

Víctor Augusti Negri

“Estudo do metabolismo de CO_2 em *Propionibacterium acidipropionici* visando o aumento no rendimento da produção de ácido propiônico”

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

VICTOR AUGUSTI NEGRI

“Estudo do metabolismo de CO₂ em *Propionibacterium acidipropionici* visando o aumento no rendimento da produção de ácido propiônico”

Este exemplar corresponde à redação final da DISSERTAÇÃO defendida pelo candidato

**VICTOR AUGUSTI
NEGRI**

e aprovada pela Comissão Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N312e Negri, Víctor Augusti, 1986-
Estudo do metabolismo de CO₂ em *Propionibacterium acidipropionici* visando o aumento no rendimento da produção de ácido propiônico / Víctor Augusti Negri.
– Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Propionibacterium. 2. Ácido propiônico. 3. Metabolismo microbiano. 4. Dioxido de carbono. 5. Fermentação. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of carbon dioxide metabolism in *Propionibacterium acidipropionici* to increase propionic acid yield

Palavras-chave em inglês:

Propionibacterium

Propionic acid

Bacterial metabolism

Carbon dioxide

Fermentation

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Regina Lúcia Baldini

Cláudio Chrysostomo Werneck

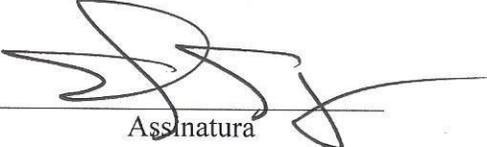
Data de defesa: 18-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 18 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias Da Silveira

Assinatura

Prof. Dr. Gabriel Padilla

Assinatura

RESUMO

Propionibacterium acidipropionici é uma bactéria gram-positiva que apresenta a capacidade de produzir ácido propiônico em sua via fermentativa, composto de grande importância na indústria petroquímica e alimentícia. Tendo-se em vista que esse ácido é hoje obtido através de derivados do petróleo, *P. acidipropionici* vem sendo apontada como uma potencial plataforma industrial na produção de ácido propiônico. Uma das características que enfatizam a sua utilização está a sua capacidade em fixar CO₂ e direcioná-lo para a produção de ácido propiônico. Entretanto, pouco se sabe sobre esse fenômeno em propionibactérias. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e estudar o metabolismo de assimilação de CO₂ em *P. acidipropionici*, visando avaliar a relevância do mesmo na fermentação desta bactéria. Através da análise do genoma e resultados prévios de expressão global foram identificados potenciais genes envolvidos tanto na assimilação de CO₂ quanto na produção de ácido propiônico, destacando-se a enzima piruvato carboxilase como uma importante candidata envolvida na fixação de CO₂. Dados de expressão dessa enzima indicaram que a mesma tem sua expressão aumentada quando a bactéria é cultivada em glicerol como fonte de carbono, condição em que há uma maior produção de ácido propiônico. Outros genes que se destacaram foram os genes do metabolismo de biotina, cofator importante em enzimas fixadoras de dióxido de carbono. Foi descrito que os genes envolvidos na sua síntese estão ausentes em seu genoma e que os genes envolvidos em sua assimilação se mostraram diferencialmente expressos ao fim das fermentações em glicerol e glicose, indicando uma possível carência metabólica dessa vitamina. Adicionalmente, foi reportado que a assimilação de CO₂ pode ocorrer em diferentes fontes de carbono, podendo apresentar até 25% de ácido propiônico e até 32% do ácido succínico, contendo pelo menos um carbono proveniente do CO₂. Tais dados revelaram que a assimilação de CO₂ é provavelmente um fenômeno recorrente e relevante em *P. acidipropionici*, o que reforça essa bactéria como uma promissora plataforma industrial. Por fim, experimentos realizados em biorreator indicaram que ambientes com alta disponibilidade de CO₂ podem levar a um aumento expressivo da produção de ácido succínico, intermediário da via do ácido propiônico e também um importante produto de interesse da indústria química.

ABSTRACT

Propionibacterium acidipropionici is a gram-positive bacterium that has the ability to produce propionic acid through its fermentative pathway, a highly important compound in petrochemical and food industry. In view that nowadays this acid is obtained through petroleum derivatives, *P. acidipropionici* is being appointed as an important candidate as an industrial platform in propionic acid production. One of the characteristics that emphasize its use is the ability to fix CO₂ and direct the assimilated carbon to the production of propionic acid. Little is known about this phenomenon in propionibacteria, however it's occurrence is described when the bacterium is cultivated in glycerol as its only carbon source. The present work had as objective to characterize and study the CO₂ assimilation mechanism in *P. acidipropionici*, aiming to evaluate how relevant this mechanism is in its fermentative metabolism. Through genome analysis, genes and pathways potentially involved in this process were identified. The analysis highlights the enzyme pyruvate carboxylase, a propionic acid cycle's acting enzyme and little distributed in *Propionibacteria*, and the genes involved in biotin's metabolism, a vitamin that acts as an important cofactor in CO₂ fixation reactions in bacteria. The biotin production pathway is not complete in *P. acidipropionici*, being observable in this project that in fact there is a deficiency in its growth in the absence of the same. Seeking transcriptional clues of the phenomenon and having glycerol as carbon source, a global gene expression analysis of the fermentation of *P. acidipropionici* was performed in glycerol, glucose and sugarcane juice in different points of bacterial growth (RNASeq). Interestingly, the most differentially expressed enzyme of the fermentative pathway in glycerol is the enzyme pyruvate carboxylase. The biotin related pathways are also differentially expressed at the final stages of the bacterium's fermentation, what can be related to a requirement of this vitamin at these stages. The supplementation of this vitamin was performed at the three studied carbon sources. However, no difference in growth or acids production was found. Aiming to explore in which situations the CO₂ fixation happens, fermentations with six different carbon sources supplemented with carbon-13 containing sodium bicarbonate were performed. It was evaluated from this experiment that the CO₂ assimilation occurs in all studied carbon sources, and that about 1/4 of the propionic acid total has a carbon that comes from the diluted bicarbonate. The generated data reveals that the phenomenon is relevant in *P. acidipropionici*. Lastly, the effect of sodium bicarbonate supplementation in *P. acidipropionici* fermentations having glycerol as carbon source was studied. As a result, an expressive increase in the production of succinic acid was observed, another fermentation final product in propionibacteria. Such phenomenon, therefore, could also be more explored for the production of this second acid, equally important in the industrial point of view.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Contexto Global	1
1.2	Propeno e ácido propiônico	2
1.3	Propionibactérias	3
1.4	Metabolismo de CO ₂	6
1.5	Piruvato Carboxilase	7
1.6	Biotina e Enzimas Dependentes De Biotina	10
2	OBJETIVOS	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Linhagens utilizadas e condições de cultivo	15
3.2	Reativação e preparação do inóculo de <i>P. acidipropionici</i>	16
3.3	Análise da expressão global dos genes de <i>P. acidipropionici</i> por <i>RNAseq</i>	16
3.4	Quantificação do consumo substratos e formação de produtos durante as fermentações	17
3.5	Cálculo dos parâmetros de desempenho fermentativo	18
3.6	Extração de DNA e montagem de plasmídeo de superexpressão da piruvato carboxilase	19
3.7	Obtenção de um meio definido para <i>P. acidipropionici</i>	22
3.8	Teste da suplementação de biotina em <i>P. acidipropionici</i>	25
3.9	Crescimento de <i>P. acidipropionici</i> em um ambiente rico em CO ₂	25
3.10	Crescimento de <i>P. acidipropionici</i> em MES e em diferentes concentrações de glicerol	26
3.11	Análise da capacidade de consumo de CO ₂ em diferentes fontes de carbono	27
3.12	Crescimento de <i>P. acidipropionici</i> em altas concentrações de CO ₂	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Caracterização <i>in silico</i> dos genes envolvidos no metabolismo de assimilação de CO ₂	31
4.1.1	Carboxilases	31
4.1.2	Genes envolvidos no metabolismo de biotina	35
4.2	Análise Global da Expressão de Genes em <i>P. acidipropionici</i>	42
4.2.1	Análise da expressão dos genes	46
4.2.2	Genes da via fermentativa do ácido acético/acetato	46
4.2.3	Genes da via de <i>Wood-Werkmann</i>	49
4.2.4	Piruvato carboxilase e potenciais vias relacionadas	52

4.2.5 Genes do metabolismo de biotina	58
4.3 Construção de plasmídeo para superexpressão da enzima piruvato carboxilase	61
4.4 Estudo da dependência de biotina em <i>P. acidipropionici</i>	63
4.5 Estudo da suplementação de Biotina em <i>P. acidipropionici</i>	68
4.6 Crescimento de <i>P. acidipropionici</i> em um ambiente rico em CO ² /HCO ³⁻	73
4.6.1 Crescimento de <i>P. acidipropionici</i> em um ambiente rico em CO ₂ /HCO ³⁻	74
4.6.2 Análise da capacidade de consumo de CO ₂ -HCO ³⁻ em diferentes fontes de carbono	78
4.6.3 Cultivo de <i>P. acidipropionici</i> com bicarbonato de sódio em biorreatores	88
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	97
7 ANEXO	105

**Dedico este trabalho à minha mãe Mônica,
a pessoa mais importante da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira pela oportunidade, confiança, ensinamentos e por ser uma pessoa fundamental na minha formação tanto pessoal quanto profissional.

À minha mãe Mônica Maria Augusti, por ser o meu maior exemplo e por toda a motivação, atenção, amor e apoio dado nos últimos anos. Sou eternamente grato por ter uma mãe tão exemplar e amável.

Ao meu afilhado Caio Jorge Negri, que nasceu durante o meu mestrado e se tornou meu maior presente e melhor companhia durante os últimos anos.

Ao meu pai Roberto Negri, irmão Guilherme Negri e minha cunhada Bárbara Jorge por todo apoio, compreensão e amor recebido em todos esses anos.

À minha saudosa “vó Gênica” e “vô Dio”. Sou eternamente grato pelo amor recebido em todos os anos convividos, cada um da sua maneira. Os almoços de domingo, o “melhor feijão o mundo”, os natais e os bolos de aniversários nunca mais foram e serão os mesmos. Saudades.

Aos meus tios, primos e avós: Nelson Augusti e Maria Togashi. Tenho sorte de ter nascido em uma família tão grande e querida. Agradeço também, em especial, a minha querida avó Santina Tombolato Augusti, que nas recordações e saudades se tornou um grande exemplo de pessoa em minha vida.

Agradeço especialmente Gabriel Zaniboni e Vinicius Carvalho por serem grandes amigos que fiz nos últimos anos. Obrigado por todo apoio dado, bandejões, conversas, festas, interbrios, viagens e companhia constante. Vocês dois são hoje pessoas fundamentais em minha vida, por mais que se incomodem ao ler isso! HUE!

Ao Marcelo Bassalo por ser um grande e verdadeiro amigo e me ajudar em todos os momentos em que precisei tanto na vida pessoal quanto profissional durante os últimos anos. Esse trabalho não sairia se não fosse sua ajuda e conversas diárias, sou eternamente grato.

À Nádia Maria Sampaio por ser minha eterna dupla de laboratório desde 2007 e uma das melhores companhias que tive durante todos os meus anos na UNICAMP. Obrigado por todo apoio, conversas e momentos vividos. Não achei que iria sentir tanto a sua falta quanto eu senti.

A Maria Carolina de Barros Grassi pela ajuda, motivação e discussões acerca do meu projeto. Muito Obrigado por tudo.

Ao Alexandre Gomes por toda ajuda e suporte oferecido com o espectrômetro de massas. Esse trabalho não sairia sem sua disposição em me ajudar!

À Eliane Laranja Dias por toda a atenção e disposição dada nos últimos anos.

Ao professor Dr. Fábio Papes, por todo apoio, motivação e conselhos dados durante os últimos anos. Hoje, com certeza, você é uma das minhas maiores referências tanto como professor quanto como pesquisador.

Aos membros da pré-banca e banca: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti, Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck e Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini, obrigado pela participação, ensinamentos, críticas e conselhos para a finalização deste trabalho.

À Beatriz Temer por ser uma grata surpresa nos últimos anos e por se tornado uma grande amiga em tão pouco tempo. Sou muito grato por todas as conversas e pela boa companhia. Certamente será uma das pessoas que mais sentirei falta dessa fase da minha vida.

À Cristiane Andrade, pela amizade construída e por ser uma das poucas pessoas que se interessaram em me ajudar em momentos difíceis deste trabalho, nem que isso significasse ficar até o fim da noite me ajudando a encaixar fios no biorreator ou levando banho de propionibactérias. Muito Obrigado! :)

À Marcela Salazar, Paulo Teixeira (Paulinho) e Daniella Thomazella por todos ensinamentos passado durante minha iniciação científica e demais anos. A Gabriel Lorencini Fiorini pela companhia onipresente, amizade e ajuda dada em diferentes momentos deste projeto. A Gleidson Silva e Bruno Vaz, pela grande amizade consolidada nos últimos anos. A Joan Barau por todo apoio, orientação e conselhos dados.

À Johanna Rincones por toda a motivação e suporte dado nos últimos anos.

Aos demais amigos do LGE pela ajuda e momentos vividos, especialmente: Paula Prado, Pedro Tizei, Lucas Parizzi, André Prause, Ludimila Dias, Beatriz Leite, Karina Yanagui, Giselle de Arruda Rodrigues, Osmar Netto, Marcelo Falsarella Carazzolle, Leandro Santos, Welbe Oliveira Bragança, Igor Oliveira, Ernestina Rosa, Angélica Martins, Jorge Lepikson, Eduardo Camargo, Renata Baroni, Guilherme Borelli, Iuri Waitzberg, Edgard Kamimura e Aline Rodrigues.

À Maria Angélica pela companhia, almoços sem transgênicos e amizade. À Laura Branco pelo apoio e amizade resistente, mesmo que isso significasse um Oceano Atlântico de distância. À Bia Carniel e Mateus Milani, pela cultura *nerd* compartilhada e amizade construída. À Mariana Camargos pelas conversas e companhia que tanto me fazem falta. À Emanuelle Marcelino pela amizade que já dura 13 anos e momentos compartilhados dentro e fora da UNICAMP.

Aos meus velhos e grandes amigos Patricia Davini, Kelly Filasi, Paulo Foglio, Thiago Braga e, especialmente, Daniel Perchon e Anneliese Pires Braga, pela grande e sólida amizade e por compreenderem minha ausência nos últimos anos. Obrigado por tudo!

Agradeço a todos meus amigos que fizeram dos seis anos vividos na UNICAMP como os prováveis melhores anos da minha vida: Fernando Suzuki, Aline Binato, Alexandre Carvalho, André Moreno, Mariana Nassu, Caio Guilherme Pereira, Mariana Almeida Santos, Rafael Murayama (Filhão), André Vito Scatigna (Filhão), Máira Almeida, Felipe Beato, Guilherme Ziegler, Hélio Vilas Boas, Daniel Mendes, Júlia Bier, Hector Baroni, Desirée Meirelles, Raísa Lorencini, Patricia Brito, Guilherme Barbosa, Felipe Crivellari, Tiago Aialla e Andrea Yuli.

À Braskem e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, fundamentais para a execução deste trabalho.

A Deus por me conceder saúde e sabedoria para a realização deste trabalho.

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny!'”

Isaac Asimov

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto Global

O petróleo é considerado atualmente a matéria prima mais importante utilizada pela sociedade e desempenha um papel relevante no contexto social, político e econômico da humanidade desde o século 19. O setor energético é um dos setores que mais se destacam na dependência deste produto, estimando-se, por exemplo, que no ano de 2010 o petróleo teve participação em 34,7% da energia mundial utilizada, atingindo 87% se adicionada a outros combustíveis fósseis (OPEC, 2012).

Entretanto, a crescente demanda e dependência de uma fonte de energia não renovável colocam a nossa sociedade em uma situação alarmante e sujeita a diferentes tipos de riscos. Entre os principais riscos destacam-se a eminente redução das reservas petrolíferas e diferentes questões geopolíticas envolvendo países importadores e exportadores de petróleo (Ragauskas et al. 2006; Stephanopoulos 2007). Nesse cenário, é previsto que a escassez dessa matéria prima leve a uma grande competição pela sua utilização e obtenção ocasionando flutuações em seu preço e fornecimento que gerariam rupturas energéticas, econômicas e políticas. Outro risco alarmante são os efeitos ambientais ocasionados pelo aumento nas emissões de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera devido à combustão de combustíveis fósseis provenientes desta matéria prima (Stephanopoulos 2007).

Nesse contexto, diferentes esforços vêm sendo gerados visando obter combustíveis e produtos químicos de *commodities* hoje provenientes do petróleo a partir de matérias-primas renováveis e economicamente viáveis (Connor and Atsumi 2010; Stephanopoulos 2007). Dentre as diferentes tecnologias desenvolvidas nas últimas décadas que substituem os derivados do petróleo, destacam-se as envolvidas na produção de biocombustíveis, tendo o etanol como seu principal exemplo. A obtenção do etanol industrial ocorre principalmente através da via metabólica da fermentação alcoólica presente na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que converte com grande eficiência a sacarose da cana-de-açúcar em etanol (Nevoigt 2008). O etanol como biocombustível tornou-se economicamente competitivo em todo o mundo em relação aos combustíveis derivados do petróleo e hoje é considerado como um modelo ideal a ser seguido para a produção de outras *commodities* (Goldemberg 2008).

A indústria petroquímica, entretanto, ainda não apresenta um desenvolvimento tecnológico comparável ao já desenvolvido com os biocombustíveis, mas vem investindo e buscando a obtenção de matérias-primas a partir de fontes renováveis, principalmente os polímeros. Alguns estudos foram realizados na última década visando a produção biológica de monômeros para a síntese de polímeros, como é o caso do butanol, ácido succínico, ácido láctico e o propanodiol (Lee et al. 2004; Karakashev and Angelidaki 2007; Cameron et al. 1998; López et al. 2012). Tais estudos se encaixam na chamada biotecnologia industrial, também denominada como *white biotechnology*, que se utiliza de sistemas biológicos para a produção de derivados químicos, materiais e alternativas para o setor energético. Tal área explora principalmente processos fermentativos e de biocatálise em conjunto com técnicas de genética molecular, engenharia enzimática e engenharia metabólica abrindo, por consequência, inúmeras novas possibilidades (Gupta and Raghava 2007; Gartland et al. 2013).

1.2 Propeno e ácido propiônico

O ácido propiônico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) é um ácido carboxílico que ocorre naturalmente na forma de ésteres presentes em óleos essenciais e também em mamíferos como um metabólito intermediário. Nos últimos anos, a sua importância vem crescendo por ser um importante intermediário na produção de propeno, considerado composto fundamental para a indústria petroquímica, e por apresentar uma vasta gama de aplicações nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Esse ácido orgânico, por exemplo, pode ser amplamente utilizado na produção de perfumes, herbicidas, flavorizantes artificiais de frutas e é um importante intermediário na produção de polímeros de celulose. Seus sais, tais como o propionato de sódio, cálcio e potássio são recorrentemente utilizados como conservantes de alimentos industrializados. Já dentro da indústria farmacêutica pode ser utilizado em terapia animal, sendo comumente utilizados em dermatoses, infecções de feridas, medicamentos para artrite e conjuntivite (P. Boyaval and Corre 1995; Kumar and Babu 2006; L. Liu et al. 2012).

Atualmente, o ácido propiônico é produzido a partir de derivados petroquímicos, como, por exemplo, através de um processo de oxidação de propano (Playne 1985) Embora sua síntese apresente um custo relativamente baixo, existe uma preocupação por parte de seus fabricantes por seu processo de síntese utilizar como matéria-prima compostos petroquímicos e, por consequência, estar susceptível a sofrer consequências econômicas negativas nos próximos anos (Suwannakham and Yang 2005). Devido a essa preocupação, nas últimas décadas houve uma grande busca por microrganismos e vias bioquímicas que apresentassem um potencial industrial para a produção de ácido propiônico por processos fermentativos (Huang et al. 2002; Suwannakham and Yang 2005)

Alguns gêneros de bactérias apresentam a capacidade de produzir ácido propiônico como produto principal da fermentação, tal como *Propionibacterium*, *Vailonella*, *Selenomonas* e *Clostridium*, especialmente *C. propionicum*. Dentre esses gêneros, destaca-se o gênero *Propionibacterium* por apresentar uma grande quantidade de estudos e aplicações industriais, principalmente na indústria alimentícia por ser considerado um microrganismo seguro pelo *United States Food and Drug Administration* (Patrick Boyaval, Corre, and Madec 1994).

1.3 Propionibactérias

Propionibacterium corresponde a um gênero de bactérias gram-positivas pertencentes ao filo das actinobactérias e caracterizadas como sendo não esporulantes, anaeróbias facultativas, não móveis e catalase positivas. Morfologicamente são classificadas como um bacilo, mas sua morfologia pode variar dentro da mesma espécie, caracterizando-as como bactérias polimórficas (Falkow et al. 2006).

Estudos dividem o gênero em dois grupos: propionibactérias cutâneas e propionibactérias clássicas. O primeiro grupo corresponde às espécies que são predominantemente membros da microbiota da pele humana e de outros mamíferos. Apesar de poucas espécies desse grupo serem consideradas clinicamente significantes, algumas estão associadas a alguns tipos de infecções sendo classificadas, nesses casos, como bactérias oportunistas. Um exemplo clássico desse grupo é a espécie *Propionibacterium acnes*, uma das principais bactérias causadoras da acne (Brüggemann et al. 2004; Dessinioti and Katsambas 2010).

O grupo das propionibactérias clássicas corresponde às bactérias envolvidas na produção de queijo e outros laticínios, sendo utilizada atualmente na produção de queijo suíço (Langsrud and Reinbold 1973), vitamina B12 (Playne 1985), probióticos (Jan et al. 2001) e também do ácido propiônico (Lewis and Yang 1992). Espécies desse grupo são encontradas em derivados do leite e queijo e também no solo (Falkow et al. 2006).

O ácido propiônico é o principal produto final de sua via heterofermentativa, denominada ciclo de *Wood-Werkman* ou ciclo dos ácidos dicarboxílicos, que apresenta também como subprodutos finais o ácido succínico, ácido acético e CO₂ (Figura 1). A produção, de ácido propiônico varia bastante entre as diferentes espécies do gênero, sendo *Propionibacterium acidipropionici* apontada com maior capacidade na produção e considerada promissora para o desenvolvimento da produção industrial deste ácido orgânico (Colomban, Roger, and Boyaval 1993).

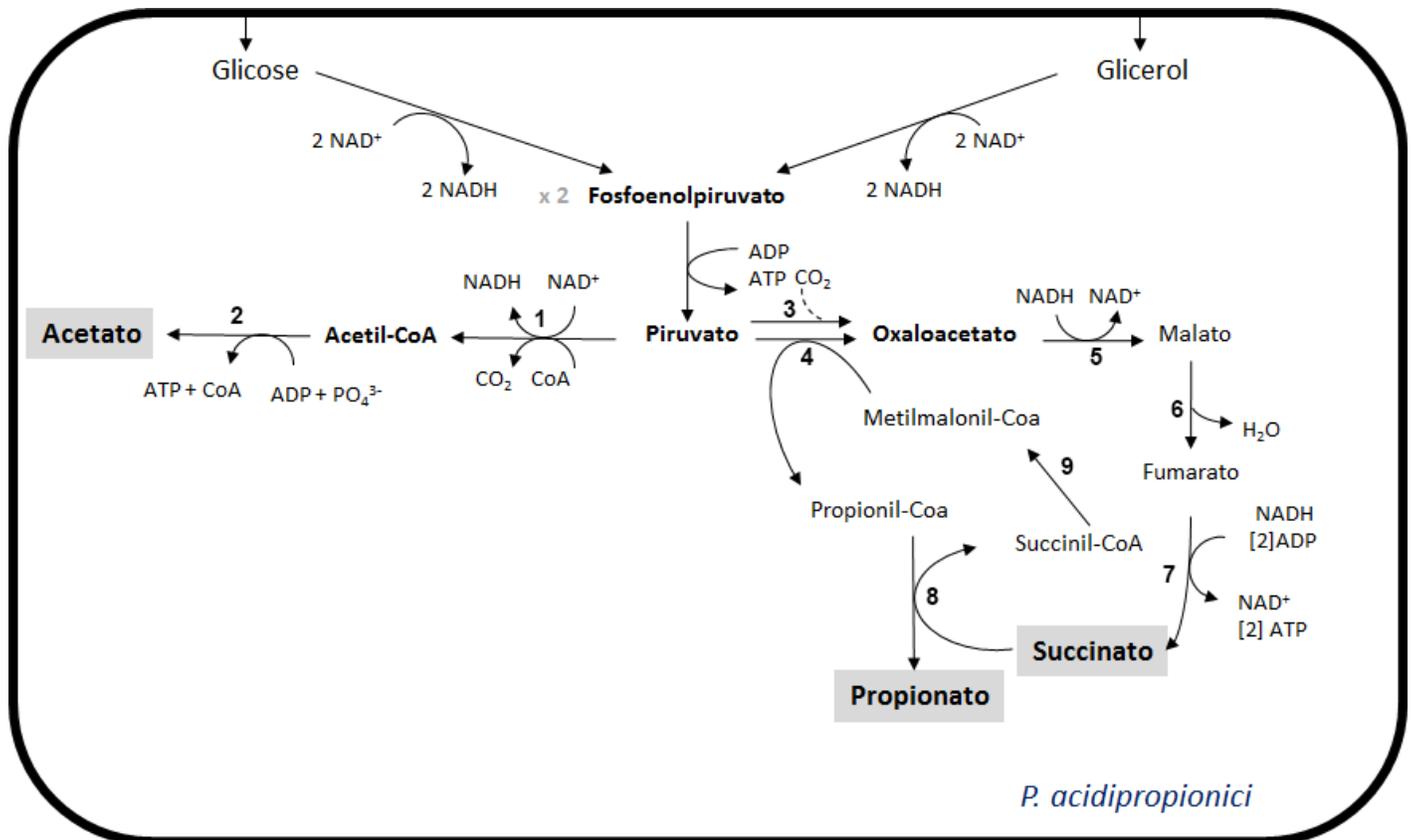


Figura 1 - Via heterofermentativa presente em *P. acidipropionici*. Estão destacados em cinza os principais produtos e subprodutos da fermentação por esta via. 1. Piruvato desidrogenase. 2. Acetil-CoA sintetase. 3. Piruvato Carboxilase. 4. Metilmalonil-CoA carboxitransferase. 5. Malato desidrogenase. 6. Fumarase. 7. Succinato desidrogenase. 8. Propionil-CoA : succinato CoA transferase. 9. Metilmalonil isomerase. As reações descritas foram obtidas a partir do genoma publicado desta bactéria (Parizzi et al. 2012).

Estudos demonstram a alta capacidade dessa espécie de fermentar diferentes fontes de carbono como glicose, lactato, arabinose, sacarose, sorbitol, xarope de cana-de-açúcar e glicerol, o que a destaca ainda mais como interessante do ponto de vista industrial (Jin and Yang 2008; Quesada-Chanto et al. 1998; Carrondo, Crespo, and Moura 1988; Barbirato, Chedaille, and Bories 1997). Através de estudos em bioprocessos sabe-se que o maior rendimento da produção de ácido propiônico se dá em sua fermentação em glicerol (Barbirato, Chedaille, and Bories 1997). Acredita-se que o maior rendimento seja pelo fato de que, comparado a glicose e outros substratos, o glicerol apresenta um estado de redução maior, o que favoreceria a produção de compostos mais reduzidos (Barbirato, Chedaille, and Bories 1997).

Entretanto, os atuais processos fermentativos envolvendo tal grupo de bactérias apresentam uma baixa concentração final de ácido propiônico, baixo rendimento e baixa produtividade, o que torna esse processo economicamente inviável. Entre os principais obstáculos na obtenção de um processo industrial envolvendo propionibactérias está a inibição da formação de ácido propiônico ocasionada pela alta concentração do próprio ácido e dos demais produtos finais da fermentação (Goswami and Srivastava 2001). Devido a isso, esforços vêm sendo gerados para a otimização da produção de ácido propiônico por este grupo de bactérias através da utilização de ferramentas da engenharia genética (Suwannakham and Yang 2005; Barbirato, Chedaille, and Bories 1997; Coral et al. 2008).

O metabolismo e a genética das bactérias propiônicas são ainda pouco explorados e o estabelecimento de ferramentas em biologia molecular para a manipulação dessas bactérias ainda se encontram em estágio inicial (Kiatpapan et al. 2000; Kiatpapan and Murooka 2002). Entretanto, diferentes fatores dificultam o estudo e a modificação genética desse grupo, como a sua parede celular espessa (gram-positiva), o seu forte sistema de restrição (Kiatpapan et al. 2000) e o alto conteúdo G+C, que corresponde a 53%-68% do seu DNA genômico, dependendo da espécie (Sneath, Mair, and Holt 1986).

Os poucos trabalhos que envolvem o estudo à nível genético de *Propionibacteria* se concentram principalmente na espécie patogênica *Propionibacterium acnes* (Brüggemann et al. 2004; Brzuszkiewicz et al. 2011) e em *P. freudenreichii* (Kiatpapan et al. 2000; Kiatpapan and Murooka 2002; Jore et al. 2001) utilizadas na produção de queijo suíço. Essas duas espécies tiveram seus genomas sequenciados (Brüggemann et al. 2004; Falentin et al. 2010; Brzuszkiewicz et al. 2011) e recentemente o nosso grupo de pesquisa sequenciou e publicou o genoma de *Propionibacterium acidipropionici* ATCC4875 (Parizzi et al. 2012).

1.4 Metabolismo de CO₂

A fixação de carbono inorgânico em material orgânico é considerada um pré-requisito para a existência de vida em nosso planeta e é definido como um ponto fundamental da evolução biológica. Esse fenômeno é realizado por inúmeros grupos de microrganismos e todas as plantas através da fixação de CO₂ pela ação da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (RuBisCO) nesse processo. Apesar de ser o mecanismo mais estudado e dominante entre os organismos autotróficos, encontramos também processos alternativos de fixação de CO₂ em microrganismos. Nesse contexto, além dos microrganismos autotróficos, microrganismos heterotróficos também apresentam a capacidade de assimilar essa fonte inorgânica e transformá-la em biomassa (Saini et al. 2011; Fuchs 2011).

Curiosamente, o primeiro relato da capacidade de um organismo heterotrófico em assimilar dióxido de carbono se deu em *Propionibacterium acidipropionici* em 1936 por Wood e Werkman em uma fermentação tendo glicerol como fonte única de carbono (H G Wood and Werkman 1936). É bem estabelecido atualmente que o fenômeno de assimilação de CO₂ é trivial e distribuído em heterotróficos tanto em *Archea* quanto em *Eubacteria* e está presente em uma grande quantidade de reações realizadas por diferentes enzimas e vias metabólicas. (Saini et al. 2011).

Nos estudos que se sucederam com propionibactérias, foi evidenciado ainda em glicerol que além de assimilar dióxido de carbono, *P. acidipropionici* assimilaria essa molécula em sua via fermentativa principal de formação de ácido propiônico, de modo que um dos carbonos dessa molécula proviria do CO₂ assimilado (H. G. Wood et al. 1941). Em 1961, foi descrito em

Propionibacterium shermanii a presença de uma enzima denominada fosfoenolpiruvato carboxitransfosforilase sendo considerada como a responsável pela assimilação de dióxido de carbono neste grupo de bactérias (Siu and Wood 1962; Willard, Davis, and Wood 1969). Essa enzima seria responsável por catalisar uma reação reversível de formação de oxaloacetato e pirofosfato tendo como substrato fosfoenolpiruvato, bicarbonato e ortofosfato (Figura 2). Entretanto, existem poucos relatos na literatura da presença dessa enzima em outros grupos de bactérias ou organismos, havendo evidências da mesma apenas em propionibactérias e em algumas bactérias do gênero *Acetobacterium* (Eden and Fuchs 1983; Sauer and Eikmanns 2005).

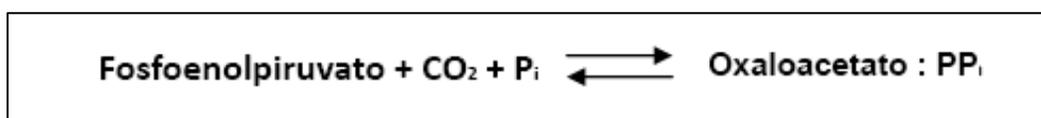


Figura 2 - Reação química realizada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxitransfosforilase (Siu & Wood, 1962).

Curiosamente, através da montagem e de análises do genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, não foi possível encontrar a sequência gênica correspondente à fosfoenolpiruvato carboxitransfosforilase. Em contrapartida, foi encontrada uma sequência análoga a outra enzima que poderia ser responsável pela fixação de CO₂ e que ainda não havia sido descrita em propionibactérias, a enzima piruvato carboxilase (PC, EC: 6.4.1.1)(Parizzi et al. 2012).

Em adição, recentemente foi realizado por nosso grupo de pesquisa um experimento borbulhando C¹³O₂ gasoso em culturas de *P. acidipropionici*, constando-se por NMR (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) a presença de carbono marcado em ácido propiônico, o que comprova que, de fato, tal espécie é capaz de assimilar CO₂ na presença de glicerol (Parizzi et al. 2012). Além disso, o nosso grupo realizou análises proteômicas de *P. acidipropionici* crescendo em glicerol, glicose e xarope de cana-de-açúcar, encontrando uma proteína correspondente à piruvato carboxilase somente em culturas crescendo em glicerol.

