempo necessário para ocorrer de 6 a 9 gerações. O aumento de temperatura induziu à integração do plasmídeo no cromossomo e reduziu o número de cópias por célula;
- ✓ Diferentes diluições destas culturas foram plaqueadas em meio seletivo ágar de SM17, suplementado com Eri e incubadas a 42°C;
- ✓ Os clones apareceram como colônias resistentes à eritromicina, após um período de incubação de 48h.

Para a confirmação da integração do plasmídeo pNZ2310 no correto locus do gene *glyA* nas linhagens B130D*glyA* e AO54D*glyA*, foi realizada uma hibridização pela técnica *Southern Blot*, na qual utilizou-se o como sonda o fragmento interno de 505pb do gene *glyA* marcado com o sistema Digoxigenina. (Figura 4.12). Nesta hibridização, o DNA cromossômico das linhagens NIZOB130, AO54, B130D*glyA* e AO54D*glyA* de *S. thermophilus*, foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e hibridizado com a sonda.

Na Figura 4.12 observa-se que a banda de hibridização nas linhagens mutantes B130D*glyA* e AO54D*glyA* encontrava-se numa posição superior ± 9 kb (fragmento de ± 5 kb + 4,5 kb do plasmídeo pNZ2310) em relação à das linhagens selvagens (± 5 kb) devido à integração do plasmídeo pNZ2310 (tamanho 4,5 kb) ocorrida no locus do gene *glyA* no cromossomo.

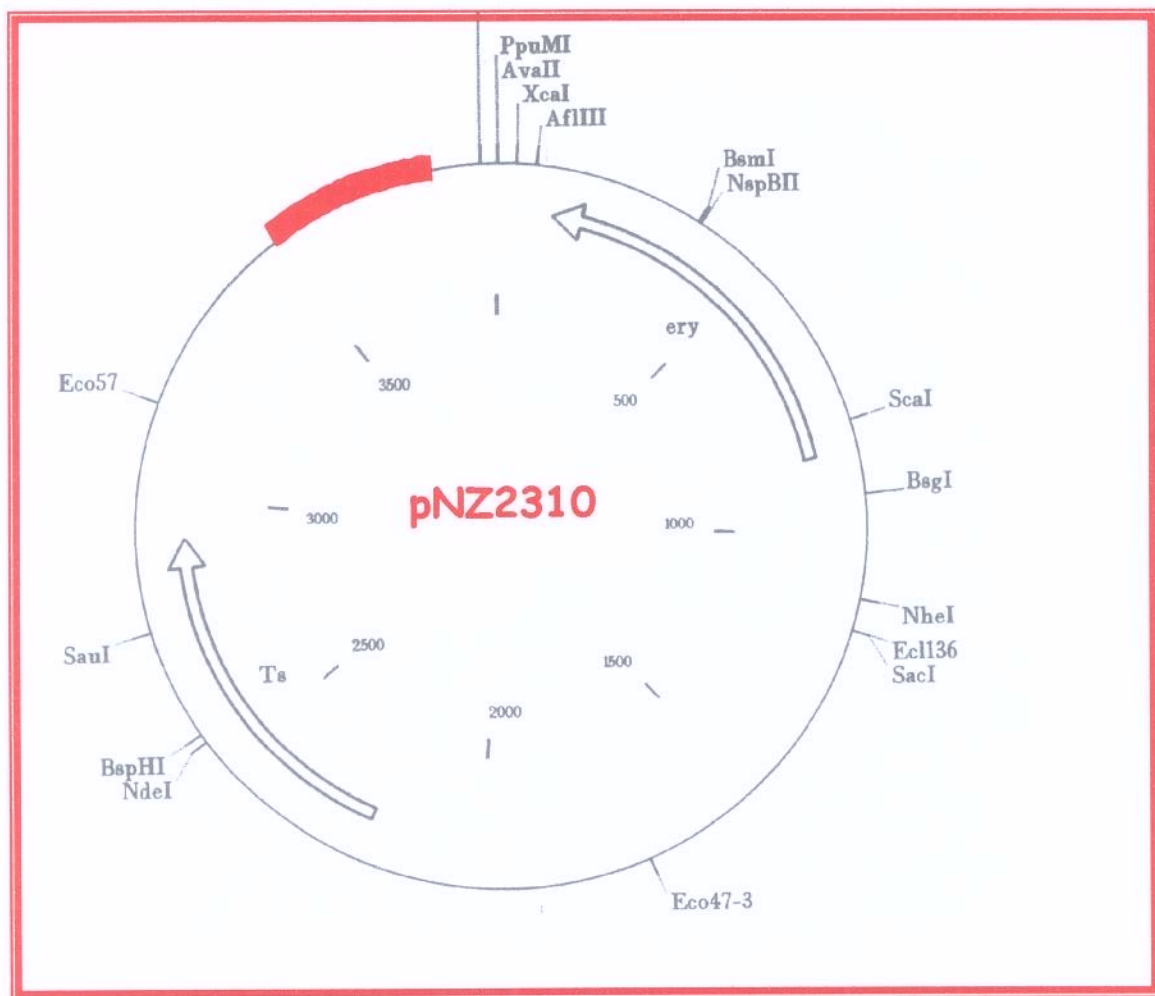


Figura 4.11. Plasmídeo pNZ2310 derivado do vetor pG⁺host9 (Maguin *et al.*, 1996), contendo o fragmento interno de 505pb do gene *glyA* de *S. thermophilus* (destacado em vermelho). Este plasmídeo foi construído para promover a interrupção do gene *glyA* nas linhagens NIZOB130 e AO54 de *S. thermophilus*. Neste vetor existem indicações para ery = gene de resistência ao antibiótico eritromicina e Ts = replicon termossensível.

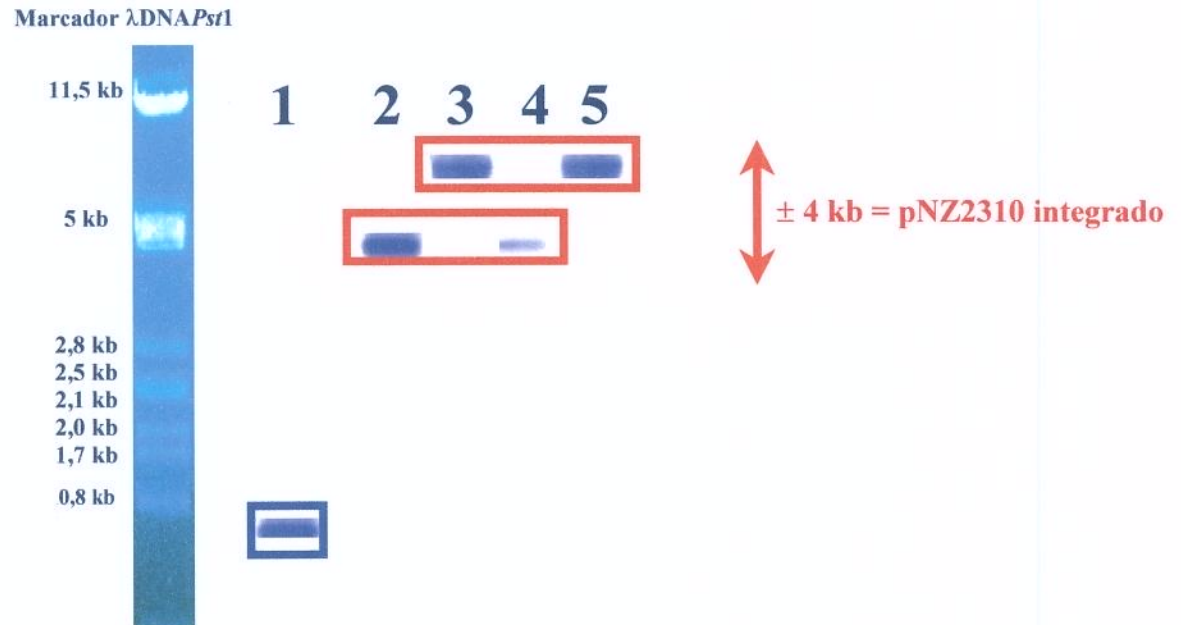


Figura 4.12. A autoradiografia mostra o resultado de hibridização pela técnica *Southern Blot*. O DNA das linhagens NIZOB103, AO54, B130DglyA e AO54DglyA foi hibridizado com sonda marcada com fragmento de 505pb do gene *glyA*. Os retângulos azuis destacam o local onde ocorreu a hibridização com a sonda marcada.

- 1= controle positivo, o fragmento de 505 bp do gene *glyA* de *S. thermophilus* NIZOB130
- 2 = fragmento de DNA da linhagem selvagem NIZOB130 com ~ 5kb
- 3 = fragmento de DNA do mutante B130DglyA com ~ 9kb
- 4 = fragmento de DNA da linhagem selvagem AO54 com ~ 5kb
- 5 = fragmento de DNA do mutante AO54DglyA com ~ 9kb

As linhagens B130DglyA, AO54DglyA, NIZOB130 e AO54 foram cultivadas em meio LM17 para sua caracterização. A interrupção do gene *glyA* de *S. thermophilus* afetou:

- ✓ O crescimento microbiano sendo observada uma acentuada redução na taxa de crescimento (aproximadamente seis vezes), em comparação às linhagens selvagens;
- ✓ A produção de acetaldeído (não sendo possível detectar);
- ✓ A atividade TA (não sendo possível detectar);
- ✓ A capacidade de acidificação;
- ✓ A produção de ácido fólico.

Para restaurar o crescimento normal destes mutantes, tentou-se a suplementação do meio de crescimento com glicina, pois, segundo Contestabile *et al.* (2001), a principal função da enzima treonina aldolase é a produção de glicina; e, porque, mutações no gene *glyA* de *E. coli*, *S. typhimurium* e *Bradyrhizobium japonicum* levaram à auxotrofia de glicina nestes microrganismos (Rossbach & Hennecke, 1991; Umbarger *et al.*, 1963).

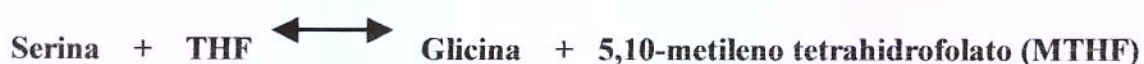
Apesar do meio LM17 já ser rico em aminoácidos, contendo cerca de 930mg/L de glicina (cálculo realizado com base no conteúdo de glicina de cada um dos ingredientes presentes neste meio, de acordo com informações dos fabricantes), esse meio foi ainda, suplementado com mais 20 ppm e 100 ppm de glicina, porém, nem assim, foi possível restaurar o crescimento normal destes mutantes (Figura 4.13).

A interrupção do gene *glyA* também interferiu na capacidade de acidificação (produção de ácido láctico) destas linhagens, sendo o seu pH final em torno de 5,2 enquanto as linhagens selvagens atingiram pH = 4,5.

Uma possível explicação para as linhagens B130DglyA e AO54DglyA não serem capazes de produzir acetaldeído durante a fermentação pode estar relacionada com o seu alto pH final; uma vez que, durante a fermentação, o acetaldeído só começa a ser produzido quando o pH do meio se encontra ao redor de 5 e a sua produção ocorre em taxas elevadas quando o pH encontra-se entre 5,0 e 4,3 (Bottazzi *et al.*, 1973).

A produção de ácido fólico também foi afetada pela interrupção do gene *glyA*, sendo superior à observada nas linhagens selvagens; no mutante B130D*glyA* o aumento foi de 53% e no AO54D*glyA* de 73%.

Sugere-se que as alterações observadas com relação ao crescimento e a produção de ácido fólico destes mutantes possam estar relacionadas com a interferência no metabolismo de ácido fólico, uma vez que a enzima SHMT é essencial à regeneração do composto tetrahydrofolato (THF), a partir da sua forma metilada (5,10-metileno tetrahydrofolato).



O papel central do THF é de transportador de uma unidade de carbono(C_1) no nível de oxidação do formaldeído. A unidade de formaldeído é usada na biossíntese de diversos compostos tais como purinas, serina e glicina. O derivado de THF que atua como coenzima é o 5,10-metileno-THF. O composto 5,10-metileno-THF, na presença de piridoxal-fosfato, de glicina e da enzima SHMT forma serina. É interessante notar que, não apenas um, mas dois derivados de importantes vitaminas, o ácido fólico e o piridoxal-fosfato, são cofatores necessários para utilização do formaldeído na formação de serina (Conn & Stumpf, 1987).

Devido à importância da serina hidroximetil transferase, parece razoável supor que, interferindo na atividade desta enzima ocorra um distúrbio em diferentes reações metabólicas, afetando diversas funções celulares, tais como o crescimento e a produção de ácido fólico.

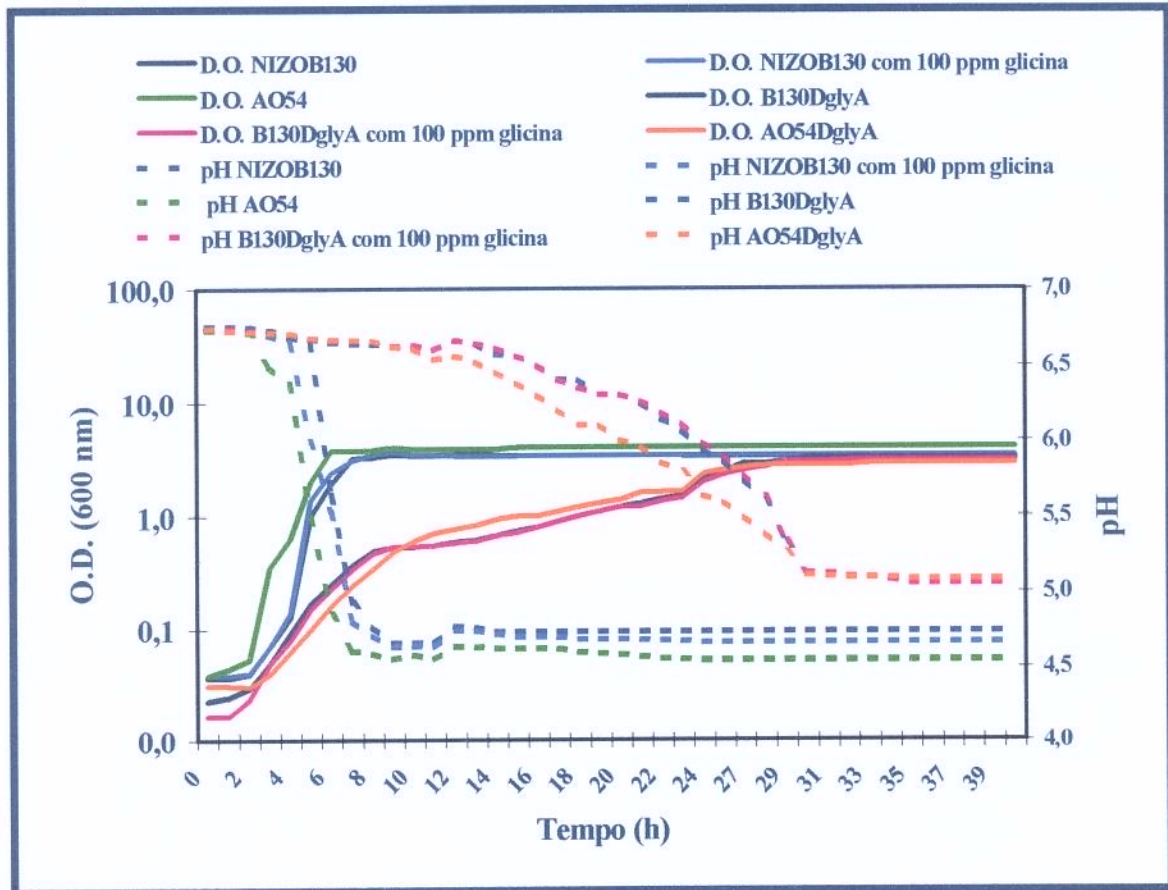


Figura 4.13. Crescimento microbiano avaliado pela determinação da densidade óptica (D.O. = 600nm) e pH das linhagens B130DglyA, AO54DglyA, NIZOB130 e AO54 cultivadas em meio LM17 com e sem suplementação com 20 e 100 ppm de glicina

Com o objetivo de complementar as linhagens B130DglyA e AO54DglyA dois plasmídeos foram construídos: (1) plasmídeo pACC2St (Figura 4.14), contendo o gene *glyA* de *S. thermophilus* sob controle do promotor da enzima lactato desidrogenase (Ldh) no plasmídeo pACC1 e (2) pACC5 (Figura 4.15), com gene *glyA* de *S. thermophilus* no vetor pJIM2246.

Apesar das inúmeras tentativas realizadas, a complementação das linhagens B130DglyA e AO54DglyA não foi possível; para explicar este resultado duas hipóteses foram levantadas. No caso do plasmídeo pACC2St, a complementação pode não ter ocorrido, porque são possíveis diversos tipos de integração entre o plasmídeo contendo o gene *glyA* e o vetor pG⁺host9, uma vez que, estas duas construções possuem regiões semelhantes. A segunda hipótese, sugerida por Anba (Comunicação pessoal, 2001), postula que, no caso específico de *S. thermophilus*, é muito difícil transformar um segundo plasmídeo, então, provavelmente o fato do plasmídeo pNZ2310 estar integrado no cromossomo impediu ou dificultou a transformação das linhagens B130DglyA e AO54DglyA com um segundo plasmídeo.

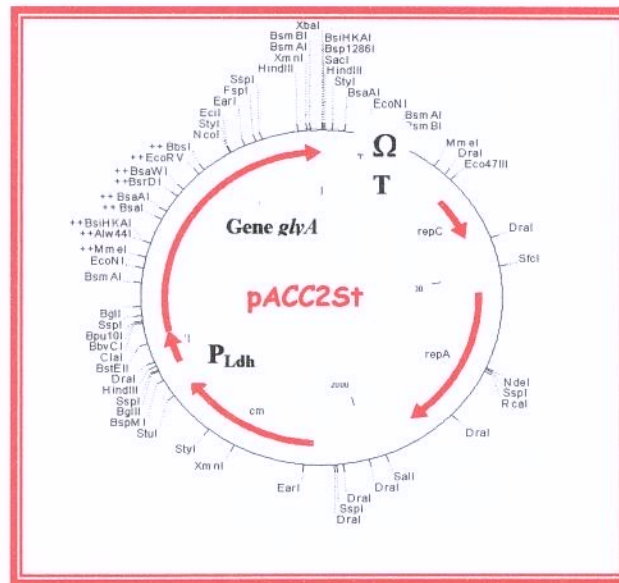


Figura 4.14. Plasmídeo pACC2St derivado do pACC1, construído para a complementação. Com o gene *glyA* de *S. thermophilus* sob controle do promotor da enzima lactato desidrogenase (P_{Ldh}). Com indicações: repA = origem de replicação; repC = repressor, cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, T terminador de transcrição.

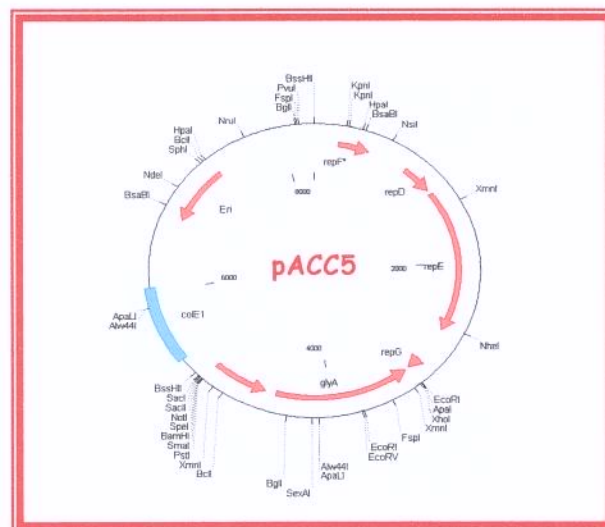


Figura 4.15. Mapa do plasmídeo pACC5, derivado do pJIM2246, construído para promover a complementação. Com as seguintes indicações: *glyA* = gene *glyA* de *S. thermophilus*; Eri = gene de resistência ao antibiótico eritromicina, genes de origens de replicação repD, repE, repF, repG e repC = repressor e em azul colE1 = promotor.

Frente às dificuldades observadas na complementação das linhagens B130DglyA e AO54DglyA, optou-se por tentar, em *S. thermophilus*, uma recombinação homóloga dupla (*Double cross-over*), procedimento este que visou promover a retirada do gene *glyA* do genoma desta bactéria. Esta seria uma alternativa que facilitaria ou possibilitaria a complementação, uma vez que, deste modo, não existiriam partes de um outro vetor integrado ao cromossomo, que no caso específico de *S. thermophilus* pode ocasionar problemas. Partes do gene *glyA* da linhagem B130 de *S. thermophilus* foram ligadas ao vetor pORI280, originando o plasmídeo pACC10 (Figura 4.16).

Células competentes de *S. thermophilus* foram transformadas com esta construção e foi possível realizar o primeiro evento de integração (*single cross-over*) do plasmídeo pACC10 em um dos lados do gene *glyA* no cromossomo de *S. thermophilus*, em três diferentes linhagens, denominadas SCO1, SCO2 e SCO3. Estes mutantes foram cultivados por volta de 200 gerações sem o antibiótico, o que deveria resultar no segundo evento de recombinação (*double cross-over*), culminando na eliminação do vetor pORI280, juntamente com o gene *glyA*, ou ainda na reversão à linhagem selvagem. Após a diluição e plaqueamento, as colônias que cresceram somente nas placas de ágar LM17 sem antibiótico e não cresceram na presença de eritromicina (cerca de 1%) foram avaliadas por PCR e por meio de crescimento em meio líquido (sabia-se que as linhagens com interrupção do gene *glyA* cresciam lentamente). Todas as colônias avaliadas haviam revertido ao tipo selvagem, apesar de crescerem lentamente, na mesma velocidade que os mutantes B130DglyA e AO54DglyA.

Uma possível explicação para a impossibilidade de retirar o gene *glyA* do genoma de *S. thermophilus* foi levantada, analisando-se a organização em torno do gene *glyA*. Inicialmente, a organização foi comparada com os microrganismos *Streptococcus pyogenes* e *L. lactis* (Figura 4.17), e em seguida por meio de um programa (Snel *et al.*, 2000) que verifica a organização em torno de um determinado gene. Observou-se que a organização em torno do gene *glyA* é altamente conservada, entre diferentes organismos o que leva a crer que este gene deva fazer parte de um grupo de genes interligados (*cluster*) sendo, portanto, regulado de maneira complexa e a interrupção de um do gene *glyA* neste *cluster* poderia interferir na regulação dos outros genes interligados, o que poderia constituir em uma possível explicação para os resultados obtidos.

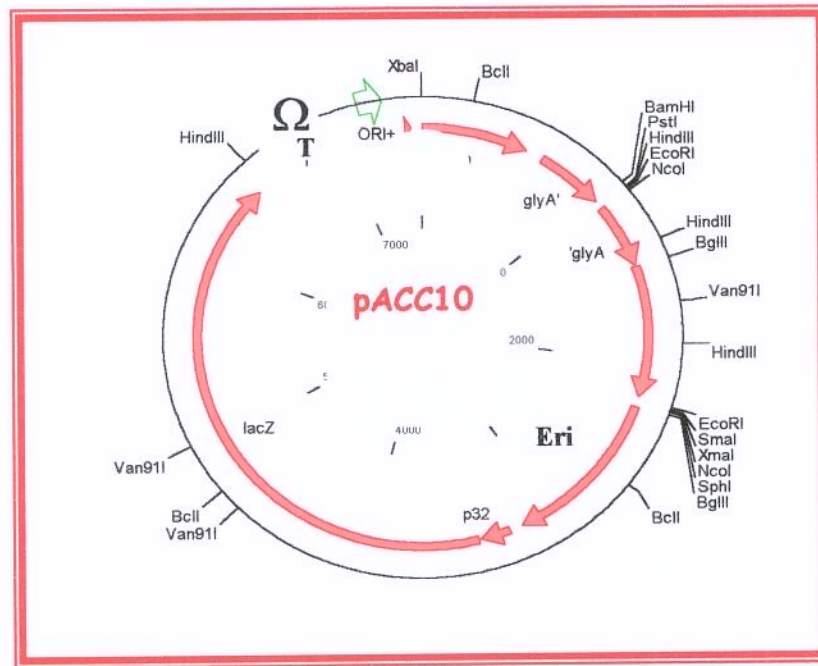


Figura 4.16. Plasmídeo pACC10 derivado do pORI280 (Leenhouts *et al.*, 1996) construído para promover a recombinação homóloga dupla. Com as seguintes indicações para os genes *glyA* = dois fragmentos com partes do gene *glyA* de *S. thermophilus*; *lacZ* = operon lac; Eri = gene de resistência ao antibiótico eritromicina; T = terminador de transcrição, ORI+ = origem de replicação, p32 = promotor de *Lactococcus*.

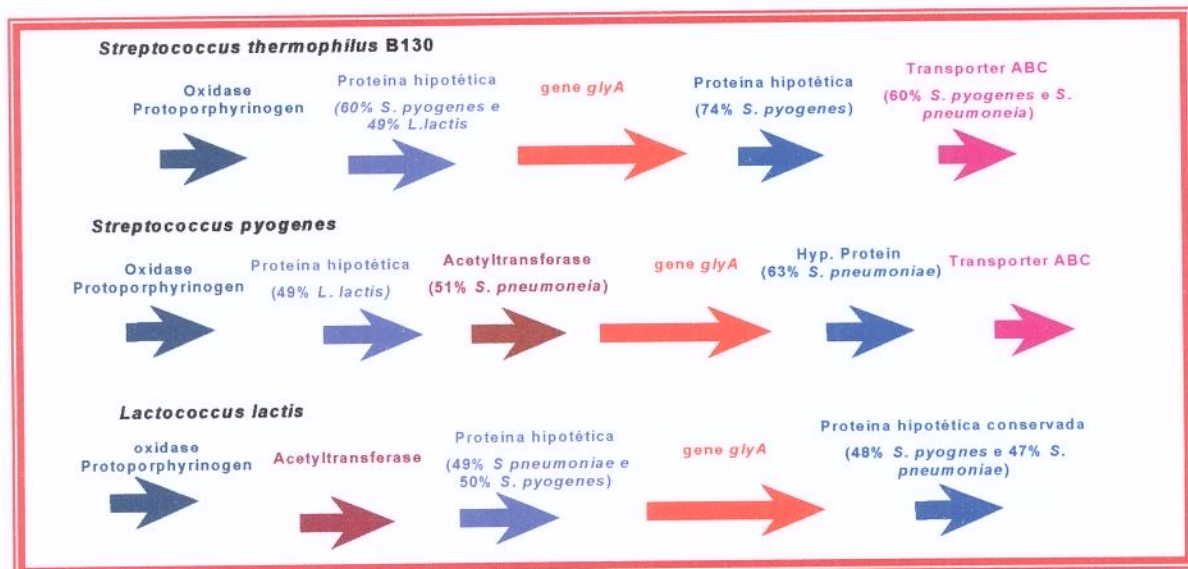


Figura 4.17. Organização dos genes em torno do gene *glyA* em três diferentes microrganismos *S. thermophilus*, *Streptococcus pyogenes* e *Lactococcus lactis*.

4.6. Construção de linhagens com superexpressão do gene *glyA*

Com a finalidade de se promover a superexpressão do gene *glyA*, visando o aumento da produção de acetaldeído, o gene *glyA* da linhagem NIZOB130 de *S. thermophilus* foi clonado sob o controle de diferentes promotores, em diferentes plasmídeos. Conhecendo-se a sequência do gene *glyA* de *S. thermophilus* foram utilizados diversos oligonucleotídeos para amplificar diferentes fragmentos contendo o gene *glyA*.

- ✓ Um fragmento com 1800pb, contendo o gene *glyA* e caso exista, a região promotora deste gene também seria amplificada, pois estaria contida nestes 600pb acima do início do gene *glyA*. Procedimento realizado segundo recomendação de M. Kleerebezem –NIZO Food Research (comunicação pessoal, 2000). Este fragmento foi inserido no vetor pNZ273 originando, respectivamente, o plasmídeo pACC6 (Figura 4.18).
- ✓ Fragmentos de DNA amplificados por PCR com aproximadamente 1,2kb contendo o gene *glyA* completo foram inseridos no vetor pNZ275 resultando no plasmídeo pACC8 (Figura 4.19) e no vetor pNZ276, resultando no plasmídeo pACC9 (Figura 4.20).

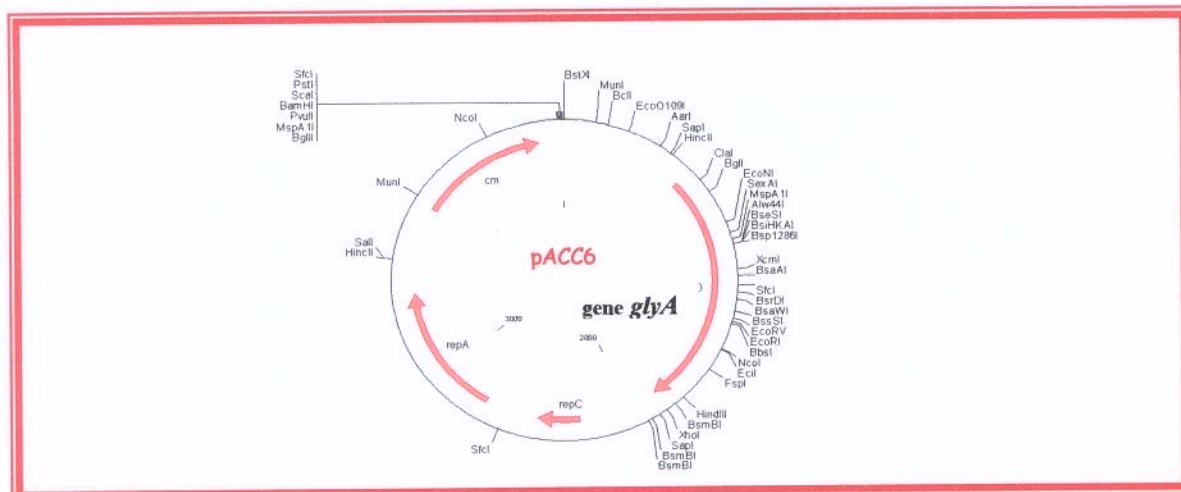


Figura 4.18. Plasmídeo pACC6, derivado do vetor pNZ273, para promover a expressão do gene *glyA* com seu próprio promotor. Contém indicações dos genes repA = origem de replicação; repC = repressor; cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol.

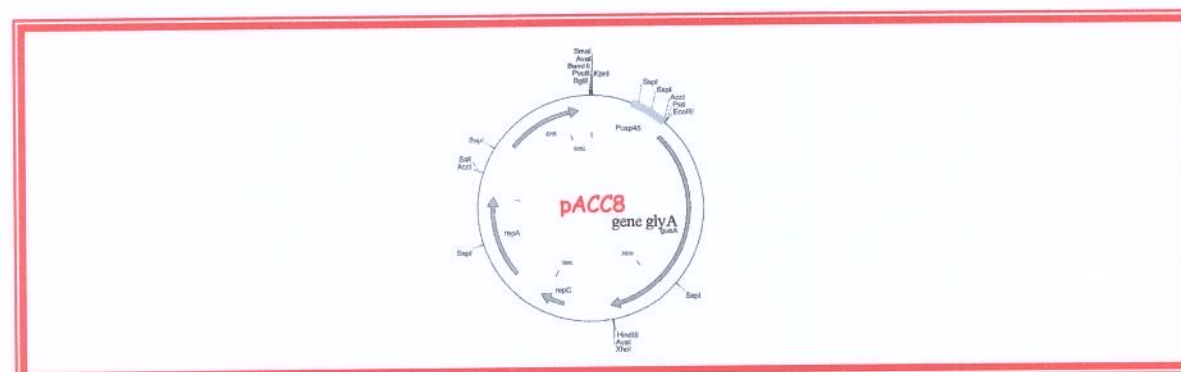


Figura 4.19. Plasmídeo pACC8, derivado do vetor pNZ275, para promover a superexpressão do gene *glyA* sob controle do P_{USP45} = promotor da enzima α -amilase.

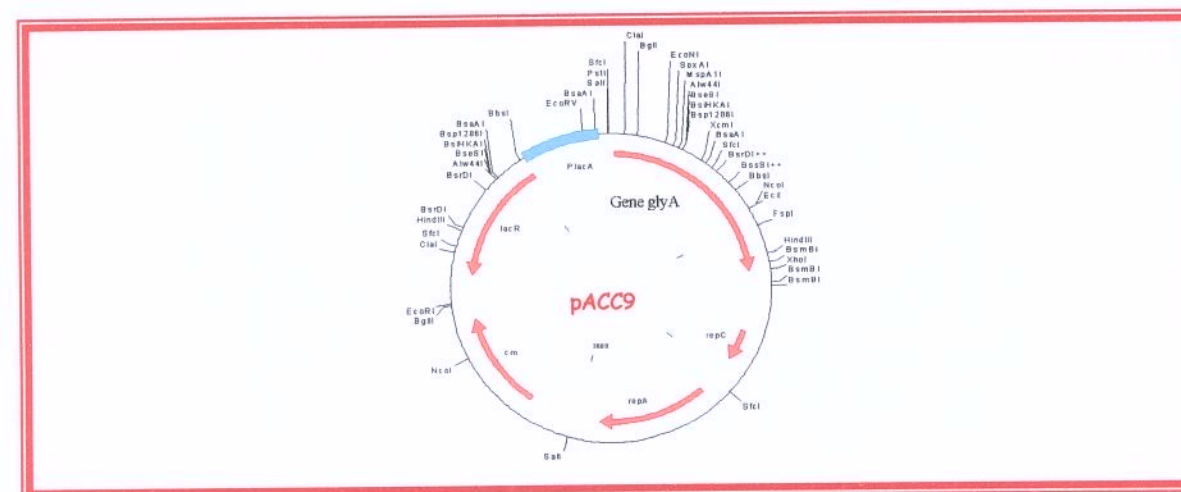


Figura 4.20. Plasmídeo pACC9, derivado do vetor pNZ276, para promover a superexpressão do gene *glyA*. Em azul encontra-se destacado o promotor P_{LacA} e lacR = gene do operon lac.

As linhagens de *S. thermophilus* NIZOB130 e AO54 foram transformadas por meio de electroporação com os plasmídeos: pACC2St, pACC7 e pACC9, resultando nas linhagens mutantes descritas a seguir. **StBCC2** (*S. thermophilus* B130 contendo pACC2St), **StACC2** (*S. thermophilus* AO54 contendo pACC2St), **StBCC7** (*S. thermophilus* B130 contendo pACC7), **StACC7** (*S. thermophilus* AO54 contendo pACC7), **StBCC9** (*S. thermophilus* B130 contendo pACC9) e **StACC9** (*S. thermophilus* AO54 contendo pACC9).

As diversas linhagens foram, então, cultivadas em LM17. Observou-se que nas linhagens StBCC2, StACC2 não houve aumento significativo na atividade TA, enquanto nas StBCC9, StACC9, StBCC7 e StACC7 foi constatada atividade TA superior à das linhagens selvagens, sendo as maiores observadas nas linhagens StBCC9 e StACC9 (Figura 4.21).

Após cultivo em meio LM17 das linhagens NIZOB130, AO54, StBCC9 e StACC9 foi observado que as linhagens mutantes StBCC9 e StACC9, apresentaram:

- ⇒ Crescimento microbiano (Figura 4.22) e comportamento acidificante (Figura 4.23) similares;
- ⇒ Aumento significativo na produção de acetaldeído em relação às linhagens selvagens (Figura 4.24); sendo de 82% na linhagem StBCC9 e 91% na StACC9;
- ⇒ Aumento na atividade enzimática de TA (Figura 4.25) de 61% para StBCC9 e de 70% para StACC9;
- ⇒ Aumento na produção de ácido fólico, de 20% para StBCC9 e de 100% para StACC9 (Figura 4.26).

Subseqüentemente, as linhagens AO54 e StACC9 foram cultivadas em leite, e no mutante StACC9 foi observado um aumento de 21% na produção de acetaldeído e de 58% na produção de ácido fólico. Pelo fato da linhagem StACC9 não crescer bem em leite, este foi suplementado com 0,2% de um hidrolisado de caseína (Bacto[®] casitone, Difco), com o objetivo de fornecer aminoácidos para melhorar o crescimento.

Essa suplementação, além de possibilitar o crescimento normal deste mutante, também elevou o teor de acetaldeído tanto na linhagem selvagem quanto no mutante devido ao aumento da concentração de treonina (entre outros aminoácidos) no meio de crescimento. O crescimento microbiano e comportamento acidificante das linhagens AO54 e StACC9, após a adição do hidrolisado de caseína foram similares.