1.5 Piruvato Carboxilase

A enzima piruvato carboxilase é responsável por catalisar a reação irreversível de carboxilação do piruvato a oxaloacetato (Figura 3) (Keech and Utter 1963). Tal enzima é uma

enzima multifuncional caracterizada pela presença de três principais domínios conservados: Domínio Biotina Carboxilase (**BC**), Domínio Carboxil Transferase (**CT**) e Domínio Proteína Carregadora de Biotina-Carboxil (**BCCP**) que catalisam a reação de carboxilação em dois passos. Em uma primeira etapa, o domínio BC transfere um grupo carboxil de um bicarbonato (reação de carboxilação) para uma molécula de biotina covalentemente ligada em um resíduo de lisina conservado no domínio BCCP, em uma reação dependente de ATP (Figura 3). Em um segundo passo, o domínio CT é responsável por transferir esse grupo carboxil da molécula de biotina para a molécula de piruvato formando uma molécula de oxaloacetato (Peters-Wendisch et al. 1998; Xiang and Tong 2008; Lietzan et al. 2011).

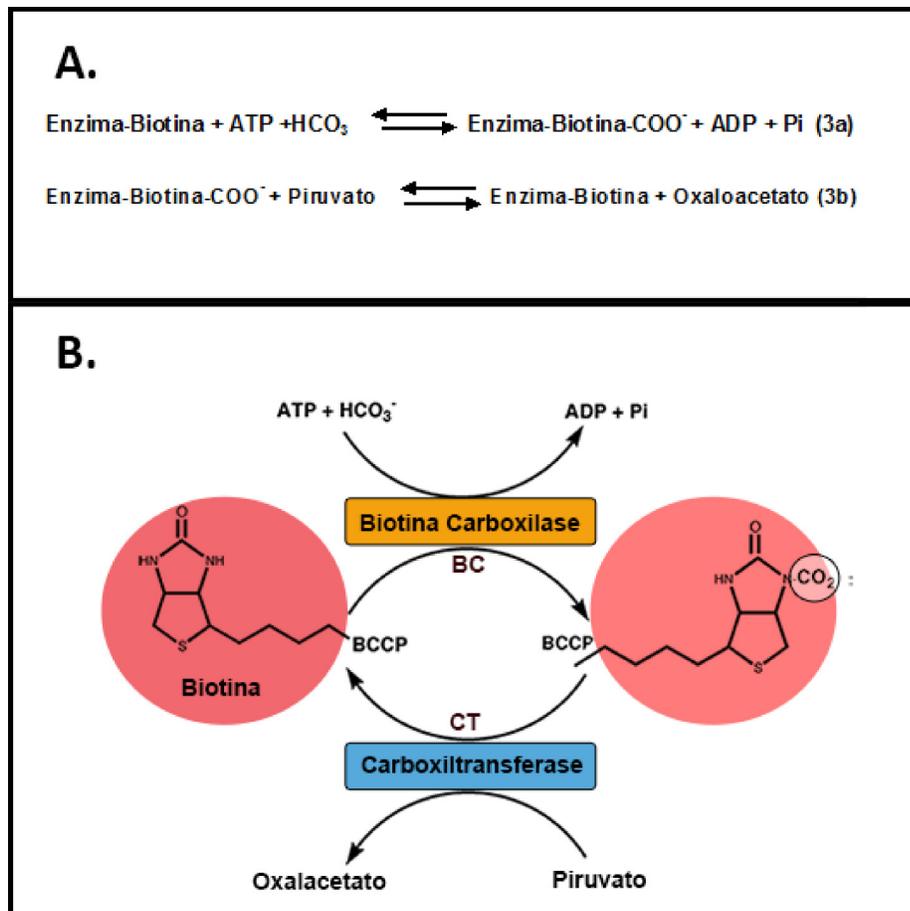


Figura 3 – Reação, em duas etapas, da enzima piruvato carboxilase (PC, EC: 6.4.1.1). **A.** Reação Enzimática. **3a.** Em um primeiro passo, ocorre uma reação de carboxilação (dependente de ATP) de uma molécula de biotina (cofator). Na segunda etapa (**3b**) há a transferência do grupo carboxil para o piruvato tendo como resultado a formação da molécula de oxaloacetato. **B.** Reação enzimática evidenciando as etapas das reações realizadas por cada um dos domínios presentes na piruvato carboxilase (CT, BC e BCCP).

A piruvato carboxilase está presente em diferentes grupos de organismos e está diretamente associada a sua função como uma importante enzima anaplerótica. Enzimas denominadas anapleróticas são enzimas que repõem e fornecem metabólitos intermediários ao ciclo do ácido cítrico (TCA), como é o caso do oxaloacetato. Seu papel na reposição e manutenção da concentração intracelular de oxaloacetato a faz estar associada a fenômenos metabólicos importantes, como a respiração e a síntese de aminoácidos. (Owen, Kalhan, and Hanson 2002; Sauer and Eikmanns 2005).

Devido a sua presença em mamíferos e sua importância em humanos grande parte dos estudos já existentes explora principalmente o seu papel no metabolismo e fisiologia destes animais. Dentro desse contexto, destacam-se a sua função envolvida nas vias de lipogênese, gliconeogênese e na secreção de insulina, fenômenos que estão diretamente relacionados a distúrbios, como a hipoglicemia e a acidose láctica. (Jitrapakdee, Vidal-Puig, and Wallace 2006; Xiang and Tong 2008).

São poucos os estudos que de fato relatam e exploram a função da piruvato carboxilase em bactérias e isso é em parte justificado pela sua pequena distribuição em *Eubacteria*. Entre os organismos que possuem essa enzima e que dispõem de dados disponíveis na literatura destacam-se *Rhodobacter spheroides* (Payne 1969), *Rhodobacter capsulatus* (Modak and Kelly 1995), *Corynebacterium glutamicum* (Koffas 1998) e espécies do gênero *Bacillus* (Bower et al. 1996; Kondo et al. 1997; Brautaset et al. 2010).

Corynebacterium glutamicum é uma bactéria gram-positiva também pertencente ao filo das actinobactérias e de grande importância industrial devido a sua alta produtividade de glutamato e lisina. Além de apresentar a piruvato carboxilase, essa espécie apresenta outra enzima carboxilase também dependente de biotina, a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase, EC 4.1.1.31). A PEPCase também apresenta como produto o oxaloacetato mas tem como substrato uma molécula de fosfoenolpiruvato, sendo classificada também como uma enzima anaplerótica. Diferentes estudos focam nas funções desempenhadas por ambas as enzimas no metabolismo de *C. glutamicum* e hoje se sabe que a piruvato carboxilase é o principal gargalo da produção de glutamato e lisina. Devido a isso, atualmente a piruvato carboxilase é um dos principais alvos para a manipulação genética e otimização dos processos fermentativos para a

produção industrial de aminoácidos em *C. glutamicum* (Peters-Wendisch et al. 1998; Petersen et al. 2000; Sauer and Eikmanns 2005).

Adicionalmente, outros estudos evidenciam a importância dessa enzima como um potencial alvo biotecnológico. *Escherichia coli* não apresenta a enzima piruvato carboxilase e diferentes estudos demonstram que a expressão dessa enzima altera o fluxo fermentativo da bactéria disponibilizando uma maior concentração de oxaloacetato e, por consequência, aumentando a produção de ácido succínico. Quando comparada a outras carboxilases, como a PEPCase, a piruvato carboxilase se confirma como a enzima que aumenta mais a taxa de assimilação de CO₂ e a produtividade de ácido succínico (Blankschien, Clomburg, and Gonzalez 2010; R. Liu et al. 2013).

1.6 Biotina e Enzimas Dependentes De Biotina

A biotina (Figura 4), também denominada vitamina H ou B7, é considerada o cofator mais importante envolvido em processos de assimilação de CO₂ em bactérias, o que torna o seu metabolismo e suas enzimas envolvidas alvos importantes no estudo da fixação de CO₂ em microrganismos. (Streit and Entcheva 2003; Knowles 1989; Modak and Kelly 1995). Em adição às reações que há a fixação de grupos carboxil (carboxilases), a biotina também está envolvida em reações metabólicas em que há a liberação (descarboxilases) e a transferência (transcarboxilase) de grupos carboxil, sendo todas denominadas enzimas dependentes de biotina. Além da assimilação de CO₂, tais enzimas estão relacionadas a diferentes vias metabólicas vitais para metabolismo como a síntese de ácidos graxos, catabolismo de aminoácidos ramificados e da gliconeogênese (Zempleni and Hassan 2009).

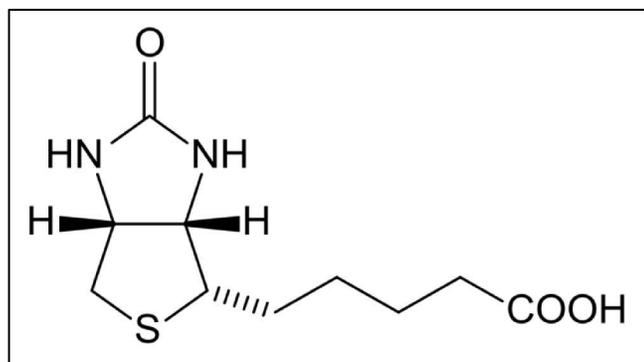


Figura 4 – Molécula de Biotina (vitamina B7 ou H). Estruturalmente a biotina é constituída de dois anéis fundidos, um anel ureído e um anel tetraidrotiofeno contendo enxofre e uma cadeia de ácido valérico.

A via de biossíntese de biotina é bastante variável em diferentes microrganismos e atualmente é mais bem caracterizada em *E. coli* e *B. subtilis* (Streit and Entcheva 2003). As principais diferenças se dão nas primeiras etapas e na formação de um importante precursor da via de síntese: o pimelil-CoA. Não estão ainda elucidados todos os mecanismos que levam à formação dessa molécula, mas sabe-se que *B. subtilis* pode formar pimelil-CoA a partir de ácido pimélico através de uma enzima denominada BioW (pimelil-CoA sintase) ou a partir de ácidos graxos que envolve uma enzima da família do citocromo P450 denominada BioI (Pimeloil Sintase, EC:1.14.15.12)(Bower et al. 1996). Em *E.coli* sabe-se que pimelil-CoA pode ser formado também a partir de intermediários da síntese de ácidos graxos havendo duas outras enzimas importantes nesse processo: BioC (Malonil-CoA O-metiltransferase, EC: 2.1.1.197) e BioH (pimelil metil ester esterase, EC: 3.1.1.85) (Streit and Entcheva 2003; Lin and Cronan 2010). A segunda e final etapa da síntese de biotina consiste na conversão do pimeloil-CoA em biotina através de quatro diferentes reações. Ao contrário da etapa anterior, essa etapa é considerada altamente conservada em bactérias gram-positivas e gram-negativas e é realizada pelas enzimas: BioF, BioA, BioD e BioB (Figura 5). Inicialmente, a enzima BioF (KAPA sintetase, EC:2.3.1.47) converte pimeloil-CoA em uma molécula de ácido 7-ceto-8-aminopelargônico (KAPA), a enzima Bio A (DAPA aminotransferase, EC:2.6.1.62) então converte essa molécula em uma molécula de DAPA (ácido 7,8 diaminopelargônico) que é convertido, por sua vez, em uma molécula de detibiotina pela BioD (Detiobiotina Sintetase, EC:6.3.3.3). Por fim, a enzima Biotina Sintase (BioB, EC:2.8.1.6) converte uma molécula de detiobiotina em biotina (Figura 5).

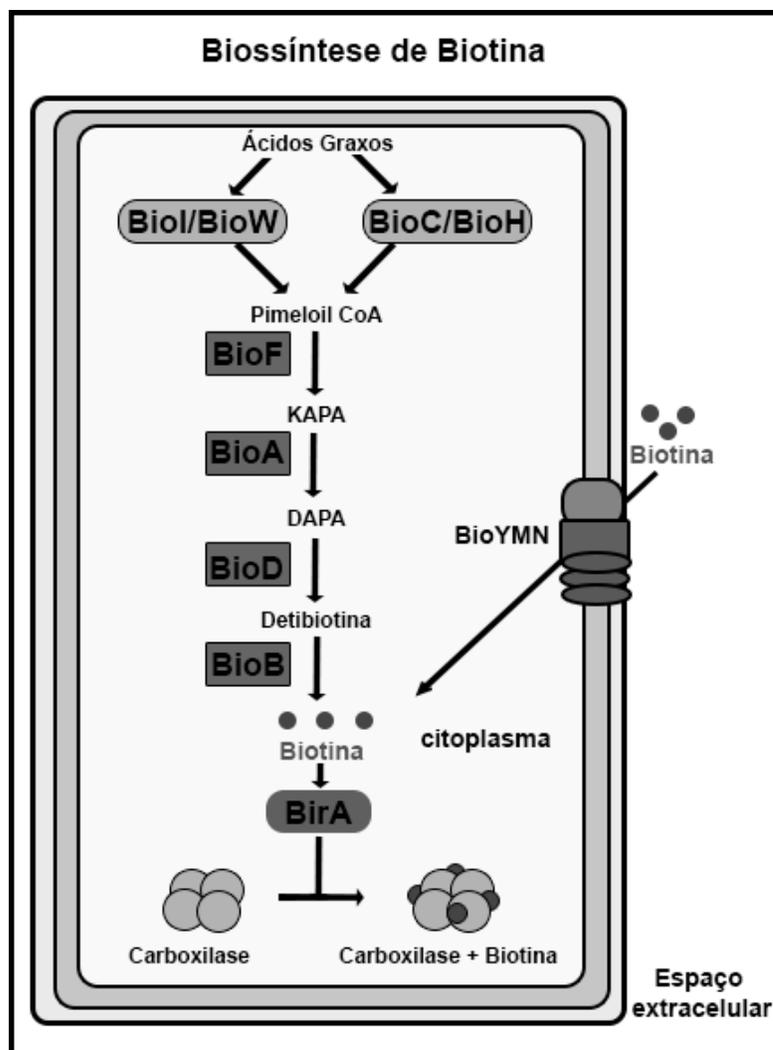


Figura 5 – Via biossintética de produção de biotina encontrada em diferentes grupos de *Eubacteria*.

Apesar da via de síntese da biotina ser amplamente distribuída em microrganismos alguns grupos de bactérias não apresentam a capacidade de sintetizá-la, sendo denominados auxotróficos para biotina. Em geral, é descrito que propionibactérias não apresentam a capacidade de sintetizar tal vitamina, necessitando, portanto, possuir mecanismos que permitam obter e assimilar biotina presentes no ambiente em que vive. Contudo, não existem estudos mais aprofundados que explorem os motivos da provável auxotrofia e as alternativas tomadas por *P. acidipropionici* para a assimilação de biotina. É interessante *P. acidipropionici* ser relatada como dependente de biotina, pois além da piruvato carboxilase, uma das principais enzimas da sua via fermentativa de ácido propiônico também é dependente de biotina: a enzima metilmalonil-CoA carboxitransferase (MMC, EC:2.1.3.1).

A enzima metilmalonil-CoA carboxitransferase (MMC), também conhecida como transcarboxilase foi descrita em *Propionibacterium* e é considerada uma enzima chave da via de produção do ácido propiônico (Swick and Wood 1960), juntamente com a enzima propionil-CoA:succinato-CoA transferase. Ambas as enzimas são caracterizadas por serem bifuncionais e responsáveis por tornar a via de síntese de ácido propiônico cíclica (Figura 1 e 6)(Swick and Wood 1960; H. G. Wood and Stjernholm 1961; Parizzi et al. 2012). O complexo enzimático correspondente à enzima metilmalonil CoA carboxilase possui como substrato o piruvato (molécula de 3 carbonos) e a metilmalonil-CoA (molécula de 4 carbonos) e realiza uma reação de transcarboxilação onde transfere um grupo carboxil do metilmalonil-CoA para a molécula de piruvato tendo como produto final uma molécula de oxaloacetato (4 carbonos) e o succínil-CoA (3 carbonos). Uma característica interessante presente nessa reação é a transferência do grupo carboxil sem gasto energético e a conversão de uma molécula de 3 carbonos em 4 carbonos sem a necessidade de assimilar uma molécula de CO₂ (H G Wood 1979; Carey and Sönnichsen 2004).

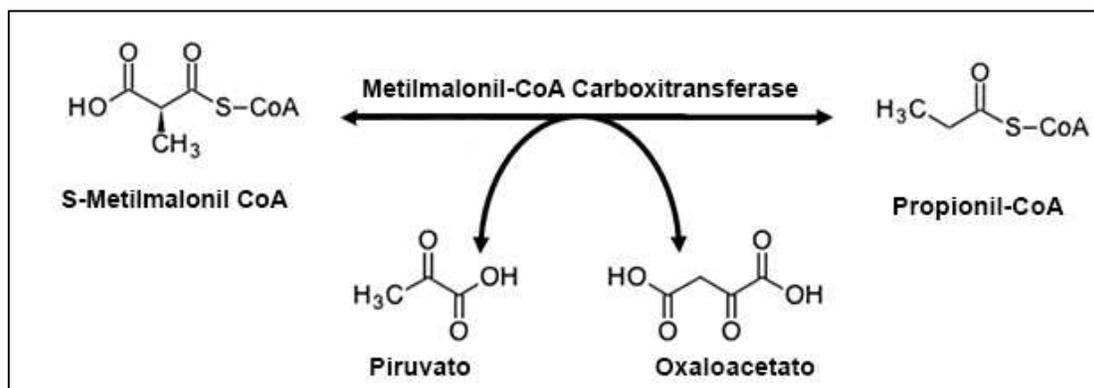


Figura 6 – Reação enzimática realizada pela enzima metilmalonil-CoA carboxitransferase (MMC) (Swick and Wood 1960).

Apesar de não consumir CO_2 , a metilmalonil-CoA carboxitransferase apresenta o mesmo substrato e produto (piruvato e oxaloacetato, respectivamente) da piruvato carboxilase. Desse modo, as duas enzimas competiriam pela disponibilidade de piruvato (Figura 7) gerando o mesmo produto. Apesar de ser esperada uma atividade constante da metilmalonil-CoA carboxitransferase no metabolismo fermentativo da bactéria, nada se sabe sobre a função representada pela piruvato carboxilase e de como a sua atividade afeta a fisiologia e a fermentação de *P. acidipropionici*. Desse modo, a piruvato carboxilase torna-se um interessante alvo de estudo tanto para a compreensão do fenômeno de assimilação de CO_2 quanto para o entendimento dos mecanismos que levam à produção de ácido propiônico nesse organismo.

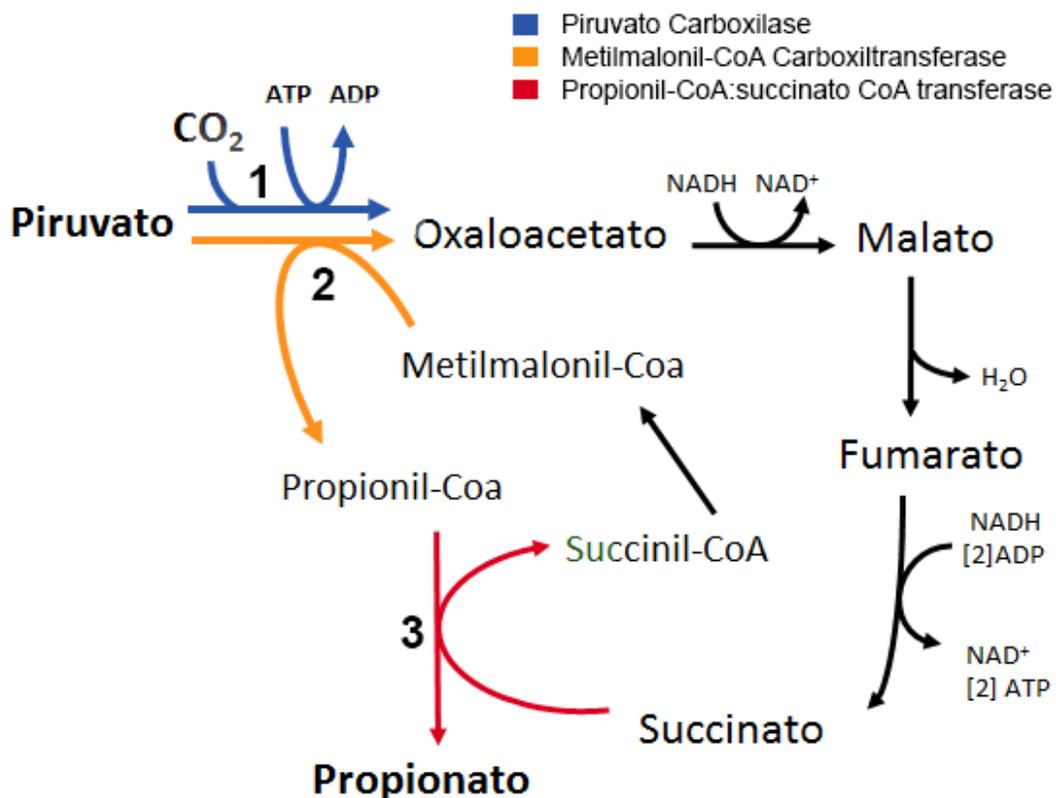


Figura 7 – Via fermentativa de *Wood Werkmann*. **1 (azul)**. Piruvato Carboxilase. **2(amarelo)**: Metilmalonol CoA carboxitransferase e **3 (vermelho)**: propionil-CoA:succinato CoA transferase.

2 OBJETIVOS

Em propionibactérias pouco se conhece sobre os mecanismos, vias metabólicas e circunstâncias envolvidas no processo de fixação de CO₂. Sendo assim, a partir de dados disponíveis de genoma e transcriptoma de *Propionibacterium acidipropionici*, o presente trabalho teve como objetivo geral explorar e aprofundar o conhecimento sobre a assimilação de CO₂ nessa espécie. Ademais, o presente trabalho estudou os efeitos da suplementação de biotina e CO₂ em fermentações de *P. acidipropionici* buscando obter indícios de como esses dois compostos poderiam interferir na sua fisiologia e na produção de metabólitos, como por exemplo, o ácido propiônico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens utilizadas e condições de cultivo

No presente projeto foi utilizada *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 adquirida do centro de coleção de organismos “*Global Bioresource Center*” (ATCC). O meio de cultivo padrão (também denominado meio rico) utilizado nos experimentos é composto por 2% da fonte de carbono de interesse, 1% de extrato de levedura, 0,1% de KH₂PO₄, 0,2% de NH₄H₂PO₄, 0,1% da solução salina denominada *solução 1* e 0,1% da *solução salina 2*. A solução salina 1 é composta por 10 mg/L de MgSO₄.7H₂O e 2,5 mg/L de MnSO₄.H₂O, enquanto a solução salina 2 é composta por 10 mg/L de CaCl₂.2H₂O e 10 mg/L de CoCl₂.6H₂O. Para o cultivo em placa de *Petri* (meio de cultura sólido) foi adicionado ágar (1,5%) ao meio de cultura padrão. O pH do meio de cultura foi corrigido com NaOH 5M até alcançar um pH igual à 6.8. O cultivo em semi-anaerobiose foram realizados em tubos do tipo *falcon* de 50 mL e mantidos à 30°C sem agitação. O cultivo em meio sólido foi realizado à 30°C em jarra de anaerobiose junto com um gerador de anaerobiose *Anaerobac (Alfalab)*. Dentre as fontes de carbono utilizadas estão glicose, glicerol, xilose, sorbitol e xarope cana-de-açúcar. O xarope de cana-de-açúcar foi obtido da “Usina Costa Pinto”, localizada na cidade de Piracicaba (SP). O xarope foi coletado após o terceiro efeito de evaporação na linha de produção de açúcar. O xarope foi esterilizado por autoclavagem (121°C, 1 bar por 20 minutos) e estocado a 4°C para posterior utilização. O

xarope foi caracterizado e quantificado quanto ao seu teor de sacarose, glicose e frutose por HPLC.

3.2 Reativação e preparação do inóculo de *P. acidipropionici*

A preparação do inóculo aqui relatada foi realizada antes do início de todos os experimentos deste projeto que envolveu o cultivo de *P. acidipropionici*. As culturas permanentes da linhagem ATCC4875 de *P. acidipropionici* disponibilizadas em nosso laboratório em *biofreezer* a -80°C foram reativadas em tubos de polipropileno estéreis de 15mL contendo meio padrão com glicose como fonte de carbono (Seção 3.1) e 1mL de cultura permanente. Os tubos foram incubados em estufa à 30°C . Após um período de 24 horas 5mL da cultura reativada foi inoculada em dois tubos *falcon* de 50mL contendo 45mL de meio de cultura padrão com glicose como fonte de carbono (Seção 3.1). Os tubos foram incubados por 40 horas em 30°C . Em 40 horas a cultura se apresenta em sua fase logarítmica de crescimento e é então centrifugada por 6 minutos a $10000 \times g$ e ressuspendida em 100mL em meio de cultura correspondente ao que será utilizado no experimento a ser realizado. É medida então a densidade óptica em 600 nm (OD_{600}) utilizando espectrofotômetro (*Ultrospec 2000 UV/VIS*). A cultura é então adicionada ao meio de cultura desejado em um volume que corresponde a uma densidade óptica (OD_{600}) final de valor 0,2.

3.3 Análise da expressão global dos genes de *P. acidipropionici* por *RNAseq*

A autoria dos experimentos de análise global dos genes de *P. acidipropionici* é compartilhada com a pesquisadora Maria Carolina de Barros Grassi. As bibliotecas de *RNAseq* foram obtidas a partir do cultivo de *P. acidipropionici* cultivada em biorreator de bancada de capacidade de 2,5 litros (*Labfors*, da *Infors HT*). Foi utilizado o meio padrão descrito na seção 3.1 para a realização do experimento com 60g/L de uma das três fontes de carbono utilizadas: glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar. O cultivo foi realizado em condições de anaerobiose, a 35°C , com pH controlado em 7,0 e agitação de 100 rpm. 2mL de amostras foram retiradas da fermentação durante o crescimento para a análise da formação de metabólitos por HPLC (Seção 3.4). Quatro amostras foram retiradas de cada fermentador em diferentes

momentos da curva de crescimento bacteriana: uma na fase de latência (fase *lag*), uma no início da fase logaritmica de crescimento (fase log inicial), no fim da fase logaritmica (fase log final) e na fase de morte ou declínio. As amostras coletadas foram estabilizadas com 2 volumes do reagente *RNAprotect Bacteria (Qiagen)*. Essa solução foi “vortexada” por 5 segundos e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 5000 x g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado em *biofreezer* à -80°C. A extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O sequenciamento do RNA foi feito pela *Illumina, Inc* (San Diego, California), utilizando o serviço “*Fast Track Genetic Analysis Services*”. A partir dos reads obtidos, foi realizado o alinhamento dos mesmos contra os genes de *P. acidipropionici* ATCC4875 depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Geer et al. 2010), utilizando o programa *BOWTIE* (Langmead & Salzberg, 2009). Foram considerados somente os *reads* que alinharam com um único gene, permitindo no máximo dois *mismatch*. O número de reads alinhados foi então utilizados para o cálculo do RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*), método no qual quantifica a expressão levando em consideração a normalização a partir do tamanho do gene e do total de número de *reads* gerados na biblioteca (Mortazavi et al, 2008).

3.4 Quantificação do consumo substratos e formação de produtos durante as fermentações

A quantificação de todos as fontes de carbono e produtos gerados e apresentados pelo presente trabalho foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (*HPLC*), utilizando o cromatógrafo *Alliance HT (Waters)* acoplado a um detector de índice de refração *IR 2414 (Waters)*. Foi utilizada a coluna *HPX-87H (BioRad)*, operando a 35°C com um fluxo de fase móvel (2mM de H_2SO_4) de 0,6 mL/min. Curvas de calibração para cada composto analisado foram obtidas para a quantificação dos compostos analisados. Antes de serem injetadas no *HPLC*, as amostras foram descongeladas, centrifugadas e filtradas em filtro *Milipore* de 0,22µ.

3.5 Cálculo dos parâmetros de desempenho fermentativo

Uma vez tendo a análise quantitativa dos substratos e produtos da fermentação por HPLC, o desempenho dos processos avaliados nas fermentações em biorreatores foi estimado através dos parâmetros expressos a seguir:

- **Rendimento:** É definido como a massa de produto formada por unidade de massa consumida expressa em porcentagem (Doran 1995).

$$\text{Rendimento \% (m/m)} = \frac{\text{MF produto} - \text{MI produtos}}{\text{MI substrato} - \text{MF substrato}} \times 100$$

Onde,

MF produto: massa final do produto analisado, expresso em gramas.

MI produto: massa inicial do produto analisado, expresso em gramas.

MI substrato: massa inicial do substrato utilizado, expresso em gramas.

MF substrato: massa final do substrato utilizado, expresso em gramas.

Para as fermentações com xarope de cana-de-açúcar, o substrato foi considerado como sendo a sacarose, sendo a massa de glicose e frutose adicionadas à de sacarose (subtraindo 0,05% de massa na somatória das massas de glicose com frutose). Dessa forma, a massa de substrato foi expressa como gramas de açúcar equivalentes em sacarose.

- **Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação:**

Tendo como objetivo representar o fluxo de carbono nas fermentações aqui estudadas, foi realizada uma distribuição em mols de carbono do substrato entre os produtos fermentativos observados. Para isso, a massa produzida de cada produto ([concentração final x volume final]) foi dividida pela massa molecular do mesmo, resultado no número de mols produzidos para cada composto.

3.6 Extração de DNA e montagem de plasmídeo de superexpressão da piruvato carboxilase

Para a extração de DNA de *P. acidipropionici*, foram retiradas amostras de 2 mL de culturas crescidas em semi-anaerobiose em meio rico padrão. As amostras foram centrifugadas e precipitadas tendo o seu sobrenadante descartado. O concentrado de bactérias (*pellet*) foi ressuspenso em 400 µL de tampão TE (10M Tris, 1mM EDTA) pH 8,0. Para a quebra da parede celular, foram adicionados 50 µL de lisozima (Sigma-Aldrich) em uma concentração de 10 mg/mL (Sigma-Aldrich). A solução foi mantida por 14 horas (*overnight*) à temperatura ambiente e 100 rpm. Após isso foram adicionados 70 µL de SDS 10% e 5 µL de Proteinase K 10 mg/mL (Sigma-Aldrich). A suspensão foi então homogeneizada e incubada a 65°C durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl (0,8 g/L de CTAB e 0,4 g/L de NaCl). A suspensão foi agitada e incubada à 65°C por um período de 10 minutos. A solução obtida foi centrifugada a 12000X g por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado (-20°C), mantendo a solução por 30°C em *freezer* por um período igual ou maior à 30 minutos visando a precipitação ao DNA. Uma vez precipitado a solução foi centrifugada a 12000 Xg por 5 minutos e seu sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado (-20°C). Por fim, o DNA extraído foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de água deionizada (*MilliQ*).

Para a construção dos plasmídeos de superexpressão da piruvato carboxilase planejou-se construir um cassete contendo a sequência codificadora do gene fusionado à região promotora e terminadora do gene da metil malonil-CoA carboxitransferase (Transcarboxilase), promotor e terminador padrão utilizado por outras construções realizadas em nosso grupo de pesquisa. Buscando utilizar inicialmente a metodologia denominada *Double-Joint PCR* (Yu et al. 2004) foram desenhados e utilizados oligonucleotídeos que adicionariam sítios correspondentes à enzima *NdeI* na região promotora e *XbaI* na terminadora. Para a amplificação de cada um dos insertos (promotor, piruvato carboxilase e terminador) foram realizada reação de PCR com *Pfu DNA Polymerase* (*Promega*). Parte das padronizações das reações de PCR também foram realizadas com a *Go Taq Flexi Dna Polimerase* (*Promega*) ou com a *Taq Dna Polimerase*

(Promega). As reações inicialmente utilizadas estão expressas nas tabelas 1 a 3 e os oligonucleotídeos utilizados estão evidenciados na tabela 4

Tabela 1 - Reação de PCR padrão com *Taq DNA Polimerase*

Reagente	Volume (µL)
DNA (20ng/mL)	2,0
<i>Primer Forward</i> (5pmol/µL)	1,2
<i>Primer Reverse</i> (5pmol/µL)	1,2
Dntp (10mM)	0,4
MgCl ₂ (50mM)	1,2
Pfu Buffer (s/ Mg ²⁺)	2,0
DMSO 20%	6,0
<i>Pfu DNA Polimerase</i> (2,5 U/µL)	0,5
H ₂ O MiliQ	5,5
Volume Total	20,0

Tabela 2 –Reação de PCR padrão com *Pfu DNA Polimerase*

Reagente	Volume (µL)
DNA (20ng/mL)	1,0
<i>Primer Forward</i> (5pmol/µL)	0,5
<i>Primer Reverse</i> (5pmol/µL)	0,5
Dntp (10mM)	0,2
MgCl ₂ (50mM)	0,6
Pfu Buffer (s/ Mg ²⁺)	1,0
DMSO 20%	3,0
<i>Pfu DNA Polimerase</i> (2,5 U/µL)	0,2
H ₂ O MiliQ	3,0
Volume Total	10,0

Tabela 3 - Ciclagem padrão utilizada nas reações de reações de PCR. O tempo de extensão depende do tamanho do fragmento a ser amplificado e da DNA polimerase utilizada.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Primeira Desnaturação	94 °C	5 min	1x
Desnaturação	95 °C	50 seg	
Anelamento	61 °C	40 seg	35x
Extensão	72 °C	*Variável	
Extensão Final	73 °C	5 min	1x

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da sequência dos fragmentos utilizados e para a montagem (nested) e confirmação das reações de fusão do cassete de superexpressão da piruvato carboxilase. Os primers que adicionaram uma cauda de restrição na sequência estão evidenciados na tabela

Nome do <i>Oligo</i>	Sequência	Cauda de Restrição
Promotor_Direto_Ndel	5'- TCGCATATGATCGACGTTTCCCGTTGTG-3'	<i>Ndel</i>
Promotor_Reverso	5'- CGTCGCGGGTGCAAGGATTGGACCCATGTTTCAGCAAGATTCTCGTG-3'	-
Terminador_Direto	5'-AGGAGACCTGCTTGCGGTGATCGAGTGATCAGGCTGAGAACGACCTGAT-3'	-
Terminador_Reverso_Xbal	5'-ACTAGTCTAGAGTAGGAGGCCTGCCTTGCCC-3'	<i>Xbal</i>
PiruvatoCarboxilase_Direto	5'-ATGTTTCAGCAAGATTCTCGTGGC-3'	-
PiruvatoCarboxilase_Reverso	5'-TCACTCGATCACCGCAAGCAG-3'	-
<i>Nested_Direto</i>	5'-CGAAGCTTATCGACGTTTCC-3'	-
<i>Nested_Reverso</i>	5'-CTAGTCTAGAGTAGGAGGCCTGC-3'	-
Confirmação_Fusão_Direto	5'-AGTGCTGAACTTGTCGTCGC-3'	-
Confirmação_Fusão_Reverso	5'-GGTTCTCCGAGAGGAAGCCGTAT-3'	-

Os fragmentos correspondentes ao terminador e ao promotor, utilizando tanto a *Pfu DNA Polymerase* (Promega) quanto a *Advantage HD Polymerase* (ClonTech) foram amplificados com sucesso através da utilização da reação expressa na tabela 1 e 2 em uma temperatura de anelamento de 61°C. Para a reação final padronizada de amplificação da piruvato carboxilase foram utilizadas as concentrações indicadas nas tabelas 1 e 2 com modificações nas concentrações de MgCl₂ e DMSO 20% (1,5mM de MgCl₂ e 3,0 µL de DMSO 20%) em uma temperatura de anelamento também de 61°C. Uma vez padronizado e amplificado os fragmentos foram isolados por eletroforese em gel de agarose seguido do protocolo do kit de purificação *PureLink PCR Purification* (Invitrogen).