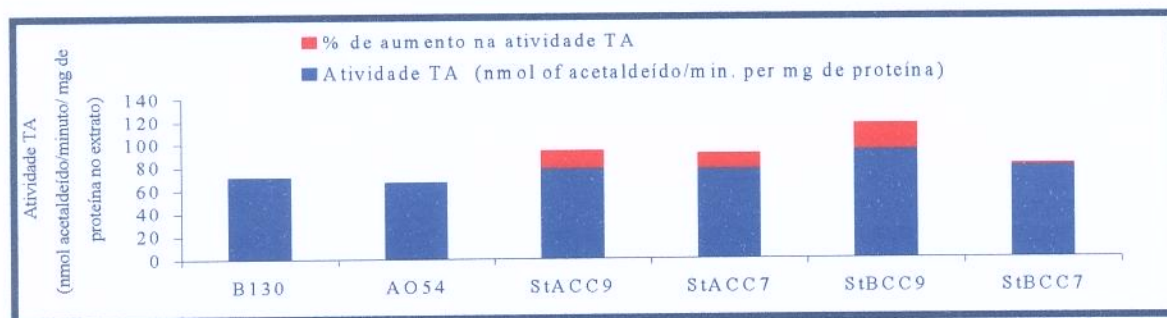


Figura 4.21. Comparação da atividade TA entre as linhagens de *S. thermophilus* B130, AO54, StACC7, StACC9, StBCC7 e StBCC9. Nas colunas em vermelho está destacado o aumento da atividade TA ocorrido em cada construção em relação à linhagem parental.

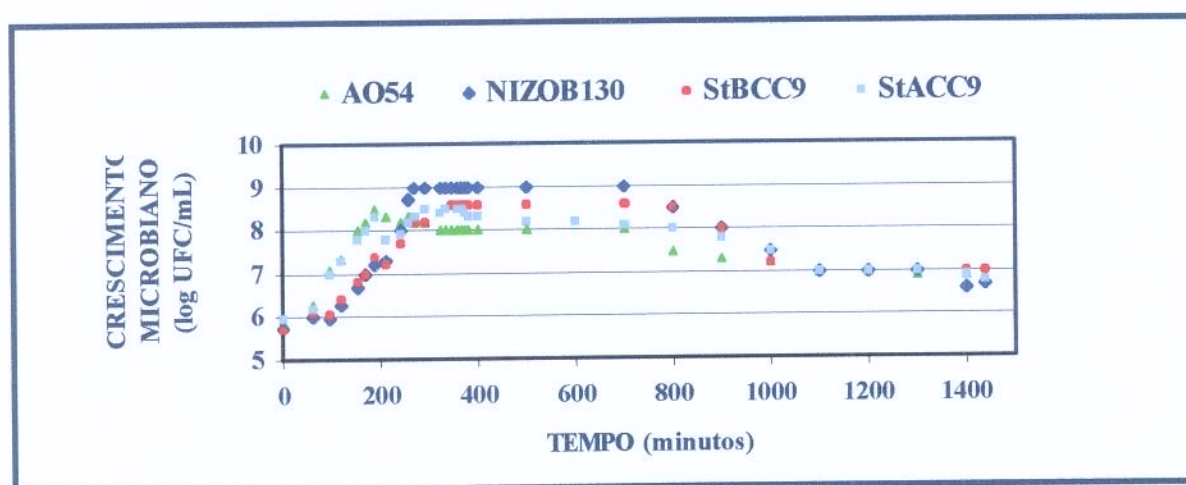


Figura 4.22. Crescimento microbiano (log de UFC/mL) meio em LM17 das linhagens NIZOB130, AO54, StBCC9 e StACC9.

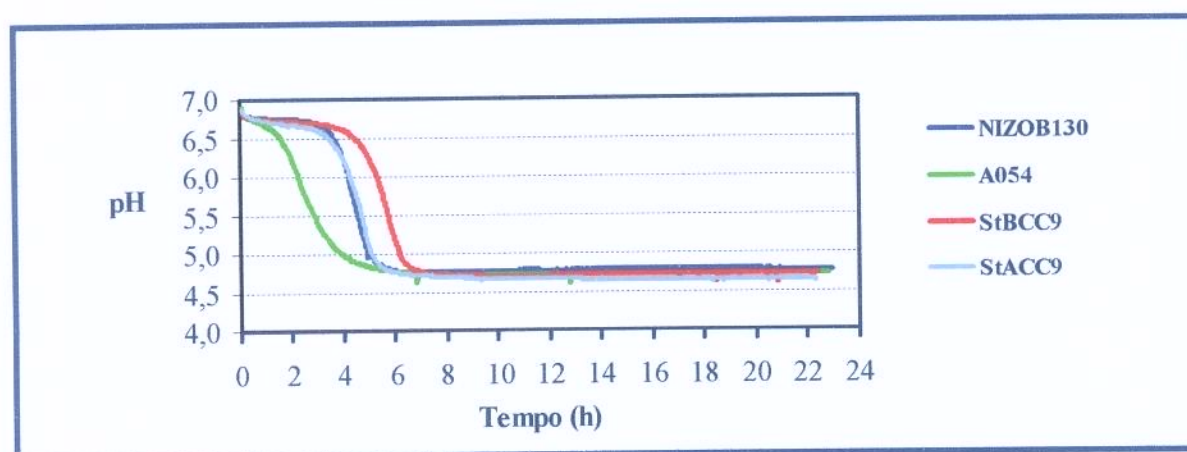


Figura 4.23. Curva de pH durante crescimento em LM17 das linhagens NIZOB130, AO54, StBCC9 e StACC9.

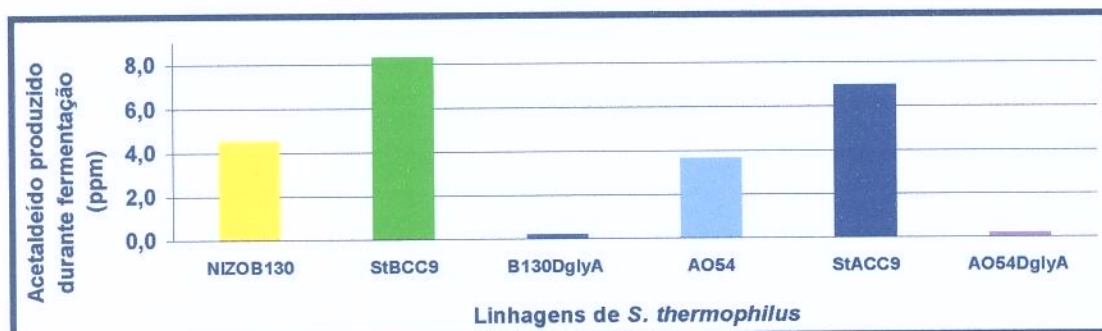


Figura 4.24. Comparação da produção de acetaldeído em diferentes linhagens de *S. thermophilus* NIZOB130, AO54, StBCC9, StACC9 (linhagens com superexpressão do gene *glyA*), B130DglyA e AO54DglyA (linhagens com interrupção do gene *glyA*).

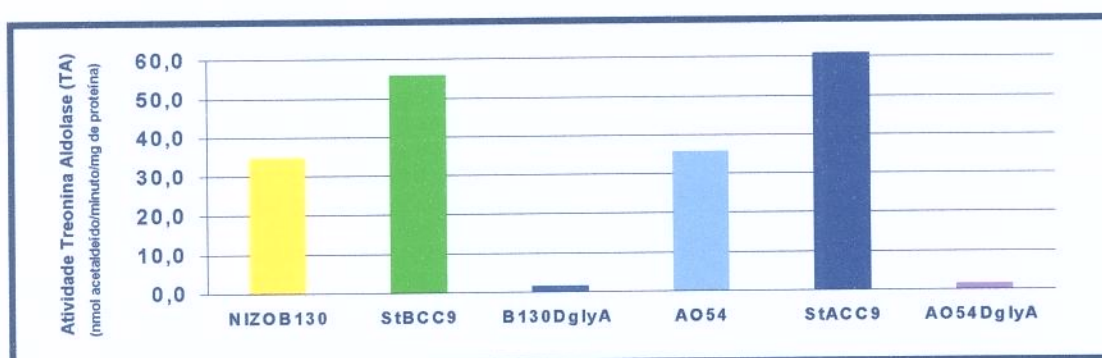


Figura 4.25. Comparação da atividade de treonina aldolase em diferentes linhagens de *S. thermophilus* NIZOB130, AO54, StBCC9, StACC9 (linhagens com superexpressão do gene *glyA*), B130DglyA e AO54DglyA (linhagens com interrupção do gene *glyA*).

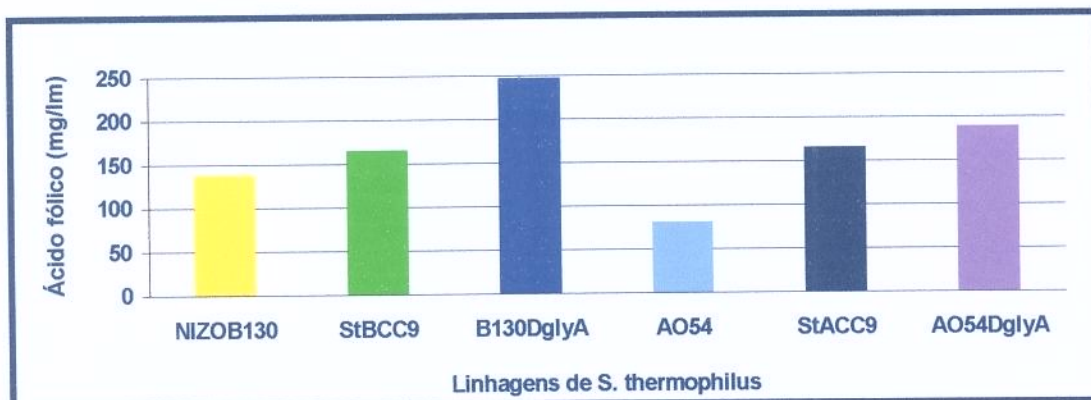


Figura 4.26. Comparação da produção de ácido fólico em diferentes linhagens de *S. thermophilus* NIZOB130, AO54, StBCC9, StACC9 (linhagens com superexpressão do gene *glyA*), B130DglyA e AO54DglyA (linhagens com interrupção do gene *glyA*).

4.6.1. Superexpressão de genes *glyA* no Sistema NICE SYSTEM[®]

Os genes *glyA* provenientes de *S. thermophilus*, *Bacillus subtilis* e de *L. lactis* foram clonados sob controle do promotor da nisina no vetor pNZ8148 (NIZO Food Research), originando, respectivamente, os plasmídeos pACC4 (Figura 4.27), pACC3 (Figura 4.28) e pACC11 (Figura 4.29). A linhagem NZ9000 de *L. lactis* foi transformada com estes plasmídeos gerando, respectivamente, as linhagens mutantes denominadas ***StglyACC3***, ***BsglyACC3*** e ***LltglyACC3***.

Após a indução com diferentes teores de nisina, foram preparados os extratos enzimáticos nos quais verificou-se um aumento da expressão do gene *glyA* por meio de: (1) avaliação da atividade enzimática da SHMT de duas maneiras distintas, por meio da atividade treonina aldolase (somente para o caso do gene *glyA* de *S. thermophilus*) e da atividade da SHMT (conversão de serina em glicina) e (2) aplicação desses extratos em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), com a finalidade de visualizar o aumento na produção da enzima SHMT.

A superprodução da enzima SHMT proveniente de *S. thermophilus*, *B. subtilis* e *L. lactis* foi visualizada pelo claro aumento da banda com tamanho correspondente ao desta enzima em todos os casos (Peso molecular da SHMT = ± 46 kDa, valor estimado da seguinte forma, número de aminoácidos da proteína multiplicado por 110; no caso de *S. thermophilus*: $416\text{aa} \times 110 = 45,6 \text{ kDa} = \pm 46 \text{ kDa}$).

Quando o mutante ***StglyACC3*** foi induzido com $3\eta\text{g/mL}$ de nisina, foi observado um aumento de 50% na atividade TA e de 3,5 vezes na atividade da SHMT (Figura 4.30). Neste caso, também foi observado aumento na produção de ácido fólico.

A concentração de nisina utilizada na indução do gene *glyA* na linhagem ***LltglyACC3*** foi diretamente proporcional ao aumento verificado na atividade da SHMT (Figura 4.31) e na produção de ácido fólico (Figura 4.32). Esses resultados confirmam a superexpressão do gene *glyA* de *L. lactis* no NICE SYSTEM, a Figura 4.33, ilustra essa superexpressão assim como também a superprodução da enzima SHMT.

Sumarizando os resultados obtidos ao longo deste trabalho, o gene *glyA* de *S. thermophilus* B130 foi isolado, seqüenciado e clonado em *S. thermophilus* e *L. lactis*. A inativação deste gene em *S. thermophilus* resultou em acentuada redução da atividade TA, assim como também na perda completa da capacidade de produção de acetaldeído durante a fermentação. Nas linhagens de *S. thermophilus*, com aumento da expressão do gene *glyA*, observou-se incremento na atividade TA, na produção de acetaldeído e de ácido fólico.

Para a obtenção de tais mutantes, foram utilizadas diferentes ferramentas da biologia molecular, com o objetivo de se elucidar a produção de acetaldeído através do aminoácido treonina pela via da serina hidroximetil transferase. Os conhecimentos obtidos ao longo deste trabalho podem contribuir para melhorar as características tecnológicas de linhagens de *S. thermophilus*, visando atender às necessidades das indústrias lácteas para a produção de leites fermentados e/ou iogurtes, com quantidades constantes de acetaldeído, garantindo, desta forma, o aroma característico desses produtos. Como consequência da engenharia metabólica da enzima SHMT em *S. thermophilus* (visando aumentar a produção de acetaldeído), ocorreu aumento da produção de ácido fólico, com conseqüente incremento no valor nutricional deste leite fermentado.

Para que os conhecimentos adquiridos com este estudo possam reverter em benefícios para a indústria alimentícia, o gene *glyA* de *S. thermophilus*, que foi devidamente caracterizado e avaliado deve ser clonado em um vetor de grau alimentício (*Food grade*, sem o gene de resistência ao antibiótico e contendo somente seqüências de DNA proveniente de bactérias lácticas), permitindo deste modo à análise sensorial deste produto. Este gene também poderia ser clonado em outros microrganismos, com o objetivo de aumentar o conteúdo de acetaldeído e/ou ácido fólico.

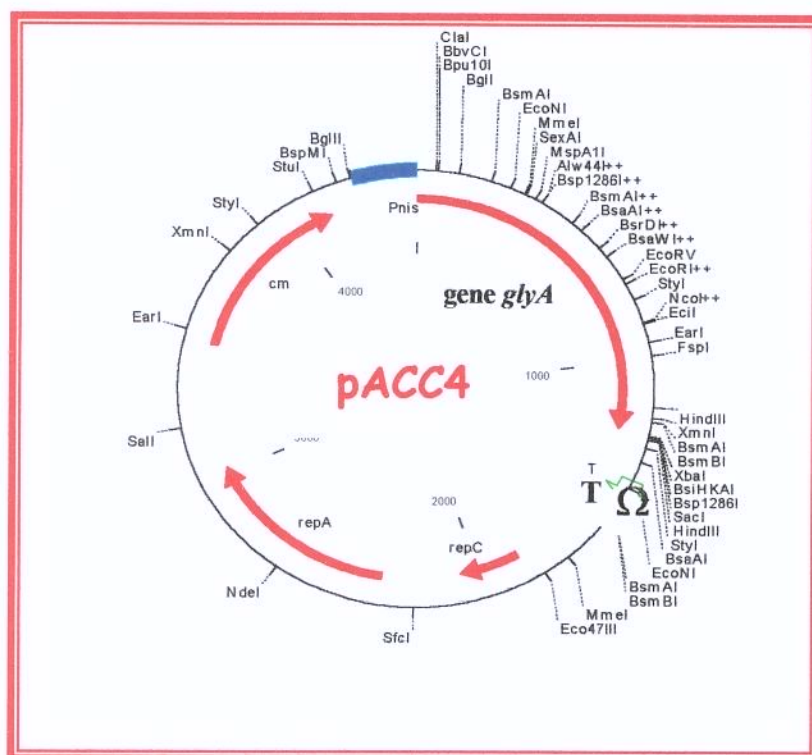


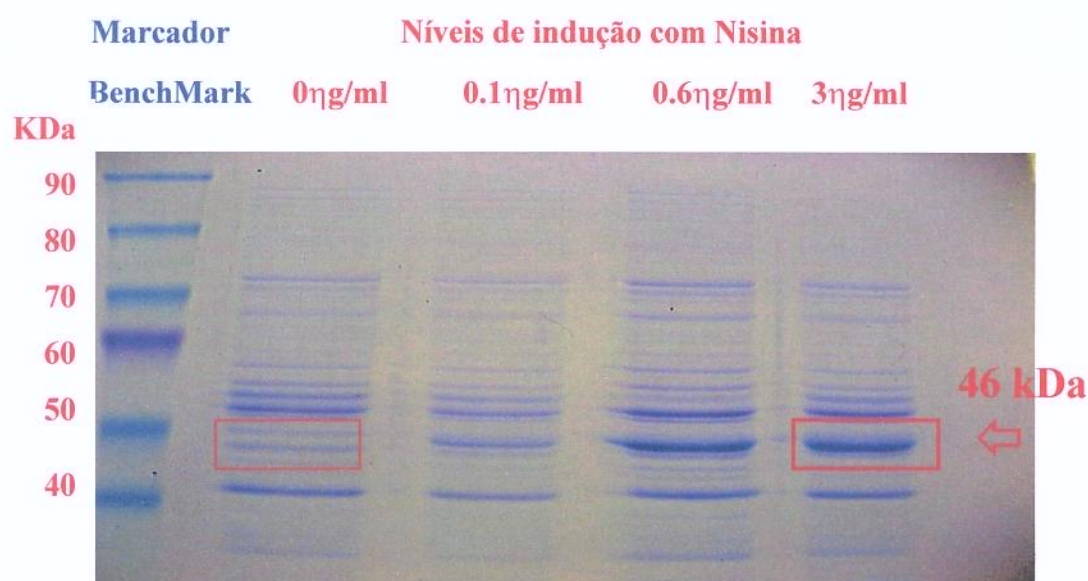
Figura 4.27. Plasmídeo pACC4, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) e construído para promover a superexpressão do gene *glyA* de *S. thermophilus* B130 sob controle do P_{NIS}, em *L.lactis* NZ9000.

Figura 4.28. Plasmídeo pACC3, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) e construído para promover a superexpressão do gene *glyA* de *B. subtilis* sob controle do P_{NIS} , em *L.lactis* NZ9000.

Figura 4.29. Plasmídeo pACC11, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) e construído para promover a superexpressão do gene *glyA* de *L.lactis* MG1363 sob controle do P_{NIS}, em *L.lactis* NZ9000.

Observação: Como todos a única diferença entre os plasmídeos pACC3, pACC4 e pACC11 é o gene *glyA*, somente um deles foi representado. Todos eles têm em comum as indicações dos genes:

repA = origem de replicação; repC = repressor; cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, T = terminador de transcrição e em azul o P_{Nis} = promotor da nisina.



	Níveis de indução com Nisina (ηg/ml)			
	0	0.1	0.6	3
(1) Atividade TA (Unidades)	33.0	34.1	40.9	50.7
(2) Atividade SHMT (Unidades)	0.02	0.024	0.03	0.07

Figura 4.30. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando a superprodução da enzima SHMT em *L. lactis* NZ9000 contendo o gene *glyA* de *S. thermophilus* B130 sob controle do promotor da nisina.

E determinação da atividade enzimática nos diversos níveis de indução por meio de duas metodologias: (1) atividade TA = conversão de treonina em glicina e acetaldeído

(2) atividade SHMT = conversão de serina em glicina.

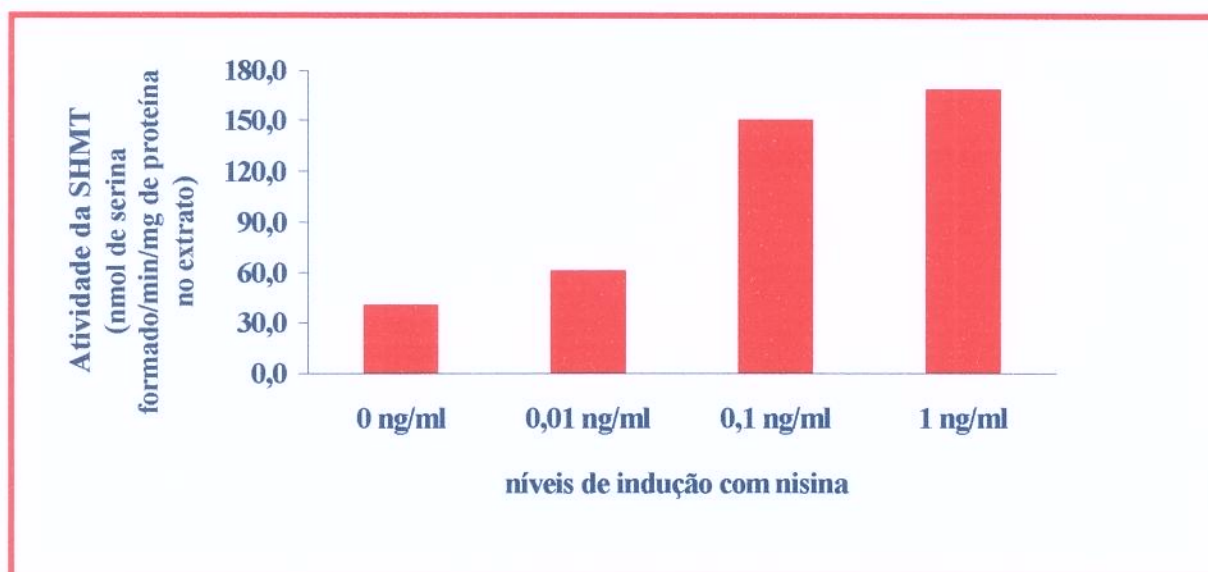


Figura 4.31. Atividade da serina hidroximetil transferase da linhagem *LltglyACC3* nos diferentes níveis de indução com nisina.

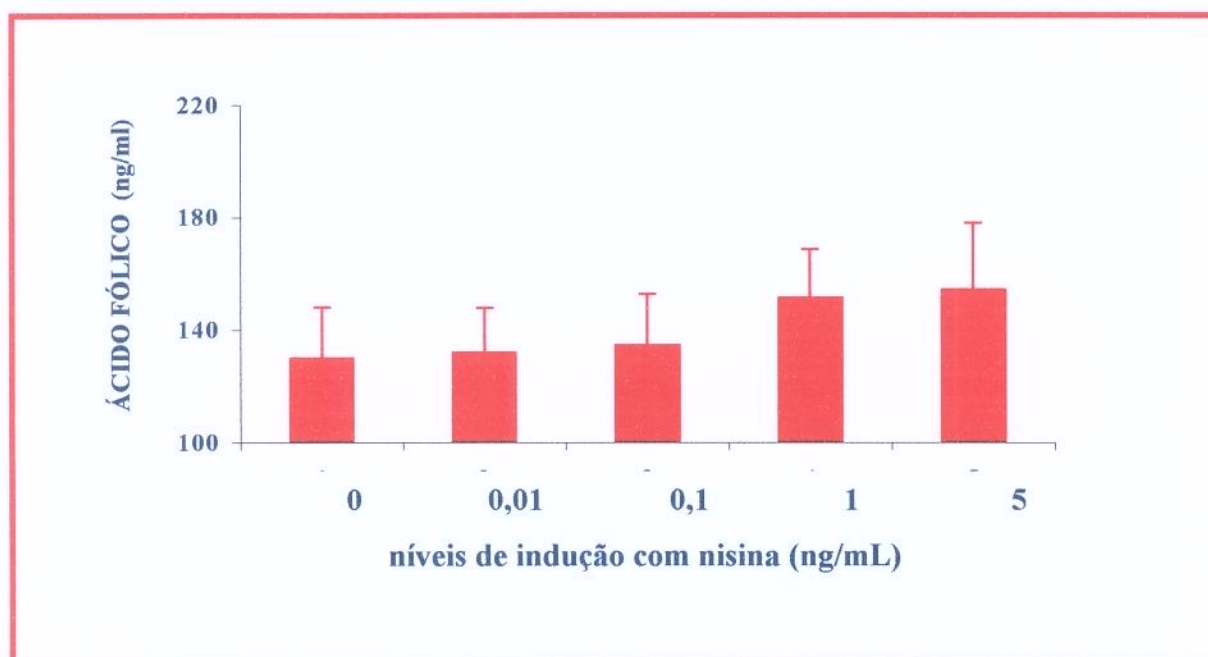


Figura 4.32. Produção de ácido fólico nos diferentes níveis de indução com nisina pela linhagem *LltglyACC3*.

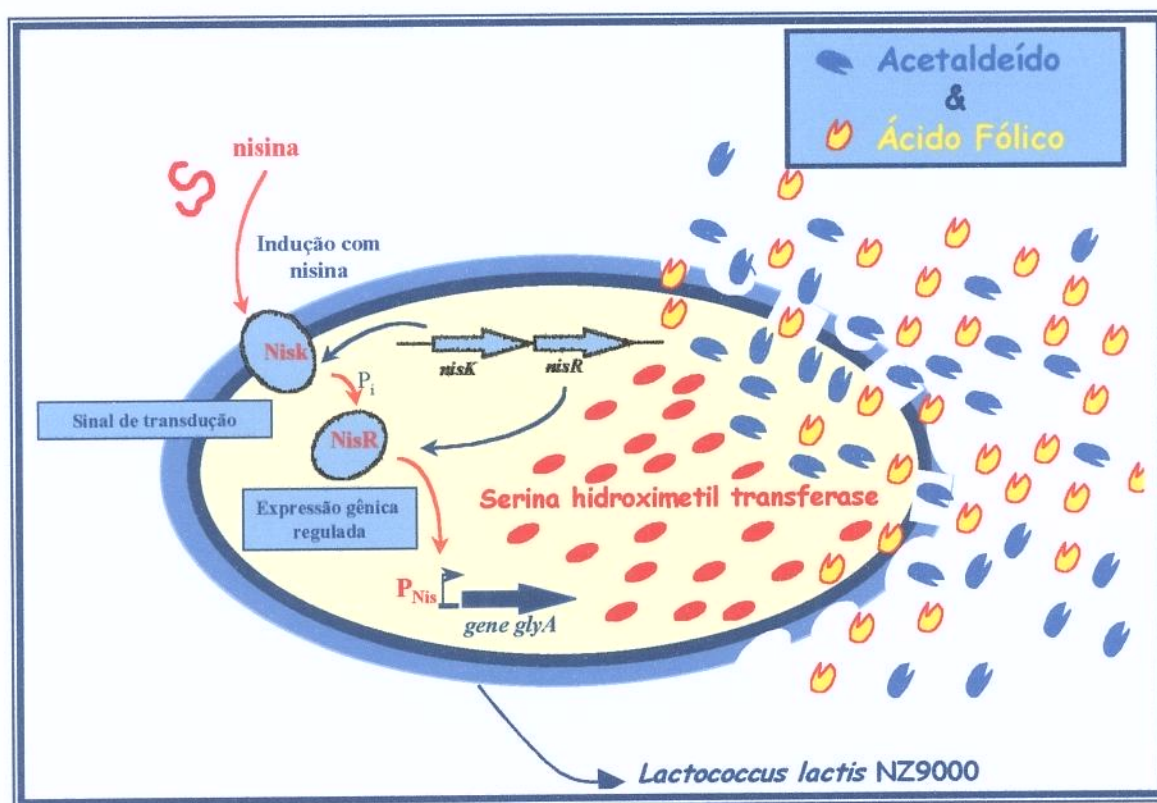


Figura 4.34. Ilustração do gene *glyA* no NICE SYSTEM (NIZO Food Research), sob o controle do P_{Nis} com superprodução da enzima SHMT.

5. CONCLUSÕES

1. O aminoácido L-treonina está envolvido no processo de regulação da enzima serina hidroximetil transferase em *S. thermophilus* e induz à produção de acetaldeído.
2. Existe uma relação direta entre a produção de acetaldeído e a atividade TA (treonina aldolase) da enzima serina hidroximetil transferase (SHMT).
3. Em *S. thermophilus*, o gene *ItaE*, que codifica a enzima treonina aldolase (EC.4.1.2.5.) não existe ou ele difere muito dos genes seqüenciados que codificam as enzimas treonina aldolase disponíveis nos bancos genômicos.
4. O gene *glyA* da linhagem NIZOB130 de *S. thermophilus*, que codifica a enzima SHMT foi amplificado e seqüenciado.
5. A interrupção do gene *glyA* resultou na supressão da produção de acetaldeído, em uma acentuada redução na taxa de crescimento e na produção de ácido láctico.
6. A superexpressão do gene *glyA* em *S. thermophilus* resultou em aumento na produção de acetaldeído e de ácido fólico em meio LM17 e em leite.
7. Nas linhagens mutantes (com interrupção e superexpressão do gene *glyA*), a produção de ácido fólico foi afetada sendo, em ambos os casos, superior à das selvagens. Esses resultados evidenciam o envolvimento da enzima SHMT no metabolismo de ácido fólico.
8. A superexpressão do gene *glyA* proveniente de *S. thermophilus* e de *L. lactis* sob o controle do promotor da nisina resultou na superprodução da enzima SHMT aumentado, também a produção de ácido fólico.
9. A enzima SHMT de *S. thermophilus* apresenta, entre outras funções, também a atividade característica da enzima treonina aldolase, realizando a conversão reversível da treonina em glicina e acetaldeído. Estabelecendo-se, assim, a importância dessa enzima na formação de acetaldeído durante o processo de fermentação.

10. A elucidação desta via metabólica poderá contribuir para controlar e/ou aumentar a produção de acetaldeído e de ácido fólico por *S. thermophilus* em leites fermentados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALM, L. Effect of fermentation on B-vitamin content of milk in Sweden. **J. of Dairy Science**, v.65, n. 3, p. 353-359, Mar, 1982.
2. ANTUNES, L. Comunicação Pessoal - Gerente de qualidade e aplicação de tecnologia da Chr-Hansen- Valinhos- Brasil, maio, 2002.
3. ANBA, J. Comunicação Pessoal - Pesquisadora de Biotecnologia de Genética Microbiana em Jouy an Josas / Inra, Set, 2001.
4. ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, L. T.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; Z.; ZHANG, Z.; MILLER, W. e LIPMAN, J. D. Gapped BLAST and PSI_BLAST: a new generation of protein database search programas. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
5. BACCIGALUPI, L.; NACLERIO, G.; DE FELICE, M.; RICCA, E. Efficient insertional mutagenesis in *S. thermophilus*. **Gene**, v. 258, p. 9-14, 2000.
6. BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513-1519, 1979.
7. BLAKLEY, R. L. **In Frontiers of Biology**. Amesterdam: North Holand, Neuberger; A.; Tatum, E. D. (Eds), 1969. v. 13. p. 190.
8. BOTTAZZI, V.; BATTITOTTI, B.; MONTESCANI, G. Influence des souches seules et associées de *L. bulgaricus* et *Str thermophilus* ainsi que des traitements du lait sur la production d'acide acétique dans le yaourt. **Le Lait**, v. 53, p. 295-308, 1973
9. BOTTAZZI, V; VESCOVO, M. Carbonyl compounds produced by yoghurt bacteria. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 23, p. 71-78, 1969.
10. BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- 11.CODERRE, P. E.; SOMKUTI, G. A. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. **Current Microbiology**, v. 39, p. 295-301, 1999.
- 12.CONN, E. E.; STUMPF, P. K. A química dos compostos biológicos – Vitaminas e coenzimas. In: CONN, E. E.; STUMPF, P. K. (ed). **Introdução à Bioquímica**. Tradução Lédia Mennucci e outros. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1980. Cap. 8, p. 180-185.
- 13.CONTESTABILE, R.; PAIARDINI, A.; PASCARELLA, S.; DI SALVO, M.L.; D'AGUANNO, S.; BOSSA, F. L-Threonine aldolase, serine hydroxymethyl transferase and fungal alanine racemase: a subgroup of strictly related enzymes specialized for different functions. **European Journal Biochemistry**, v. 268, p. 6508-6525, 2001.
- 14.CURIC, M. **Improving and stabilizing aroma in fermented dairy products**. Lyngby, Dinamarca 1998. Tese de Doutorado, Department of Biotechnology, Technical University of Denmark.
- 15.DAVIS, F.L.; LAW, B.A. **Advances in microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. London: Elsiever Applied Science Publisher, 1984, p.260.
- 16.DELCOUR, J.; FARAIN, T.; HOLS, P. Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria. Review. **Current Opinion Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 497-504, Oct; 2000
- 17.De VOS, W.M.; SIMONS, G. Gene cloning and expression systems in lactococci. In: gasson, M.J; de VOS, W.M. (Eds). **Genetics and biotechnology of Lactic Acid Bacteria**. 1ª Edição, London: Chapaman & Hall, 1994. p. 52-105.
- 18.De VOS, W. M.; BOERRIGTER, I.; van ROOIJEN, R. J.; HENGSTENBERG, W. Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. **Journal Biol Chem.**, v. 265, n. 36, p. 22554-22560, Dec, 1990.
- 19.DUMONT, J.P.; ADDA, J. Méthode rapide {étude} des composés très volatils de l'arôme des produits laitiers. application au yoghourt. **Lait**, v.53, p. 12-22, 1973.

20. EBERHARD, P.; LAVANCHY, P.; BUEHLER-MOOR, U. Sensorial tests of yoghurt . Joghurtdegustation an der OLMA. **Agrar. Forsch**, v. 2, p. 439-442, 1995.
21. ERLICH, H. A.; BELL J. PCR Polymerase Chain Reaction Technology, principles and applications for DNA amplification. **Nature**, v.341, n. 6239, p. 196-196, Sep, 1989.
22. FERREIRA, C.L.L.F. Valor Nutritivo e Bioterapêutico de Leites Fermentados. In: **Apostila do curso de leites fermentados e bebidas lácticas**. Ital, Campinas, São Paulo, 2-4 Abril., 1997, p.1-2.
23. FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. - General Aspects. Elsevier Applied Science, London, New York, v. 1, p. 400, 1987.
24. FROSETH, B. R.; MACKAY, L. L. Development and application of pFM011 as a positive food-grade cloning vector. **J. of Dairy Science**, v. 74, p. 1445-1453, 1991.
25. GASSON, M. J. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and others lactic streptococci after protoplast-induced curing. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 1-9, 1983.
26. GONZALEZ, S.; AMBROSINI, V. M.; NADRA, M. M.; HOLGADO, A. P. R.; OLIVER, O. Acetaldehyde production by strains used as probiotics in fermented milk. **Journal of Food Protection**, v. 57, p.436-440, 1994.
27. GILLILAND, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria Review. **FEMS Microbiology Rev.**, v. 7, n. 1/2, p. 175-88, Sep, 1990.
28. HAMDAN, I. Y.; KUNSMAN, J. E. Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. **Journal of Dairy Science.**, v. 54, n. 7, p. 1080, 1971.
29. HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, p. 557-580, 1983.
30. HELLER, K. J.; GEIS, A.; NEVE, H. Behaviour of genetically modified microorganisms in yogurt. **Systematic Applied Microb.**, v. 18, p. 504-509, 1995.
31. HIGGINS, D. G.; SHARP, P. M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. **Comput. Appl. Biosci.**, v. 5, p. 151-153, 1989.

- 32.HOLO, H.; NES, I. F. High-frequency transformation, by electroporation, of *L.-lactis* subsp *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3119-3123, dez.,1989.
- 33.HORNE, D. W.; PATTERSON, D. *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96 well microtiter plates. **Clin. Chem.**, v.34, n. 1, p.2357-2359, 1988.
- 34.HUNGER, W. Sauermilchprodukte Hergesllt Mit "Mild Sauernnden Kulturen" **Dtsch. Mol. Ztg.**, v. 106, p. 826-833, 1985.
- 35.HUTKINS, R.W.; MORRIS, H.A. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a Review. **J. of Food Protection**, v. 50, n. 10, p. 876-884, 1987.
- 36.ITO, Y.; SASAKI, T. Cloning and nucleotide sequencing of L-lactate dehydrogenase gene from *S. thermophilus* M-192. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, p. 1569-1573, 1994.
- 37.IMHOF, R. **Bildung von flüchtigen aromakomponenten durch starteorganismen und ihr beitrag an das resultierende aroma in frisch fermentierten milchprodukten.** Berne, 1994. Tese de doutorado - University of Berne, Suíça.
- 38.JOHANSEN, E. Genetic Engineering (b) Modification of Bacteria, **Encyclopedia of Food Microbiology**. Robinson, R; Batt, C.; Patel, P. (Eds) London, Academic Press, 1999.
- 39.KEENAN, T.W.; BILLS, D. D. Metabolism of volatile compounds by lactic starter culture microorganisms. A Review. **J. of Dairy Science**, v. 51, p. 1561-1567, 1968.
- 40.KLEINSCHMIDT, J.; SOEDING, B.; TEUBER, M.; NEVE, H. Evaluation of horizontal and vertical gene transfer and stability of heterologous DNA in *Streptococcus thermophilus* isolated in yogurt and yogurt starter cultures. **System. Applied Microbiology**, v. 16, p.287-295, 1993.
- 41.KLEEREBEZEM, M. Comunicação Pessoal – Pesquisador do NIZO Food Research, Ede, Holanda, 1999.