As reações de *Double-joint PCR* foram realizadas de acordo com o descrito por Yu e colaboradores (2004), sendo utilizadas a *Pfu DNA Polymerase* (Promega) e a *Advantage HD Polymerase* (ClonTech). Os resultados das reações de *Double-joint PCR* foram visualizadas em eletroforese com gel de agarose e posterior análise sob luz ultravioleta utilizando o fotodocumentador *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech).

Após as dificuldades encontradas na obtenção da construção por *Double-joint PCR* foi testado também o método denominado "*Gibson Assembly*" (Gibson et al. 2009). Para as reações com esse método, foram utilizados os fragmentos correspondentes ao promotor, terminador e a piruvato carboxilase utilizadas anteriormente. As reações foram realizadas com a adição do plasmídeo *pJOE826*. O *pJOE826* é um plasmídeo híbrido de 7361 pares de base com origem de replicação para a propagação em *Streptomyces sp* e *E. coli*. Em sua sequência encontramos um sítio de clonagem múltipla, um gene de resistência para ampicilina para a seleção em *E.coli* (*bla*), e um gene de resistência à higromicina (*hph*) para a seleção em *Streptomyces sp* e *Propionibacterium sp*. Antes de ser utilizado para as reações de fusão, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e XbaI.

As reações de digestão foram feitas para um volume final de 20 µL contendo 1 µg de DNA plasmidial, 2 µL de tampão de digestão apropriado para cada enzima e 0,5 µL de enzima de restrição. As reações foram incubadas à 37°C por um período de 4 horas e a digestão foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose. As reações de *Gibson Assembly* foram realizadas de acordo com o protocolo utilizados por Gibson e colaboradores (2009).

3.7 Obtenção de um meio definido para *P. acidipropionici*

Foi estabelecido um meio definido para *P. acidipropionici* devido à indispensabilidade do mesmo para a realização de experimentos que envolvem o estudo de dependência de biotina. Para a sua padronização foi utilizado como base e modelo o meio de cultura descrito por Dherbe'court e colaboradores (2008) e utilizado por Falentin e colaboradores (2010), em experimentos com *Propionibacterium freudenreichii*. As modificações foram baseadas na disponibilidade de materiais em nosso laboratório e na utilização do mínimo possível de compostos não autoclaváveis, como vitaminas e aminoácidos (biotina, assim como a maioria das vitaminas, não resiste às condições de alta temperatura e pressão). O meio de cultura obtido está expresso em resultados e discussão.

Entre as alterações realizadas estão a troca de acetato de cobalto (acetato-Co.4H₂O) por cloreto de cobalto (CoCl₂). Essa alteração se deu principalmente pelo fato do acetato ser uma potencial fonte de carbono. Como grande parte dos experimentos do nosso grupo envolvem o

estudo do comportamento metabólico da bactéria em diferentes fontes de carbono, seria inviável a presença de uma segunda potencial fonte de carbono em nossos experimentos. Além disso, no meio descrito por Dherbe'court *et al* (2008) foram adicionados nove diferentes vitaminas (biotina, ácido pantotênico, vitamina B12, ácido para-aminobenzóico; vitamina B1; ácido nicotínico, pirodoxal fosfato, riboflavina e ácido fólico). Entretanto, é descrito que em geral propionibactérias são auxotróficas principalmente para ácido pantotênico e biotina e que algumas espécies apresentariam dependência por tiamina (vitamina B1) e ácido para-aminobenzóico (PABA) (Falkow et al. 2006). Decidimos, portanto, manter as quatro vitaminas possíveis de serem indispensáveis em *P. acidipropionici* na composição do nosso primeiro meio definido.

Após problemas de precipitação de sais e a dificuldade em solubilizar diferentes compostos (principalmente alguns aminoácidos) foi estabelecido uma ordem para a adição dos reagentes ao meio. Primeiramente é adicionada a fonte de carbono selecionada, em seguida os fosfatos, seguida dos demais sais, aminoácidos e por fim as vitaminas. Os tampões fosfatos e as fontes de carbono são autoclavados. Os demais constituintes são filtrados em filtros *millipore* de 0,22 µm em fluxo laminar. Parte dos aminoácidos são solubilizados com o auxílio de adições de NaOH 5mM, uma vez que a solubilidade de parte deles é muito baixa (glutamato, aspartato e tirosina, principalmente). O pH foi acertado ao fim para 6,8 com NaOH 5mM com o auxílio de um pHmetro. Todo o meio foi, então, completado para 1 litro e filtrado em sistema de filtração a vácuo com membrana *PES* 0,22µm.

Como citado em resultados e discussão, uma segunda adaptação desse meio foi realizada onde foi retirado o ácido para-aminobenzóico (PABA) e a tiamina da composição do meio e passou-se a autoclavar parte dos aminoácidos. Essa decisão foi tomada após a suspeita de que, devido a grande utilização destes compostos pelo nosso grupo de pesquisa, haveria a possibilidade de conter pequenas concentrações de vitamina juntos dos mesmos.

Para a comprovação da adequação do meio de cultura para *P. acidipropionici* as culturas foram previamente inoculadas em meio rico padrão (descrito na seção 3.1) à 30°C em uma condição semi-anaeróbica e sem agitação. No momento em que as culturas atingiram sua fase exponencial de crescimento (OD 600 ~ 2 à 3) as mesmas foram “lavadas” duas vezes em PBS 1%

(tampão fosfato salino / 137mM NaCl, 12 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.4) à 9000 RPM por 9 minutos. As culturas foram inoculadas no meio definido padronizado em uma densidade óptica (OD₆₀₀) de aproximadamente 0,2. As curvas de crescimento foram acompanhadas através da visualização da densidade óptica em 600nm (OD₆₀₀) utilizando um espectrofotômetro *ULTROSPEC 2000 UV/visible* (Pharmacia Biotech).

Para o primeiro teste de dependência de biotina, as culturas foram preparadas e lavadas assim como relatado no experimento anterior. Entretanto, neste experimento, as culturas foram divididas em dois grupos: culturas inoculadas em meio definido sem adição de biotina e culturas inoculadas em meio definido com biotina (0,004 mg/L-*Sigma-Aldrich*). O crescimento bacteriano foi realizado à 30°C e em condições semi-anaeróbias. O acompanhamento do crescimento se deu através também da análise da densidade óptica em 600 nm (OD₆₀₀).

Para o teste de adequação do segundo meio de cultura adaptado as culturas também foram preparadas e “lavadas” como descrito anteriormente. As culturas foram diluídas a uma OD₆₀₀ final de valor 0,2 em tubos de 50mL sendo inoculadas em quatro diferentes grupos: (1) meio definido sem adição de nenhuma vitamina, (2) meio definido com ácido pantotênico e sem biotina, (3) meio definido com biotina e ácido pantotênico e, por fim, (4) meio padrão (rico) como o descrito em 5.1, como controle de viabilidade do pré-inóculo. O experimento foi realizado com triplicata biológica. Amostras foram retiradas durante toda a curva de crescimento e foram aferidas a sua densidade óptica a 600nm (OD₆₀₀) por espectrofotometria. Todas as culturas foram mantidas à 30°C, em uma condição de semi-anaerobiose e sem rotação.

No experimento de ciclagem, as lavagens e o pré-inóculo foram realizados como descrito nos experimentos anteriores. A cultura foi inoculada em 50 mL de meio definido sem adição de biotina. A primeira ciclagem foi acompanhada por um período de cinco dias por análise de sua densidade óptica (OD₆₀₀). Após esse período a cultura bacteriana foi novamente inoculada em um novo meio definido diluindo-a a uma densidade óptica final (OD₆₀₀) de valor igual a aproximadamente 0,2. As curvas de crescimento das culturas foram acompanhadas por um período de 20 dias. Após esse período a cultura foi transferida para três diferentes meios de cultura: (1) um meio rico padrão visando testar sua viabilidade; (2) um meio definido sem biotina e (3) um meio rico sem biotina. O experimento foi realizado em triplicata biológica e

acompanhado por 18 dias através da aferição da densidade óptica a 600nm assim como descrito anteriormente. Todo o experimento foi realizado em estufa à 30°C, em semi-anaerobiose e sem rotação.

3.8 Teste da suplementação de biotina em *P. acidipropionici*

Os testes de suplementação de biotina foram realizados em meio padrão (Seção 3.1) em três experimentos separados, tendo uma concentração de 2% (20g/L) de fonte de carbono: glicerol, glicose ou xarope de cana-de-açúcar. Foi avaliado o crescimento de *P.acidipropionici* nas três fontes de carbono e em três diferentes concentrações de biotina: 0 mg/L (controle), 0,004mg/L e 0,04 mg/L. A biotina adicionada ao experimento foi previamente diluída em água destilada e filtrada (filtro *millipore* 0,22µm) obtendo-se uma solução estoque de 25mL com uma concentração final de 0,04 mg/L. A avaliação do crescimento foi acompanhada através da medição da densidade óptica em 600nm (*ULTROSPEC 2000 UV/visible - Pharmacia Biotech*). Adicionalmente, foram retiradas 1 mL de amostra em diferentes pontos do crescimento para análise de metabólitos por cromatografia líquida (*HPLC*).

3.9 Crescimento de *P. acidipropionici* em um ambiente rico em CO₂

Para os experimentos em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio, as culturas foram cultivadas em frascos de penicilina com capacidade para 100 mL com tampa de borracha. Foi optado por utilizar esse recipiente de vidro visando uma menor perda de gás diluído (NaHCO₃) da cultura para a atmosfera. O meio de cultura padrão (Seção 3.1) foi preparado em 400 mL contendo a quantidade de reagentes equivalentes a 1 litro de meio de cultura. Em uma garrafa separada foram diluídos 20 gramas de glicerol em 50 mL de água. Ambas as soluções foram autoclavadas junto de uma terceira garrafa contendo 50mL de água destilada.

Momentos antes da preparação do inóculo inicial do experimento foram diluídos 6,472 gramas de bicarbonato de sódio (NaHCO₃ / *J.T. Baker*) em 80mL de água destilada e filtrados lentamente em filtro *milipore* de 0,22 nm em fluxo laminar estéril. Para a obtenção do pH final,

foi padronizado anteriormente o volume de HCL 1M necessário para alcançar um pH final de valor 7,0. Os constituintes de cada um dos meios de cultura final, que continha um volume total de 80 mL, utilizados no experimento estão expressos a seguir:

60mM de NaHCO₃	20 mL de Solução de NaHCO ₃ 50 mL de meio Padrão com Glicerol 150µL de HCL 1M (29,85 mL - X mL de inóculo) de Água Destilada
120mM de NaHCO₃	20 mL de Solução de NaHCO ₃ 50 mL de meio Padrão com Glicerol 150µL de HCL 1M (29,35 mL - X mL de inóculo) de Água Destilada
Controle	20 mL de Solução de NaHCO ₃ 50 mL de meio Padrão com Glicerol 0µL de HCL 1M (30 mL - X mL de inóculo) de Água Destilada

“X” equivale ao volume necessário da cultura do pré-inóculo (Seção 3.2) para a obtenção da densidade óptica em 80 mL inicial de 0,2. As culturas foram cultivadas em estufa a 30°C por um período de 10 dias. A aferição de densidade óptica (600nm) só foi realizada ao fim da fermentação, visando evitar a abertura do frasco contendo altas concentrações de CO₂. Foram retirados 2mL no início e ao fim das fermentações para a quantificação do consumo do substrato e a formação de produtos na fermentação (Seção 3.4).

3.10 Crescimento de *P. acidipropionici* em MES e em diferentes concentrações de glicerol

Para os testes de crescimento foi utilizado o meio padrão (Seção 3.1) contendo 10 gramas (1%) ou 20 gramas de glicerol (2%). Os reagentes foram calculados e pesados para um volume total de 1 litro, mas diluídos em 850 mL de água destilada. Glicerol (10 gramas ou 20 gramas) foi diluído em 50mL de água destilada. Ambas soluções foram autoclavadas. Para os experimentos contendo tampão MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado/ *Sigma-Aldrich*) foi adicionado 5mL de uma solução filtrada de MES 1 Molar em fluxo laminar estéril, obtendo uma concentração final de 100mM nos meios de cultura. Para os experimentos não contendo

tampão, foi adicionada 5 mL de água destilada esterilizada. Todos os componentes foram juntados em fluxo laminar esterilizado. Cada cultura foi cultivada em tubo

As culturas foram cultivadas em estufa a 30°C em uma condição de semi-anaerobiose por um período de 10 dias. A aferição de densidade óptica (600nm) foi acompanhada durante toda a curva de crescimento e foram retiradas 2 mL em diferentes momentos da fermentação para a quantificação do consumo do substrato e produção de ácidos orgânicos finais.

3.11 Análise da capacidade de consumo de CO₂ em diferentes fontes de carbono

A análise do consumo de CO₂ em *P. acidipropionici* foi realizada em meio de crescimento padrão contendo 1% (10g/L) de uma das fontes de carbono testadas: glicose, glicerol, xarope de cana-de-açúcar, sacarose, xilose e sorbitol. Os meios foram divididos em dois grupos (controle e tratamento) onde foi diluído para uma concentração final de 60mMm NaH₂CO₃ (*J.T. Baker*) (carbono “não marcado”/ controle) ou NaH₂C¹³O₃ (*Sigma Aldrich*). As soluções de bicarbonato foram diluídas em água à 8°C e filtradas com filtro *millipore* 0,22µm momentos antes da cultura ser adicionada ao meio. A etapa de preparação do meio de cultura foi toda realizada em ambiente estéril em fluxo laminar.

As culturas foram reativadas e inoculadas assim como descrito no tópico 5.2. O cultivo foi realizado em tubos PET tipicamente utilizados para coletas de sangue com tampas de segurança (*Safety Cap*) com capacidade para 9mL (*Vacurette*), visando manter a bactéria em um ambiente fechado que impedisse a perda ou a troca de CO₂. O volume total de cultura obtido no experimento foi de 8mL. Após 8 dias de crescimentos, 4mL foram separados e centrifugados para a análise em HPLC e em Espectrômetro de Massa (UPLC).

4.9.1 Método de UPLC–MS

Soluções-padrão de ácidos propiônico e succínico para otimização dos parâmetros instrumentais foram preparadas por diluição em acetonitrila (ACN) a uma concentração de 50 ppm. As amostras de extratos foram injetadas concentradas em meio aquoso. Todas as soluções assim preparadas foram então transferidas para frascos do auto-injetor do UPLC e

mantidas a 10 °C antes das injeções. As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Waters Acquity UPLC (*Ultra performance liquid chromatography*) acoplado a um espectrômetro de massas Waters Acquity TQD com geometria triplo-quadrupolo (QqQ), equipado com fonte de ionização do tipo ESI (*Electrospray ionization*). Cada injeção de solução padrão de ácido láctico ou de amostra foi sucedida por uma injeção de branco de solvente (ACN), para se verificar a presença ou não de efeito de memória (*carryover*) na cromatografia.

A fase estacionária consistiu em uma coluna analítica de fase reversa *Acquity BEH Amide* (2,1 × 100 mm, partículas de 1,7 µm), mantida a 50°C durante todas as corridas. Como fase móvel, foram empregadas misturas em gradiente dos solventes A (acetato de amônio 10 mM em 50:50 ACN/H₂O, pH 9,0) e B (acetato de amônio 10 mM em 95:50 ACN/H₂O, pH 9,0), a um fluxo de 600 µL min⁻¹. Um volume de 7,5 µL de cada amostra foi injetado por meio de um auto-injetor, para cada análise. Foi empregada solução 95:5 ACN/H₂O como *Weak Needle Wash* e *Strong Needle Wash*. O gradiente linear de solventes A e B foi o seguinte:

Tempo (min)	% A	% B
Inicial	0,1	99,9
0,40	0,1	99,9
0,50	40,0	60,0
2,00	70,0	30,0
2,01	0,1	99,9
5,00	0,1	99,9

Os compostos eluídos pela coluna foram continuamente ionizados por ESI(-) e analisados por um método de varredura (*MS Scan*) de *m/z* 70 a 130 (*Scan Duration* 0,5 s, *Inter-Scan Delay* 0,1 s) ao longo dos 5 min de corrida. Os demais parâmetros instrumentais empregados foram Capillary 4,0 kV, Cone 30 V, Extractor 3 V, RF Lens 0,1 V, Source Temperature 130°C, Desolvation Temperature 350 °C, Cone Gas Flow 0 L h⁻¹, Desolvation Gas Flow 650 L h⁻¹, Collision gas flow 0,1 mL min⁻¹ LM1 Res 15, HM1 Res 15, Entrance 50, Collision Energy 2, Exit 50, LM2 Res 15, HM2 Res 15 e Multiplier 650 V.

Os resultados foram avaliados através da análise dos picos obtidos no método de varredura (MS Scan). Foram selecionados os picos correspondentes a cada uma das moléculas baseadas em sua relação massa/carga (m/z). No padrão isotópico observado para os íons de ácido succínico, foram consideradas como m/z 117 as moléculas contendo somente átomos de ^{12}C , m/z 118 as moléculas contendo um átomo de ^{13}C e m/z 119 para aquelas com dois átomos de ^{13}C . Para o ácido propiônico foram considerados como m/z 73 as moléculas contendo somente átomos de ^{12}C e m/z 74 para as moléculas contendo um átomo de ^{13}C . A intensidade (altura) de cada um dos picos foi anotada e utilizada para a obtenção dos resultados aqui apresentados (Figura 8).

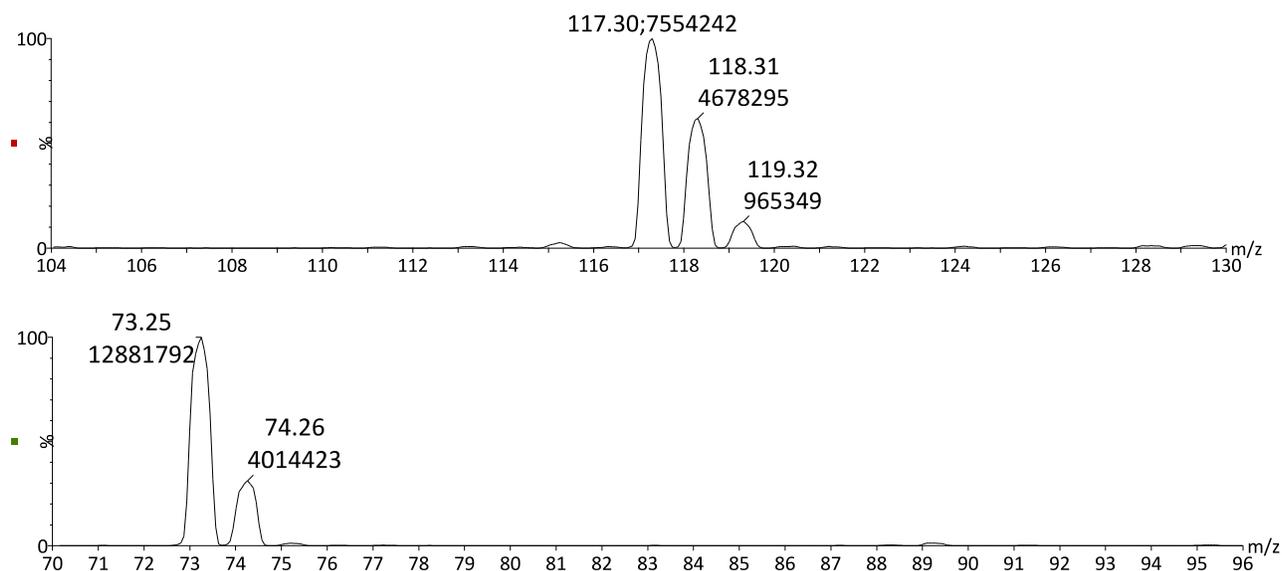


Figura 8- Resultado de análise de varredura obtida através da análise das amostras em UPLC-MS. **A.** Picos correspondentes à molécula de ácido succínico. m/z 117.30 corresponde a uma molécula somente com C^{12} , m/z 118.31 para as moléculas com um C^{13} e m/z 119.32 para aquelas com dois C^{13} . **B.** Picos referentes à molécula de ácido propiônico. m/z 73.25, correspondente às moléculas somente com C^{12} . m/z 74.26 corresponde às moléculas com um C^{13} .

3.12 Crescimento de *P. acidipropionici* em altas concentrações de CO₂

Para a análise dos efeitos do bicarbonato de sódio no metabolismo de *P. acidipropionici* foram realizadas fermentações em biorreator de bancada (*Labfors 2,5L*, da *Infors HT*). Foi realizada a fermentação em glicerol em duplicata e a fermentação em bicarbonato de sódio 120mM com e sem adição constante de CO₂ gasoso sem replicatas. Todas as fermentações foram efetuadas com 2% (20g/L) de glicerol como fonte de carbono com o meio padrão descrito da seção 3.1. No cultivo com CO₂ burbulhando foi mantido um fluxo constante de 0,5VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) de CO₂ gasoso 99% (*White Martins*). As fermentações foram conduzidas a 30°C, com agitação de 200 rpm e pH fixado em 6,8 através da adição automatizada de NaOH 5M. Antes de introduzir o inóculo no biorreator foram borbulhados 4,5 vvm de nitrogênio gasoso durante 20 minutos. A preparação dos inóculos foi realizada de acordo com o relatado em 3.2.

Para a preparação do biorreator da condição controle (sem adição de espécies de CO₂) foi preparado o meio de cultura com as concentrações necessárias para o volume final de 1litro. 800mL do meio foi adicionado ao biorreator, o qual foi esterilizado em autoclave a 121°C, 1 bar, por um período de 20 minutos. Em paralelo, os 100mL restantes foram transferidos para uma garrafa de 250mL e foi juntamente autoclavada com o biorreator sendo posteriormente utilizados para a ressuspensão das culturas de *falcon* (tubos de 50mL) a serem inoculadas no biorreator. Em outra garrafa de 250mL foi diluído 20 gramas de glicerol em 100mL de água destilada, também autoclavado nas condições acima citadas. A fermentação foi realizada em duplicata.

Para a preparação do biorreator das condições contendo CO₂ foi preparado o meio de cultura com as concentrações necessárias para o volume final de 1litro. 700mL do meio foi adicionado ao biorreator, o qual foi esterilizado em autoclave a 121°C, 1 bar, por um período de 20 minutos. Em paralelo, os 100mL restantes foram transferidos para uma garrafa de 250mL e foi juntamente autoclavada com o biorreator sendo posteriormente utilizados para a ressuspensão das culturas de *falcon* (tubos de 50mL) a serem inoculadas no biorreator. Em

outra garrafa de volume 250mL foi diluído 20 gramas de glicerol em 100mL de água destilada, também autoclavado nas condições acima citadas e filtrado em filtro *millipore* 0,22µm. Momentos antes do inóculo, foi diluído 10,0812 gramas de bicarbonato de sódio em 100mL de água destilada gelada e filtrado lentamente em fluxo laminar estéril. A solução foi adicionada ao biorreator antes da adição do pré-inóculo.

Uma vez iniciada a fermentação no biorreator, duas amostras de 1,5 mL foram coletadas em intervalos aproximados de 8 horas. Uma amostra foi utilizada para avaliar o crescimento por densidade óptica (OD₆₀₀), enquanto a outra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e mantida a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização *in silico* dos genes envolvidos no metabolismo de assimilação de CO₂

4.1.1 Carboxilases

Através da análise do genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 foi possível identificar genes candidatos que estariam envolvidos no processo de assimilação de CO₂ nessa bactéria. Dentre as enzimas identificadas, destaca-se a piruvato carboxilase (PC, PACID_00400, EC: EC 6.4.1.1), enzima provavelmente relacionada à assimilação de CO₂ e ao seu direcionamento para a formação de ácido propiônico. Através da análise da piruvato carboxilase predita no genoma de *P. acidipropionici* pela ferramenta *InterproScan* (Quevillon et al. 2005) é possível confirmar que a proteína predita mantém os domínios específicos (BC, CT e BCCP) e as regiões conservadas necessárias para sua atividade (Figura 3 e 9).

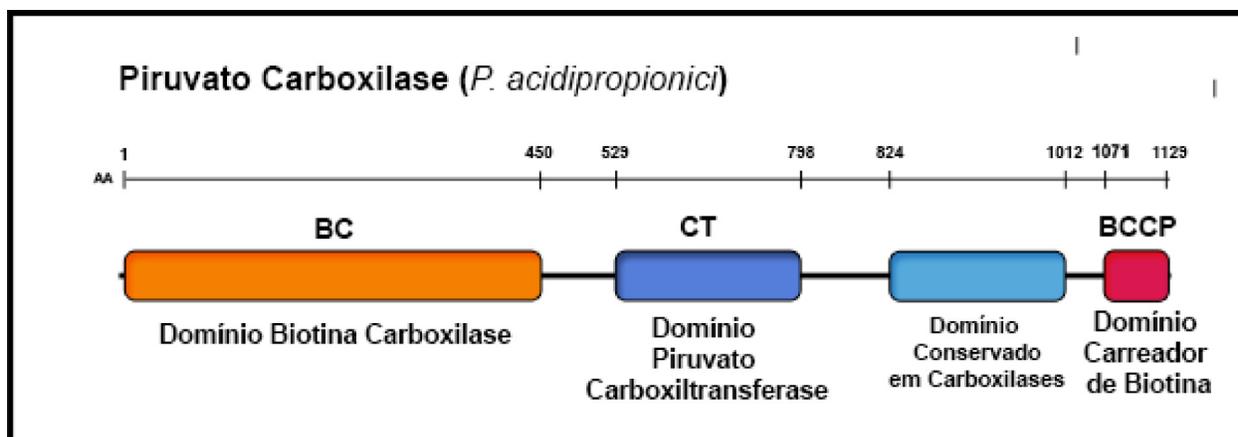


Figura 9 – Piruvato carboxilase de *P. acidipropionici* ATCC4875 e os domínios conservados encontrados através da análise da ferramenta *InterproScan* (Quevillon et al, 2005).

Foram buscadas também sequências similares em outras bactérias do gênero *Propionibacterium* já com genomas sequenciados. Não foi encontrada uma sequência correspondente nos genomas de *Propionibacterium acnes* (Brüggemann et al. 2004; Hunyadkürti et al. 2011), *Propionibacterium avidum* (Ördögh and Hunyadkürti 2013) e de *Propionibacterium freudenreichii* (Falentin et al. 2010). A única espécie que apresenta uma sequência similar e depositada no banco de dados do *NCBI* (Geer et al. 2010) é a *Propionibacterium propionicum* F0320a (depósito YP_006511051). *P. propionicum* pertence ao grupo das propionibactérias cutâneas e patogênicas, geralmente relacionadas ao desenvolvimento de acnes e outras inflamações em humanos. Poucos estudos metabólicos e fisiológicos foram realizados com essa espécie, logo é difícil inferir o papel dessa enzima no metabolismo da bactéria (Mordarska and Paściak 1994; Paściak et al. 2003). Tendo-se em vista que *P. acidipropionici* é reconhecida como a espécie que apresenta uma maior produção de ácido propiônico (Colomban and Boyaval 1993), é possível que, além de estar envolvida na assimilação de CO₂, a piruvato carboxilase possa também estar relacionada ao aumento da produção desse ácido orgânico, uma vez que essa enzima tem como produto um substrato importante do ciclo de ácido propiônico e é quase que exclusiva nessa espécie de propionibactéria (Figura 10).

Através da análise do genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875, foi identificada também uma possível propionil-CoA carboxilase (PACID_24180) (PCC, EC 6.4.1.3)(Parizzi et al. 2012). Essa enzima seria responsável por adicionar um grupo carboxil na molécula de propionil-CoA, formando metilmalonil-CoA e seria também um possível candidato para a assimilação de CO₂ dentro da via de *Wood Werkman*, apesar de sua reação de carboxilação se dar no sentido contrário ao de produção de ácido propiônico (Figura 10).

Entretanto, apesar de identificada como um uma propionil-CoA ligase (Parizzi et al. 2012) a busca e análise de domínios conservados por *Interproscan* (Quevillon et al. 2005) revela em sua sequência correspondente a presença de domínios conservados da enzima acetil-CoA carboxilase (Figura 11). A acetil-CoA carboxilase (ACC, E.C.6.4.1.2) é uma enzima indispensável que catalisa a carboxilação de acetil-CoA e que atua no início da síntese de ácidos graxos (Polyak et al. 2012). Como não encontramos outra sequência referente à ACC em todo o genoma, existe a probabilidade de que essa sequência corresponda a essa enzima. Dessa maneira, apesar de incerta a função dessa sequência no metabolismo de *P. acidipropionici*, a consideramos também como uma potencial enzima envolvida na fixação de CO₂ nesse organismo.

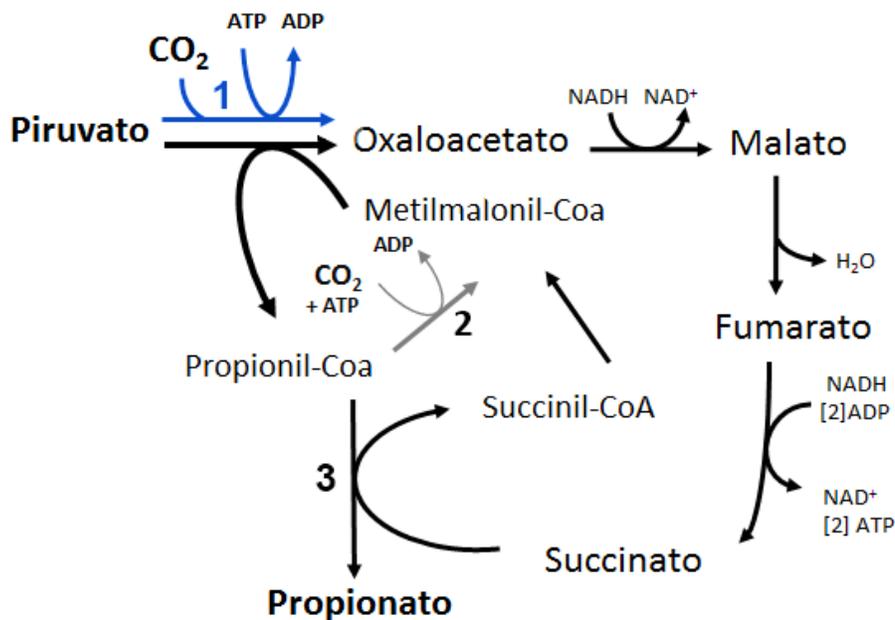


Figura 10- Via fermentativa de *Wood-Werkman* evidenciando as duas carboxilases presentes no metabolismo de *P. acidipropionici* 4875 e possivelmente envolvidas no fenômeno de assimilação de CO₂ nesse organismo: **1.** Piruvato Carboxilase e **2.** Propionil-CoA carboxilase.

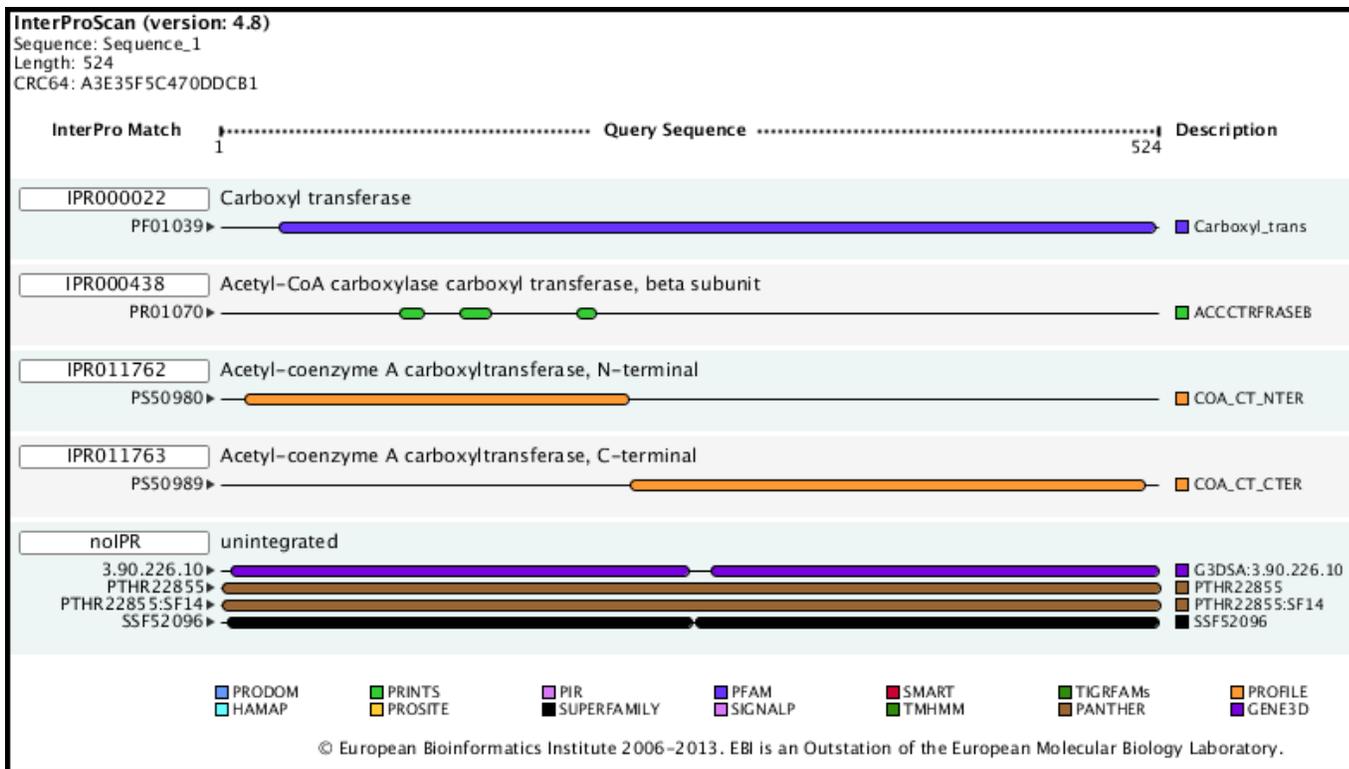


Figura 11 – Análise de domínios conservados pela ferramenta *InterproScan* da sequência PACID_24180 do genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 depositada no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

4.1.2. Genes envolvidos no metabolismo de biotina

Os genes envolvidos no metabolismo de biotina podem ser divididos em quatro grupos: (1) genes envolvidos na síntese de biotina, (2) genes envolvidos no transporte e assimilação de biotina, (3) genes de enzimas dependentes de biotina e (4) genes envolvidos na regulação da transcrição dos genes anteriores.

Através da prospecção de todos os genes já descrito nas vias de biossíntese de biotina no genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 encontramos apenas uma sequência correspondente à biotina sintase (*bioB*) presente e conservada em seu genoma (Tabela 5 e Figura 12). Uma vez que é desconhecido um mecanismo de síntese de detibiotina (substrato da BioB) na ausência de enzimas da própria via de síntese de biotina, podemos inferir pela análise do genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 que essa bactéria seria de fato dependente dessa vitamina.

Tabela 5 – Resumo dos principais genes envolvidos no metabolismo de biotina já descrito em bactéria e sua disponibilidade no genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875. A maioria dos genes encontrados não apresentavam-se anotados como os genes correspondentes, sendo aqui identificados através da análise de bancos de dados pelas ferramentas *Blastx* e *Interproscan*.

Gene	Sigla	Genoma	Gene ID	Anotação NCBI
Pimeloil Sintase	<i>bioI</i>	Ausente	-	-
Pimelil-CoA Sintetase	<i>bioW</i>	Ausente	-	-
Pimeloil metil ester esterase	<i>bioH</i>	Ausente	-	-
Malonyl-CoA O-metiltransferase	<i>bioC</i>	Ausente	-	-
KAPA Sintase	<i>bioF</i>	Ausente	-	-
DAPA Aminotransferase	<i>bioA</i>	Ausente	-	-
Detiobiotina Sintase	<i>bioD</i>	Ausente	-	-
Biotina Sintase	<i>bioB</i>	Presente	PACID_10240	<i>biotin synthase</i>
Transportador de Biotina BioY	<i>bioY</i>	Presente	PACID_20900	<i>hypothetical protein</i>
Transportador de Biotina BioM	<i>bioM</i>	Presente	PACID_20890	<i>ABC transporter ATP-binding protein</i>
Transportador de Biotina BioN	<i>bioN</i>	Presente	PACID_20880	<i>cobalt transport protein</i>
Biotina Ligase	<i>birA</i>	Presente	PACID_24170	<i>Biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] ligase</i>
Regulador Transcricional BioQ	<i>bioQ</i>	Presente	PACID_10250	<i>Transcriptional regulator, TetR family</i>

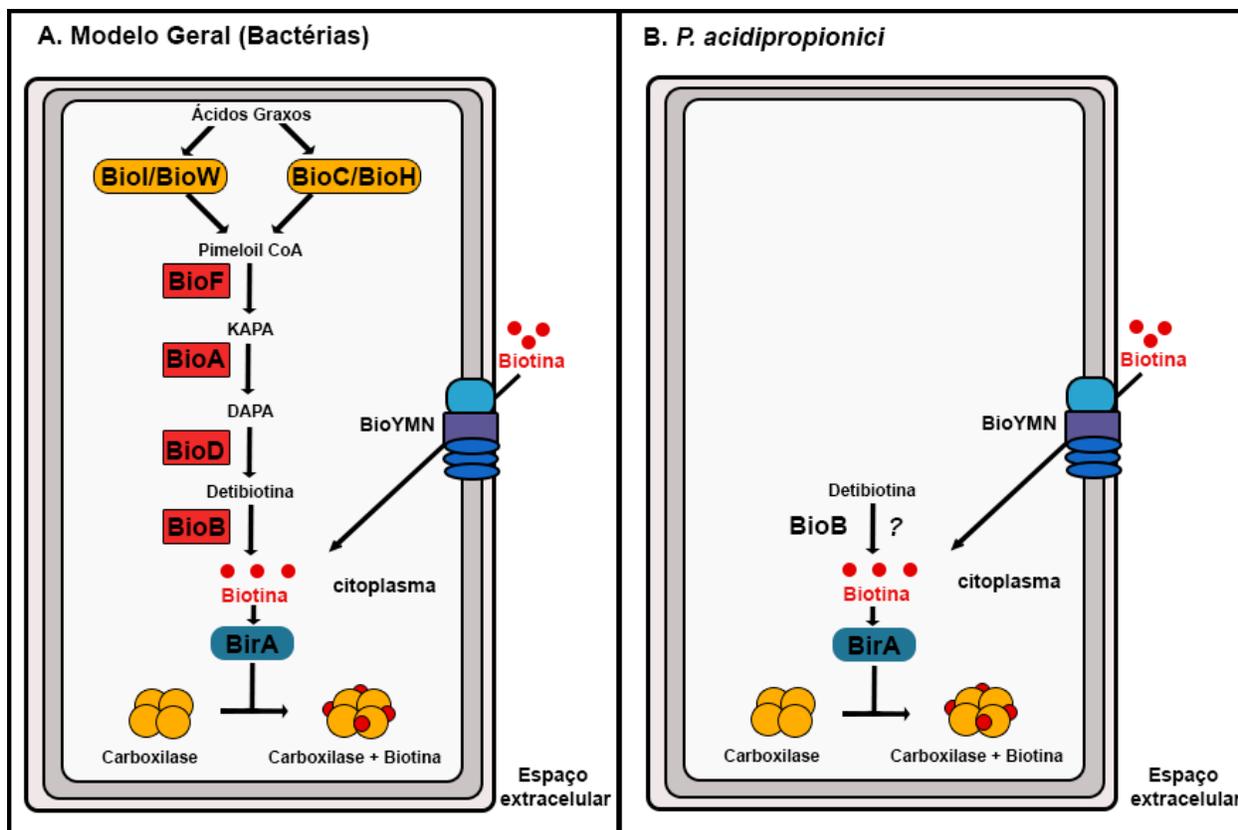


Figura 12 – A. Via de biossíntese de biotina em diferentes grupos de bactérias. B. Sequências identificadas e presentes no genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875.

Pressupondo-se que *P. acidipropionici* apresente auxotrofia para biotina, a alta demanda dessa vitamina necessitaria de um eficiente sistema de assimilação. Entretanto, não é conhecido o mecanismo de assimilação de biotina em propionibactérias. No genoma de *P. acidipropionici* encontramos um *operon* composto por três *ORFs* (*Open Read Frames*/“Sequências de leitura aberta”), que poderiam corresponder aos genes denominados *bioY*, *bioM* e *bioN* (PACID_20900; PACID_20890; PACID_20880). Tais genes codificariam proteínas que compõem o sistema BioYMN, um sistema de transporte de biotina do tipo ABC largamente distribuído em diferentes grupos de bactérias (Hebbeln et al. 2007), incluindo actinobactérias (Schneider et al. 2012)(Tabela 5). Esse sistema torna-se, portanto, um potencial candidato na realização desse fenômeno em *P. acidipropionici*.

Uma vez internalizada, a biotina só se torna fisiologicamente ativa quando está covalentemente ligada às enzimas. Essa ligação se dá de uma maneira pós transducional e com gasto de ATP e por uma proteína chamada Biotina Proteína Ligase (BirA), enzima amplamente distribuída em *Eubacteria* (Rodionov, Mironov, and Gelfand 2002) e também encontrada em *Propionibacterium acidipropionici* ATCC4875 (PACID_24170) (Tabela 5 e Figura 12).

Além de ser responsável pelo fenômeno da biotinilação, a BirA pode estar envolvida também na regulação da transcrição dos genes das vias do metabolismo de biotina, sendo caracterizada, portanto, como uma enzima bifuncional. Em geral, a BirA atua como um repressor transcricional, impedindo o início da transcrição dos genes de biossíntese e transporte de biotina, geralmente dispostos em *operons*. A repressão acontece pela capacidade dessa molécula de se dimerizar em situações em que há um excesso de biotina ou excesso de enzimas já ligadas à biotina. Os dímeros de BirA apresentam a capacidade de se ligarem ao DNA em regiões específicas presentes nos operadores dos *operons* envolvidos no metabolismo de biotina, reprimindo, assim, a transcrição gênica (Beckett 2007; Rodionov, Mironov, and Gelfand 2002). Estudos demonstram que essa ligação ao DNA que ocasiona a repressão transcricional é realizada devido a presença de um domínio de ligação ao DNA na porção *N-terminal* da proteína contendo um domínio *HTH* (*helix-turn-helix*/Hélice-Giro-Hélice)(Rodionov, Mironov, and Gelfand 2002).

Apesar da sequência correspondente à BirA ser amplamente conservada e distribuída em diferentes grupos de bactérias, alguns grupos de bactérias, como é o caso das actinobactérias, apresentam mutações em sua região N-terminal que culminariam na perda da capacidade regulatória dessas proteínas. Através da realização da análise da sequência da BirA de *P. acidipropionici* utilizando um programa de predição de domínios *HTH* (Dodd and Egan 1990) é obtido que a probabilidade de se encontrar este domínio é nula (Figura 13). A ausência do domínio em *P. acidipropionici*, torna a BirA desta espécie uma enzima provavelmente monofuncional e possivelmente não envolvida com os fenômenos de regulação de síntese de biotina.

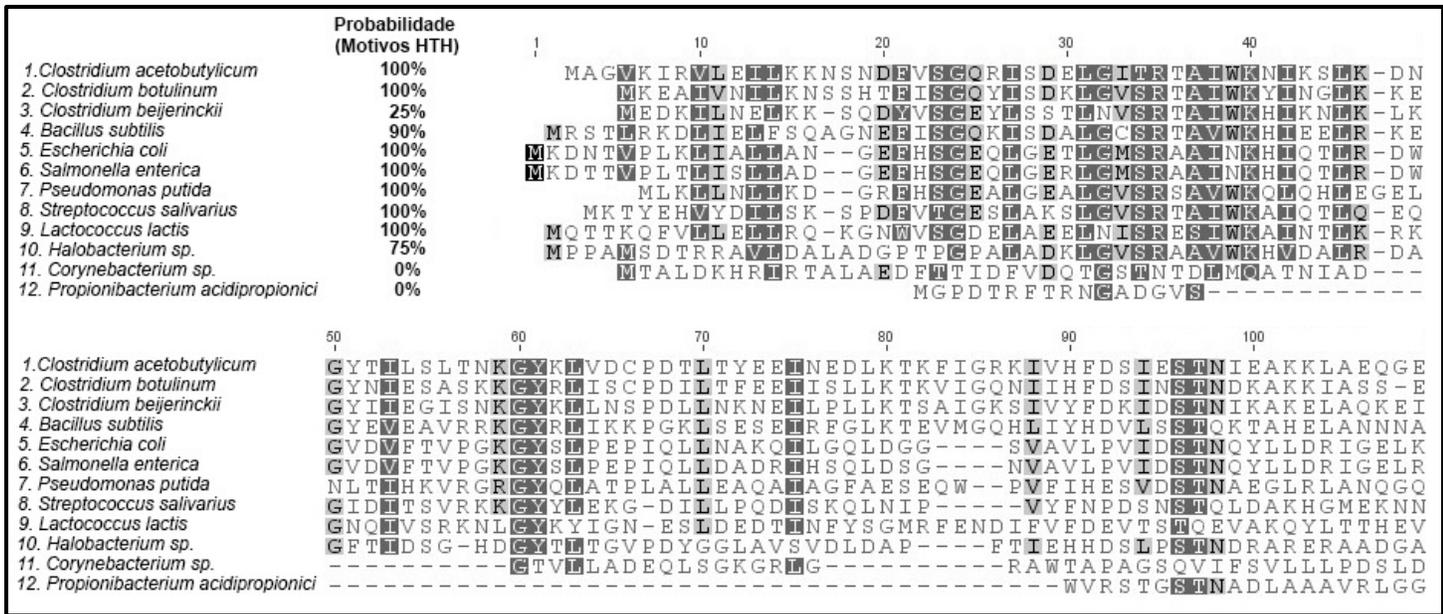


Figura 13 - Múltiplo alinhamento das regiões N-terminais da Biotina Ligase (*birA*) de diferentes espécies de bactérias. As probabilidades de cada uma das sequencias em apresentar domínios HTH (*Helix turn Helix*) estão expressas em frente ao nome das espécies e foram obtidas previstas através do método proposto por Dodd e Egan, 1990.

Nos últimos anos foi identificado em diferentes espécies de actinobactérias um regulador alternativo dos genes envolvidos no metabolismo de biotina, um fator de transcrição da família de proteínas *TeT R*, denominado “BioQ”(Rodionov and Gelfand 2006) que apresenta uma função regulatória repressora de maneira semelhante ao observado em BirA bifuncionais (Brune et al. 2012). Tal fator de transcrição foi caracterizado por identificar uma sequência de um motivo (TGAAC-N3-GTTAC) que forma um palíndromo de 17 pares de base que está sempre associado a genes envolvidos na assimilação e síntese de biotina (Figura 14)(Rodionov 2007).



Figura 14 - Sequência consenso predita para os sítios de ligação do fator de transcrição BioQ (Rodionov, 2007)

Através da análise do genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 encontramos uma sequência com alta similaridade a *bioQ* (PACID_10250) e co-localizada com o gene codificante da biotina sintase (*bioB*) (Figura 15). Foram também localizadas cinco sequências que corresponderiam ao motivo de reconhecimento da BioQ. Os cinco motivos encontrados estão evidenciados na tabela 6. Um dos motivos é encontrado na região promotora do *operon bioYMN* de maneira semelhante ao observado no genoma de outras bactérias, incluindo *P. acnes* (Figura 15)(Rodionov 2007). Dois motivos são encontrados justapostos e *downstream* às sequências codificadoras da biotina sintase (*bioB*) e do próprio fator de transcrição (*bioQ*). A localização do motivo na região promotora de *bioQ* sugere um mecanismo de auto regulação negativa deste fator de transcrição, comumente encontrado em fatores de transcrição em bactérias. Outro motivo é localizado em uma região do genoma onde não aparenta estar associado a um gene. Sua sequência se encontra presente entre dois genes de função desconhecida e localizada em uma região *downstream* ao término de ambos os genes. Por fim, encontramos também um motivo na região promotora do *operon* codificante para a enzima metil malonil-CoA carboxitransferase (EC: 2.1.3.1), um complexo enzimático dependente de biotina e fundamental para a formação do ácido propiônico (Tabela 6 e 7, Figura 15).

Tabela 6- Sequências consenso reconhecidas pela BioQ e regiões promotoras em que são encontradas no genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875

Sequência	Região Promotora
TGAACGATGTTCA	bioYMN
TGAACGATGTTCA	Biotin Sintase (birB)
TGAACGGTGTTC	bioQ
TGAACGGTGTTC	Metil Malonil-CoA Carboxitransferase
TGAACTGGTTCA	-

A identificação de uma região regulatória para BioQ em um gene não envolvido com a assimilação ou síntese de biotina é o primeiro caso descrito até então. Em alguns estudos realizados com BirA, de fato é observado que é possível que ocorra uma regulação da BirA não só com vias associadas à biotina, mas também às enzimas dependentes da mesma, incluindo a piruvato carboxilase (Rodionov, Mironov, and Gelfand 2002). Entretanto, esses são baseados apenas em dados genômicos e não foram comprovados *in vivo*. É ainda importante ressaltar ainda que existem mais três enzimas dependentes de biotina encontradas no genoma de *P. acidipropionici* (Tabela 3), mas nenhuma delas apresenta um sítio supostamente reconhecível pela BioQ, incluindo a enzima piruvato carboxilase.

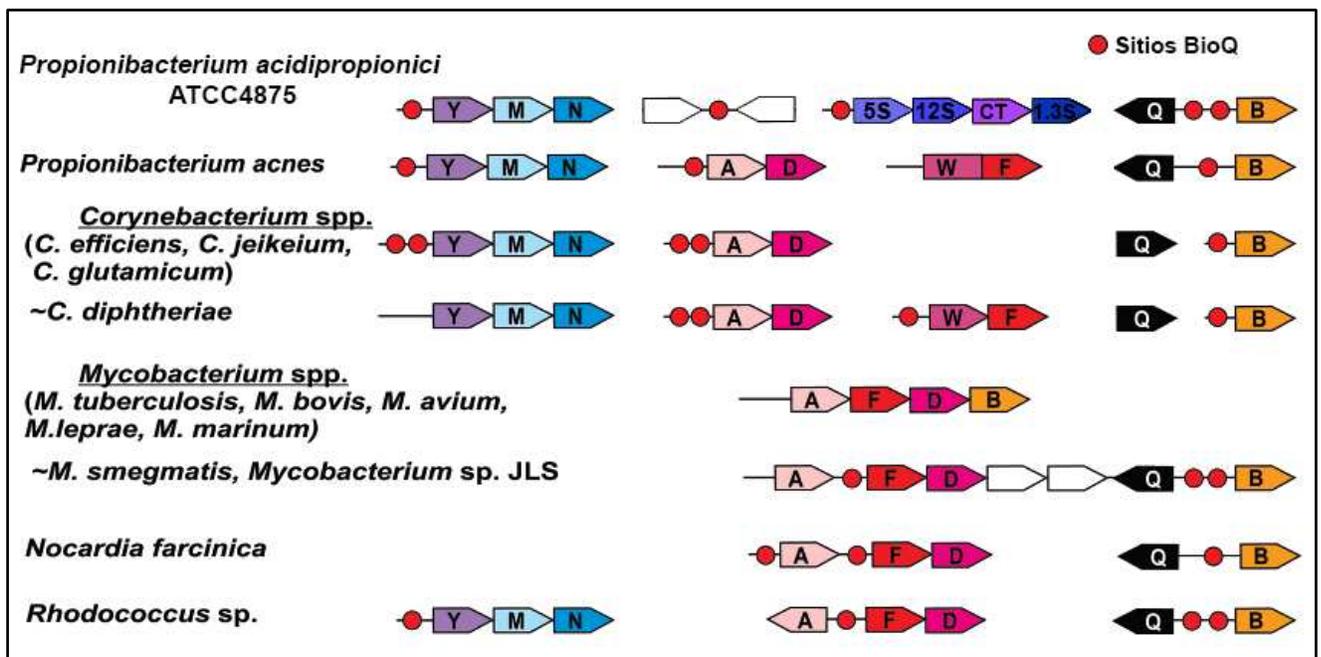


Figura 15 - Clusters envolvidos na síntese e transporte de biotina e a localização dos sítios de ligação de BioQ no genoma de diferentes espécies de bactérias. Em *P. acidipropionici* destaca-se a presença de um sítio de ligação do fator de transcrição BioQ no promotor do operon da enzima metil-malonil CoA carboxitransferase, composto por genes que codificam as subunidades que compõem esse complexo proteico (5S, 12S, 1.3S e região C-terminal – CT). Os demais genes presentes em *P. acidipropionici* e em outras bactérias e que apresentam um sítio de ligação de BioQ correspondem aos genes envolvidos na síntese e assimilação de biotina BioY (Y), BioM (M), BioN (N), BioQ(Q), BioB (B), BioA (A), BioW (W), BioF (F) e BioD (D). Figura adaptada de Rodionov, 2007

Tabela 7 – Genes encontrados no genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 que codificam proteínas que utilizam biotina como cofator em sua atividade enzimática.

Gene ID	Anotação no Genoma
Metil-malonil CoA Decarboxilase	
PACID_02160	<i>Carboxyl transferase</i>
PACID_02170	<i>OAD_gamma domain-containing protein</i>
PACID_02180	<i>Putative acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit</i>
PACID_02190	<i>Sodium ion-translocating decarboxylase, beta subunit</i>
Piruvato Carboxilase	
PACID_00400	<i>Pyruvate carboxylase</i>
Metil Malonil CoA Carboxitransferase	
PACID_07980	Biotin dependent transcarboxylase 12S subunit
PACID_07970	Methylmalonyl-CoA:Pyruvate transcarboxylase 5S subunit
PACID_07990	C-terminal of methylmalonyl-CoA carboxyltransferase
PACID_08000	Biotin dependent transcarboxylase 1.3S subunit
Propionil CoA carboxylase ou Acetil-CoA carboxilase	
PACID_24180	Carboxyl transferase domain-containing protein

Portanto, podemos inferir através dessa análise, que a biotina é provavelmente fundamental para o fenômeno da assimilação de CO₂ e para a expressão e funcionamento de uma das principais enzimas da via fermentativa de ácido propiônico. Tal dado reforça ainda mais o metabolismo de biotina como um importante candidato nos estudos de *P. acidipropionici* visando o aumento no rendimento da produção de ácido propiônico. Como aqui relatado, tal espécie não apresentaria no genoma os genes necessários para a síntese de biotina, possuindo um sistema de assimilação que deveria ser bastante eficiente para suprir a necessidade metabólica deste cofator. Os dados aqui obtidos servem como base para estudos futuros da importância da vitamina no metabolismo fermentativo e geral dessa bactéria.

4.2 Análise Global da Expressão de Genes em *P. acidipropionici*

O transcriptoma é uma importante ferramenta que nos permite ampliar a compreensão da estrutura gênica e da regulação a nível transcricional de diferentes grupos de organismos. São recentes os trabalhos que realizam o sequenciamento do transcriptoma completo em procariotos, uma vez que havia uma dificuldade no processo de enriquecimento das amostras com mRNA (cauda poli-A ausente) e não são encontrados íntrons e *splicing* alternativo em procariotos. Nesse contexto, uma vez estabelecido o genoma e tendo essa ferramenta disponível, a obtenção de dados transcriptômicos poderia nos fornecer uma grande quantidade de dados que ampliariam a compreensão e conhecimento dos mecanismos envolvidos no metabolismo e regulação gênica em *P. acidipropionici*.

Em experimentos fermentativos realizados com *P. acidipropionici* é observado diferentes padrões de crescimento bacteriano, assim como a produção diferencial de ácidos orgânicos (ácido propiônico, acético e succínico), o que remete a uma evidente plasticidade metabólica presente em propionibactérias. Visando compreender mais a fundo o metabolismo e a expressão gênica global em *P. acidipropionici*, foi estabelecida a análise do transcriptoma total de *P. acidipropionici* cultivada em diferentes de carbono: glicerol, glicose e o xarope de cana-de-açúcar. Adicionalmente, a análise do transcriptoma pode ainda nos fornecer dados importantes referentes ao metabolismo de CO₂, uma vez que já é reconhecido que esse fenômeno está presente em culturas cultivadas tendo glicerol como fonte única de carbono.

A análise foi realizada em quatro diferentes pontos da curva de crescimento de *P. acidipropionici* (fase *lag*, fase logarítmica inicial, fase logarítmica final e declínio) crescendo em biorreator em três diferentes fontes de carbono: glicose, glicerol e xarope de cana-de-açúcar. As curvas de crescimento obtidas estão evidenciadas na figura 16 e os perfis fermentativos obtidos estão expressos nas figuras 17 a 19.

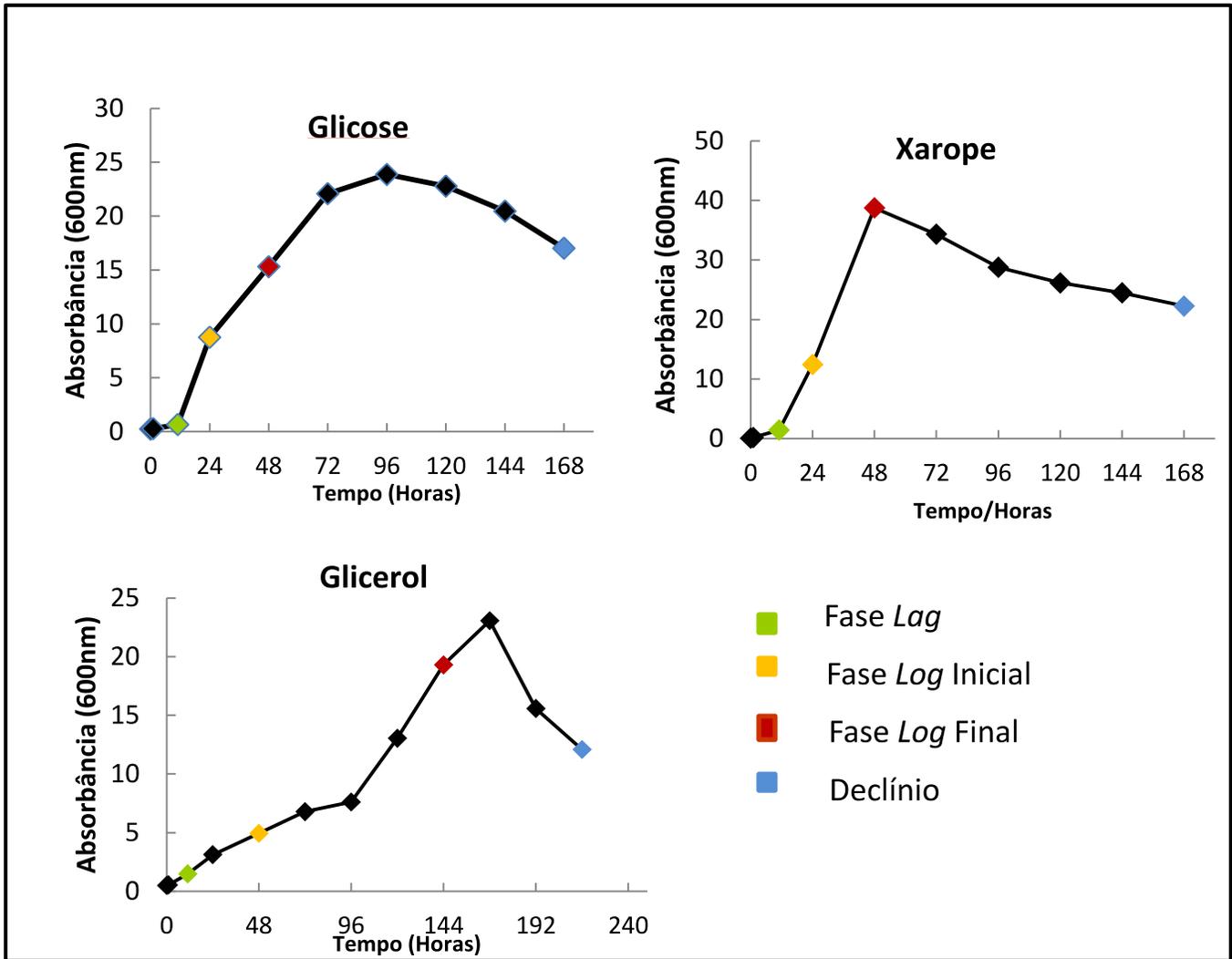


Figura 16 - Curva de crescimento de *P. acidipropionici* ATC4875 cultivada em meio de cultura padrão contendo diferentes fontes de carbono disponíveis: glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar. Os pontos coloridos referem-se as amostras retiradas para análise da expressão gênica.

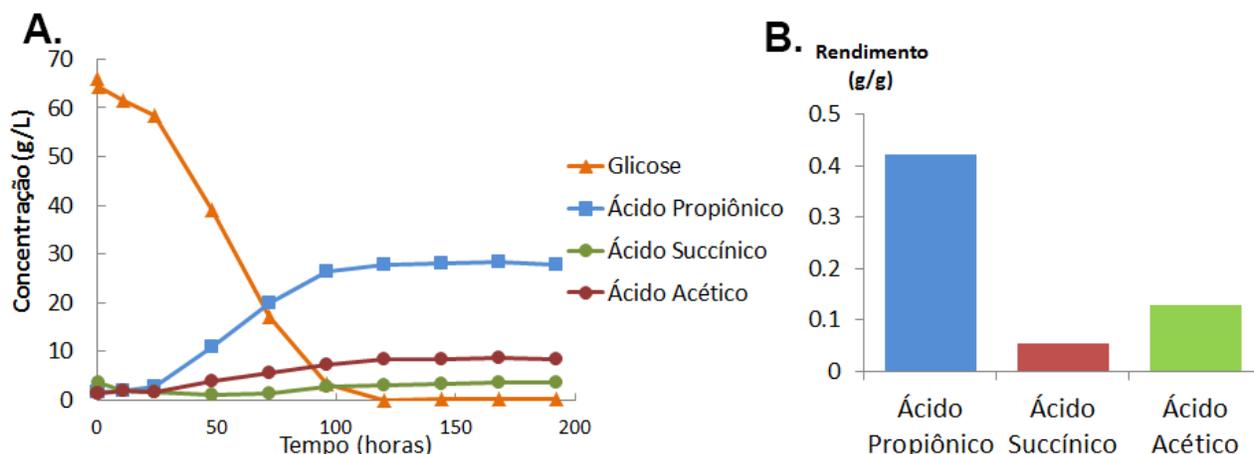


Figura 17- Perfil fermentativo obtido através da análise por HPLC de *P. acidipropionici* cultivada em anaerobiose utilizando **glicose** (60 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato e a formação dos produtos. **B.** Rendimento (grama de produto/grana de substrato consumido) dos ácidos orgânicos finais da fermentação.

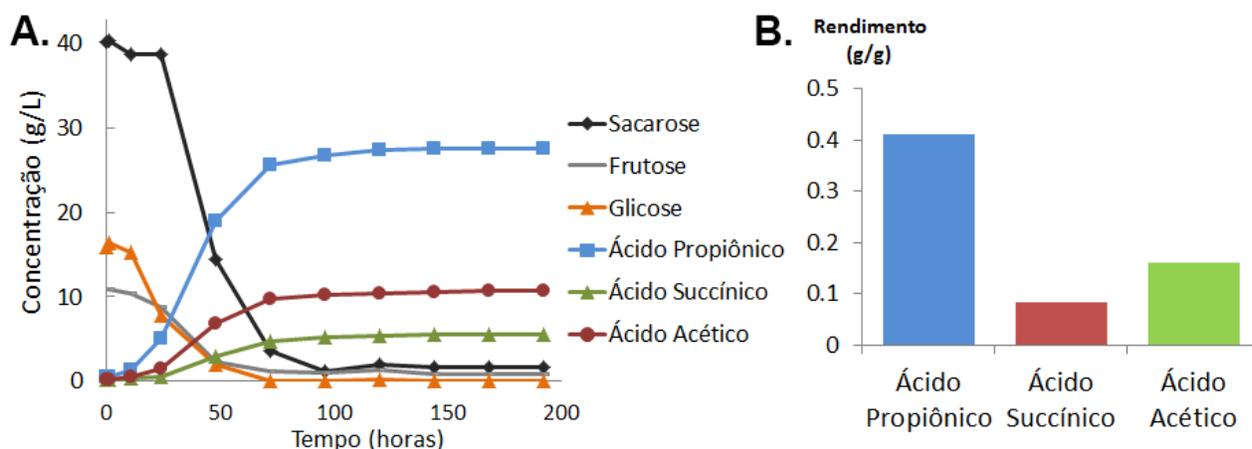


Figura 18 - Perfil fermentativo obtido através da análise por HPLC de *P. acidipropionici* cultivada em anaerobiose utilizando **xarope de cana-de-açúcar** (60 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato e a formação dos produtos. **B.** Rendimento (grama de produto/grana de substrato consumido) dos ácidos orgânicos finais da fermentação.