- 42.KLEEREBEZEM, M; HOLS, P.; HUGENHOLTZ, J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 26, p. 840-848, 2000.
- 43.KNEIFEL, W.; ULBERTH, F.; ERHARD, F.; JAROS, D. Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. I. Screening of commercially available starter cultures. **Milchwissenschafft**, v. 47, p.362-365, 1992.
- 44.KUIPERS, O. P.; PASCALLE, G. G. A. A.; de RUYTER, P. G. G. A.; KLEEREBEZEM, M; de VOS, W. M. Controlled overproduction of protein by lactic acid bacteria. **Trends Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 135-140, 1997.
- 45.KUIPERS, O. P.; de RUYTER, P. G. G. A; KLEEREBEZEM, M; de VOS, W. M. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 64, p. 15-21, 1998.
- 46.LAEMMLI, U.K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 47.LAW, B.A. The formation of aroma and flavor compounds in fermented dairy products. **Dairy Science Abstract**, v. 43, p. 143-154, 1981.
- 48.LEES, G. J.; JAGO, G. R. Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Research**, v. 43, p.75-83, 1976.
- 49.LEES, G. J.; JAGO, G. R. Formation of acetaldehyde from 2-deoxy-d-ribose-5-phosphate in lactic acid. **Journal of Dairy Research**, v. 44, p.139-144, 1977.
- 50.LEES, G. J.; JAGO, G. R. The role of acetaldehyde in metabolism: a review 2. The metabolism of acetaldehyde in cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 1216-1224, 1978.
- 51.LEENHOUTS, K.; BUIST, G.; BOLHUIS, A.; TEN BERGE, A.; KIEL, J.; MIERAU, I.; DABROWSKA, M.; VENEMA G.; KOK, J. A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. **Mol. Gen. Genet.**, v. 253, p.217-224, 1996.

52. LEEDS, A. R. R.; ROWLAND, I. R. In LEEDS, A. R. R.; ROWLAND, I. R (Eds). **Gut Flora and Health – Past, Present and Future**. The Royal Society of Medicine Press Limited, 1996. v. 219, 71p. International Congress and Symposium Series.
53. LERAYER, A. L. S.; GRAEL-MARASCA, E. T.; VIALTA, A. Utilização de microrganismos geneticamente modificados na indústria de alimentos. In GIÚDICE, M. P. (Ed.). **Alimentos transgênicos**. 1ª Edição. Viçosa/MG: Universidade Estadual de Viçosa, 2000. Cap. 10, p. 203-274.
54. LEVANDER F, SVENSSON M, RADSTROM P. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 784-790, Feb, 2002.
55. LIN, M. Y.; YOUNG, C. M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 409-414, 2000.
56. LIU, J-Q.; NAKATA, S.; DAIRI, T.; MISONO, T.; SHIMIZU, S.; YAMADA, H. The *gly1* gene from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specificity L-threonine aldolase that catalyses cleavage of l-Allo threonine and l-threonine to glycine: expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of this enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, p. 289-293, 1997.
57. LIU, J-Q.; DAIRI, T.; ITOH, N.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S.; YAMADA, H. Gene cloning, nucleotide sequencing, purification, and characterization of low-specificity l-threonine aldolase from *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v. 255, p. 220-226, 1998a.
58. LIU, J-Q.; DAIRI, T.; ITOH, N.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S.; YAMADA, H. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity l-threonine aldolase from *Pseudomonas sp* NCIMB strain 10558. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 549-554, 1998b.
59. MAGUIN, E.; PREVOST, H.; EHRLICH, S. D.; GRUSS, A. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 931-935, 1996.

- 60.MANCA DE NANDRA, M. C.; RAYA, R. R.; PESCE DE RUIZ, A.H.; OLIVER, O.
Isolation and properties of threonine aldolase of *Lactobacillus bulgaricus* Yop₁₂ .
Milchwissenschaft, v. 42, p. 92-94, 1987.
- 61.MARRANZINI, R. M., SCHMIDT, R. H. SHIREMAN, R. B. MARSHALL, M. R.;
CONERLL, J. A. Effect of threonine and glycine concentration on threonine
aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in modified milk
prepared by ultrafiltration. **Journal of Dairy Science**. v. 72, p. 1142-1148, 1989.
- 62.MARSILI, R.T. Monitoring bacterial metabolites in cultured buttermilk by high-
performace liquid chromatografy and head space gas chromatografy. **Journal of
Chromatography Science**, v. 19, p. 451-456, 1981.
- 63.MARSHALL, V.M. Fermented milks and their future trends. Part I - microbiological
aspects. **Journal of Dairy Research** v. 54, p. 559-574, 1987.
- 64.MCKAY, L. L. Functional properties of plasmids in Lactic Streptococci. **Antonie Van
Leeuwenhoek**, v. 49, p. 259-274, 1983.
- 65.MERCENIER, A. ROBERT, C.; ROMERO, D. A.; I.; SLOS, P.; LEMOINE; Y.
Transfection of *Streptococcus thermophilus*, In: FERRETTI, J. J.; CURTISS, R.
(Ed.), **Streptococcal Genetics**. III Ed. Washington, D. C.: American Society for
Microbiology, 1987. p. 234-237.
- 66.MERCENIER, A. ROBERT, C.; ROMERO, D. A.; CASTELLINO, I.; SLOS, P.;
LEMOINE; Y. Development of an efficient spheroplast transformation procedure
for *s. thermophilus*: the use of transfection to define a regeneration medium.
Biochimie , v. 70, p. 567-577, 1988.
- 67.MERCENIER, A.; LEMOINE, Y. Genetics of *Streptococcus thermophilus*: A Review.
Journal of Dairy Science v. 72, p 3444-3454, 1989.
- 68.MERCENIER, A. Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus* Review. **FEMS
Microbiology Review**, v. 7, n. 1/2, p. 61-77, Sep, 1990.
- 69.METCHNIKOFF, E. **The prolongation of Life**. Tradução (para inglês) MITCHELL, C.
1ª Ed. de1907 revisada. New York: G. P. Putnam's Sons, 1910.

- 70.MOLLET, B.; KNOL, J.; POOLMAN, B.; MARCISSET, O.; DELLEY, M. Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene expression in *S. thermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p.4315-4324, 1993.
- 71.MOLOY, A. M.; J. M. SCOTT. Microbiological assay for serum, plasma and red cell folate using cryopreserved, microtiter plates method. **Methods in Enzymology**, v. 281, p. 43-53. 1997.
- 72.MONSCHAU, N.; SAHM, H.; STAHMANN, K. P. Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhance riboflavin production in *Ashbya Gossypii*. **Applied Envir. Microbiology**, v. 64, p. 4283-4290, 1998.
- 73.MUSTAPHA, A. HUTKINS, R. W.; ZIRNSTEIN, G. W. Cloning and characterization of the galactokinase gene from *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 989-997, 1995.
- 74.NEWTON, S.M.C. Elementos móveis em procariontes. In NEWTON, S. O. P. (Ed.). **Genética molecular de microrganismos**. São Paulo: Editora Manole Ltda., p. 291-306, 1987.
- 75.OGAWA, H.; GOMI, T.; FUJIOKA, M. Serine Hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 289-301, 2000.
- 76.OLIVEIRA, A.F.A. Qualidade e organização na produção de leites fermentados. In: **Apostila do curso de Leites Fermentados e Bebidas Lácticas**. Ital, Campinas, 2-4 Abril. p.16-1, 1997.
- 77.ORLA-JENSEN, S. **The Lactic Acid Bacteria**. Compenhagem: AF Holt and Son, (Eds), 1919.
- 78.OTT, A., FAY, L. B.; CHAINTREAU A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v. 45, p. 850-858, 1997.
- 79.OTT, A; GERMOND, J.E.; BAUMGERTNER, M.; CHAINTREAU, A. Aroma comparisons of traditional and mild yogurt. head-space-gc quantitation of volatiles

- and origin of a α -dikotones. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p. 2379-2385, 1999.
- 80.OTT, A.; HUGI, A.; GERMOND, J. E.; BAUMGERTNER, M.; CHAINTREAU, A. Sensory investigation of yogurt flavor perception: mutual influence of volatiles and acidity. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 4411-450, 2000.
- 81.PETTE, J.W.; LOLKEMA, H. Acid production and aroma formation in yoghurt. **Neth. Milk Dairy Journal**, v. 4, p. 261-273, 1950.
- 82.PHILLIPS, D. R; WRIGHT, A. J. A. Studies on the response of *L. casei* to different folate monoglutamates. **British J. of Nutrition**, v. 47, p. 183-189, 1982.
- 83.PHILLIPS, D. R; WRIGHT, A. J. A. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate vitamin in foods. **British Journal of Nutrition**, v. 49, p. 181-186, 1983.
- 84.PLATTEUW, C.; SIMONS G.; DE VOS W. M. Use of *Escherichia coli* β -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analysing promoters in Lactic Acid Bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 587-593, 1994.
- 85.RASIC, J.L.; KURMANN, J. A. **Yogurt-Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations**. Compenhagem: Technical Dairy Publishing House, Denmark, 1978. 428p.
- 86.RAYA, R. R.; MANCA DE NADRA, M. C.; PESCE DE RUIZ HOLGADO; A.; OLIVER, G. Acetaldehyde metabolism in Lactic Acid Bacteria. **Milchwissenschaft**, v. 41, p. 397-399, 1986.
- 87.REITER, B.; ORAN, J. D. Nutritional studies on cheese starters. Vitamin and amino acid requirements of single strain starters. **J. Dairy Res.**, v. 29, p. 63-77, 1962.
- 88.REDDY, K.P.; SHAHANI, K.M.; KULKARNI, S.M. B-Complex vitamin in cultured and acidified yogurt. **J. of Dairy Science**, v. 59, p. 191-195, 1976.
- 89.ROBINSON, R.K. **Microbiologia de la Leche: Microbiologia Lactologica**. Zaragoza: Editora Acribia. 1987, v. 1, 230p.

- 90.ROSSBACH, S.; HENNECKE, H. Identification of *glyA* gene as a symbiotically essential gene in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 39-47, 1991.
- 91.RUYTER, P. G.G.A.; KUIPERS, O. P.; DE VOS, W.M. Controlled gene expression system for lactococcus lactis with the food-grade inducer nisin. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3662-3667, 1996.
- 92.SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2^a Ed. 1989.
- 93.SCHIRCH L. Serine Hydroxymethyltransferase. In: ALTON MEISTER (Ed.) **Advances in enzymology**. F.F. Nord, 1983. v. 53, p. 83- 112.
- 94.SCHIRCH, L. Serine Hydroxymethyl transfarase. In: BLAKLEY, R. L.; BENKOVIC, S. J. (Ed.), **Folates and Pterins**. New York: John Wiley & Sons Inc. 1984. v. 1, p.399-432.
- 95.SCHIMIDT, R.H.; DAVIDSON S.M.; BATES, R.P. Acetaldehyde determination in fermented food-products by direct 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization, extraction and high-performance liquid-chromatography. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 5, p. 1556- 1557, 1983.
- 96.SCHLEIFER, K. H.; EHRMANN, M.; KRUSCH, U.; NEVE, H. Revival species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. **System Applied Microbiology**, v. 14, p. 386-388, 1991.
- 97.SHAHANI, K. M.; KELLY, D. L.; HATHAWAY, I. B-Complex vitamin content of cheese: niacin, pantothenic acid, pyridoxine, biotin and folic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 833, 1962.
- 98.SHANKAR, P. Amino acid and peptide utilization by *S. thermophilus* in relation to yogurt manufacture. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 43, n VIII, 1977.
- 99.SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P.; HUYNEN, M. A. String: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighborhood of a gene. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 3442-3444, 2000.

- 100.SNEATH, P.H.A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M.E.; HOLT. J.G. **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore, USA: Willians & Wilkins, 1986, v. 2, p. 948-1599.
- 101.SOMKUTI G. A.; STEIMBERG, D. H. Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 1, p. 157-163, 1986.
- 102.SOMKUTI G. A.; SOLAIMAM, D. K. Y; STEIMBERG, D. H. Cloning of a tyrosinase gene in *Streptococcus thermophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 8, p. 773-778, 1991a.
- 103.SOMKUTI G. A.; SOLAIMAM, D.K.Y; STEIMBERG, D. H. *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 330-334, 1991b.
- 104.SOLAIMAM, D.K.Y.; SOMKUTI G.A. DNA structures contributing to the instability of recombinant plasmids in *Streptococcus thermophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 9, p. 753-758, 1992.
- 105.SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 5, n. 98(3), p. 503-517, Nov, 1975.
- 106.STANLEY, E.; WALSH, L.; van der ZWET, A.; FITZGERALD, G. F.; van SINDEREN, D. Identification of four loci isolated from two *Streptococcus thermophilus* phage genomes responsible for mediating bacteriophage resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 15, n. 182 (2), p. 271-277, Jan, 2000.
- 107.STOVER, P.; KRUSCHWITZ, H.; V. SCHIRCH. Evidence that 5-formyltetrahydropteroylglutamate has a metabolic role in one-carbon metabolism, In AYLING, J.E. (Ed.), **Chemistry and biology of pteridines and folates**, New York: Plenum Press. 1993. p. 679-685.
- 108.TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 939-977, 1980.
- 109.TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yogurt: Science and Technology**. 2ª Edição. Oxford (U.K.): Pergamon Press, 1999.

110. TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. Fermented milks and their future trends. Part II - Technological Aspects. **Journal of Dairy Research**, v. 55, p. 281-307, 1988.
111. UMBARGER, H. E.; UMBARGER, M. A.; SIU, P. M. L. Biosynthesis of serine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriology**, v. 85, p. 1431-1439, 1963.
112. ULBERTH, F. Headspace gas chromatographic estimation of some yogurt volatiles. **J. Association of Official Anal Chemistry**, v. 74, p. 630-634, 1991.
113. VAN KRANENBURG, R.; MARUGG, J. D.; VAN SWAN, I. I.; WILLEM, N. J.; de VOS, W. M. Exopolyssaccharides biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZOB40: functional analysis of the polysaccharides backbone. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 338-340, 1999.
114. VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Fermented Milk. **Milk and Milk Products - Technology, Chemistry and Microbiology**. London: Chapman and Hall, 1994. v. 1, Cap. 8, p. 347-385.
115. VEDAMUTHU, E. R.; NEVILE, J. M. Involvement of plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk culture by *Streptococcus cremoris* ms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, p. 677-682, 1986.
116. VOS, P.; VAN ASSELDONK, M.; VAN JEVEREN, F.; SIEZEN, R.; SIMONS, G.; de Vos, W. M. A maturation protein essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SKII serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. **J. Bacteriology**, v. 171, n. 5, p. 2795-2802, May, 1989.
117. WEEB, E. C. In VLIEGENTHART, J. F. G. e outros (ed.), **Enzyme nomenclature IUBMB: International Union of Biochemistry and molecular biology**. San Diego: Academic Press, INC Publisher Harcourt Brace Jovanovich, 1992. p. 173 e 460
118. WILLETTS A. J.; TURNER, J. M. L-Threonine acetaldehyde-lyase in strain of *Bacillus subtilis*, **Biochimica et Biophysica acta** v. 252, p. 105-110. 1971
119. WILKINS, D. W.; SCHMIDT, R. H.; SHIREMAN, R. B.; SMITH K. L; JEZESKI, J. J. Evaluating acetaldehyde synthesis from L-[¹⁴C(U)] threonine by *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. **J. of Dairy Science**, v. 69, p. 1219-1224, 1986a

120. WILKINS, D. W.; SCHMIDT, R. H.; KENNEDY, L. B. Threonine aldolase activity in yogurt bacteria as determined by headspace gas chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 34, p. 150-152, 1986b.
121. WOUTERS, J. T. M.; AYAD, H. E. E.; HUGHENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk to fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91-109, 2002.
122. ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J.. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. a Review. **Le Lait**, v. 72, p.1-34, 1992.

ANEXO I

MAPAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS NAS CONSTRUÇÕES

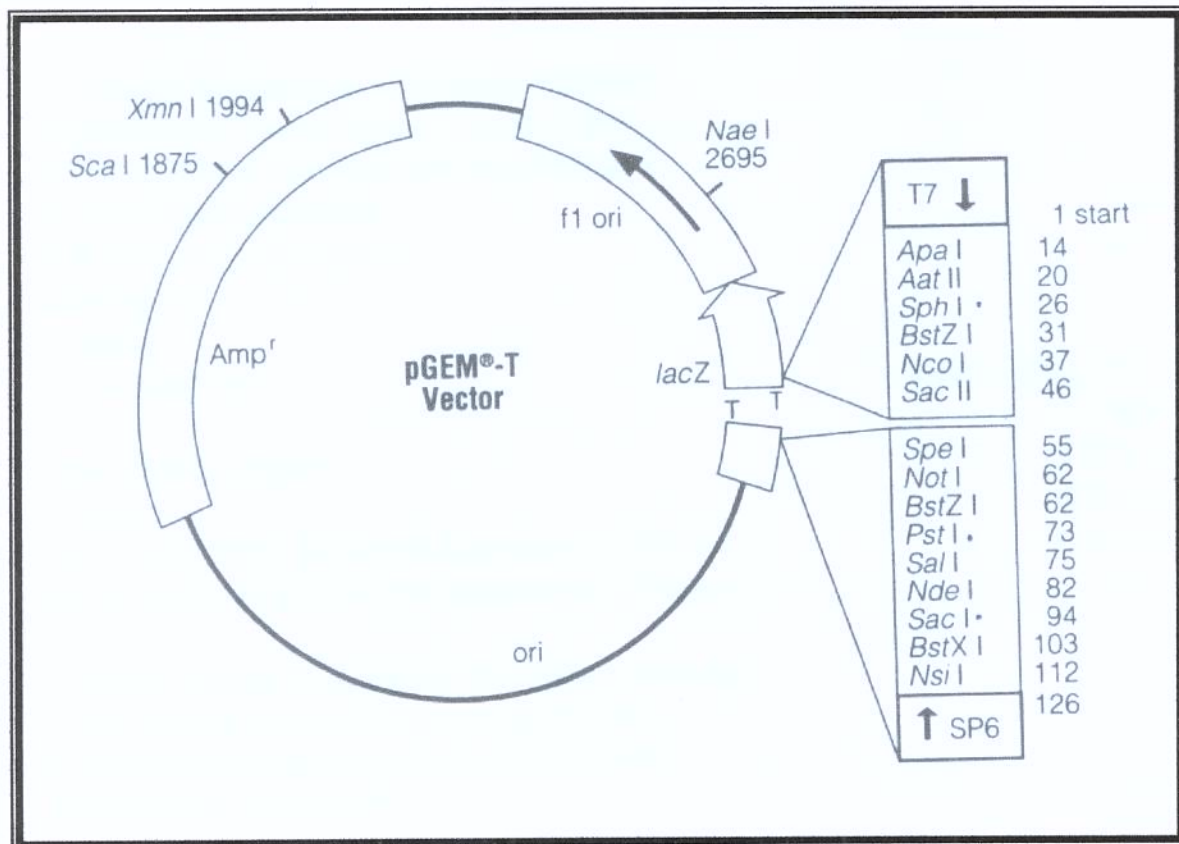


Figura 3.1. Mapa do vetor comercial pGEM®-T (Promega) que foi utilizado para clonagem direta de produtos de PCR para sequenciamento. Neste vetor existem indicações dos genes: *lacZ*, *Amp^r* = o gene de resistência ao antibiótico ampicilina, *f1* = região de fago e *ori* = origem de replicação. Existe também um múltiplo sítio para clonagens com diversas enzimas de restrição.