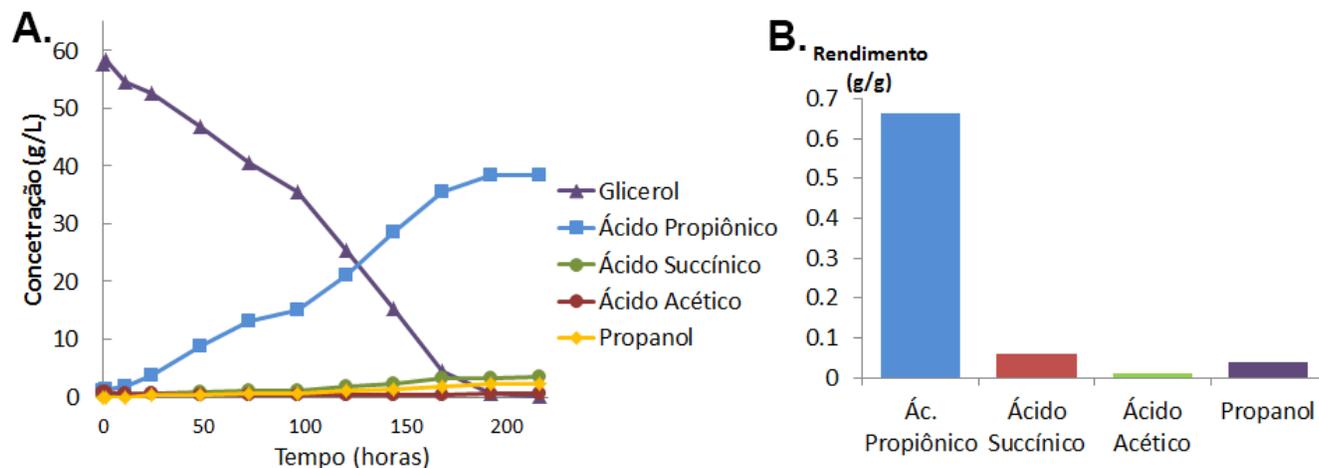


Figura 19- Perfil fermentativo obtido através da análise por HPLC de *P. acidipropionici* cultivada em anaerobiose utilizando **glicerol** (60 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato e a formação dos produtos. **B.** Rendimento (grama de produto/grana de substrato consumido) dos ácidos orgânicos finais da fermentação.

Os resultados obtidos nas fermentações estão de acordo com dados já relatados em estudos mais antigos e em outras fermentações já realizadas pelo nosso grupo de pesquisa. De fato é esperado um maior rendimento de ácido propiônico em glicerol quando comparado com as demais fontes de carbono. Observa-se também uma maior produção de ácido acético em glicose e xarope de cana-de-açúcar quando comparado com glicerol. Acredita-se que esse fenômeno esteja relacionado com o grau de redução da fonte de carbono e com a manutenção do balanço *redox* intracelular da bactéria (Barbirato, Chedaille, and Bories 1997). Em uma via fermentativa o grau de redução dos substratos deve equivaler ao grau de redução dos produtos, mantendo o estado oxi-redutivo da bactéria. Dessa forma, ao utilizar um substrato mais reduzido, a geração de cofatores reduzidos (como, por exemplo, o NADH) direciona o metabolismo da bactéria para a geração de um produto também com maior grau de redução. Nesse contexto, teoricamente, compostos mais reduzidos como o ácido propiônico seriam produzidos quando se tem o glicerol como fonte de carbono (grau de redução = 4,66), e produtos mais oxidados como o ácido acético seriam produzidos tendo glicose e sacarose como substratos (ambos com grau de redução de 4,0) (Barbirato and Bories 1997). O propanol, produzido somente em glicerol, é também um produto da via de *Wood-Werkman* e para sua formação é regenerada mais uma molécula de NAD^+ , sendo preferencial formado, portanto, também em fontes de carbono mais reduzidas.

4.2.1 Análise da expressão dos genes

Os dados de expressão gênica aqui apresentados e analisados em cada um dos pontos selecionados estão medidos através do seu *RPKM* (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*). Nesse contexto, o presente trabalho teve como principal foco a análise do perfil da expressão dos genes que potencialmente poderiam estar envolvidos com o metabolismo de CO_2 e com o perfil fermentativo de produção de ácidos obtidos nas fermentações de *P. acidipropionici* ATCC4875. É importante ressaltar que os dados aqui apresentados são dados prévios, sendo ainda necessária, a utilização de métodos que validem os mesmos.

4.2.2. Genes da via fermentativa do ácido acético/acetato.

Através da análise do genoma de *P. acidipropionici* ATCC4875 é proposto que o acetato é formado a partir de piruvato através de uma via composta pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDC) e a enzima acetil-CoA ligase (AcL) (Figura 20). O primeiro passo da síntese do acetato é realizado pela piruvato desidrogenase (PDC), um grande complexo enzimático, composto por três diferentes componentes denominados E1 (EC 1.2.4.1), E2 (EC 2.3.1.12) e E3 (EC 1.8.1.4) responsáveis pela decarboxilação do piruvato e pela formação de acetil-CoA (Tabela 8). O segundo passo é realizado pela enzima acetil-Coa ligase (AcL, PACID_02150), que tem como substrato o ADP, o fosfato e acetil-CoA e produto ATP, acetato e CoA (Figura 20).



Figura 20 – Via fermentativa de produção de ácido acético (acetato) em *Propionibacterium acidipropionici* ATCC4875. **PDC**: Complexo Piruvato Deidrogenase e **AcL**: Acetato Ligase

Tabela 8 - Genes preditos de *P. acidipropionici* ATCC 4875 correspondentes às enzimas presentes no complexo enzimático piruvato desidrogenase.

Gene ID	Anotação do Genoma
E1: Pyruvate Dehydrogenase	
PACID_15020	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component</i>
PACID_31120	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit</i>
PACID_21650	<i>Thiamine pyrophosphate enzyme</i>
PACID_31110	<i>Transketolase, pyridine binding domain-containing protein</i>
E2: Diidrolipoil transacetilase	
PACID_31300	<i>Biotin-requiring enzyme*</i>
E3: Diidrolipoil desidrogenase	
PACID_16890	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>

Através da análise dos dados de expressão não encontramos nenhuma alteração no número de transcritos de nenhuma das enzimas envolvidas no processo de síntese de acetato comparando as 12 bibliotecas analisadas (Figura 21). Curiosamente, há uma evidente diferença nas concentrações de acetato quando comparada as fermentações nas três diferentes fontes de carbono. É possível que as alterações observadas na produção de ácidos estejam relacionadas à alterações e regulações à nível proteico não passíveis de serem observadas através da análise de alterações transcricionais.

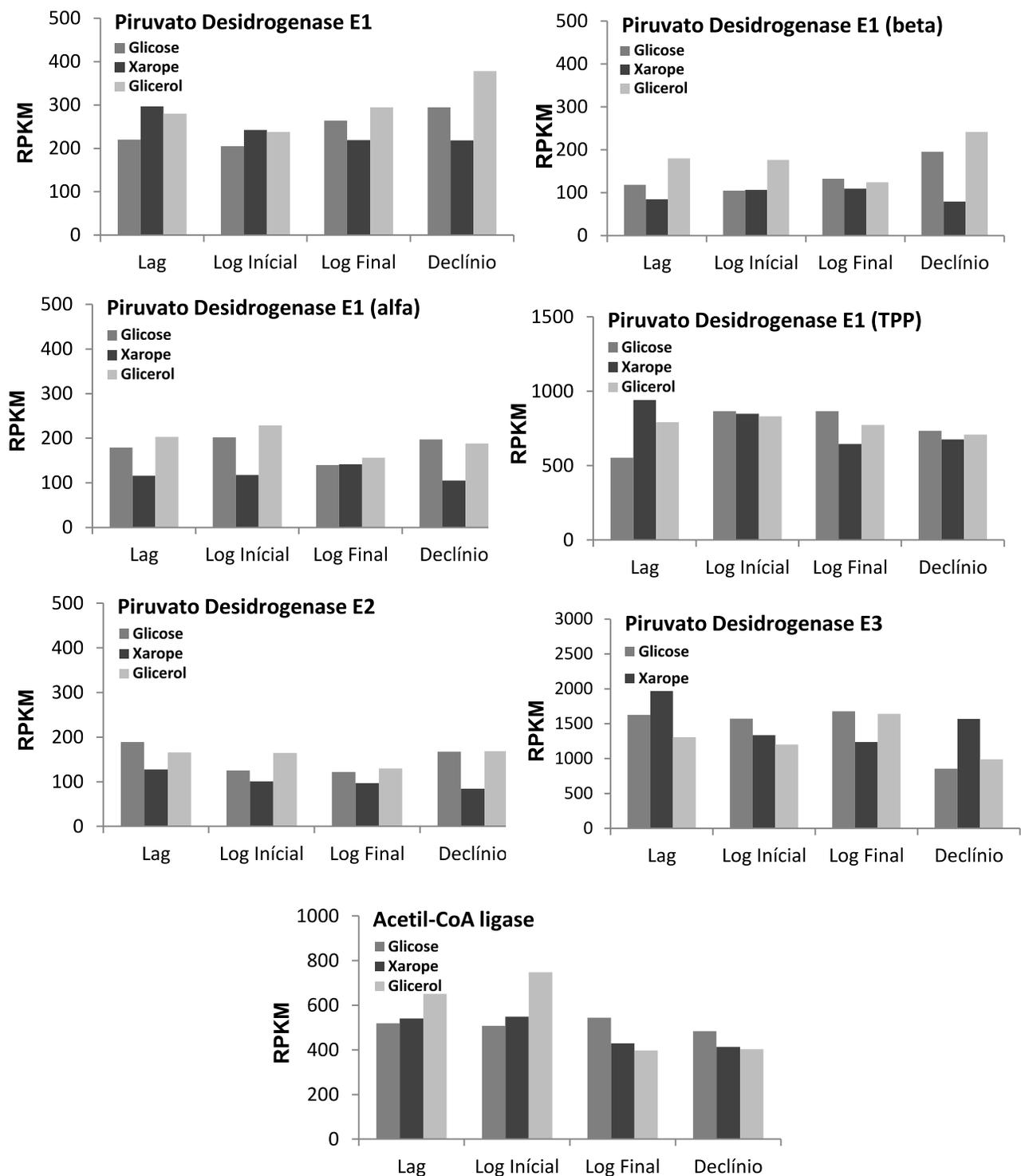


Figura 21 – Comparação da análise de expressão por RPKM (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*) de seqüências de RNA correspondentes a genes da **via fermentativa do ácido acético** de *P. acidipropionici* ATC4875 cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono em diferentes fases da curva de crescimento bacteriano (fase *lag*, fase *log* inicial, fase *log* final e fase declínio).

4.2.3 Genes da via de *Wood-Werkmann*

A via de produção de ácido propiônico é uma via cíclica composta por sete principais enzimas: metilmalonil-CoA carboxitransferase (MMC, EC:2.1.3.1, PACID_07970-08000), malato desidrogenase (EC:1.1.1.37, PACID_24560), fumarato hidratase (EC:4.2.1.2, PACID_33440), succinato desidrogenase (EC:1.3.99.1, PACID_21310-21330), propionil-CoA: succinato CoA-transferase (EC:2.8.3.-, PACID_06950), metilmalonil-CoA epimerase (EC:5.1.99.1, PACID_19260) e metilmalonil-CoA mutase (EC: 5.4.99.2, PACID_11200 e PACID_11210) (Figura 1). A partir da análise dos dados brutos de expressão (*RPKM*) observa-se que de maneira geral as principais enzimas envolvidas na produção de ácido propiônico não apresentam alterações transcricionais evidentes nas condições analisadas (Figura 22 e 23). No entanto, duas enzimas da via chamam atenção quanto ao seu padrão de expressão: o complexo enzimático da metilmalonil-CoA carboxitransferase (figura 22) e a metil-malonil-CoA mutase (Figura 23).

Através da análise do resultado obtido, observa-se que a MMC apresenta em glicerol um número maior de transcritos quando comparado às outras fontes de carbono, sendo essa diferença mais visível quando comparamos o início da fase logarítmica de crescimento (fase log inicial). Sabendo que a produção de ácido propiônico é maior quando *P. acidipropionici* é cultivado em glicerol podemos propor que, do ponto de vista transcricional, uma maior expressão da MMC pode estar associada ao aumento na produção deste ácido nessas condições.

A. Metilmalonil CoA Carboxitransferase



B.

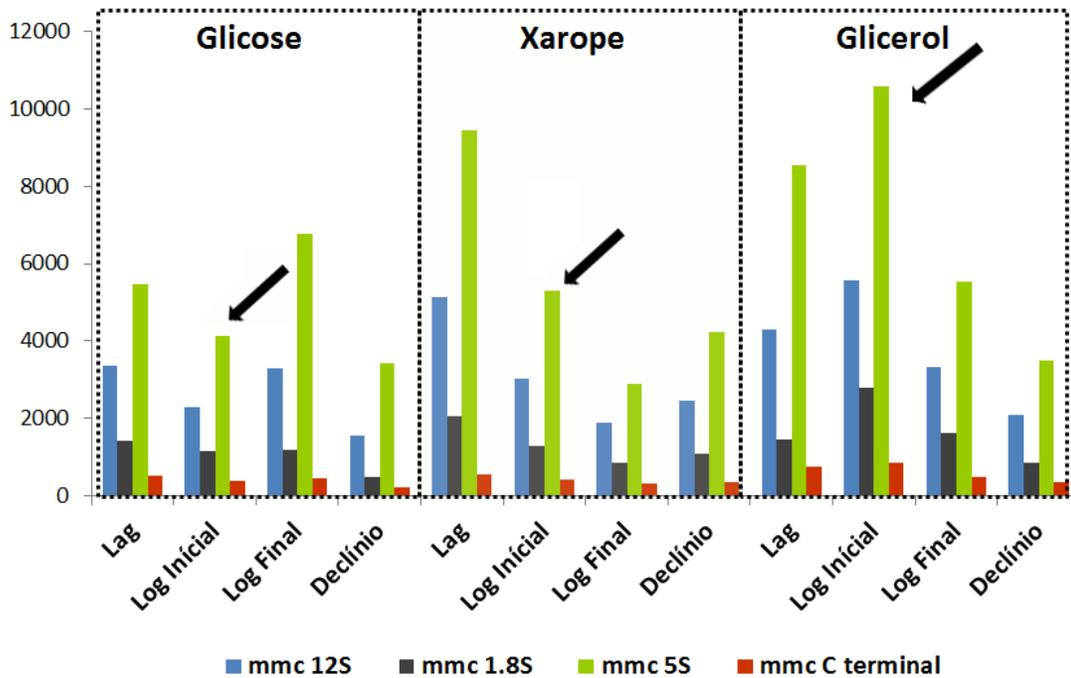


Figura 22 – A. Disposição do *operon* do complexo enzimático metilmalonil-CoA carboxitransferase em *P. acidipropionici* (ATCC4875) contendo os genes que codificam suas 4 subunidades (12S, 18S, 5S e região C-terminal (c Term) . B. Valor bruto da expressão dos transcritos do *operon* em RPKM nas diferentes fases de crescimento selecionadas (*lag*, *log* inicial, *log* final e declínio) e nas três fontes de carbono estudadas (glicose, xarope de cana-de-açúcar e glicerol). As setas indicam o ponto referente à fase *log* inicial das três fermentações realizadas, etapa que aparentemente ocorre uma diferença na expressão dos genes constituintes do *operon* quando comparada o cultivo em diferentes fontes de carbono.

Em menor grau, a enzima metilmalonil-CoA mutase (MCM, EC:5.4.99.2) também poderia estar associada a essa diferença de produção final de ácidos encontrada uma vez que aparentemente está mais expressa em todos os pontos em glicerol quando comparada à glicose ou xarope (Figura 23). Tal enzima é responsável pela reação de isomerização da succinil-CoA para metilmalonil-CoA durante a síntese de ácido propiônico e, ao contrário da MMC, atua no fim da via de produção de ácido propiônico (Parizzi et al. 2012).

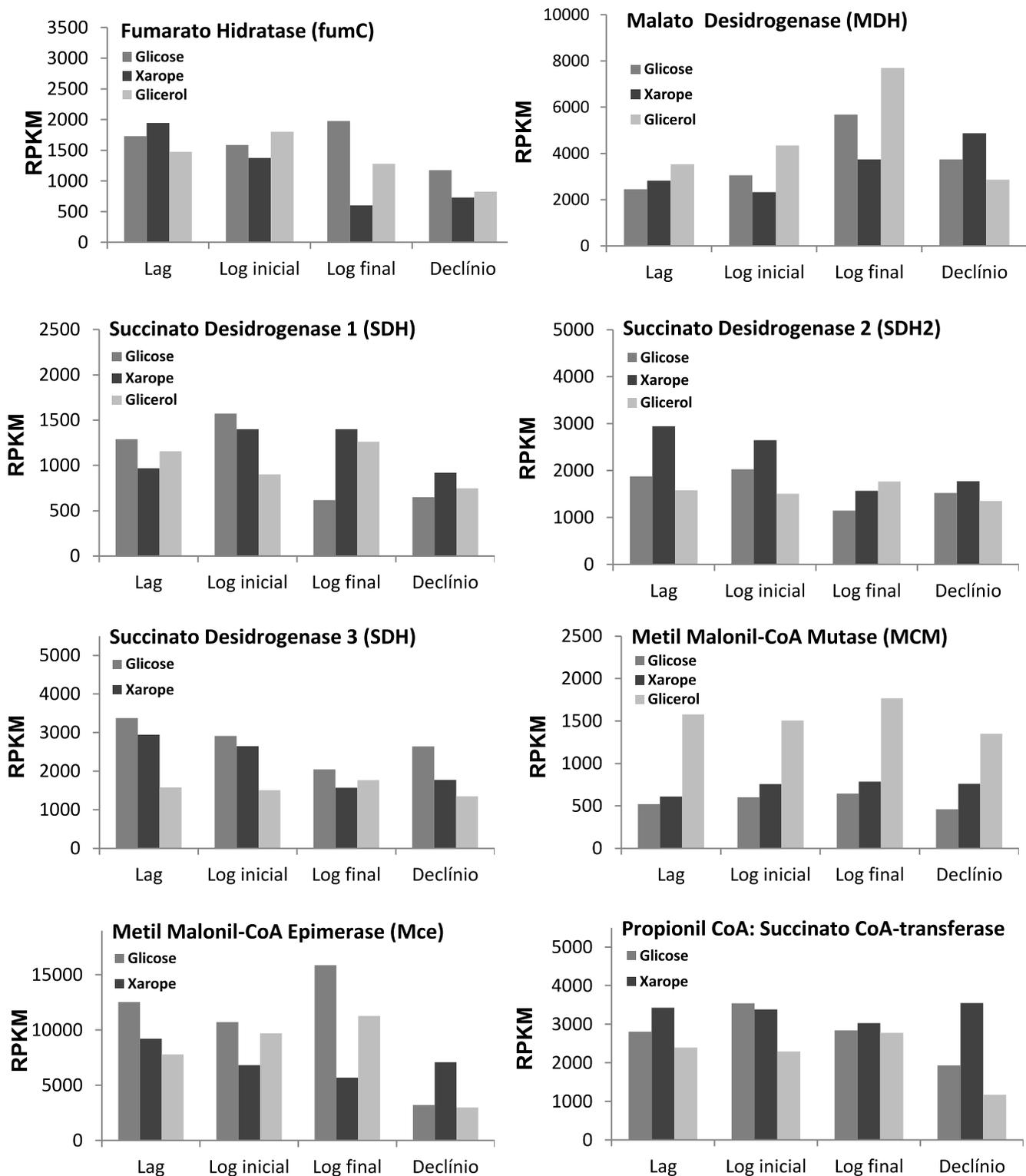


Figura 23 – Comparação da expressão bruta em RPKM de seqüências correspondentes a genes da via fermentativa do ácido propiônico (Via de Wood-Werkman) de *P. acidipropionici* ATC4875 cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono em diferentes fases da curva de crescimento (fase lag, fase log inicial, fase log final e fase declínio).

4.2.4 Piruvato carboxilase e potenciais vias relacionadas

Apesar das sequências correspondentes à MMC e MCM apresentarem um perfil que indicaria uma diferença de expressão, o gene que apresentou a diferença de expressão mais notável entre as diferentes fontes de carbono foi a piruvato carboxilase (*pc*) (Figura 24). Nas culturas cultivadas em glicerol, encontramos em todos os pontos da sua curva de crescimento uma elevada expressão da PC quando comparada às culturas cultivadas em glicose ou xarope, chegando a apresentar dez vezes mais transcritos em glicerol quando comparadas às demais fontes. Tais dados suportam os resultados obtidos com bibliotecas de proteômica em que, nas mesmas condições, encontramos uma sequência correspondente a essa enzima somente em glicerol (dados não publicados). Possivelmente, essa enzima não foi identificada nas bibliotecas de proteoma de glicose e xarope de cana-de-açúcar devido a sua baixa expressão (valores muito baixos de *RPKM*).

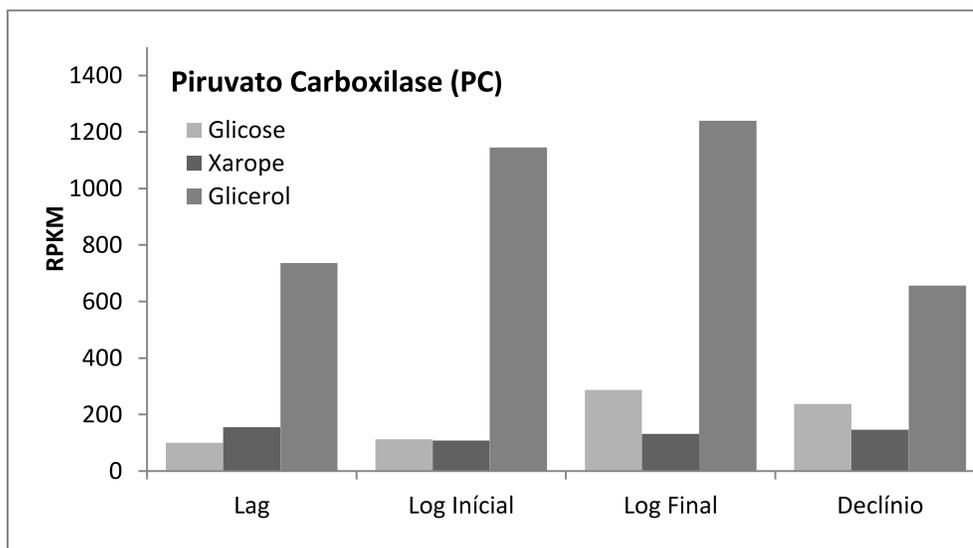


Figura 24 – Comparação da expressão bruta em *RPKM* da sequência correspondente à enzima piruvato carboxilase (PACID_00400) de *P. acidipropionici* ATC4875 cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte única de carbono em diferentes fases da sua curva de crescimento.

Pouco se sabe sobre os fatores que poderiam influenciar a expressão da piruvato carboxilase em microrganismos. Dos poucos estudos que exploram as condições que influenciariam sua expressão destacam-se principalmente o tipo de fonte de carbono utilizado (Brewster et al. 1994; Han, Inui, and Yukawa 2007). Sabe-se que em bactérias gram-positivas o aumento da expressão da piruvato carboxilase pode ocorrer quando se tem piruvato como fonte única de carbono. Acredita-se que esse evento ocorra pelo fato do piruvato ser uma fonte de carbono gliconeogênica, que corresponderiam às fontes de carbono que deslocariam o fluxo de carbono para a via da gliconeogênese. Outras fontes de carbono são também consideradas gliconeogênicas como, por exemplo, o acetato, alguns grupos de aminoácido e o próprio glicerol. Entretanto, a relação da diferença de expressão da piruvato carboxilase utilizando glicerol como fonte de carbono ainda não foi reportada.

Quando observamos a expressão dos genes envolvidos na gliconeogênese nos dados obtidos no presente trabalho, não encontramos alterações nos genes envolvidos diretamente com essa via e com os genes compartilhados com a glicólise (Figura 25). É importante ressaltar que não encontramos no genoma de *P. acidipropionici* a sequência correspondente à enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK ou PEPCK, EC: 4.1.1.32). Essa é uma importante enzima do início da via da gliconeogênese que converte oxaloacetato em fosfoenolpiruvato. Como não há indícios de uma sequência correspondente à essa enzima no genoma de *P. acidipropionici* é possível que a diferença de expressão encontrada na PC não esteja relacionada com o aumento da disponibilidade de oxaloacetato para a via da gliconeogênese, uma vez que essa molécula não seria convertida facilmente em fosfoenolpiruvato. Os mesmos estudos que indicam que, ao contrário das fontes gliconeogênicas, culturas em glicose teriam uma expressão maior de genes envolvidos na glicólise (Han, Inui, and Yukawa 2007). Entretanto, esse fenômeno também não é claro em nossos dados de *RNAseq* (Figura 25 e 26). Os únicos genes envolvidos em ambas as vias que de fato demonstram um perfil de diferença de expressão entre as fontes em estudo são os genes envolvidos na degradação de glicerol, onde encontramos, como esperado, uma maior expressão dos mesmos nessa fonte de carbono (Figura 26).

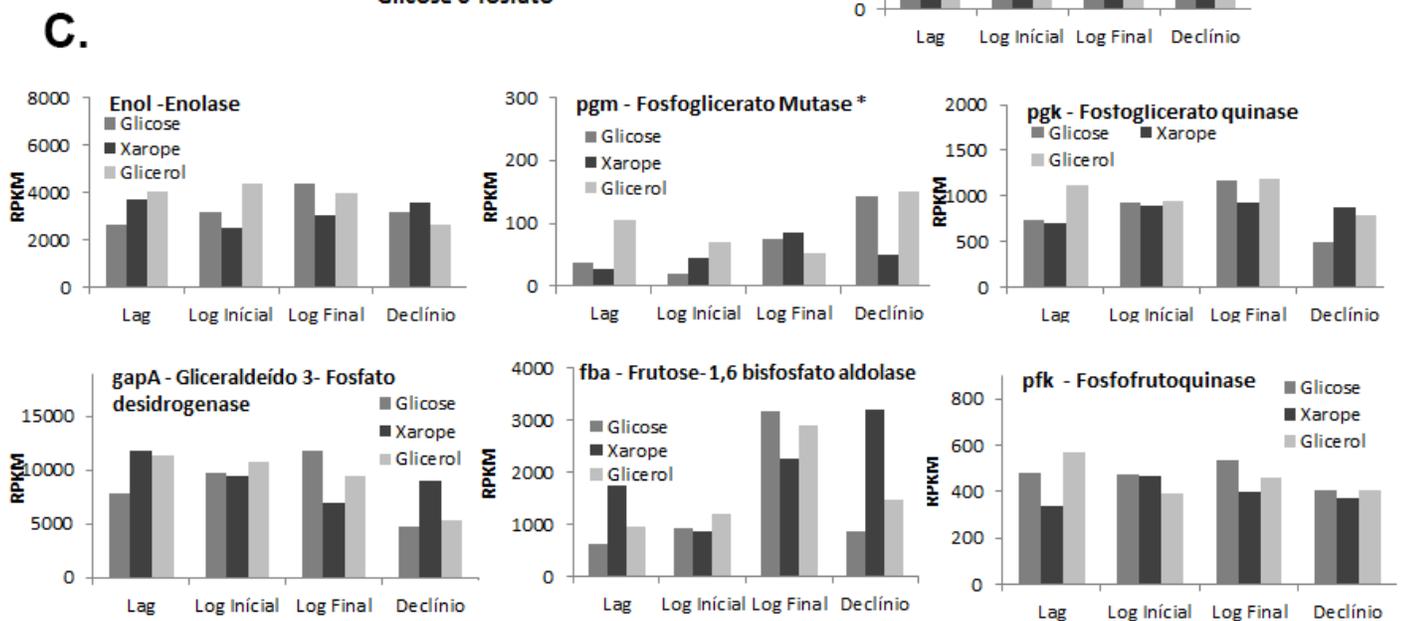
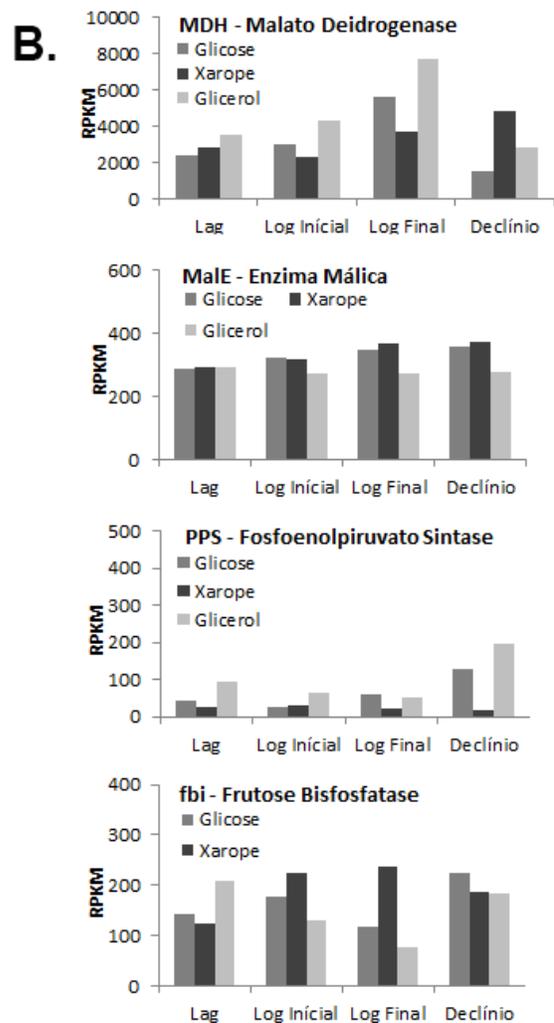
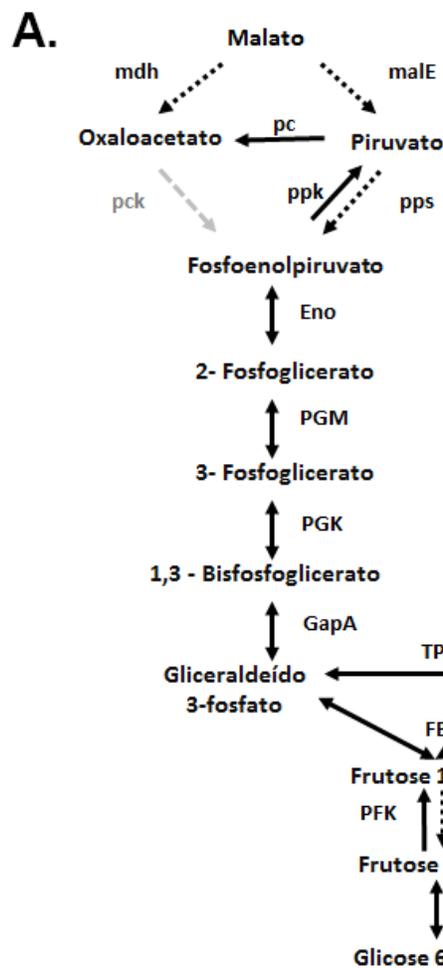


Figura 25. Comparação da expressão bruta em RPKM de seqüências correspondentes a genes da via de gliconeogênese e glicólise de *P. acidipropionici* ATC4875 cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte única de carbono em diferentes fases da sua curva de crescimento. **A.** Vias correspondentes à gliconeogênese (linhas pontilhadas e linhas não pontilhadas bidirecionais) e glicólise (somente as linhas não pontilhadas). **B.** Expressão em RPKM dos genes diretamente envolvidos na gliconeogênese. **C.** Expressão em RPKM dos genes pertencentes à glicólise e a gliconeogênese.

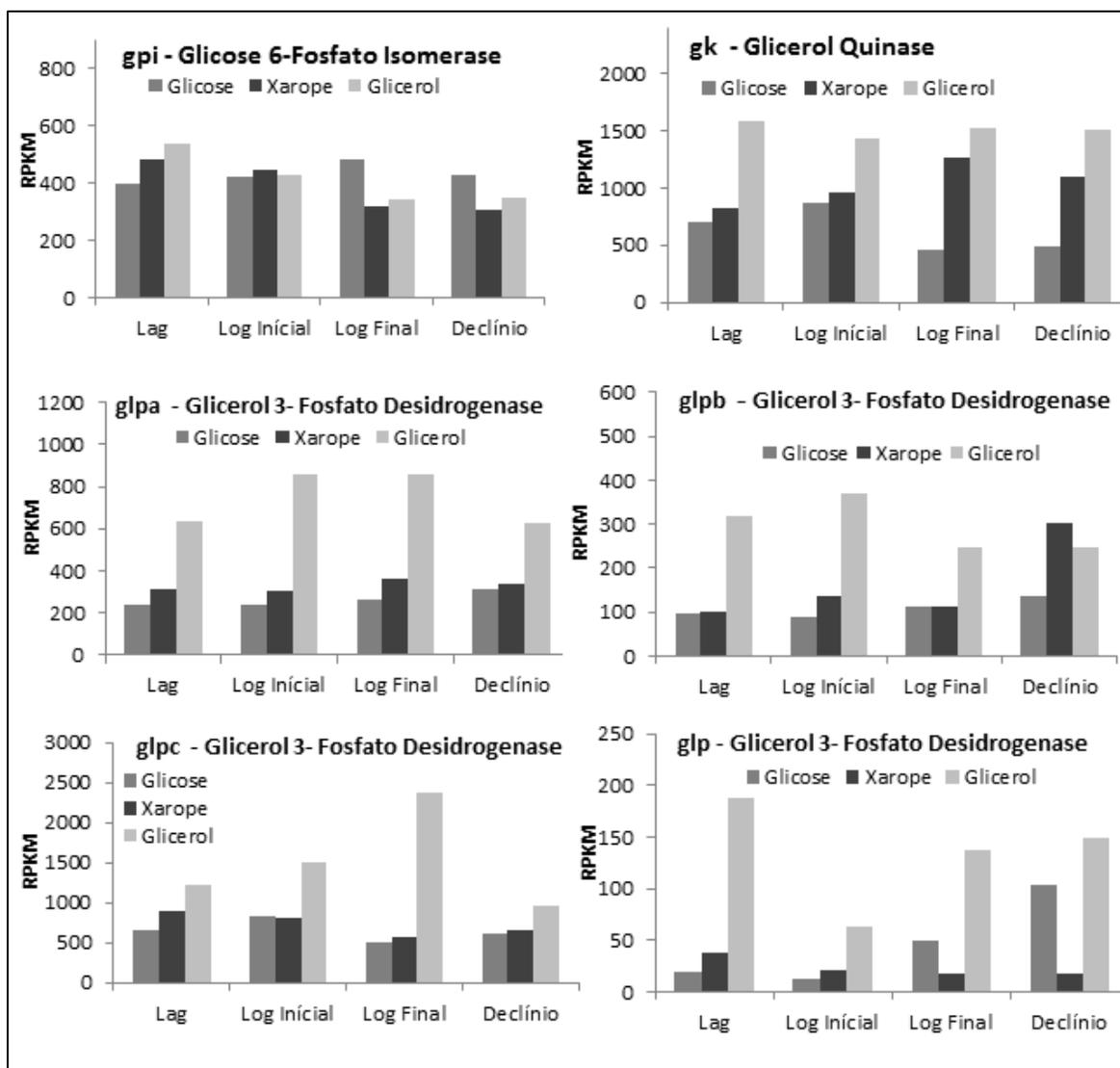


Figura 26 - Comparação da expressão bruta em RPKM de seqüências correspondentes a genes da via da glicólise (glicerol-6-fosfato isomerase / *gi*) e da via de degradação de glicerol (glicerol quinase/ *gk* e glicerol 3-fosfato desidrogenase/*glpa*, *glpb*, *glpc* e *glp*) e de *P. acidipropionici* ATC4875 cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte única de carbono em diferentes fases da sua curva de crescimento.

Outro fenômeno que a alta expressão da piruvato carboxilase poderia estar associada é o aumento no requerimento da síntese de aminoácidos, uma vez que o oxaloacetato é precursor da lisina, asparagina, metionina, treonina, metionina e isoleucina. Entretanto, ao analisar os genes envolvidos na síntese de todos esses aminoácidos também não apresentam alterações claras nos perfis de expressão quando comparados as diferentes fontes de carbono. Alguns dos genes analisados estão evidenciados na figura 27.

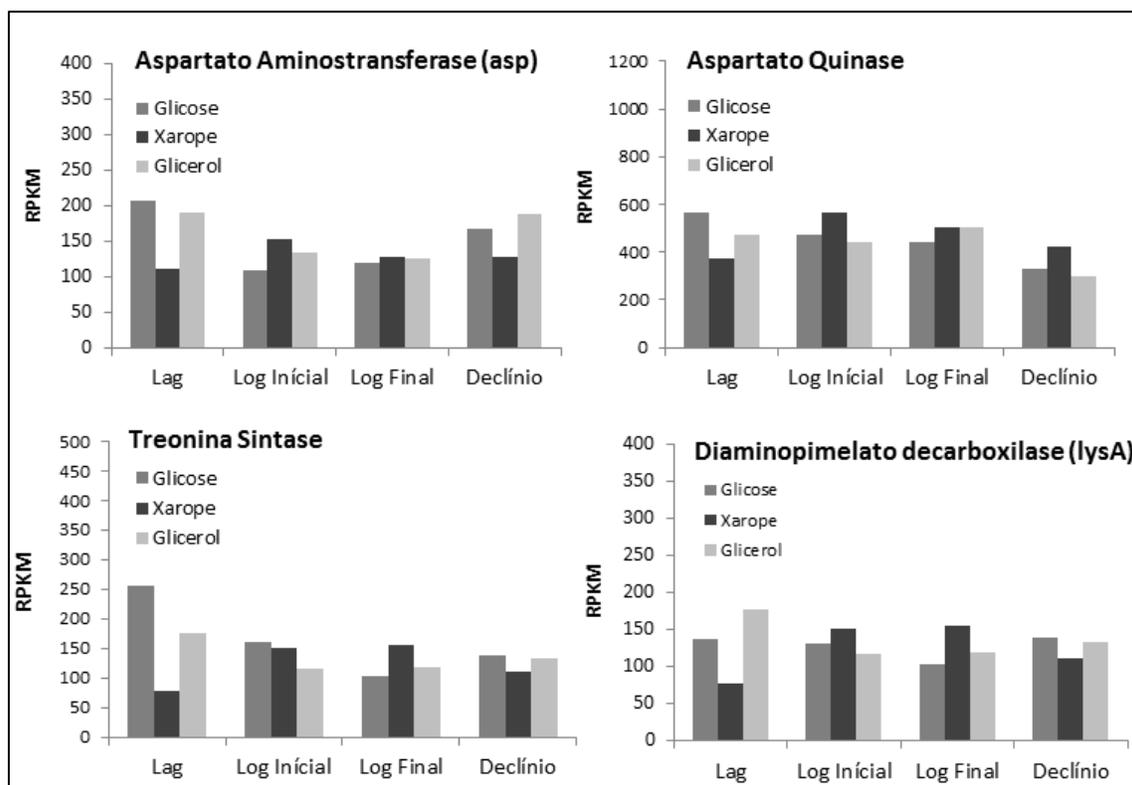


Figura 27 – Comparação da expressão bruta em RPKM de sequências correspondentes a genes de vias de **síntese de aminoácidos** que apresentam oxaloacetato como precursor em *P. acidipropionici* ATC4875 cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono em diferentes fases da sua curva de crescimento.

É difícil inferir sobre a expressão de genes e a consequência da mesma sobre o fluxo de carbono gerado nessas condições, principalmente pelo fato das vias e genes aqui destacadas apresentarem, além de uma regulação genética, regulações pós transcricionais, como, por exemplo, por inibição por *feedback* (Han, Inui, and Yukawa 2007). Entretanto, podemos sugerir aqui que, do ponto de vista transcricional a expressão da piruvato carboxilase parece de fato estar associada ao aumento da disponibilidade de oxaloacetato para a produção de ácido propiônico. Como consequência, esse aumento de fluxo poderia estar associado à maior produção de ácido propiônico quando a bactéria é cultivada em glicerol como fonte de carbono. É importante destacar também que, como considerada o nosso maior alvo no estudo de assimilação de CO₂ a expressão dessa enzima com altos valores de *RPKM* indica que é possível que essa enzima esteja de fato envolvida com esse fenômeno em *P. acidipropionici*, principalmente em glicerol, fonte já destacada e relacionada à ocorrência do fenômeno (H G Wood and Werkman 1936; Parizzi et al. 2012). Adicionalmente, a enzima correspondente à propionil-CoA carboxilase (ou acetil-CoA carboxilase), indicada aqui como uma possível carboxilase também presente na via de *Wood-Werkman* apresenta-se expressa em todas as bibliotecas, apesar de apresentar um valor de *RPKM* baixo e pouca variação de expressão quando comparado à piruvato carboxilase (Figura 28), de modo que não podemos inferir nada sobre sua relação com o aumento da produção de ácido propiônico em glicerol do ponto de vista transcricional.

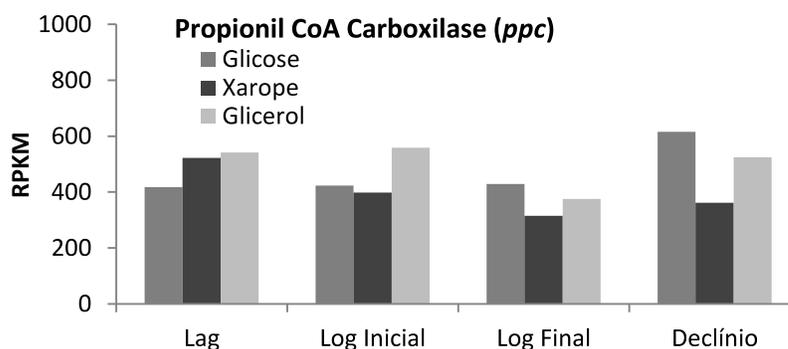


Figura 28 – Comparação da expressão bruta em *RPKM* da sequência correspondente à PACID_24180 em *P. acidipropionici* ATCC4975 cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono em diferentes fases da sua curva de crescimento. A sequência corresponde a uma carboxilase dependente de biotina que apresenta similaridade com genes codificantes da enzima propionil-CoA carboxilase e da enzima acetil-CoA carboxilase de outras bactérias.

4.2.5 Genes do metabolismo de biotina

Os perfis de expressão encontrados para genes envolvidos no metabolismo de biotina estão representados nas figuras 29 e 30. Como podemos observar, existe um padrão de expressão semelhante em todas as bibliotecas analisadas para o gene único gene remanescente da vida de síntese de biotina (*bioB*, biotina sintase) e os genes de envolvidos na assimilação de biotina extracelular (*operon* BioYMN). Observa-se uma evidente diferença de expressão na fase logarítmica quando comparamos as culturas crescidas em glicérol e glicose comparadas com xarope de cana-de-açúcar, que apresenta valores de *RPKM* relativamente baixos. Ademais, comparando glicose e glicérol, observamos ainda que existe ainda uma expressão maior dos genes em glicérol, principalmente na fase logarítmica (*log inicial* e *log final*).

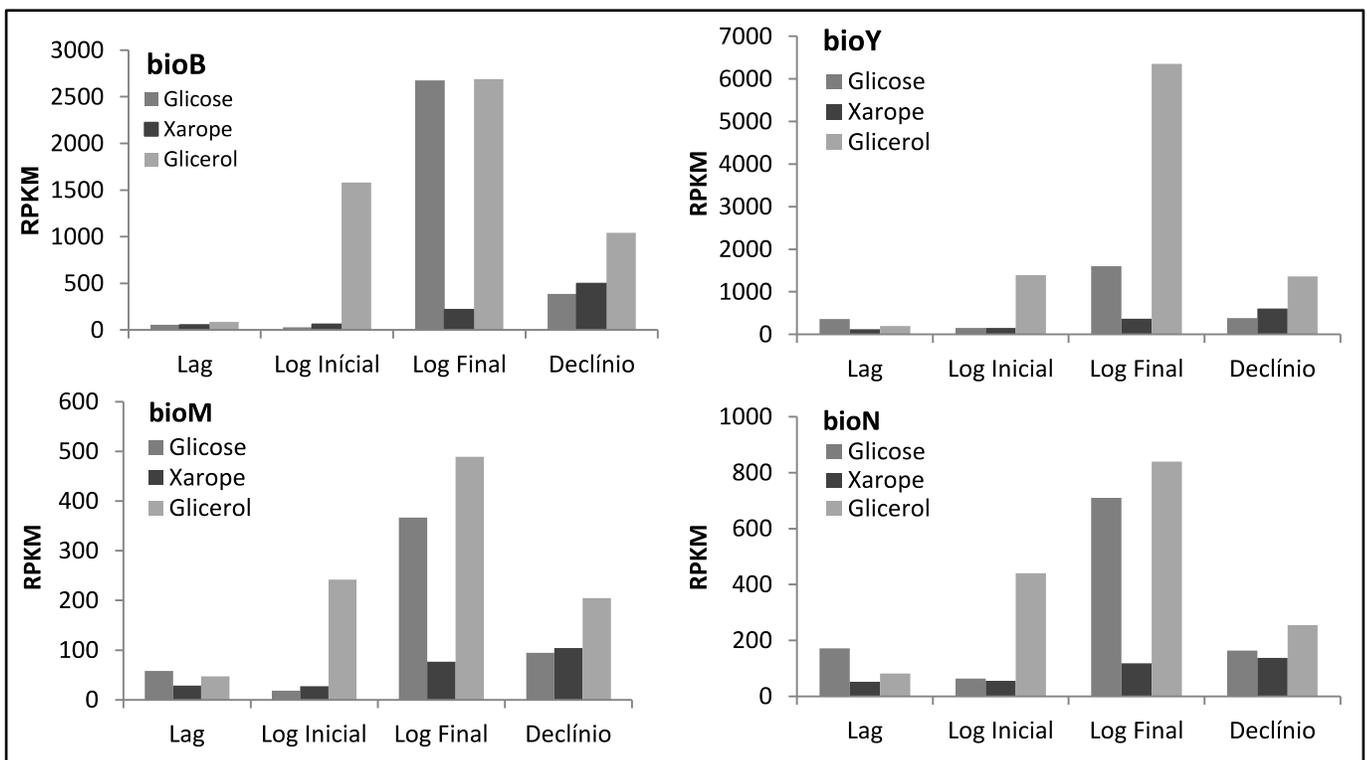


Figura 29 - Comparação da expressão bruta em *RPKM* das sequências correspondentes à síntese de biotina (*BioB*, biotina ligase) e aos genes envolvidos na assimilação e transporte de biotina (*BioY*, *BioM* e *BioN*) em *P. acidipropionici* cultivada em glicose, glicérol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono em diferentes fases da sua curva de crescimento.

A diferença de expressão encontrada em glicerol e glicose poderia estar relacionada a uma possível demanda por biotina durante as fermentações. Essa hipótese se dá principalmente por apresentar valores maiores de expressão ao fim da fase de crescimento indicando um possível esgotamento dessa vitamina em um momento em que as células ainda estão crescendo. A única fonte de vitamina do meio de cultura utilizado para as culturas contendo glicerol e glicose (Materiais e Métodos, seção 3.1) é o extrato de levedura. Segundo o fornecedor (*HIMEDIA*) haveria uma concentração final de biotina próxima a 5µg/L.

Em leveduras (auxotrófica para biotina), por exemplo, é estabelecido que a taxa de crescimento máxima e de saturação de efeitos de biotina se dá em 3–4 µg/L de biotina (Alfenore et al. 2002), o que nos sugeriria que o meio de cultura é suficientemente rico em biotina. Entretanto, ainda não se sabe a concentração ideal de biotina para o crescimento de *P. acidipropionici* e, como o meio de cultura, é autoclavado e a biotina é uma vitamina que degrada em altas temperaturas, é difícil prever o quanto de biotina há disponível.

Todavia, os resultados de expressão em xarope de cana-de-açúcar reforçam que a variação de expressão observada deve estar relacionada a uma demanda por biotina para o metabolismo da bactéria. O xarope de cana-de-açúcar é um meio rico em nutrientes, entre eles a biotina e outras vitaminas do chamado complexo B (Jackson and Macek 1944). Como o meio de cultura utilizado contém xarope e extrato de levedura, podemos inferir que há concentrações elevadas de biotina disponíveis. Através da análise da expressão dos genes de síntese e assimilação de biotina nas bibliotecas referentes a xarope observamos que a expressão se mantém baixa em toda a curva de crescimento. Esse comportamento deve provavelmente relacionado ao fato de não haver uma necessidade do aumento da expressão de genes envolvidos na obtenção externa dessa vitamina quando *P. acidipropionici* é cultivada em xarope de cana-de-açúcar, uma vez que esse ambiente já forneceria quantidades suficientes de biotina para o seu metabolismo.

Considerando a existência de uma demanda por biotina em glicerol e glicose, a expressão maior dos genes em glicerol pode ser justificada pela maior expressão dos genes dependentes de biotina, como é o caso da metil malonil-CoA carboxilase (MMC, Figura 22) e da piruvato carboxilase (PC, Figura 24), também visualizada quando comparamos as duas fontes de carbono.

Outros genes envolvidos com o metabolismo de biotina e também encontrados em todas as bibliotecas são a *birA* e o regulador transcricional *bioQ*. Ambos apresentam valores de *RPKM* baixos e variações nos níveis de expressão não relevantes (Figura 30). Entretanto, é interessante observar um padrão semelhante na expressão do *bioQ* quando comparado com o *bioB* e o operon *bioYMN*. De fato, como discutido na seção 4.1.2 deste trabalho encontramos sítios de reconhecimento do BioQ *upstream* a todos esses genes destacados e os dados de expressão fortalecem o pressuposto de que os mesmos são co-regulados transcricionalmente (Figura 15). O único gene envolvido no metabolismo de biotina que não apresentou padrão semelhante (apesar de apresentar um perfil de expressão maior em glicerol) foi a *MMC* (Figura 22). Propomos aqui que provavelmente essa importante enzima da via de produção de ácido propiônico deve ser regulada transcricionalmente também por outros fatores transcricionais.

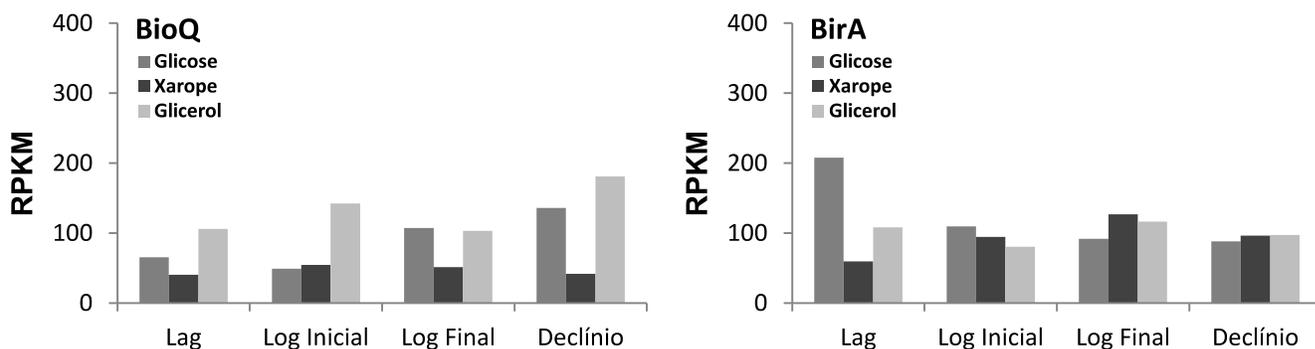


Figura 30 – Comparação da expressão bruta em *RPKM* dos genes *BioQ* e *BirA* em *P. acidipropionici* cultivada em glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono em diferentes fases da sua curva de crescimento.

4.3 Construção de plasmídeo para superexpressão da enzima piruvato carboxilase

Um dos objetivos iniciais desse projeto foi a obtenção de uma linhagem de propionibactéria superexpressando o gene codificante da enzima piruvato carboxilase (PACID_00400). Com base nos resultados discutidos anteriormente, nos quais observamos que nas condições em que a piruvato carboxilase está mais expressa há uma maior produção de ácido propiônico (Seção 4.2.3), uma linhagem contendo uma elevada expressão dessa enzima poderia nos dar indícios do quanto ela pode influenciar a produção fermentativa de ácido propiônico.

Apesar de reconhecida a dificuldade em se obter linhagens geneticamente modificadas de bactérias do gênero *Propionibacterium*, integrantes do nosso grupo de pesquisa conseguiram com sucesso obter algumas linhagens transformadas de *P. freudenreichii*. Nesse contexto, foi proposta a utilização dos métodos de construção de plasmídeo e transformação de *P. acidipropionici* de maneira semelhante à realizada nas tentativas em que se obtiveram êxito. Nesse contexto, optamos por construir o cassete de superexpressão através da técnica de *Double-Joint PCR* (Yu et al. 2004), e inseri-lo no plasmídeo pJOE826. O *Double-Joint PCR* consiste em um método em que é possível fusionar diferentes sequências de DNA com regiões de homologia em apenas três reações de PCR. Desse modo, é possível montar um cassete de expressão contendo um promotor, um terminador e um gene de interesse de maneira rápida. Os três fragmentos a serem fusionados (promotor e terminador da MMC e a sequência correspondente à piruvato carboxilase) foram amplificados em reações de PCR padronizadas para o presente trabalho. Os fragmentos gerados e seus respectivos tamanhos estão indicados na figura 31.

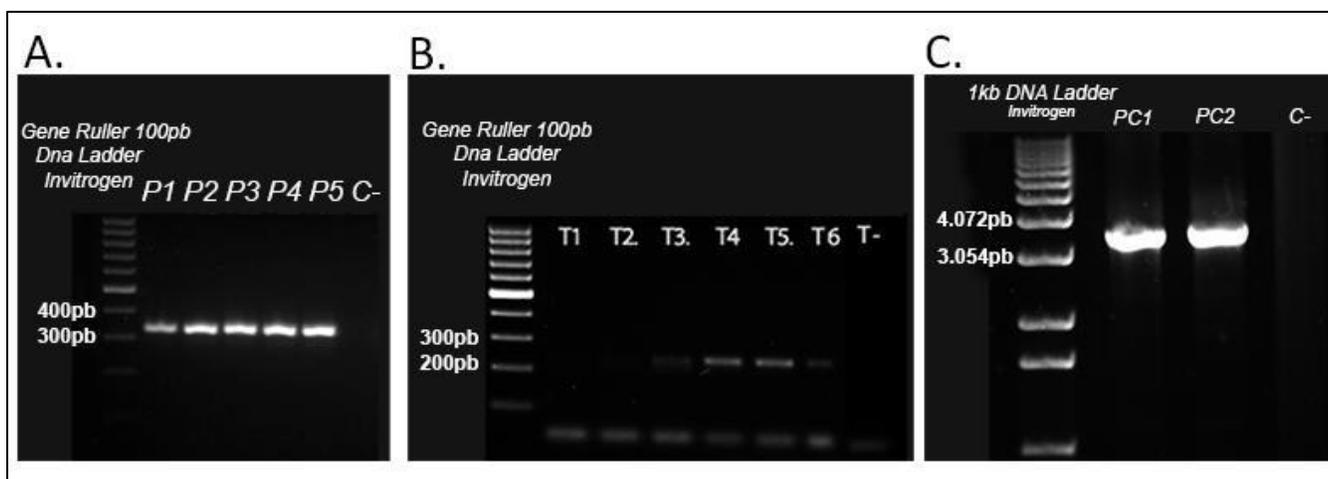


Figura 31 – Amplificação por *PCR* dos fragmentos utilizados na construção do cassete de superexpressão da piruvato carboxilase. **A.** Promotor do *operon* da Metilmalonil-CoA Carboxitransferase. P1-P5, amplificações do promotor em diferentes temperaturas de anelamento (58°C-63°C). “C-”: amplificação controle. **B.** Terminador do *operon* da Metilmalonil-CoA Carboxitransferase. T1-T6, amplificações do terminador em diferentes temperaturas de anelamento (58°C-63°C). “T-”: amplificação controle. **C. Piruvato Carboxilase.** Amplificação correspondente a sequencia do gene da piruvato carboxilase (PC1 e PC2) e controle negativo (C-).

Os fragmentos correspondentes a cada uma das partes do cassete de superexpressão foram amplificados com sucesso, no entanto, mesmo após várias tentativas, não foi possível juntar os fragmentos pelo método do *Double-Joint PCR*. Em vista disso, passamos a adotar outra estratégia para a junção dos fragmentos, o método descrito por Gibson e colaboradores (2009), conhecido como *Gibson Assembly*. Nesse método, há a união de fragmentos de DNA em apenas uma reação isotérmica, contendo uma *T5 exonuclease*, uma DNA polimerase termoestável e uma DNA ligase termoestável, desde que esses fragmentos a serem ligados possuam pelo menos de 20 a 40 bases de homologia entre si. Entretanto, novamente obtivemos resultados negativos onde não obtivemos a junção do promotor, gene e terminador.

A dificuldade na junção dos fragmentos provavelmente está relacionada ao elevado conteúdo G-C (68,8%) presente no DNA de *P. acidipropionici* (Parizzi et al. 2012). A sequência correspondente à piruvato carboxilase é uma sequência relativamente grande (próximo a 4000 pares de base) e com alto conteúdo G-C, logo é possível que durante as reações de junção ocorra a formação de estruturas secundárias complexas ou que ocorra uma resistência nas etapas de desnaturação, o que impede o anelamento dos oligonucleotídeos. (Kennedy and Nick 2011). Outros métodos mais simples poderiam ser testados para a obtenção e utilização do

plasmídeo desejado, entretanto, devido ao pouco tempo disponível para a realização da dissertação de mestrado e das possíveis dificuldades recorrentemente encontradas no momento da transformação de plasmídeos em propionibactérias, optou-se por deslocar a atenção a outros objetivos igualmente importantes apresentados no projeto.

4.4 Estudo da dependência de biotina em *P. acidipropionici*

Para a demonstração experimental da dependência de biotina em *P. acidipropionici* foi necessário o estabelecimento de um meio definido. Como citado anteriormente, o meio de cultura padrão já estabelecido para *P. acidipropionici* possui extrato de levedura que contém biotina em sua composição, havendo uma necessidade, portanto, de um novo meio em que seja possível controlar a concentração desta vitamina. O meio definido padronizado está evidenciado na tabela 9 e as principais alterações realizadas estão expressas em materiais e métodos (Seção 3.7). Uma vez estabelecido, foi realizado o teste de adequação do meio de cultura. Neste teste foi observado o crescimento de *P. acidipropionici*, o que confirma a capacidade da bactéria de crescer no meio de cultura padronizado (Figura 32). Como é possível observar, o crescimento de *P. acidipropionici* no meio definido se mostrou mais lento quando comparado ao meio padrão utilizado. Isso se deve, provavelmente, ao fato do meio definido ser um meio mais pobre em nutrientes quando comparado com o meio padrão recorrentemente utilizado (Seção 3.1).

Tabela 9 - Meio Definido padronizado para o cultivo de *P. acidipropionici* ATCC4875.

Fonte de Minerais		Aminoácidos		Fonte de Carbono	
Composto	Concentração Final (g/l)	Composto	Concentração Final (g/l)	Composto	Concentração Final (g/l)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	L-Aspartato	1,25	Glicose	20,0
MnSO ₄ .H ₂ O	0,02	L-Glutamato	3,8	Vitaminas	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	L-Arginina	1,0	Composto	Concentração Final (mg/l)
NaCl	0,01	Cisteína	1,25	Ca-pantotenato	1,0
CoCl ₂	0,001	Histidina	0,75	Biotina	0,004
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0001	Lisina	1,0	Tiamina.HCl	1,0
Na ₂ HPO ₄	2,60	Tirosina	0,38	Ácido Para-aminobenzoico	0,2
KH ₂ PO ₄	3,00				

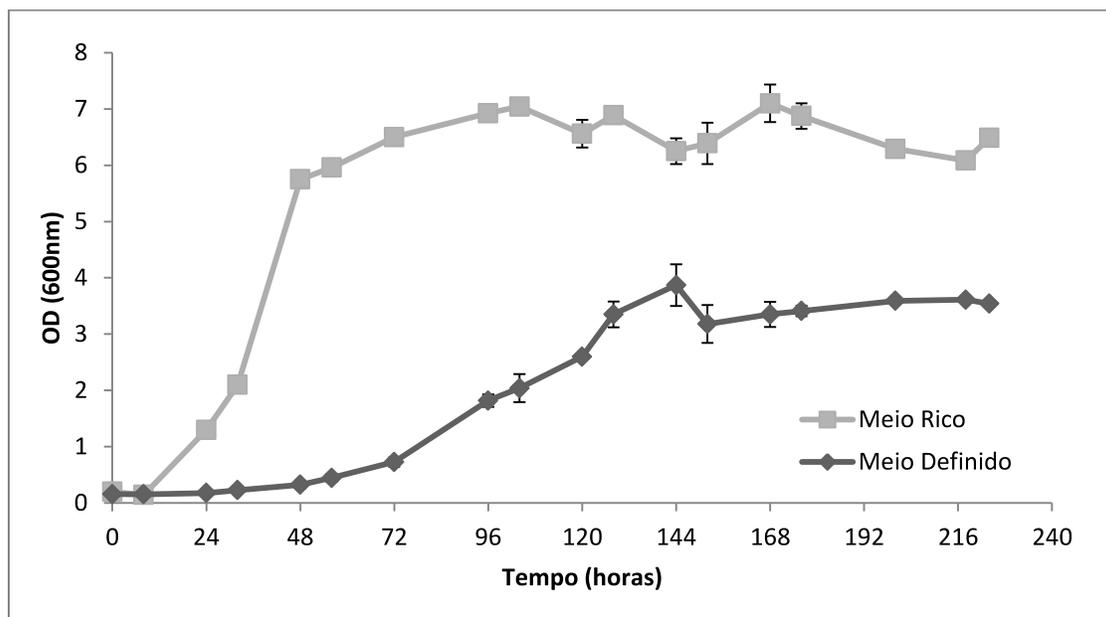


Figura 32 – Perfil de crescimento de *P. acidipropionici* em meio definido e em meio padrão (meio rico).

Em um experimento prévio foi cultivado *P. acidipropionici* em meio definido com e sem 4µg/L de biotina por um período de 18 dias. Nesse experimento foi observado um crescimento semelhante da população bacteriana nos dois meios de cultura apresentando uma densidade óptica (600nm) máxima final de valor próximo a 2,34 (desvio padrão de 0,093) no meio definido completo (controle) e uma densidade óptica máxima final de de 2,42 (desvio padrão de 0,082) em meio definido com ausência de biotina.

Como já descrito na literatura, outras espécies de propionibactérias são dependentes de quantidades muito pequenas de biotina para seu crescimento (Falentin et al. 2010). É possível que essa pequena quantidade possa estar presente em nossos experimentos e seja proveniente do meio rico na qual a bactéria foi inoculada anteriormente ao ou que alguns dos componentes utilizados no laboratório estejam contaminados com traços de biotina uma vez que mesmo a biotina sendo descrita como não resistente a alta temperatura, a maior parte dos componentes utilizados foram filtrados e não autoclavados, principalmente os aminoácidos e vitaminas.

Visando diminuir possíveis contaminações com biotina no meio definido, o mesmo foi adaptado. Além de utilizar reagentes novos, passamos a autoclavar aminoácidos e retiramos duas vitaminas da composição do meio: PABA (ácido para-aminobenzóico) e a tiamina, vitaminas que não seriam essenciais para nossa espécie segundo dados do genoma (Parizzi et al. 2012). Foi realizado, portanto, um novo experimento de crescimento em meio definido adaptado em quatro diferentes condições: **(1)** meio definido sem adição de nenhuma vitamina, **(2)** meio definido apenas com ácido pantotênico (1mg/L) e sem biotina, **(3)** meio definido com biotina (4µg/L) e ácido pantotênico (1mg/L) e **(4)** meio rico como controle. A curva de crescimento obtida está evidenciada na figura 33.

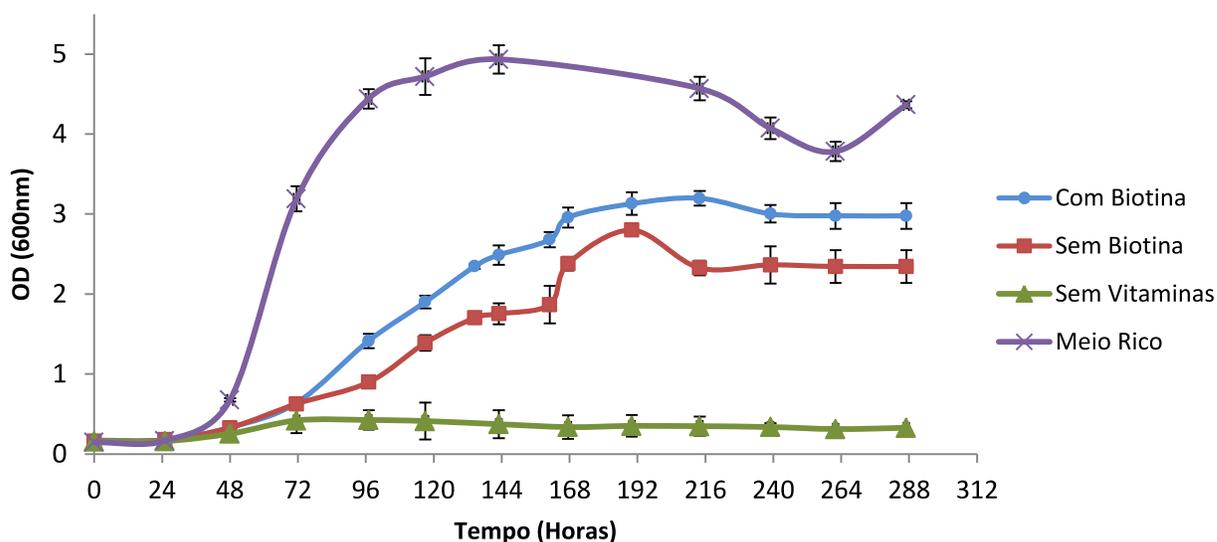


Figura 33 - Crescimento de *P. acidipropionici* em meio definido por 12 dias. (1) **Com Biotina**: Meio definido com 0,004mg/L de biotina e 1mg/L de ácido pantotênico, sem adição de outras vitaminas. (2) **Sem Biotina**: Meio definido com 1mg/L de ácido pantotênico, sem biotina ou outras vitaminas. (3) **Sem vitaminas**: Meio definido sem adição de vitaminas. (4) **Meio Rico**: controle mostrando a viabilidade das culturas inoculadas.

Como resultado observamos o crescimento da bactéria tanto no meio com suplementação de biotina quanto no meio sem biotina. Entretanto, observa-se já uma diferença no perfil de crescimento quando comparado ao primeiro experimento realizado, o que evidencia que provavelmente a bactéria se utiliza da biotina adicionada. Interessantemente, não observamos um crescimento das bactérias cultivadas em meio de cultura sem biotina e sem ácido pantotênico, o que evidencia uma grande dependência do seu

metabolismo para essa última vitamina. O ácido pantotênico é o precursor da coenzima CoA, composto de extrema importância e que atua como cofator de enzimas importantes do ciclo do ácido cítrico (TCA), do metabolismo de ácidos graxos e, em nosso caso, do ciclo de *Wood-Werkman*, responsável pela produção de ácido propiônico (Leonardi et al. 2005). Dessa maneira, a influência no crescimento aqui demonstrada abre indícios da importância da assimilação dessa vitamina no metabolismo de *P. acidipropionici*, sendo interessante não só do ponto de vista do estudo do metabolismo basal da bactéria quanto na busca de mecanismos de aumento na produção de ácido propiônico.

Mesmo crescendo pouco no meio sem vitaminas, ainda observamos um crescimento lento da população bacteriana. Esse fenômeno poderia também ser explicado pela possível “contaminação” de biotina em reagentes não autoclaváveis utilizados ou, principalmente, pela presença de vitaminas remanescentes do pré-inóculo. É bem estabelecido que microrganismos em geral apresentem a capacidade de armazenar grandes quantidades de biotina e que no momento da divisão celular as compartilhe com suas células-filhas (Alfenore et al. 2002). Sendo assim, a ciclagem em um meio sem vitaminas seria necessária para o esgotamento das vitaminas armazenadas anteriormente aos experimentos de dependência dessa vitamina.