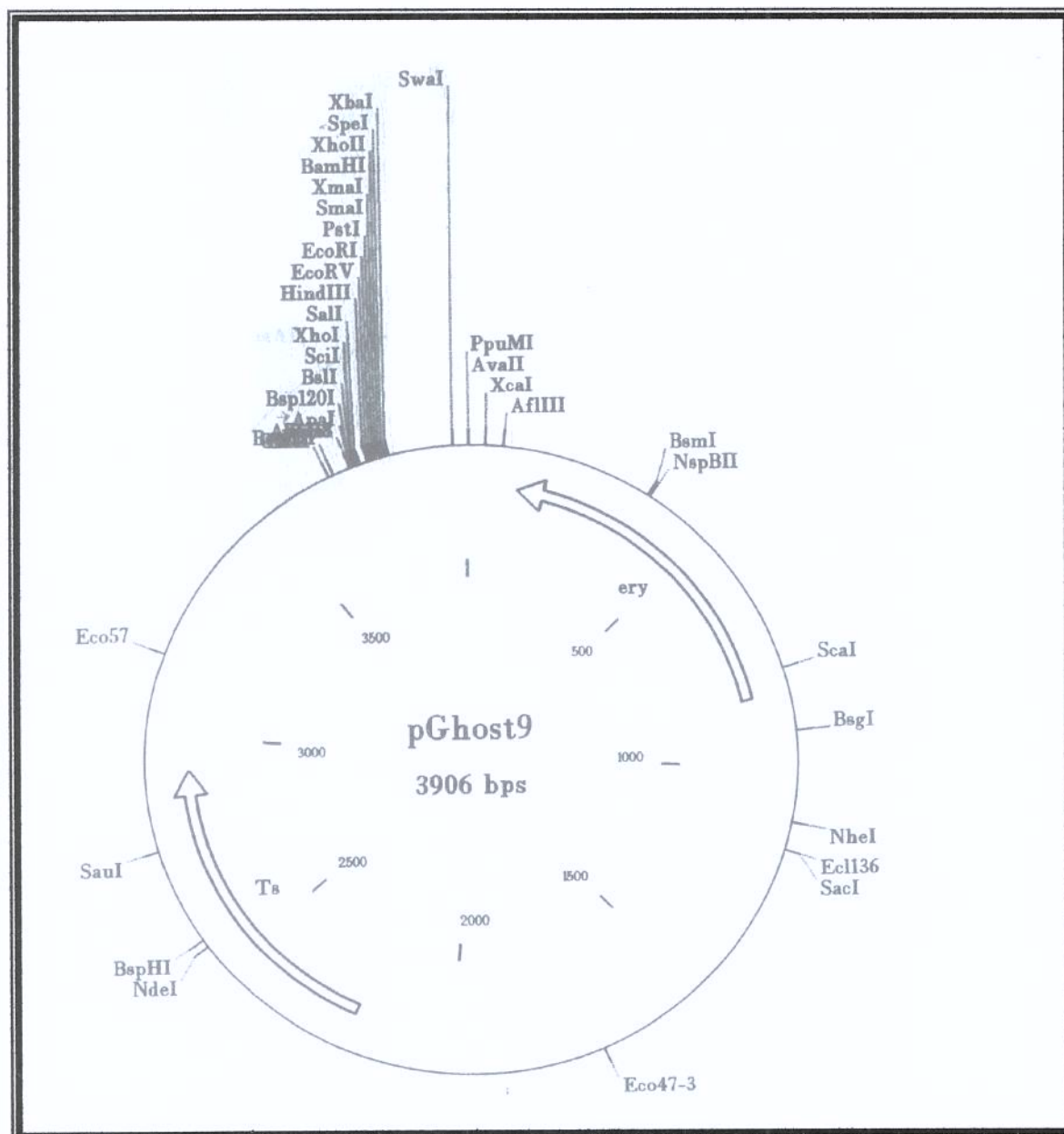


Figura 3.2. Mapa do plasmídeo pG⁺host9 (Maguin *et al.*, 1996) foi utilizado para interrupção do gene *glyA* em *S. thermophilus*. Neste vetor existem indicações para ery = gene de resistência ao antibiótico eritromicina, Ts = replicon termossensível e um múltiplo sítio para clonagem com diferentes enzimas de restrição.

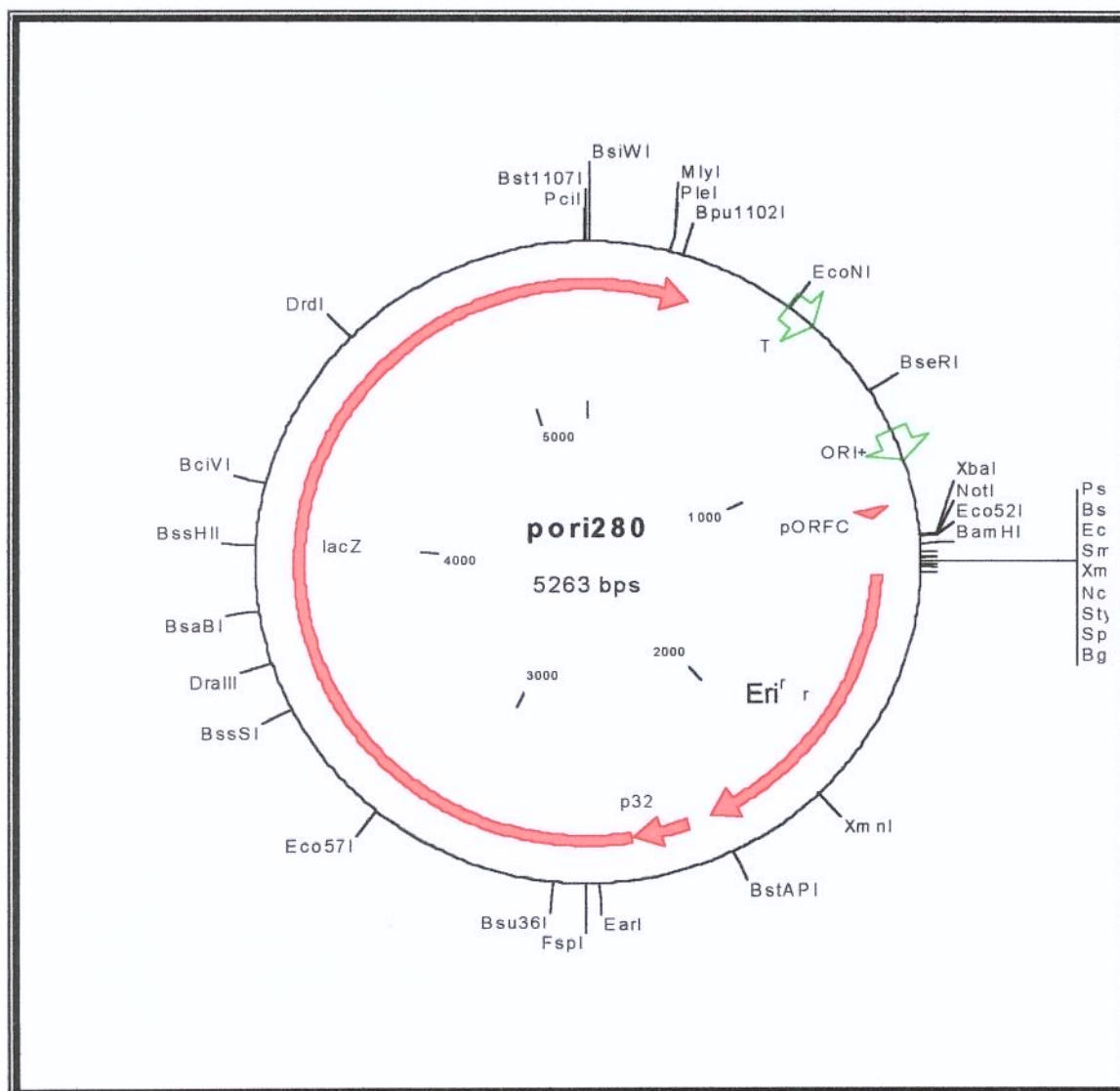


Figura 3.3. Mapa do plasmídeo pORI280 (Leenhouts *et al.*, 1996) com as seguintes indicações para os genes *lacZ*, *Eri^r* = gene de resistência ao antibiótico eritromicina, T = terminador de transcrição, ORI+ = origem de replicação, p32 = promotor de *Lactococcus* também ativo em *E. coli* e em *B. subtilis* e um sítio múltiplo para clonagem com diferentes enzimas de restrição.

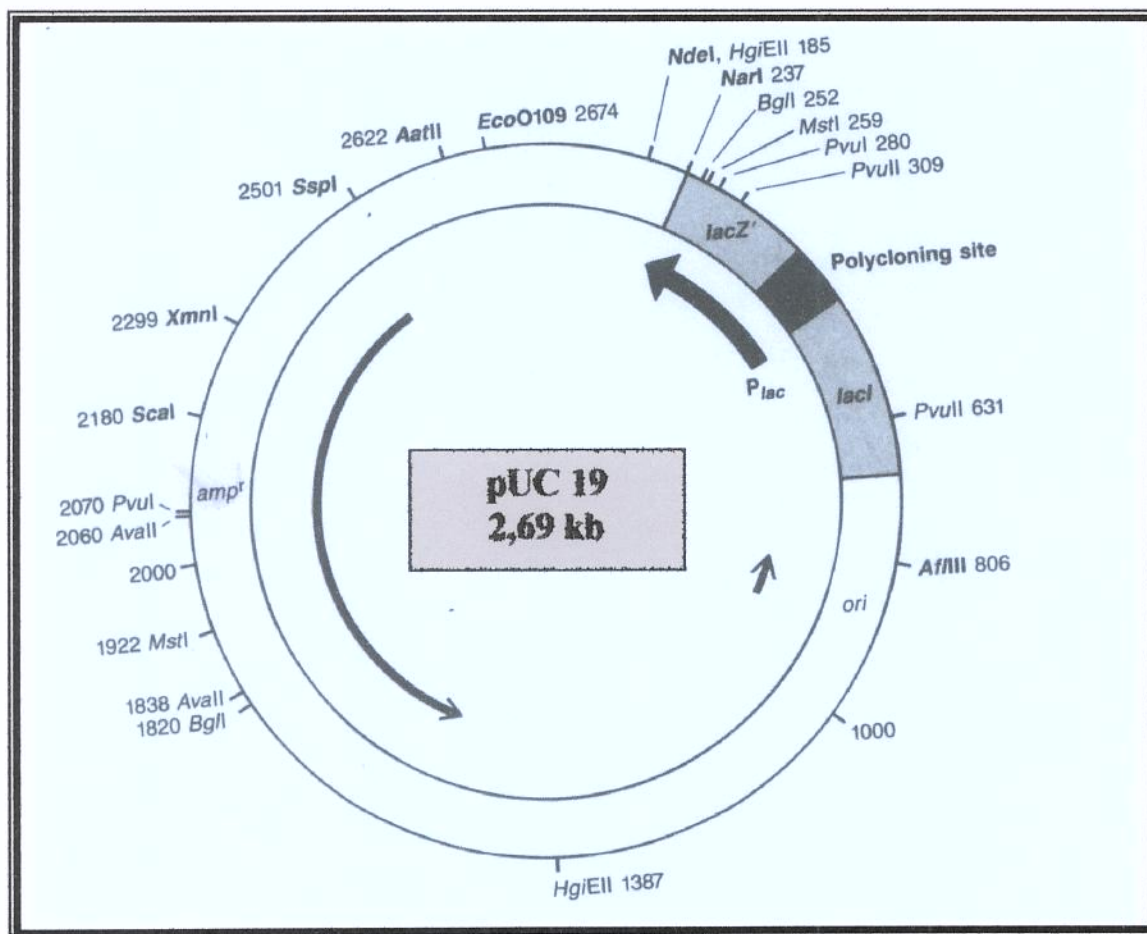


Figura 3.4. Mapa do plasmídeo pUC19 (Sambrook *et al.*, 1989) com as seguintes indicações para os genes *lacZ*, *lacI*, *amp^r* = gene de resistência ao antibiótico ampicilina, *ori* = origem de replicação, *P_{lac}* = promotor de *Lac* e Polycloning site = sítio múltiplo para clonagem com diferentes enzimas de restrição.

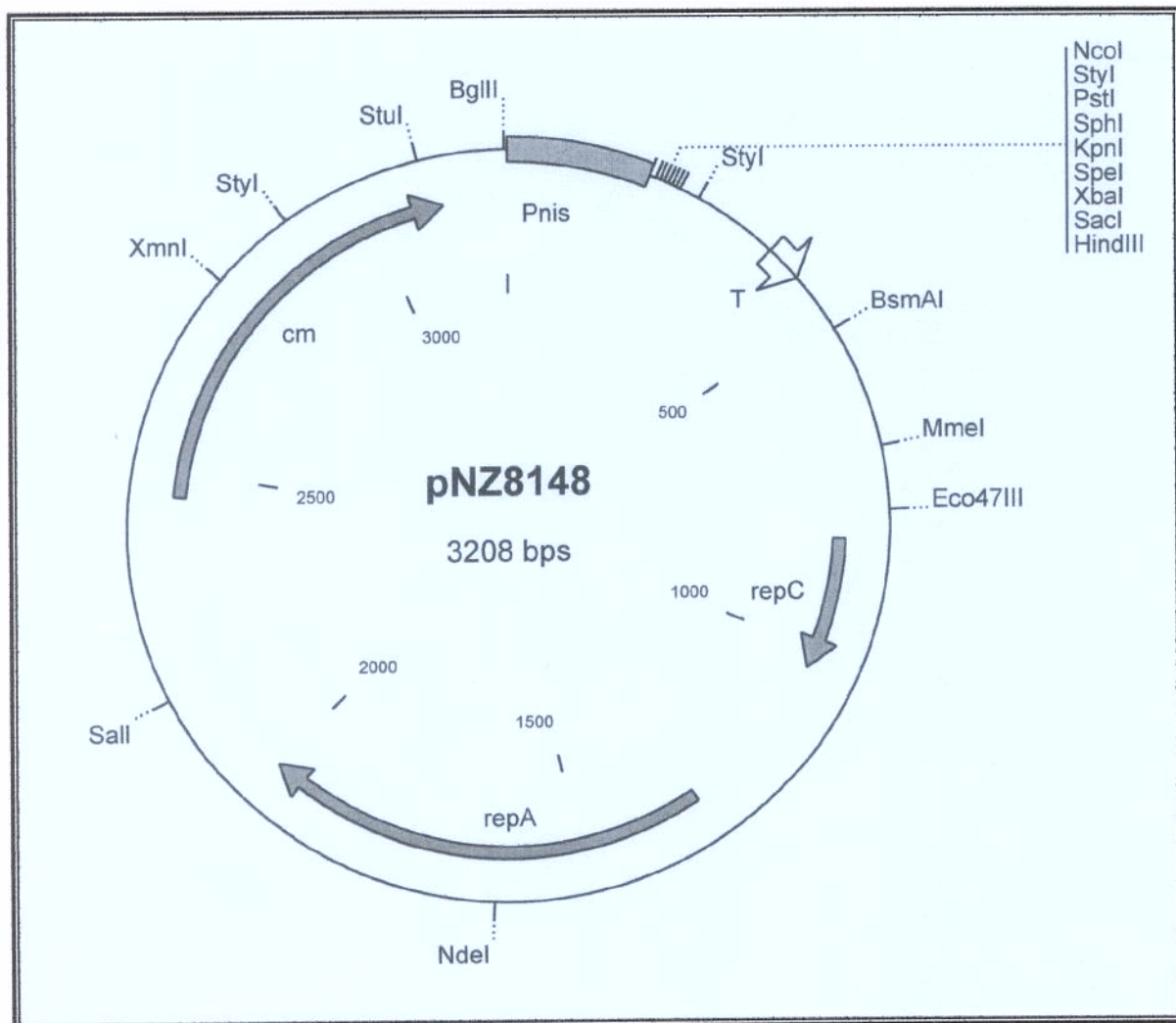


Figura 3.5. Mapa do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) com indicações dos genes repA = origem de replicação; repC= repressor; cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, flecha = T = terminador de transcrição, P_{Nis} = promotor da nisina e um sítio múltiplo de clonagem com diversas enzimas de restrição.