A ciclagem foi, então, iniciada em meio definido (2) contendo somente ácido pantotênico como única vitamina disponível. Foram realizadas três ciclagens seguidas (Figura 34 e 35) em um período total aproximado de 36 dias. Como podemos observar no gráfico, o crescimento na segunda ciclagem já apresentou uma taxa muito menor quando comparada à primeira. Além disso, observa-se um crescimento lento e em uma escala aritmética, não apresentando um crescimento em escala exponencial (logarítmico), típico em crescimento bacteriano. Como já descrito por alguns autores, esse é um dos fenótipos típicos na ausência de nutrientes, entre eles a biotina (Dietrich et al. 2009). Na terceira ciclagem (Figura 35), a passagem da cultura se deu não somente a um novo meio definido sem biotina, mas sim para três grupos diferentes: em meio definido com biotina (1), em meio definido sem biotina (2); e meio rico padrão (3), visando analisar a capacidade de crescimento da população bacteriana.

Na cultura sem biotina disponível observamos um baixo e lento crescimento quando comparado à cultura em que foi novamente disponibilizada a vitamina (Figura 35). Apesar de ainda apresentar um baixo crescimento na ausência de biotina, podemos afirmar através desse experimento que, de fato, existe uma dependência da bactéria por essa vitamina, mas não podemos concluir que a mesma seja auxotrófica. Possivelmente a dependência, ou até mesmo a auxotrofia, ficaria mais evidente nas próximas ciclagens, entretanto, não havia uma disponibilidade de volume de cultura suficiente nesta última ciclagem para dar continuidade ao experimento.

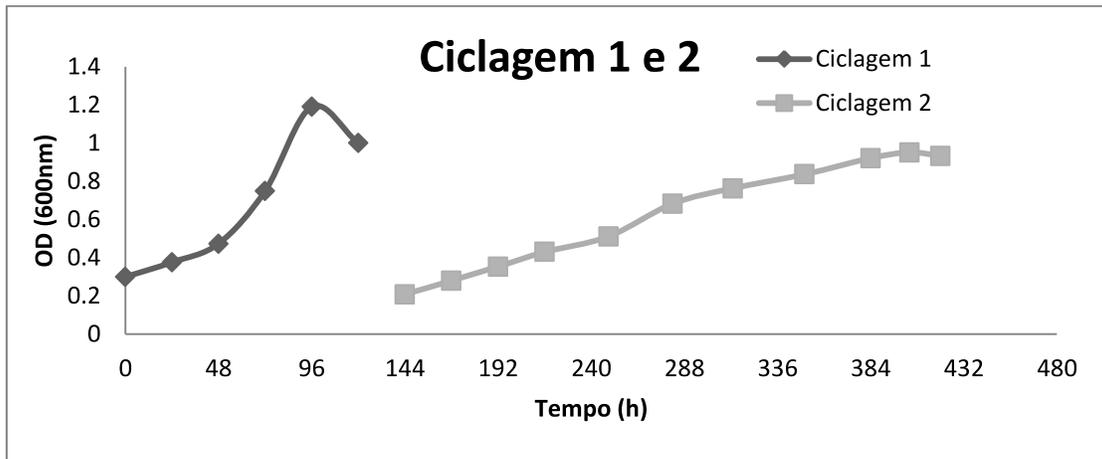


Figura 34 – Curvas de crescimento das ciclagens realizadas de *P. acidipropionici* ATCC4875 crescendo em semi-anaerobiose em meio definido sem biotina. No ciclo 1 foi utilizado o primeiro meio definido obtido durante o projeto. O segundo ciclo corresponde à bactéria diluída em uma OD~ 0,2 e em duplicata biológica em meio definido com suplementação de ácido pantotênico.

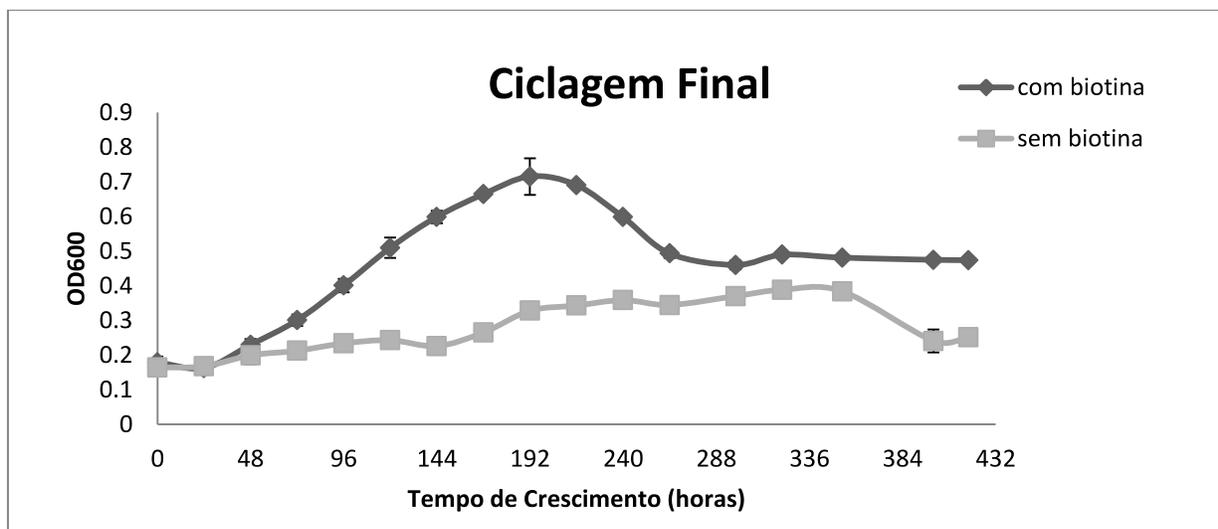


Figura 35 – Curvas de crescimento da terceira e última ciclagem realizada de *P. acidipropionici* ATCC4875 crescendo em semi-anaerobiose em meio de cultura com 0,004mg/L de biotina (**com biotina**) e sem adição de biotina (**sem biotina**).

Quando analisamos o crescimento da bactéria em meio padrão (rico) observou-se que mesmo após as ciclagens as culturas ainda apresentam a capacidade de crescer de maneira semelhante às culturas que não passaram por ciclagens (Figura 36). O baixo crescimento em meio definido com biotina suplementada poderia ser justificado pelo fato desse meio ser pobre, uma vez que apresenta pouca disponibilidade de vitaminas. Para experimentos futuros e com outros objetivos planejamos a utilização do meio definido proposto neste projeto com as demais vitaminas disponíveis em nosso laboratório.

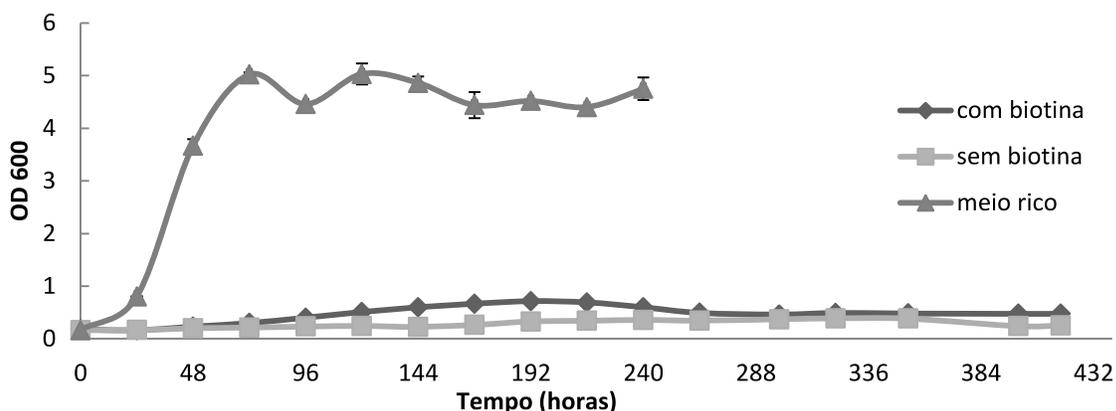


Figura 36 – Curva de crescimento correspondente à terceira ciclagem de *P. acidipropionici* ATCC4875 crescendo em uma condição de semi-anaerobiose em meio definido suplementado com biotina (0,004mg/L), em meio definido sem adição de biotina e cultivada em meio rico (ou padrão).

4.5. Estudo da suplementação de Biotina em *P. acidipropionici*

A partir da análise dos dados de expressão gênica de *P. acidipropionici*, foi constatado que em culturas contendo glicerol ou glicose como fonte de carbono, houve um aumento da expressão de genes envolvidos em vias de assimilação e síntese de biotina. Visando uma melhor compreensão desses resultados foram realizados testes de suplementação de biotina em culturas de *P. acidipropionici*. Uma vez que a biotina é um cofator de grande importância para enzimas do ciclo de ácido propiônico e que evidências indicam que há um requerimento da mesma em seu crescimento, a adição de maiores concentrações de biotina poderia alterar o seu metabolismo e as concentrações dos produtos finais de sua fermentação.

Os perfis de crescimento obtidos estão relatados na figura 37. As concentrações dos ácidos orgânicos formados e o consumo das fontes de carbono nas três condições estudadas estão representados nas figuras 38 a 40.

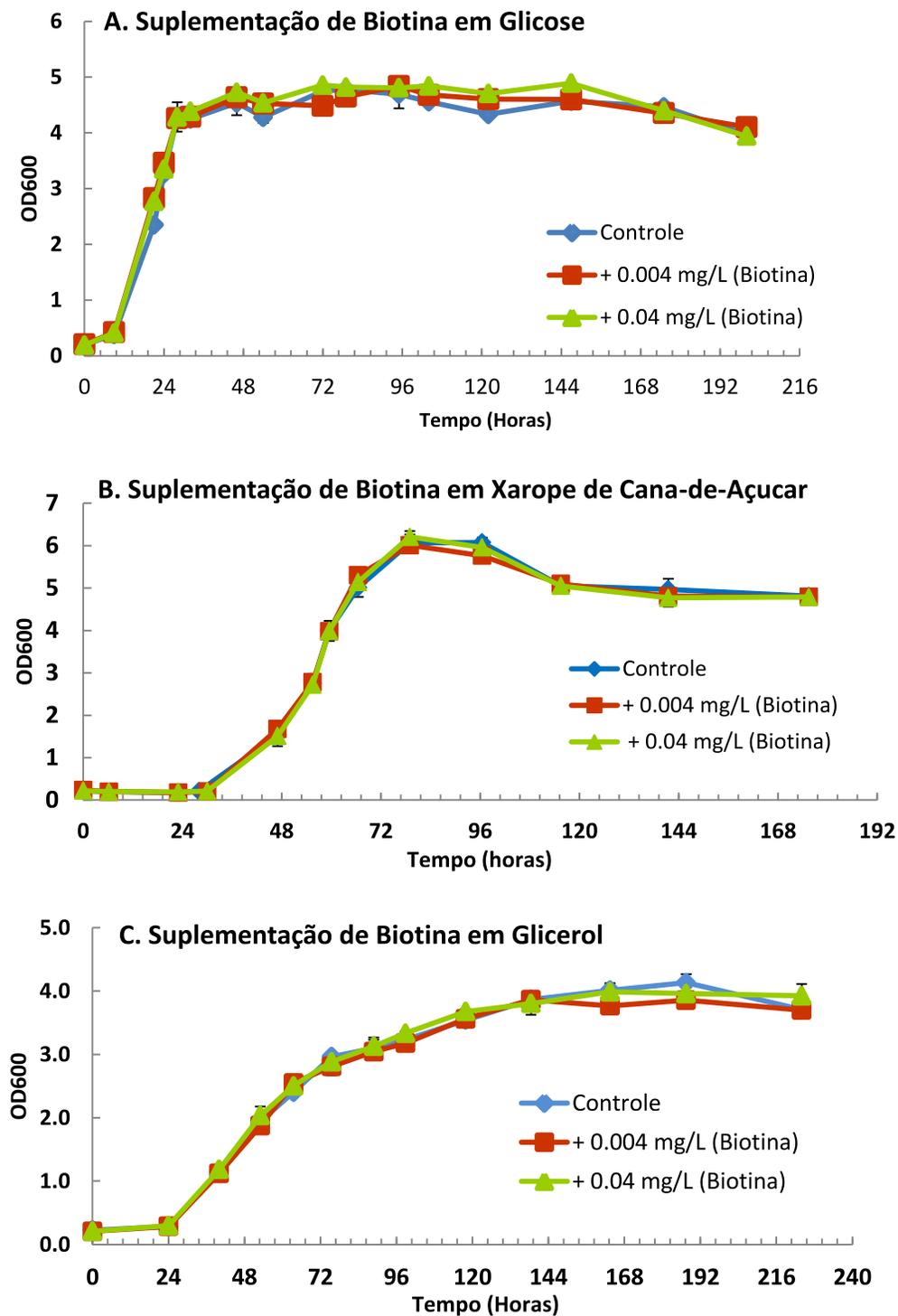


Figura 37 – Perfil de crescimento de *P. acidipropionici* crescendo em meio padrão com ou sem suplementação de biotina. A. Culturas cultivadas em glicose (2%) com ausência, 0,004mg/L ou 0,04. de biotina suplementada **B.** Culturas cultivadas em xarope de cana-de-açúcar (sacarose 2%) com ausência, 0,004mg/L ou 0,04. de biotina suplementada **C.** Culturas cultivadas em glicerol (2%) com ausência, 0,004mg/L ou 0,04. de biotina suplementada. A quantificação dos substratos consumidos e produtos formados foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

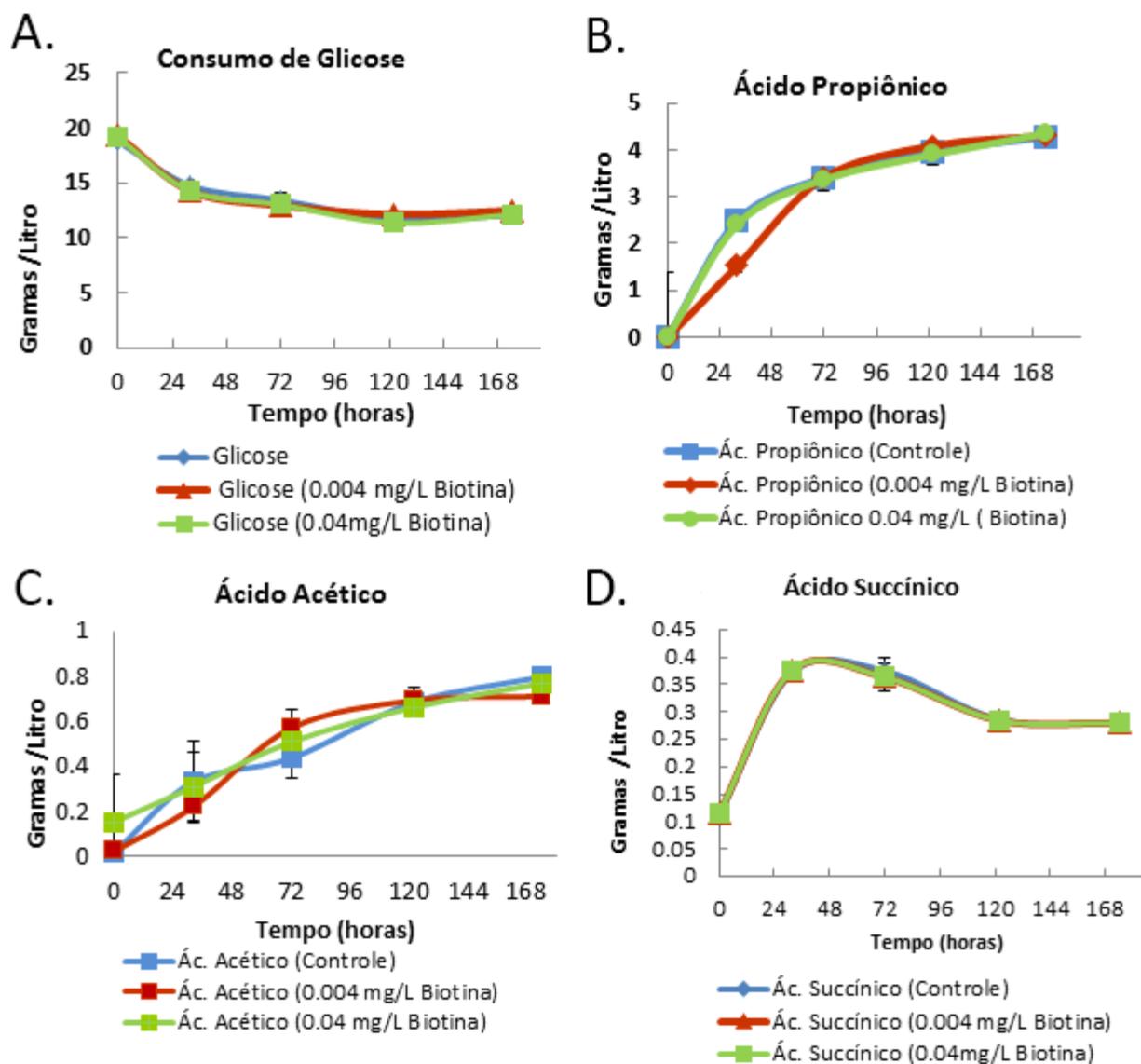


Figura 38 – Perfil fermentativo de consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos em *P. acidipropionici* cultivada em meio padrão ou em meio padrão com suplementação de biotina (0,004 mg/L ou 0,04 mg/L). **A.** consumo de glicose. **B.** ácido propiônico. **C.** ácido acético. **D.** ácido succínico. A quantificação dos substratos consumidos e produtos formados foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

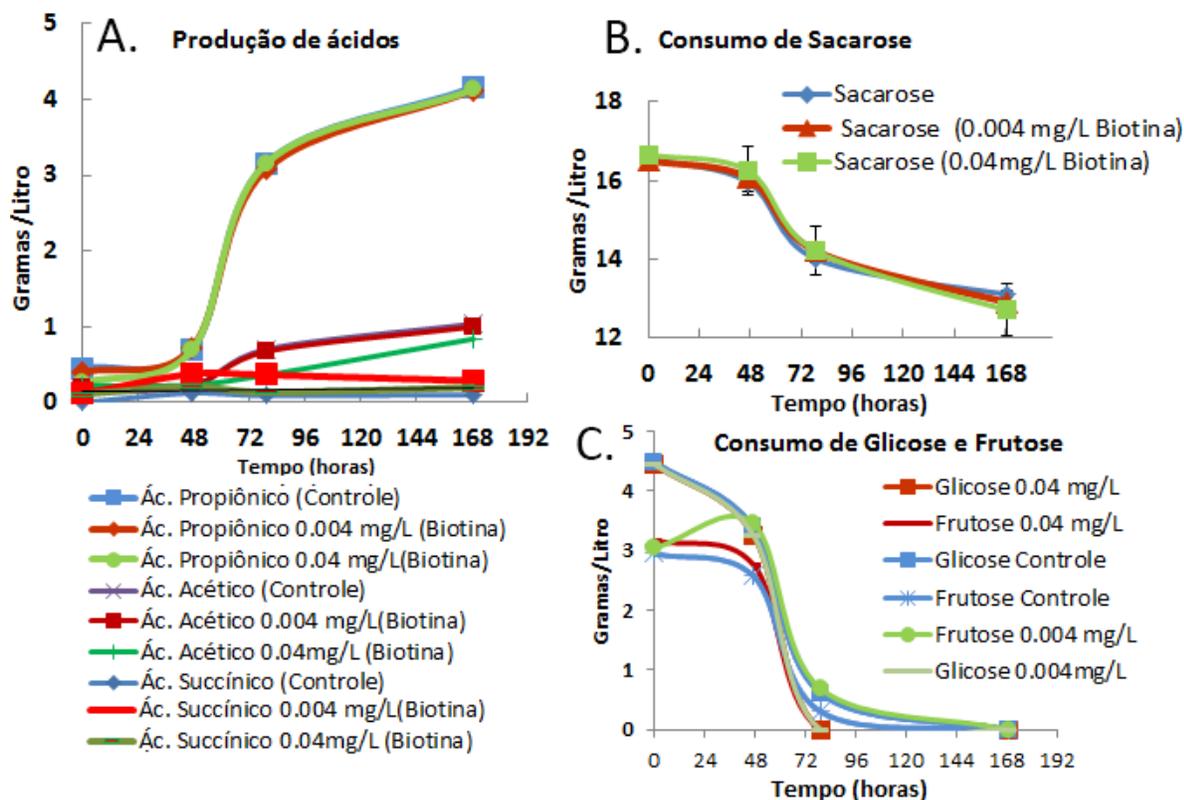


Figura 39- Perfil fermentativo do consumo de sacarose, glicose e frutose e formação e da formação de ácidos orgânicos em *P. acidipropionici* cultivada em meio padrão ou em meio padrão com suplementação de biotina (0,004 mg/L ou 0,04 mg/L). A. ácido propiônico, ácido acético e ácido succínico. B. consumo de sacarose. C. Consumo de Glicose e Frutose. A quantificação dos substratos consumido e produtos formados foi realizada por HPLC.

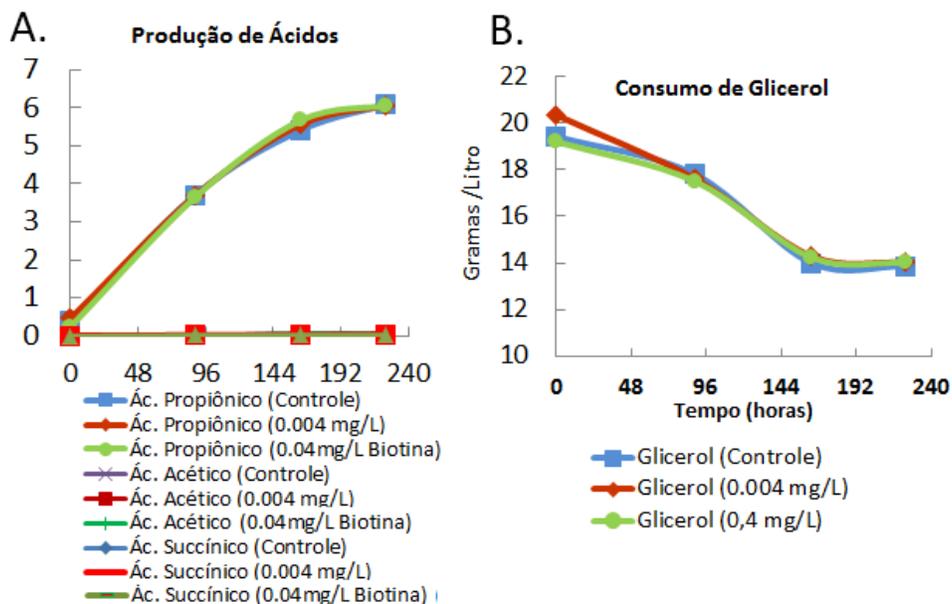


Figura 40- Perfil fermentativo de consumo de glicerol e formação de ácidos orgânicos em *P. acidipropionici* cultivada em meio padrão ou em meio padrão com suplementação de biotina (0,004 mg/L ou 0,04 mg/L). A. ácido propiônico, ácido acético e ácido succínico. B. consumo de glicerol de *P. acidipropionici* durante a fermentação. A quantificação dos substratos consumidos e produtos formados foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Baseando-se no conjunto de experimentos não é possível afirmar que a suplementação de biotina influencia de fato no crescimento ou produção de ácidos orgânicos em *P. acidipropionici*. As fermentações referentes a análise global de expressão (*RNAseq*) foram realizadas em biorreatores que apresentavam mecanismos de manutenção de pH na faixa ideal de crescimento da bactéria. Em processos fermentativos em batelada com propionibactérias observa-se um aumento crescente na produção de ácidos associada a uma grande queda no pH mesmo na presença de tampões (como é o caso do tampão fosfato presente em nosso meio padrão).

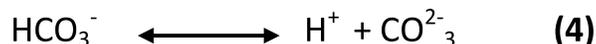
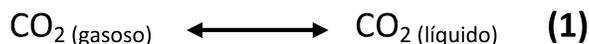
A queda progressiva do pH causada pela produção de ácidos acaba por limitar o crescimento da população de bactérias e ocasionar eventualmente a sua morte, não finalizando a fermentação. Esse fenômeno é facilmente visualizado pelo fato das populações, nessas ocasiões, atingirem a fase estacionária e a fase de declínio (morte) mesmo em um ambiente com disponibilidade de fontes de carbono. Esse fenômeno pode ser observado em todas as 27 culturas estudadas nesse experimento.

Nos experimentos realizados em biorreatores, os genes envolvidos no metabolismo de biotina mostram-se mais expressos no fim das fermentações, momento em que de fato haveria um maior requerimento nutricional de grande parte dos nutrientes e que observamos uma menor concentração de fontes de carbono. Portanto, avaliar os efeitos de uma maior disponibilidade dessa vitamina só seria possível se tivéssemos realizado a fermentação em uma mesma condição e com controle de pH. Nesse sentido, seria interessante repetir os experimento aqui destacados em biorreatores e também com quantidades diferenciadas de biotina. Outro experimento visando o mesmo tipo de análise seria o cultivo de *P. acidipropionici* utilizando o meio definido aqui relatado (seção 3.5), uma vez que no meio definido é possível controlar as concentrações de biotina. Através do acompanhamento dos produtos formados durante as fermentações seria possível avaliar o quanto uma maior concentração de biotina poderia influenciar a produção de ácido propiônico em *P. acidipropionici*.

4.6 Crescimento de *P. acidipropionici* em um ambiente rico em CO²/HCO³⁻

Tendo-se em vista que dados prévios indicam que *P. acidipropionici* incorpora dióxido de carbono externo ao seu metabolismo quando cultivada em glicerol e esse carbono é encontrado em moléculas de ácido propiônico (Wood and Werkman 1936; Parizzi et al. 2012) o presente trabalho objetivou investigar o quanto esse fenômeno é restrito ao tipo de fonte de carbono e em quais condições a fixação de CO₂ é observada em *P. acidipropionici*. Em experimentos prévios (Parizzi et al. 2012), a identificação do dióxido de carbono assimilado foi dada através do borbulhamento de CO₂ com isótopos de carbono-13 (C¹³O₂) e posterior análise da presença de isótopos C13 em moléculas de ácido propiônico. Para o presente trabalho optamos por utilizar o bicarbonato de sódio com carbono C¹³ (NaHC¹³O₃) principalmente por estar disponível em pó, o que torna mais fácil o seu manuseio e permite um melhor controle de sua concentração em cada um dos seus experimentos.

Quando dissolvido em água NaHCO₃ forma íons de bicarbonato (HCO₃⁻), uma das principais espécies de CO₂ encontradas em meio aquoso. As diferentes espécies formadas a partir da dissolução de CO₂ estão expressas nas equações de a seguir:



O estado em que o dióxido de carbono se encontra em solução aquosa depende de diferentes fatores, principalmente o pH, a temperatura e a complexidade do meio de cultura utilizado. Em condições fermentativas, na faixa de pH entre 5-8, as espécies de carbono mais disponíveis são o HCO₃⁻ e o CO₂ (líquido) (Jones and Greenfield 1982). Essas duas formas de carbono podem ser assimiladas por microrganismos e fixadas em suas vias metabólicas, sendo

preferencialmente utilizado o HCO_3^- em reações catalisadas pelas carboxilases dependentes de biotina, como é o caso da piruvato carboxilase (Jones and Greenfield 1982; Fuchs 2011).

Entretanto, sabe-se que cada microrganismo responde de uma maneira diferente a altas concentrações de CO_2 diluído, de maneira que altas concentrações podem ser tóxicas aos mesmos (Jones and Greenfield 1982; Jones and Talley 1977). Como não há dados na literatura com *P. acidipropionici* sendo cultivada em altas concentrações de NaHCO_3 , foi analisado o comportamento de *P. acidipropionici* crescendo em NaHCO_3 antes de realizar os experimentos com o bicarbonato de sódio com carbono marcado.

4.6.1 Crescimento de *P. acidipropionici* em um ambiente rico em $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$

P. acidipropionici foi cultivada em três condições diferentes tendo glicerol como fonte única de carbono: sem a adição de NaHCO_3 (controle), com uma concentração inicial de 60 mM de NaHCO_3 ou com 120 mM de NaHCO_3 . Os resultados obtidos após 8 dias de fermentação em ambiente fechado estão expressos na tabela 10 e 11 e figura 41.

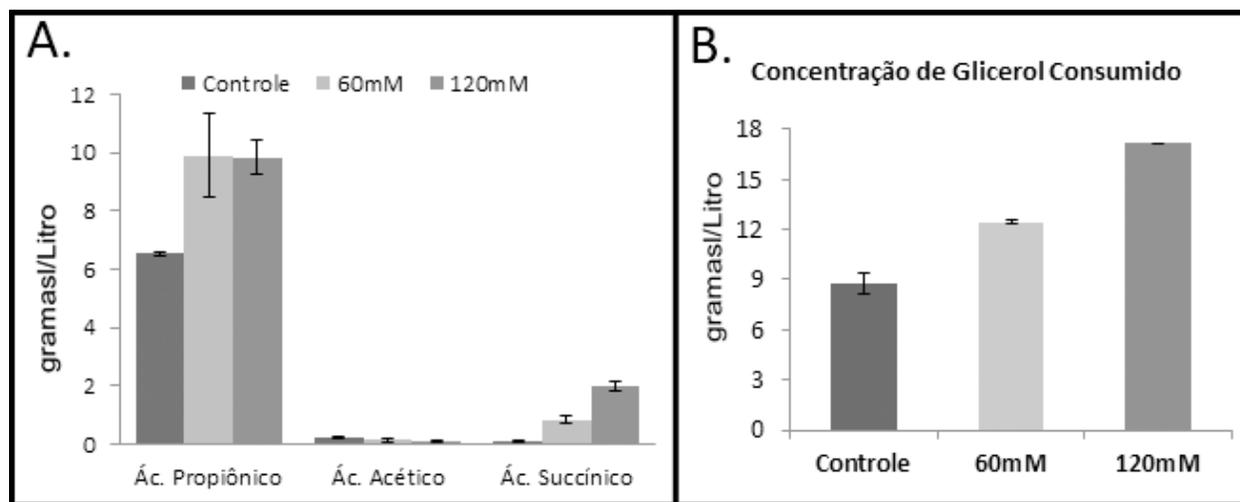


Figura 41 – A. Produção em gramas/litro dos ácidos finais formados nas fermentações de *P. acidipropionici* em diferentes concentrações de NaHCO_3 diluído. B. Consumo De glicerol em g/L por *P. acidipropionici* em diferentes concentrações de de NaHCO_3 . A condição controle refere-se à triplicata cultivada em meio de cultura sem a adição de NaHCO_3 . A quantificação do glicerol consumido e dos ácidos formados foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Tabela 10 – Concentração de glicerol consumido e dos produtos finais da fermentação formados nas fermentações de *P. acidipropionici* em diferentes concentrações de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ disponíveis.

Amostra	Glicerol Consumido (g/L)	Ácido Propiônico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Succínico (g/L)	Propanol (g/L)
Controle	8,757 ± 0,62	6,534 ± 0,07	0,2 ± 0,005	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01
60mM NaHCO₃	12,451 ± 1,1	9,915 ± 1,1	0,15 ± 0,05	0,84 ± 0,10	0,0 ± 0,0
120mM NaHCO₃	17,137 ± 0,41	9,581 ± 0,54	0,12 ± 0,01	1,94 ± 0,16	0,0 ± 0,0

Tabela 11- Densidade óptica e pH inicial e final das fermentações contendo diferentes concentrações de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$

Amostra	OD₆₀₀ final	pH Inicial	pH final
Controle	4,2 ± 0,08	6,8	4,37 ± 0,07
60mM NaHCO₃	4,58 ± 0,1	6,8	4,78 ± 0,03
120mM NaHCO₃	5,35 ± 0,05	6,8	5,41 ± 0,13

Todas as culturas cultivadas em bicarbonato de sódio apresentaram crescimento e tiveram a produção final dos ácidos orgânicos esperada, de modo que aqui podemos confirmar que essa faixa de concentração de bicarbonato de sódio aparentemente não é tóxica para *P. acidipropionici* ATCC4875. Entretanto, através da análise dos resultados fica claro que a produção de ácidos orgânicos foi diferente entre as condições estudadas. Esse fenômeno é novamente um exemplo dos efeitos dos ácidos produzidos sobre as condições de crescimento da bactéria, tal como foi discutido nos experimentos com suplementação de biotina (Seção 3.6). Apesar de todas as culturas começarem com um mesmo valor de pH (6,8), o bicarbonato de sódio é naturalmente um agente tamponante, de modo que, durante a fermentação, foi mantida uma faixa de pH elevada por mais tempo quanto maior foi sua concentração. Como podemos observar, quanto maior a concentração de bicarbonato, maior foi o consumo de glicerol, a produção de ácidos orgânicos e o crescimento celular (aqui evidenciados pela densidade óptica).

Entretanto, apesar das diferenças encontradas nas concentrações dos produtos finais, podemos observar que aparentemente o bicarbonato de sódio afeta o perfil metabólico da bactéria. Quando visualizamos a distribuição molar do carbono nos ácidos finais observamos um aumento relevante na proporção de ácido succínico nas amostras com bicarbonato quando comparado ao controle (Figura 42). Esse fenômeno é explorado posteriormente pelo presente trabalho.