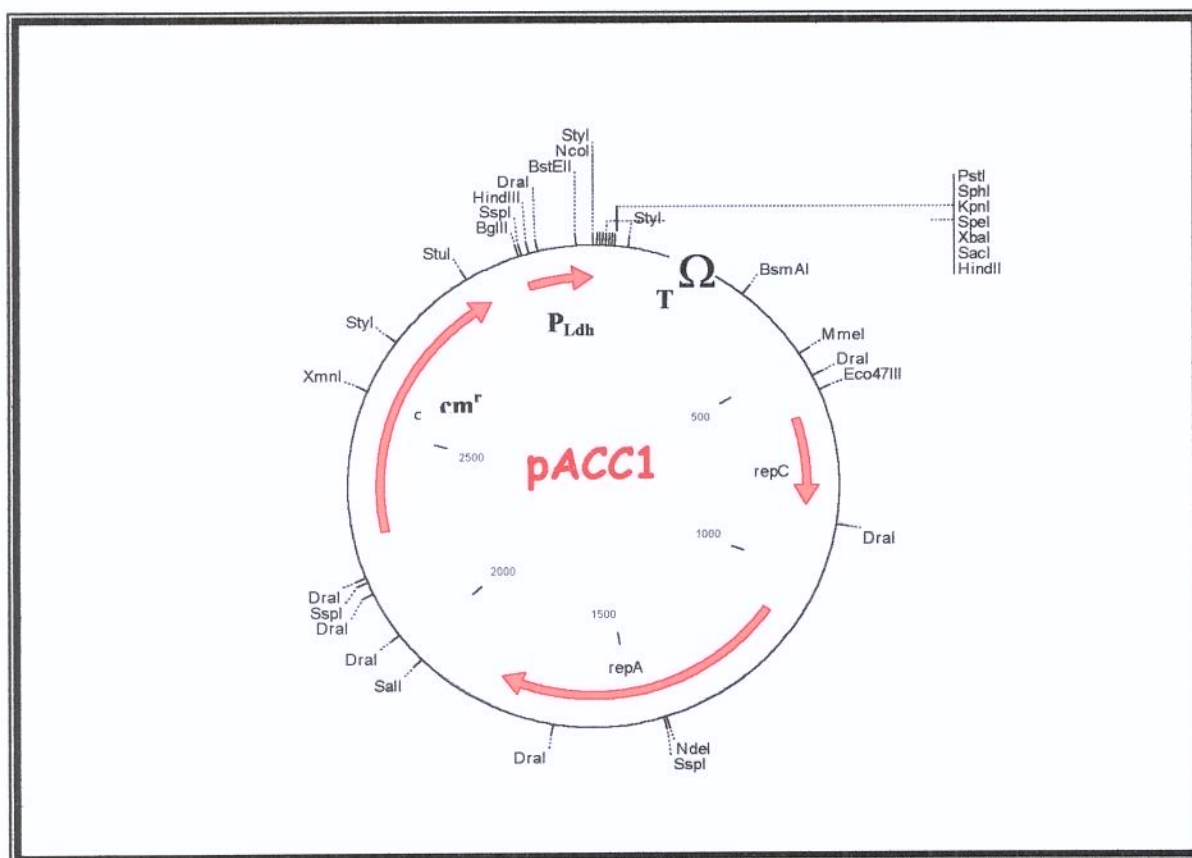


Figura 3.6. Mapa do plasmídeo pACC1 obtido a partir do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research) com indicações dos genes: repA = origem de replicação, repC = repressor, cm^r = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, T = terminador de transcrição, P_{Ldh} = promotor do gene lactato desidrogenase e um sítio múltiplo de clonagem com diversas enzimas de restrição.

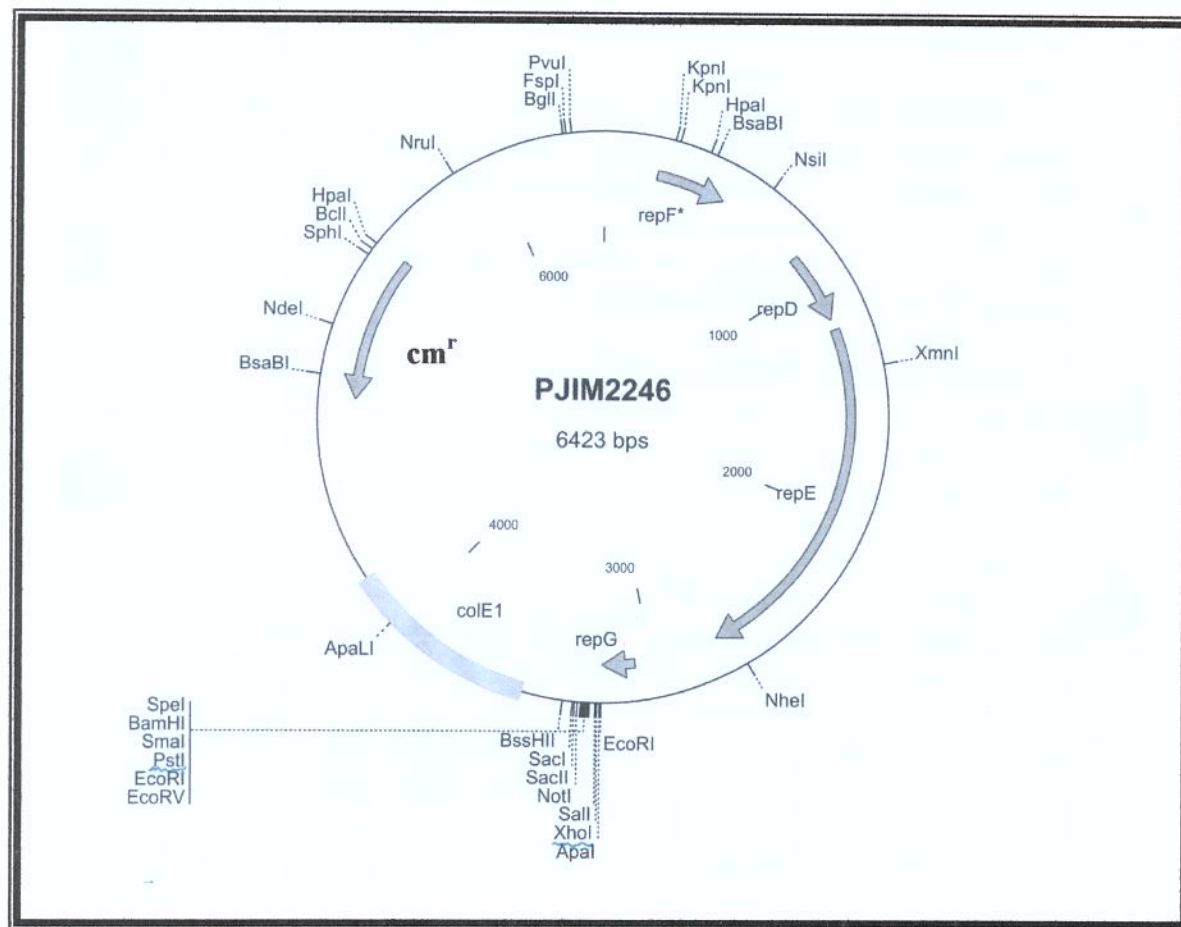


Figura 3.7. Mapa do vetor pJIM2246 com indicações dos genes de origens de replicação repD, repE, repF, repG e repC = repressor; cm^r= gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol; colE1 = promotor e um sítio múltiplo para clonagem com diferentes enzimas de restrição.

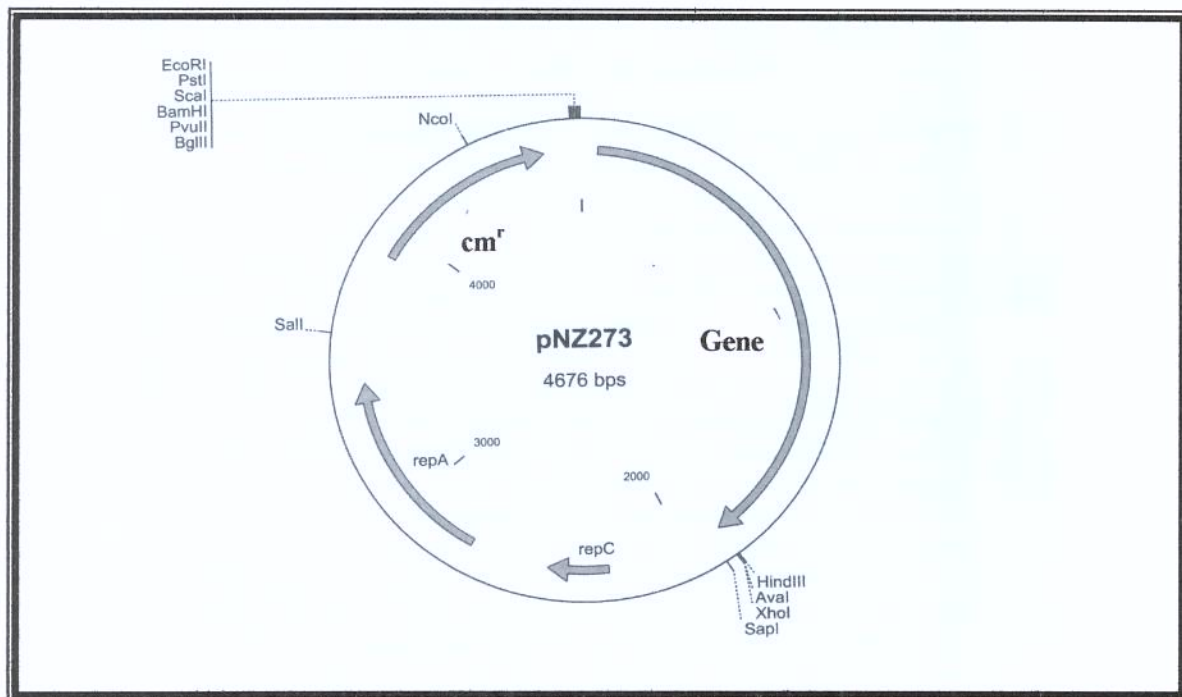


Figura 3.8. Mapa do vetor pNZ273 (NIZO Food Research) sem promotor para expressão de gene com promotor. Contém indicações dos genes repA = origem de replicação; repC = repressor; cm^r = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol; Gene = local para clonagem do gene a ser expresso e dois sítios múltiplos de clonagem com diversas enzimas de restrição.

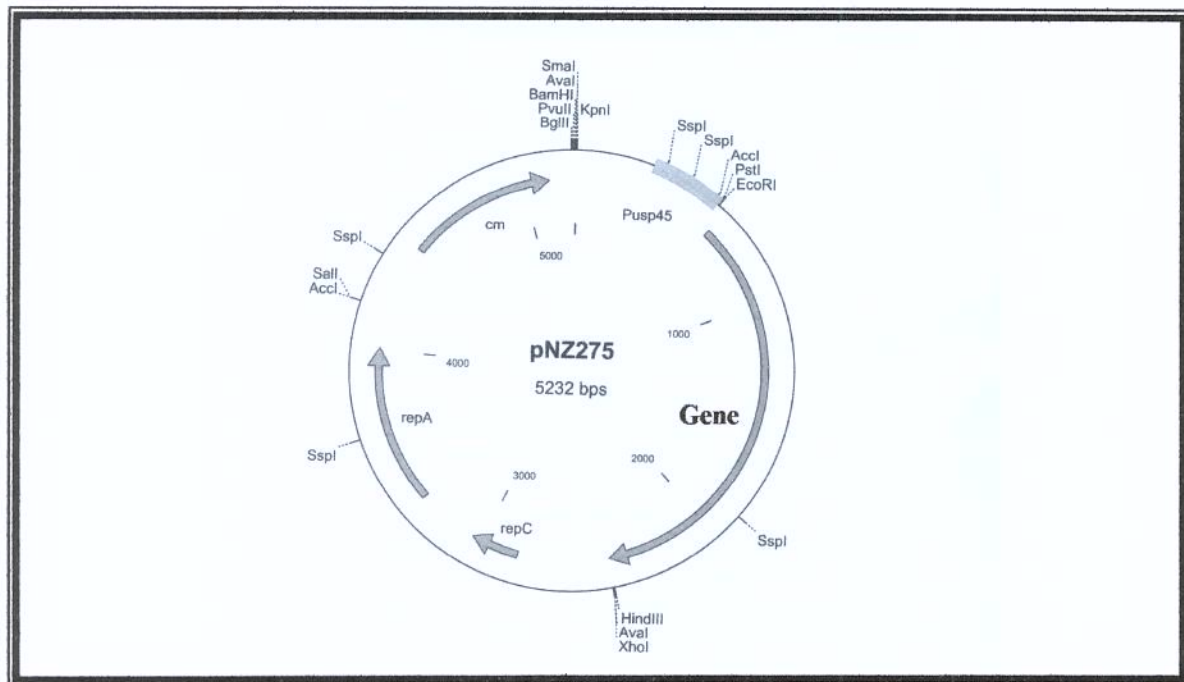


Figura 3.9. Mapa do vetor pNZ275 (NIZO Food Research) para superexpressão do gene de interesse (Gene = local para clonar o gene para superexpressão). Contém indicações dos genes repA = origem de replicação; repC= repressor; cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol. P_{USP45} = promotor da enzima α -amilase e dois sítios múltiplos de clonagem com diferentes enzimas de restrição.

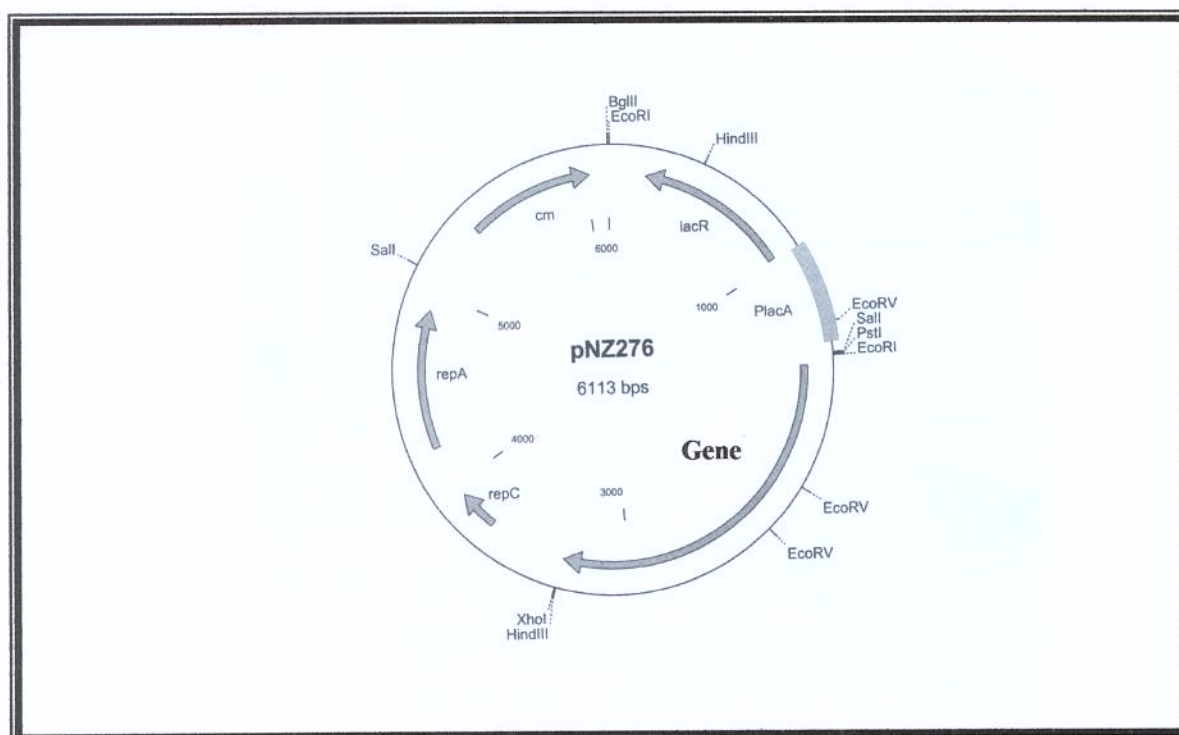


Figura 3.10. Mapa do vetor pNZ276 (NIZO Food Research) para superexpressão do gene de interesse (Gene = local para clonar o gene para superexpressão). Contém indicações dos genes repA = origem de replicação; repC = repressor; cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol e lacR = gene do operon lac. P_{lacA} = promotor e dois sítios múltiplos de clonagem com diferentes enzimas de restrição.

ANEXO II

PUBLICAÇÕES, PALESTRAS e POSTER DURANTE ESTA TESE

- ⇒ Resumo da publicação enviada em abril de 2002 para revista “Applied and Environmental Microbiology” - Título: **Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*.**
- ⇒ Publicação enviada em julho de 2002 para revista de Biotecnologia - Título: **Engenharia metabólica em *Lactococcus lactis* para aumentar a produção de ácido fólico.**
- ⇒ Resumo enviado para apresentação de Pôster “**Increase of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus***” - 7th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Genetics, metabolism and applications. Setembro de 2002 - Holanda.
- ⇒ Pôster “**Increasing acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus* in milk fermentation**” - Congresso da IDF - Setembro de 2002 – Paris/França -Setembro de 2002.
- ⇒ Palestra em mesa redonda de bactérias lácticas: “**Engenharia metabólica na otimização de compostos produzidos por bactérias lácticas**” dia 4/3/02 na XXII Reunião de genética de microorganismos - Realizada 3-5/3/2002 - Pirinópolis – Goiás.
- ⇒ Pôster e palestra “**Metabolic engineering of SHMT from *Streptococcus thermophilus* for acetaldehyde production**” NIZO Dairy Conference on food microbes. Realizada no período de 13-15/06/2001 em Ede -Holanda.
- ⇒ Palestra ministrada: **Flavour formation in yogurt using metabolic engineering of SHMT from *Streptococcus thermophilus*** para “Dutch LAB (Lactic Acid Bacteria) Platform Meeting” em 20/10/2000.
- ⇒ Poster “**Metabolic engineering of acetaldehyde production in *Streptococcus thermophilus***” 3rd ESBES (European Symposium on Biochemical Engineering Science) Setembro de 2000, Copenhagen-Dinamarca, Resumo nº 1.51, p. 147.
- ⇒ Palestra “**Metabolic engineering of Lactic Acid Bacteria for improvement of fermented dairy products**” - 9th International BioThermoKinetics Meeting em Stillebosch- África do Sul 3-8/4/2000. Autores: J. Hugenholtz; M. Starrenburg; I. Boels; W. Sysbema; A. C. Chaves; A. Mertens; M. Kleerebezem. Palestra publicada no livro de resumos, p. 285-290.
- ⇒ Poster “**Improved yogurt Flavour by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus***” Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria, Genetics, metabolism and applications. Setembro de 1999 em Veldhoven, Holanda. Livro de resumos-G2.

PAPER FOR APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*

CHAVES, A.C.S.D.^{1,2}; FERNANDES, M.^{1,#}; LERAYER, A.L.S.³;
MIERAU, I.¹; KLEEREBEZEM, M.¹ & HUGENHOLTZ, J.^{1*}

NIZO food research Postbus 20 - Kernhemseweg 2, 6710 BA - EDE - The Netherlands

¹ NIZO food research and Wageningen Center for Food Science (WCFS) - The Netherlands

² UNICAMP (Stated University of Campinas) - Campinas - SP - Brazil

³ ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) - Campinas - SP - Brazil

ABSTRACT

The process of acetaldehyde formation by the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* is described in this paper. The typical yogurt flavor is caused by acetaldehyde produced through many different pathways by the yogurt starter bacteria *Lactobacillus bulgaricus* and *S. thermophilus*. In this work, the attention was focused on one specific reaction for acetaldehyde formation catalyzed, by serine hydroxymethyltransferase (SHMT), encoded by the *glyA* gene. In *S. thermophilus*, SHMT also possesses threonine aldolase (TA) activity, the interconversion of threonine into glycine and acetaldehyde. In this work several wild type *S. thermophilus* strains were screened for acetaldehyde production in the presence and absence of L-threonine. Supplementation of the growth medium with L-threonine led to an increase in acetaldehyde production. Furthermore, acetaldehyde formation during fermentation could be correlated to threonine aldolase activity of SHMT. To study the physiological role of SHMT, a *glyA* mutant was constructed by gene disruption. Inactivation of *glyA* resulted in a severe reduction of TA activity and complete loss of acetaldehyde formation during fermentation. Subsequently, a *S. thermophilus* strain was constructed in which the *glyA* gene was cloned under control of a strong promoter (P_{LacA}). When this strain was used for fermentation an increase in TA activity, in acetaldehyde and folic acid production was observed. These results show that, in *S. thermophilus*, SHMT, displaying threonine aldolase activity, constitutes the main pathway for acetaldehyde formation under our experimental conditions. These findings can be used to control and improve acetaldehyde production in fermented (dairy) products with *S. thermophilus* as starter culture.