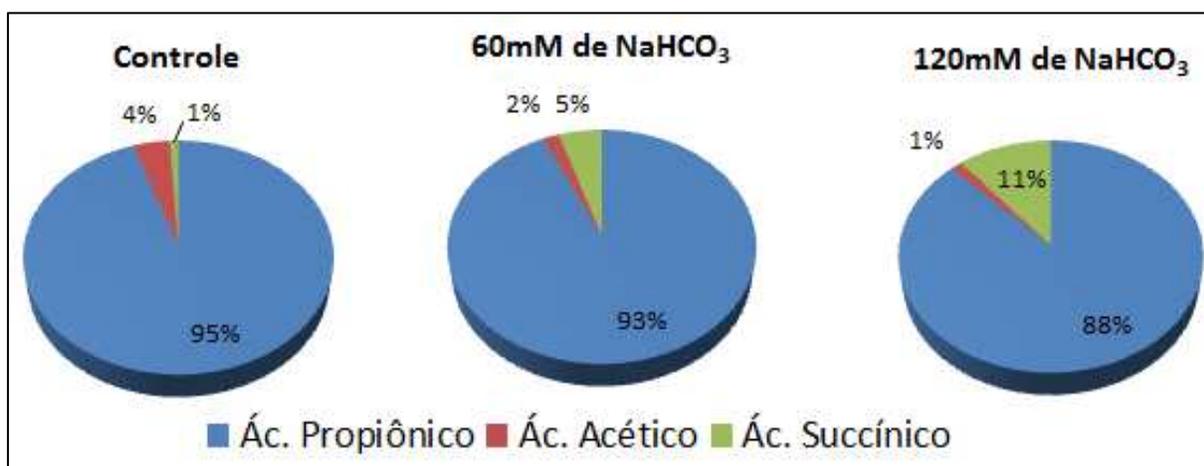


Figura 42 – Distribuição molar do carbono dos produtos finais da fermentação de *P. acidipropionici* ATCC4875 cultivada em semi-anaerobiose e em meio rico contendo diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

Uma vez que a variação do pH é um problema frequente em nossos experimentos, principalmente pelo fato de não permitir que a cultura bacteriana complete a sua fermentação, foram buscadas alternativas que contornassem esse obstáculo. Tendo-se em vista que o bicarbonato apresentou um efeito tamponante que aumentou o tempo fermentativo das culturas, optamos por avaliar os efeitos de outro tampão biológico, o ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado (MES). Adicionalmente, avaliamos também a fermentação em menores concentrações iniciais de fonte de carbono passando de 20g/L para 10g/L (Figura 43 e Tabela 12).

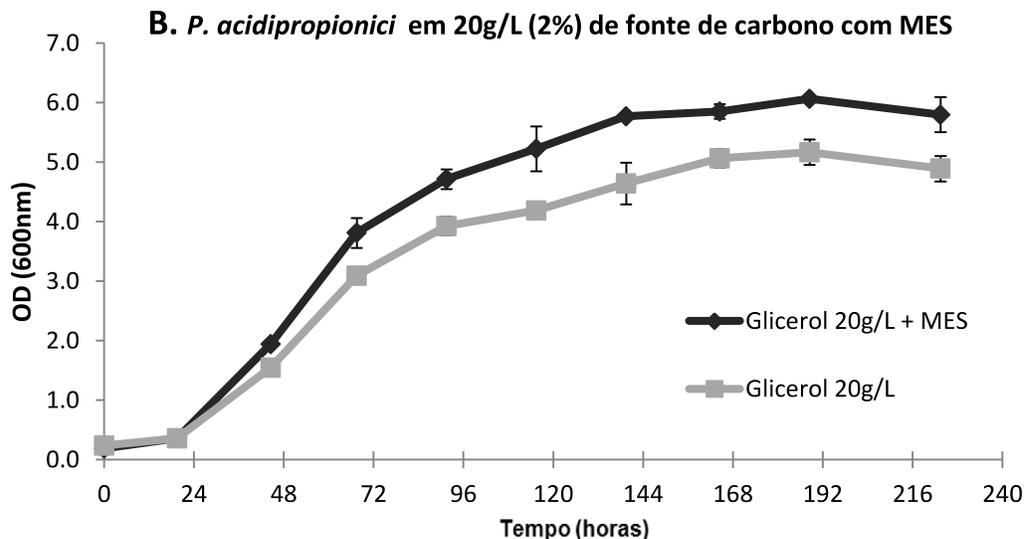
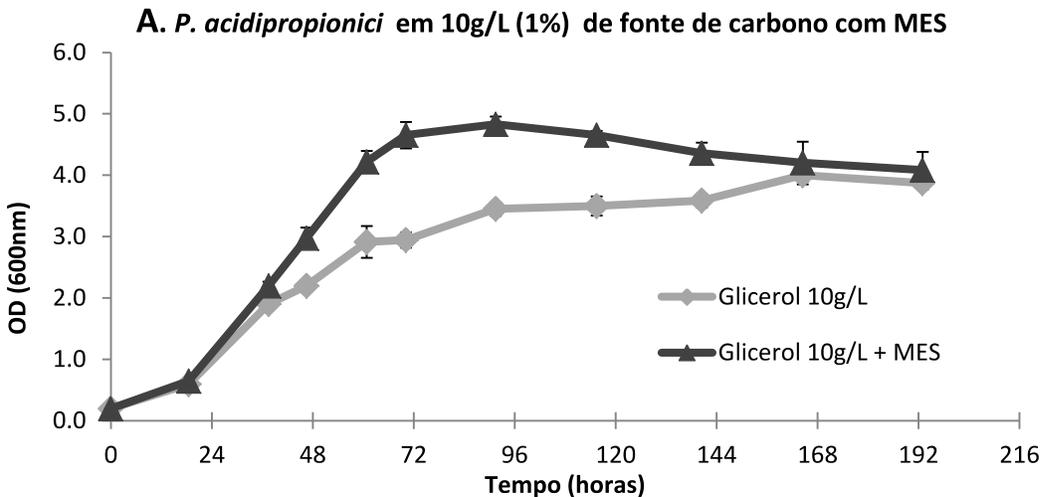


Figura 43 – Perfil de crescimento de *P. acidipropionici* ATCC4875 cultivada em (A) glicerol 1% (10g/L) ou glicerol 1% em MES 100mM e (B) *P. acidipropionici* cultivada em 2% (20g/L) ou glicerol 2% com MES 1M.

Tabela 12- Consumo de glicerol e produção de ácidos orgânicos em culturas cultivadas em glicerol 1% ou 2% contendo ou não o trampão MES (100mM) O pH inicial foi semelhante a todas as condições e igual a 6,8.

Amostra	Glicerol Consumido (g/L)	Ác. Propiônico (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Ác. Succínico (g/L)	pH final
Glicerol 10g/L	9,85 ± 0,01	3,71 ± 0,07	0,98 ± 0,01	0,26 ± 0,002	3,98 ± 0,01
Glicerol 20g/L	8,56 ± 0,04	4,83 ± 0,60	0,92 ± 0,09	0,20 ± 0,04	3,96 ± 0,01
Glicerol 10g/L + MES	9,86 ± 0,02	4,81 ± 0,01	1,01 ± 0,04	0,26 ± 0,05	4,41 ± 0,04
Glicerol 20g/L + MES	13,93 ± 1,03	10,58 ± 0,35	1,09 ± 0,04	0,35 ± 0,008	4,36 ± 0,02

Considerando como o fim da fermentação o consumo total da fonte de carbono disponível, as únicas condições em que se visualizou uma fermentação completa foram as amostras contendo 10 gramas por litro de glicerol, tanto as cultivadas na presença ou ausência de MES. Apesar da cultura em 20g/L com MES não consumir toda a fonte de carbono, nota-se que foi consumido muito mais glicerol quando comparado ao controle. Esse resultado evidencia que o MES consegue manter o pH por certo período de tempo mas que a alta produção dos ácidos consegue abaixar o pH do meio de cultivo a níveis que prejudicam o crescimento de *P. acidipropionici*. Apesar de ambas as culturas cultivadas em 10 gramas/Litro apresentarem uma fermentação satisfatória, optamos realizar nossos experimentos com a concentração de 10 gramas por litro de glicerol, uma vez que o tampão MES seria mais uma variável adicionada em nossos experimentos.

4.6.2 Análise da capacidade de consumo de $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ em diferentes fontes de carbono

Foram selecionadas seis diferentes fontes de carbono para a avaliação da presença e relevância da assimilação de CO_2 em *P. acidipropionici*. Além das três fontes até então estudadas (glicose, glicerol e xarope de cana-de-açúcar) optamos por utilizar também sacarose, xilose e sorbitol. A sacarose foi selecionada por ser a principal fonte de carbono presente no xarope de cana de açúcar. Uma vez que o xarope é um meio rico em nutrientes, é importante ter como controle uma cultura cultivada também em sacarose para discernir se eventuais resultados estariam relacionados à fonte de carbono ou a outros componentes presentes na sua composição. A xilose foi selecionada por ser uma cadeia carbônica de cinco carbonos presente em maior porcentagem em materiais lignocelulósicos e por ser atualmente um substrato importante na indústria biotecnológica. Por fim, selecionou-se sorbitol ($R=4,33$) por ser uma fonte de carbono com maior grau de redução do que a glicose, sacarose e xilose (todas com $R=4$), mas menor que o glicerol ($R= 4,66$). Como é relatado que em glicerol há maior produção de ácido propiônico por ser um substrato mais reduzido e que dados de expressão gênica evidenciam a presença de uma carboxilase (PC) com alta expressão nessas condições, se a assimilação de CO_2 estiver relacionada com o grau de redução da fonte de carbono o sorbitol é um composto interessante a ser investigado.

Através da análise dos nossos resultados observa-se que em todas as culturas cultivadas com $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ ocorreu a assimilação de CO_2 (Figura 44 a 49). Esse resultado é bastante claro quando comparamos as culturas cultivadas em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ com as cultivadas em NaHCO_3 onde a porcentagem de moléculas de ácido propiônico e succínico que apresentam um isótopo de carbono-13 identificadas pelo espectrômetro de massa é expressiva naquelas cultivadas em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$. É importante ressaltar que o carbono-13 é um isótopo estável de carbono que ocorre naturalmente na natureza em pequenas concentrações. Tal fato é observado em nossos experimentos com as culturas controle e a porcentagem de carbono-13 encontrada naturalmente foi descontada dos resultados obtidos nas culturas crescidas em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$.

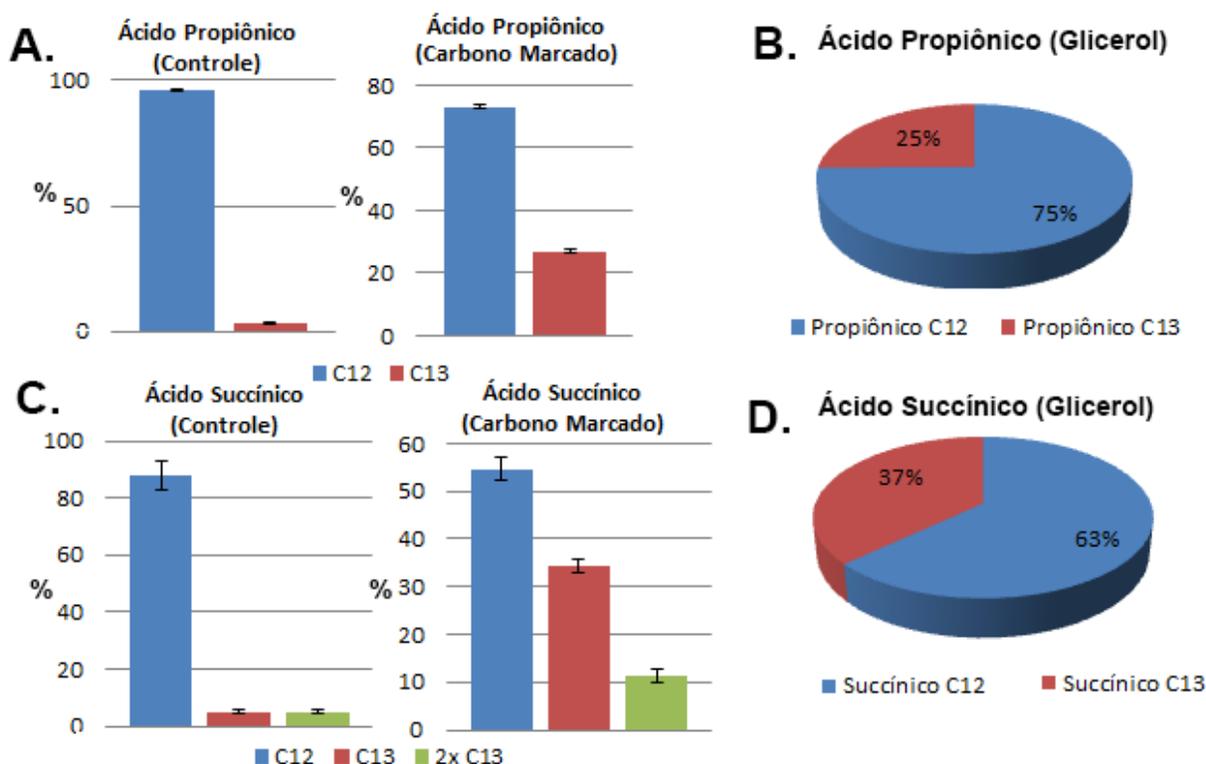


Figura 44 – Porcentagem final de moléculas de ácido propiônico e ácido succínico com isótopos de carbono 12 e 13 em fermentações com $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ (carbono marcado) ou com NaHCO_3 (controle) cultivadas em meio rico contendo glicerol como fonte de carbono. A. Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido propiônico. **B.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido propiônico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13. **C.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido succínico. **D.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido succínico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13.

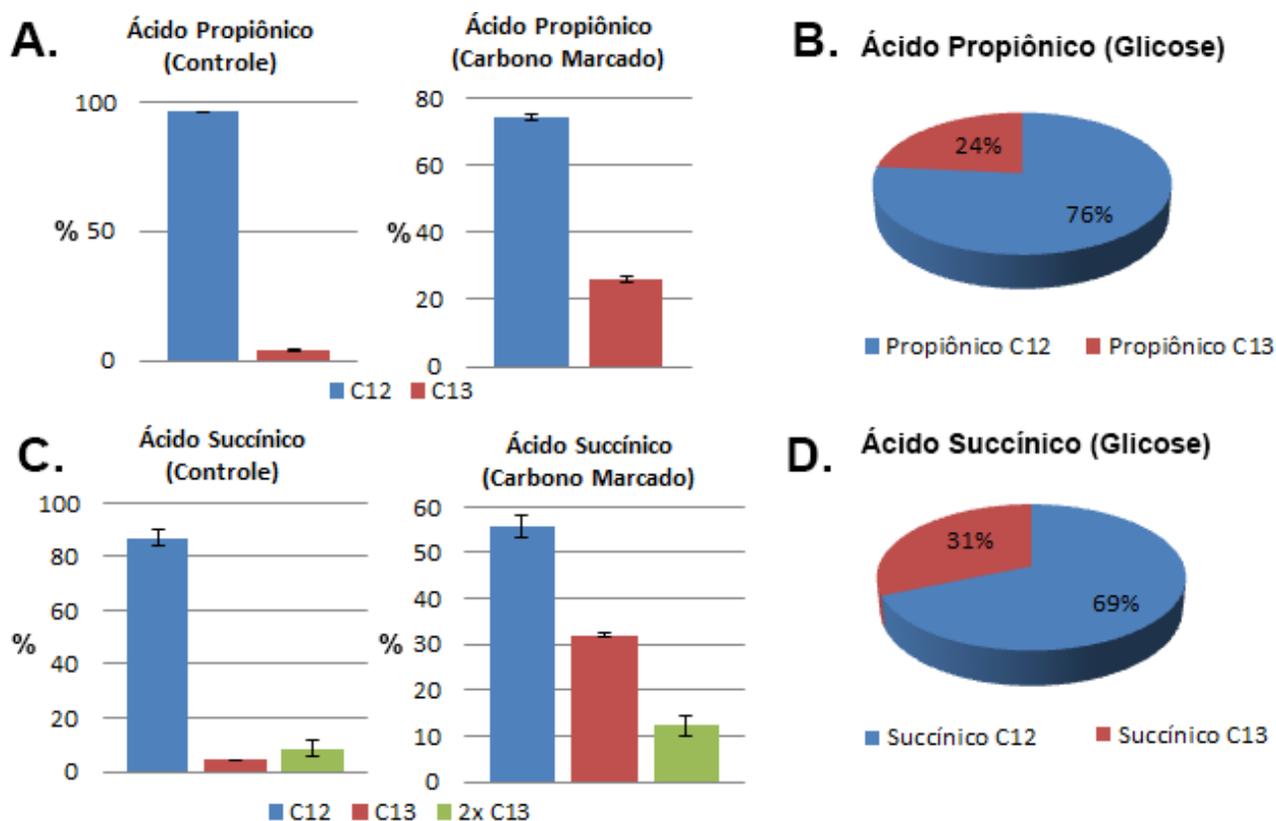


Figura 45- Porcentagem final de moléculas de ácido propiônico e ácido succínico com isótopos de carbono 12 e 13 em fermentações com $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ (carbono marcado) ou com NaHCO_3 (controle) cultivadas em meio rico contendo glicose como fonte de carbono. **A.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido propiônico. **B.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido propiônico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13. **C.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido succínico. **D.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido succínico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13.

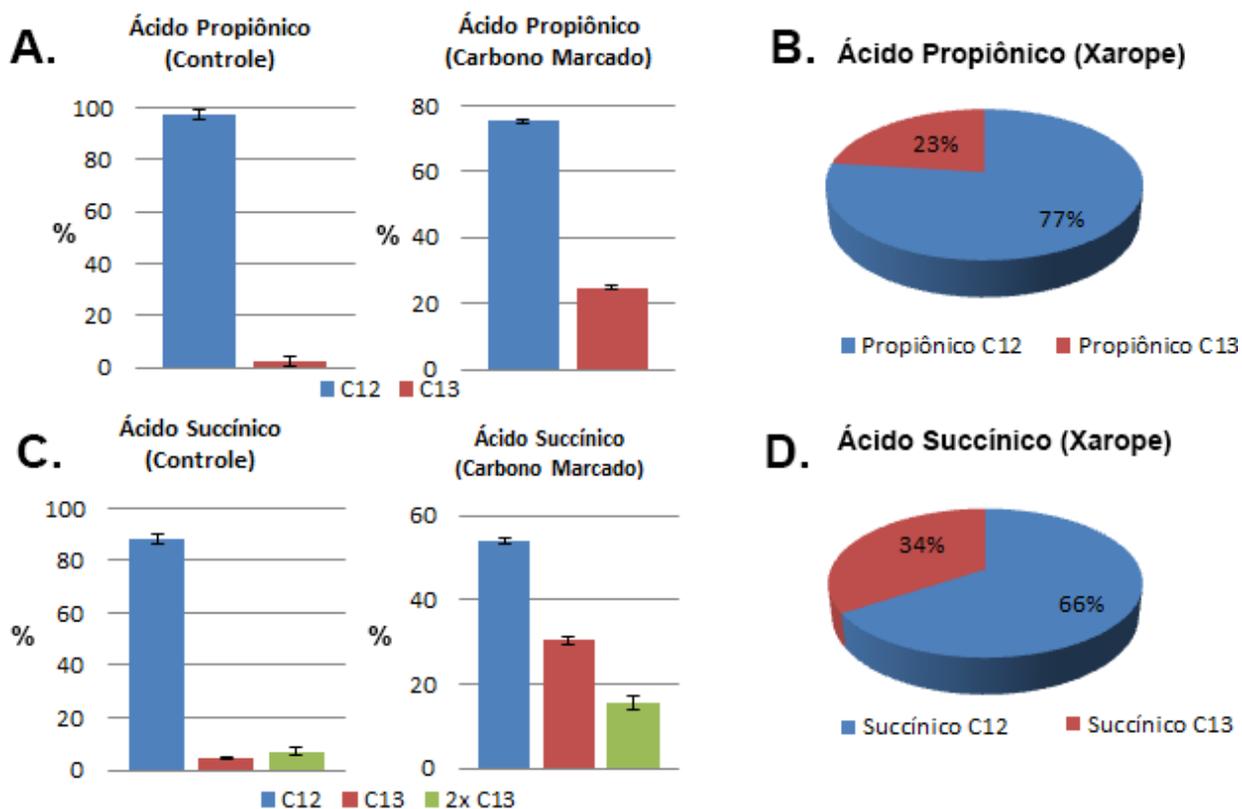


Figura 46- Porcentagem final de moléculas de ácido propiônico e ácido succínico com isótopos de carbono 12 e 13 em fermentações com $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ (carbono marcado) ou com NaHCO_3 (controle) cultivadas em meio rico contendo xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono. **A. Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido propiônico. **B.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido propiônico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13. **C.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido succínico. **D.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido succínico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13.**

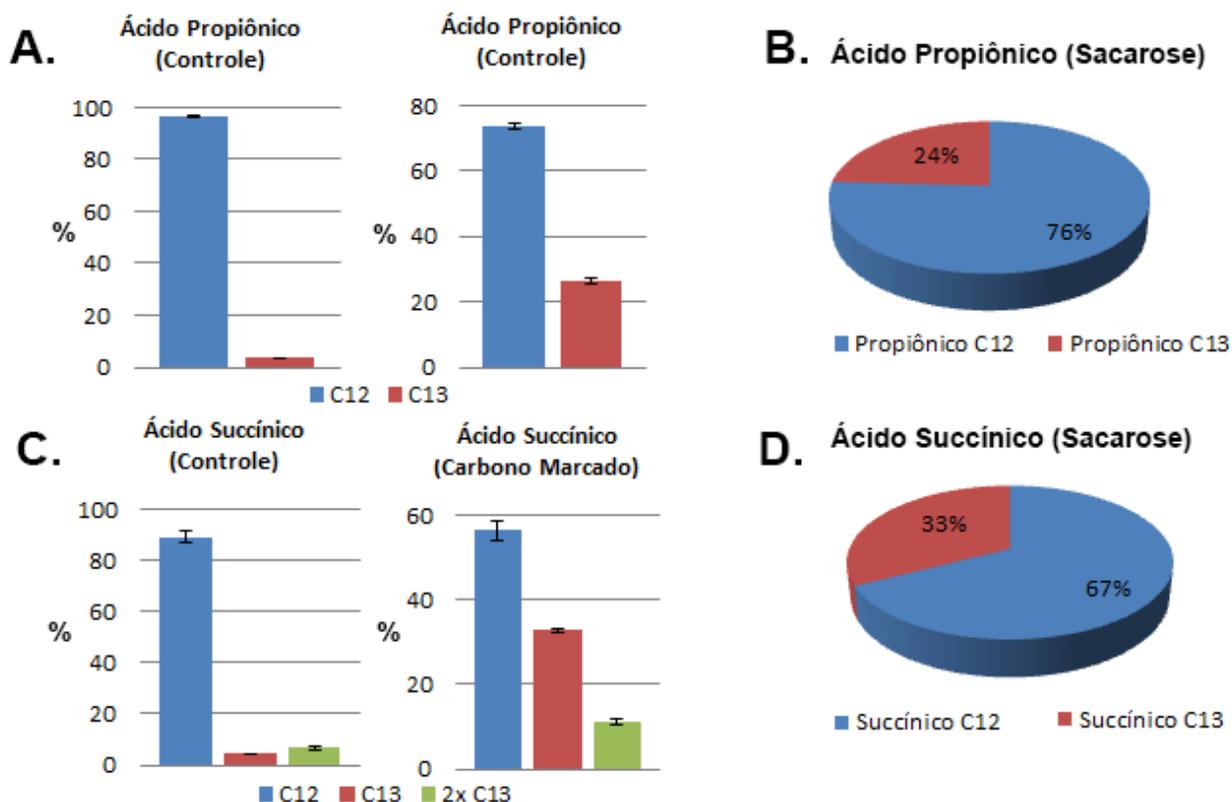


Figura 47- Porcentagem final de moléculas de ácido propiônico e ácido succínico com isótopos de carbono 12 e 13 em fermentações com $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ (carbono marcado) ou com NaHCO_3 (controle) cultivadas em meio rico contendo Sacarose como fonte de carbono. **A. Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido propiônico. **B.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido propiônico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o porcentual natural existente de carbono-13. **C.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido succínico. **D.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido succínico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o porcentual natural existente de carbono-13.**

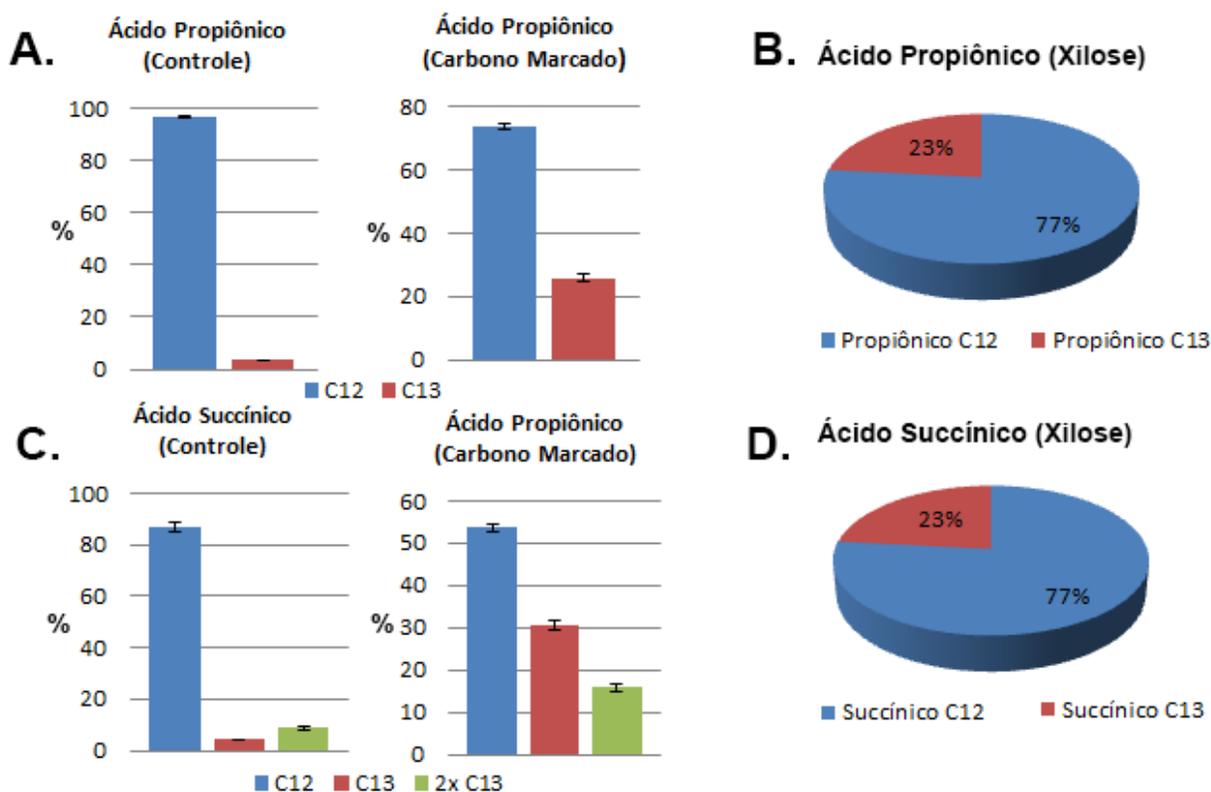


Figura 48 - Porcentagem final de moléculas de ácido propiônico e ácido succínico com isótopos de carbono 12 e 13 em fermentações com $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ (carbono marcado) ou com NaHCO_3 (controle) cultivadas em meio rico contendo Xilose como fonte de carbono. **A.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido propiônico. **B.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido propiônico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13. **C.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido succínico. **D.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido succínico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13.

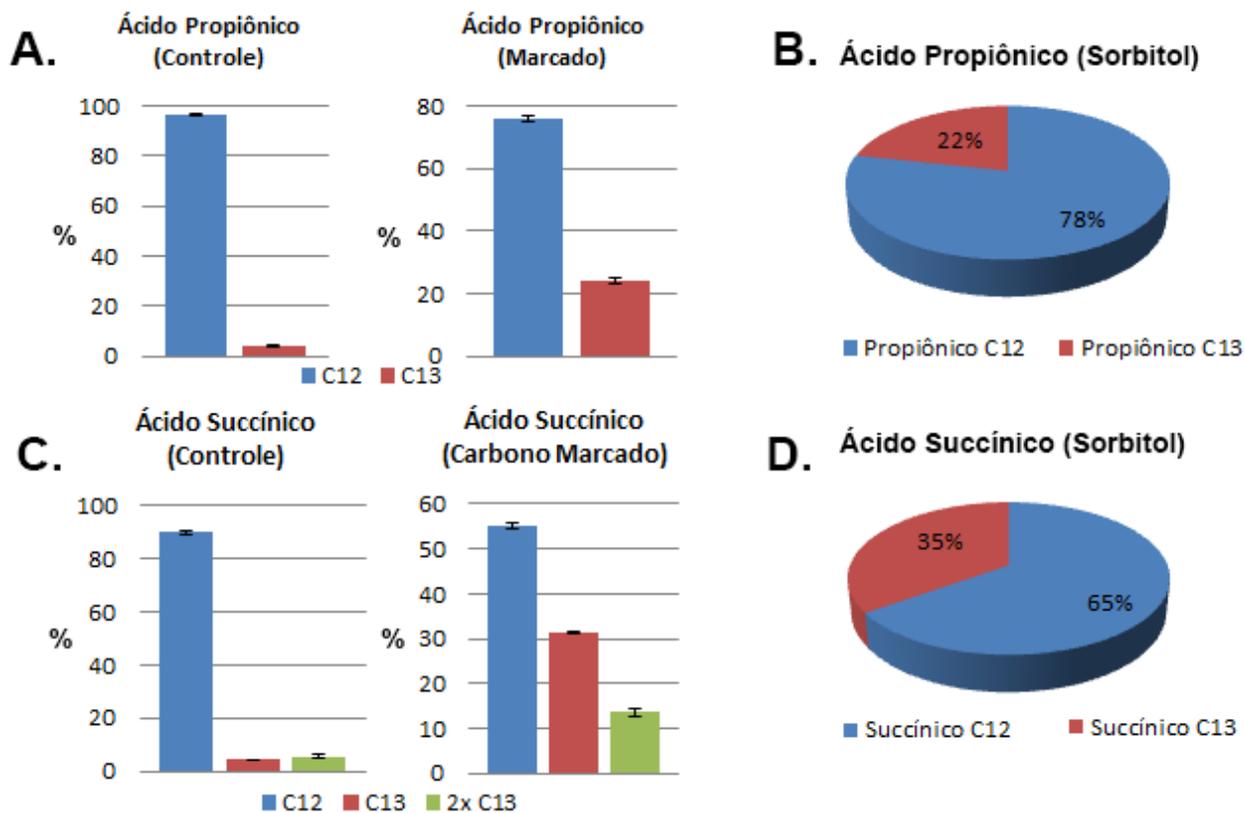


Figura 49 - Porcentagem final de moléculas de ácido propiônico e ácido succínico com isótopos de carbono 12 e 13 em fermentações com $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ (carbono marcado) ou com NaHCO_3 (controle) cultivadas em meio rico contendo Sorbitol como fonte de carbono. **A.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido propiônico. **B.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido propiônico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13. **C.** Análise, em porcentagem, da distribuição isótopos de carbono (12 e 13) presentes moléculas de ácido succínico. **D.** Porcentagem de isótopos de carbono presentes em moléculas de ácido succínico em culturas cultivadas em ambiente rico em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$ descontando-se o percentual natural existente de carbono-13

Em adição ao resultado de que a assimilação de CO_2 pode ocorrer em todas as fontes de carbono estudadas observa-se que a porcentagem de carbonos marcados entre as culturas em diferentes fontes de carbono é equivalente. A partir desse fato podemos confirmar que, nessas condições, a assimilação de CO_2 não só ocorre em todas as fontes de carbono analisadas, mas também em uma mesma proporção (Figura 50 e 51). Outro dado que chama bastante atenção é a alta porcentagem de isótopos de carbono 13 encontrados na análise dos ácidos finais. Em glicerol, por exemplo, observamos que cerca de 24% das moléculas de ácido propiônico

apresentam um carbono C^{13} em sua composição. Isso significaria que cerca de um a cada 12 carbonos encontrados na molécula de ácido propiônico foram obtidos do CO_2 . Tal dado é bastante relevante e evidencia que o metabolismo de CO_2 pode ter uma grande importância no metabolismo e na fisiologia desta bactéria.

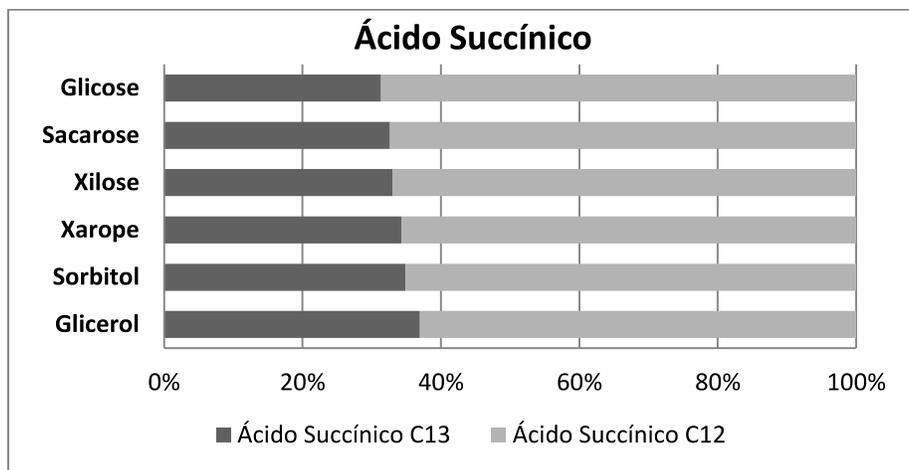


Figura 50 – Proporção média, em porcentagem, da concentração de moléculas de ácidos succínico produzidas por *P. acidipropionici* em ambiente rico em bicarbonato de sódio marcado ($NaHC^{13}O_3$) apresentando pelo menos um carbono marcado (C^{13} , ácido succínico 13) ou não apresentando nenhum carbono marcado (C^{12} , ácido succínico 12).