Publicação para revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento

Engenharia metabólica de *Lactococcus lactis* para aumentar a produção de ácido fólico

CHAVES, A.C. S. D.¹; HUGENHOLTZ, J.²; & LERAYER, A.L.S.³

¹ Ana Carolina Sampaio Dória Chaves - FEA - UNICAMP Campinas, SP

² Dr. Jeroen Hugenholtz NIZO Food Research e WCFS EDE - Holanda

³ Dra. Alda Luiza Santos Lerayer Pesquisadora do Technolab / ITAL

Resumo

A engenharia genética foi utilizada para a obtenção de linhagens *L. lactis* geneticamente modificados com aumento da produção de ácido fólico. Neste trabalho ela foi utilizada para elucidar a importância da via metabólica da enzima serina hidroximetil transferase (SHMT) provenientes de duas bactérias lácticas *S. thermophilus* e *L. lactis* na formação de ácido fólico. Com o experimento utilizando-se o NICE SYSTEM[®] foi constatada, após indução com nisina, uma superprodução da enzima SHMT proporcional ao nível de indução. Esse resultado foi observado de duas maneiras: (1) em gel SDS-PAGE, onde foi possível visualizar um claro aumento da banda com 46kDa e (2) medindo-se a atividade enzimática da SHMT através da conversão de treonina em serina. A produção de ácido fólico também aumentou proporcionalmente ao nível de indução com nisina e esses resultados confirmam o envolvimento da enzima SHMT (codificada pelo gene *glyA*) no metabolismo de ácido fólico, como já havia sido indicado por outros pesquisadores. Cultivando-se estas linhagens mutantes de *L. lactis* com superexpressão do gene *glyA* em meio GM17 observou-se um significativo aumento da produção de ácido fólico proporcional ao nível de indução com nisina.

ABSTRACT for LABVII

Increase of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*

CHAVES, A.C.S.D.¹; STARRENBURG, M.²; MIREAU, I.²; LERAYER, A.L.S.³;
KLEEREBEZEM, M.² & HUGENHOLTZ, J.²

¹ State University of Campinas, Campinas - SP - Brazil; ² NIZO food research and Wageningen Centre for Food Science (WCFS)-Netherlands; ³ ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) - Campinas - SP - Brazil.

The typical yoghurt flavor is a result of the acetaldehyde produced through many different pathways by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. This work is focused on one specific pathway, catalyzed by serine hydroxymethyltransferase (SHMT), encoded by the *glyA* gene. In *S. thermophilus* SHMT possesses also threonine aldolase (TA) activity, which is responsible for the interconversion of threonine into glycine and acetaldehyde. Several wild type *S. thermophilus* strains were screened for acetaldehyde production and for TA activity and a clear correlation was observed between them. To study the physiological role of SHMT, a *glyA* mutant was constructed by gene disruption what resulted in an abolishment of TA activity and complete loss of acetaldehyde formation. Subsequently, a *S. thermophilus* strain was constructed in which the *glyA* gene was cloned under control of a strong promoter (P_{LacA}). When this strain, overexpressing the *glyA* gene, was used for fermentation an increase in TA activity in acetaldehyde and folic acid production was observed. These results show that, in *S. thermophilus*, SHMT, displaying threonine aldolase activity, constitutes the main pathway for acetaldehyde formation under our experimental conditions. These findings can be used to control and improve acetaldehyde production in fermented dairy products with *S. thermophilus* as starter culture.

Increasing acetaldehyde production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus* in milk fermentation

WAGENINGEN
CENTRE
FOR FOOD
SCIENCES

■ Ana Carolina S. D. Chaves; Patrícia Ruas-Madiedo; Marjo Starrenburg; Alda L. S. Lerayer and Jeroen Hugenholtz

Introduction

Yoghurt is produced by fermentation of milk with a specific yoghurt starter, which consists of a mixture of two species of lactic acid bacteria (LAB), *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. The main roles of this starter culture in yoghurt fermentation are: (1) acidification by conversion of milk sugar into lactic acid; (2) formation of the viscous texture; (3) development of the typical flavour.

Yoghurt flavour is due to lactic acid which imparts an acidic and refreshing taste and various carbonyl compounds. One of these carbonyl compounds – acetaldehyde – is considered to be the major flavour component of yoghurt. Several metabolic reactions of LAB can lead to the formation of this product (Fig. 1). In this poster, we describe the role of serine hydroxymethyltransferase (SHMT), encoded by the *glyA* gene, in acetaldehyde formation by *S. thermophilus*.

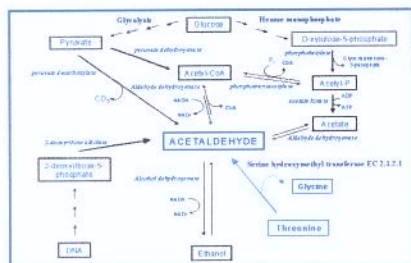


Figure 1: Pathways for acetaldehyde formation in lactic acid bacteria.

Acknowledgements

A.C.S.D. Chaves PhD student - "Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - BRAZIL".

Material & Methods

Streptococcus thermophilus (AO54) was transformed with the plasmid pNZ2305 (with *glyA* gene under control of P_{LacA} , constructed for super production of the enzyme SHMT) according to Mollet (Mollet *et al.*, 1993) generating the *S. thermophilus* mutant called StA2305.

This experiment was made using 1L of pasteurised milk (85°C, 5min) that was inoculated (1%), samples were incubated (water bath) at 42°C for 24h.

The decrease of pH was continuously monitored using Microprocessor pH/ION meter (WTW, Weilheim, Germany) and Microbe System 6.05 (NIZO food research, Ede, The Netherlands).

Samples for microbial counts were taken and deep-plated on M17-agar and expressed as log of colony-forming units (cfu mL⁻¹).

The acetaldehyde and folic acid content were measured after 24 h of incubation. Acetaldehyde was measured using a kit (Boehringer - Germany). Folic acid present in the cells was measured using a microbiological assay using a folate auxotroph *Lactobacillus casei* strain according to the method modified by Nizo food research based on the methods of Moloy and Scott (1993), Horne and Patterson (1988), Phillips and Wright (1982 e 1983).

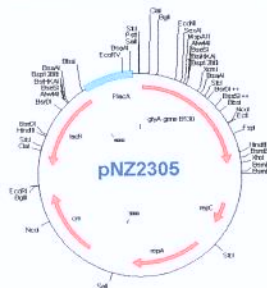


Figure 2: Plasmid constructed with *glyA* gene under control of P_{LacA} . For superproduction of SHMT.

Milk fermentation of *glyA* mutants

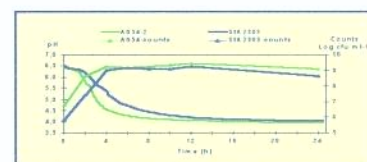


Figure 3: Mean values of pH and counts (log cfu mL⁻¹) in 24h of milk fermentation supplemented with 0.2% of Casitone of the strains A054 (wild type) and StA2305 (AO54 harbouring pNZ2305) at 42°C.

Table 1: Acetaldehyde and folic acid production in milk supplemented with 0.2% casitone in 20h of fermentation using A054 (Wild type) and StA2305 (AO54 harbouring pNZ2305). Where SD = Standard derivation

Strain	Acetaldehyde (ppm)		Total folic acid (ng/mL)	
	Mean	SD	Mean	SD
A054	13,47	1,66	26,49	2,06
StA2305	16,38	1,28	41,84	2,79

CONCLUSIONS

- ❖ In *S. thermophilus* the enzyme SHMT, encoded by *glyA*, has threonine aldolase activity and it plays a role in acetaldehyde formation.
- ❖ When using the *S. thermophilus* strain with *glyA* gene superexpressed for milk fermentation was observed an increase in acetaldehyde and folic acid formation.

■ Ana Carolina Chaves, Maria Fernandez, Alda Lerayer, Willem de Vos, Igor Mierau, Michiel Kleerebezem and Jeroen Hugenholtz

Introduction

Yoghurt is produced by fermentation of milk with a specific yoghurt starter, which consists of a mixture of two species of lactic acid bacteria (LAB), *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. The main roles of this starter culture in yoghurt fermentation are: (1) acidification by conversion of milk sugar into lactic acid; (2) formation of the viscous texture; (3) development of the typical flavour.

Yoghurt flavour is due to lactic acid which imparts an acidic and refreshing taste and various carbonyl compounds. One of these carbonyl compounds – acetaldehyde – is considered to be the major flavour component of yoghurt. Several metabolic reactions of LAB can lead to the formation of this product (Fig. 1). In this poster, we describe the role of serine hydroxymethyltransferase (SHMT), encoded by the *glyA* gene, in acetaldehyde formation by *S. thermophilus*.

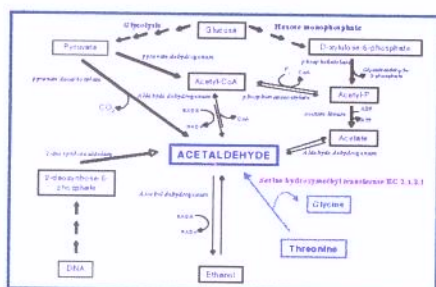


Figure 1: Pathways for acetaldehyde formation in lactic acid bacteria.

Acknowledgements

A.C.S.D. Chaves PhD student - "Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - BRAZIL".

Acetaldehyde production in *Streptococcus thermophilus*

Several *S. thermophilus* strains from the NIZO collection were screened for acetaldehyde synthesis in the presence and absence of L-threonine. It was observed that in strains which do produce acetaldehyde the production was enhanced by addition of threonine. The ratio of induction ranged from 2 to 6 fold upon the addition of threonine. Strains producing high levels of acetaldehyde also showed a higher threonine aldolase activity, suggesting that SHMT is involved in acetaldehyde production in *S. thermophilus* (Fig. 2).

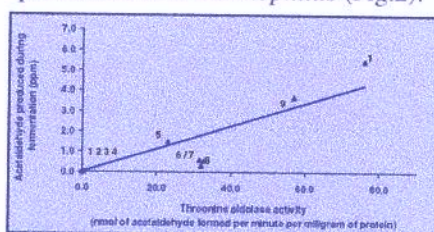


Figure 2: Correlation between threonine aldolase activity and acetaldehyde formation in fermentation in LM17 with different strains of *S. thermophilus*.

Identification of the *glyA* gene encoding for SHMT

An internal fragment of *glyA* (505bp) from *S. thermophilus* B130 was amplified by PCR using degenerated primers designed based on alignment of known SHMT amino acid sequences from different micro-organisms. To study the physiological role of SHMT, a *glyA* mutant was constructed by gene disruption.

Characterization of *glyA* mutants

Inactivation of the *glyA* gene resulted in the abolishment of threonine aldolase activity. Furthermore, no detectable amount of acetaldehyde was observed during fermentation using this mutant

(fig. 3). In growth experiments, the disruption of *glyA* resulted in a six-fold reduction of the growth rate (Fig. 4). An increase of 60% in specific folate production was observed in comparison to the parental strains.

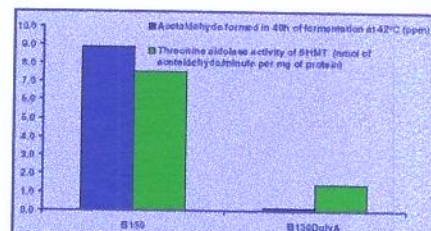


Figure 3: Comparison of threonine aldolase activity and acetaldehyde formed during fermentation between wild type (B130) and its *glyA*-negative mutant (B130DglyA)

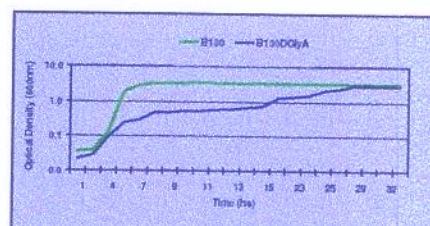


Figure 4: Growth of *S. thermophilus* B130 wild type (B130) and its *glyA*-negative mutant (B130DglyA)

CONCLUSIONS

- ❖ Threonine aldolase plays a role in acetaldehyde formation by *Streptococcus thermophilus*;
- ❖ In *S. thermophilus* SHMT, encoded by *glyA*, has threonine aldolase activity;
- ❖ SHMT plays an essential role in normal growth possibly due to its role in folate metabolism;
- ❖ These findings can be used to select natural variants with enhanced acetaldehyde production.



IMPROVED YOGHURT FLAVOUR BY METABOLIC ENGINEERING OF *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

Chaves, A.C.S.D. ; Lerayer, A.L.S; Kleerebezem, M.; & Hugenholtz, J.
E-mail: 3mb@nizo.nl or accchaves@hotmail.com

Introduction

Acetaldehyde is considered as the major flavour component of yoghurt and is produced by both yoghurt lactic acid bacteria, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. It is generally accepted that an acetaldehyde concentration range from 10 to 15 ppm may be optimal for a characteristic flavour and in general, acetaldehyde production is highly variable. Several metabolic reactions in lactic acid bacteria can lead to the production of acetaldehyde (Fig. 1).

This work is focussed on the pathway that leads to production of acetaldehyde via the activity of threonine aldolase (Glycine hydroxymethyltransferase EC.2.1.2.1.) which cleaves threonine into acetaldehyde and glycine. This enzyme activity has been found in many lactic acid bacteria including the yoghurt bacteria. *S. thermophilus* was chosen for our metabolic engineering study, since its genetics are reasonably well known and it is readily transformable in contrast to *L. bulgaricus*. The work presented here is aimed at controlling and increasing the acetaldehyde concentration in yoghurt and also at establishing that acetaldehyde formation is mainly dependent on this enzyme activity. We describe the strain-dependence in acetaldehyde production, the role of threonine aldolase activity and the genetic engineering strategy to improve acetaldehyde production.

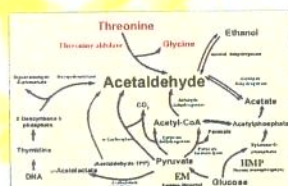


Figure 1: Pathways of acetaldehyde formation in lactic acid bacteria

Acknowledgements

This work is part of a PhD Thesis and the grant is from FAPESP - BRAZIL.

Results

Acetaldehyde production and threonine aldolase activity

Figure 2 shows the production of acetaldehyde by different *S. thermophilus* strains obtained from the NIZO food research collection.

Production was evaluated in milk with and without the addition of 10mM of L-threonine. A clear difference in acetaldehyde production between the strains was observed and the level of acetaldehyde was dependent on the concentration of L-threonine added in the medium. Strains producing high amounts of acetaldehyde also showed a high threonine aldolase activity. Using four different strains of *S. thermophilus*, a clear correlation was found between acetaldehyde production and threonine aldolase activity (Fig. 3).

This observation strongly suggests that it should be possible to control and improve acetaldehyde production in *S. thermophilus* by metabolic engineering of threonine aldolase activity.

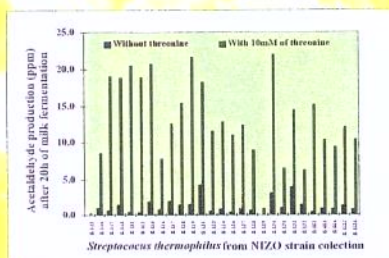


Figure 2: Acetaldehyde production with and without threonine in *S. thermophilus*

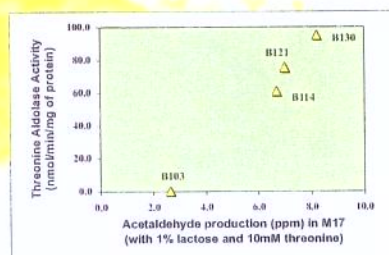


Figure 3: Threonine aldolase activity and acetaldehyde production in different strains of *S. thermophilus*

Cloning of the threonine aldolase *glyA* gene
Genetic engineering is being used to investigate the importance of the threonine aldolase pathway for the production of acetaldehyde in *S. thermophilus*.

Degenerated primers were designed based on alignment of known threonine aldolase sequences from different organisms to obtain the *glyA* gene coding for threonine aldolase in *S. thermophilus*. Using these primers, PCR was performed to amplify an internal fragment of *glyA* (550bp) from the chromosomal DNA of *S. thermophilus*. This PCR product was cloned in pGEM-T and sequenced. A single open reading frame was found showing high homology with other *glyA* genes from *Escherichia coli*, *Micrococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* etc. The PCR fragment will be used as a probe to clone the complete *glyA* gene.

Deletion and overexpression of the *glyA* gene

The *glyA* gene is being knocked out to investigate the importance of threonine aldolase in the acetaldehyde formation using the 550 bp internal fragment. Overexpression of the complete *glyA* gene will be performed using the NICE system (Fig. 4) and the effect on acetaldehyde production will be investigated.

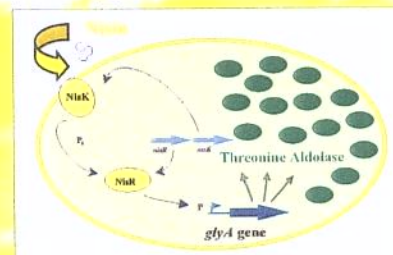


Figure 4: Overexpression of *glyA* gene using the NICE system to overproduce threonine aldolase

Conclusions

- A large difference was found in the production of acetaldehyde among the different strains of *S. thermophilus*.
- The level of acetaldehyde production was dependent on the concentration of L-threonine in the medium.
- The amount of acetaldehyde production is directly correlated with the threonine aldolase activity.
- Part of *glyA* gene encoding threonine aldolase has been cloned and sequenced.

NIZO food research
P.O. Box 20
6710 BA Ede, the Netherlands
Tel.: +31 318 659511 Fax: +31 318 650400
Website: <http://www.nizo.com>

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE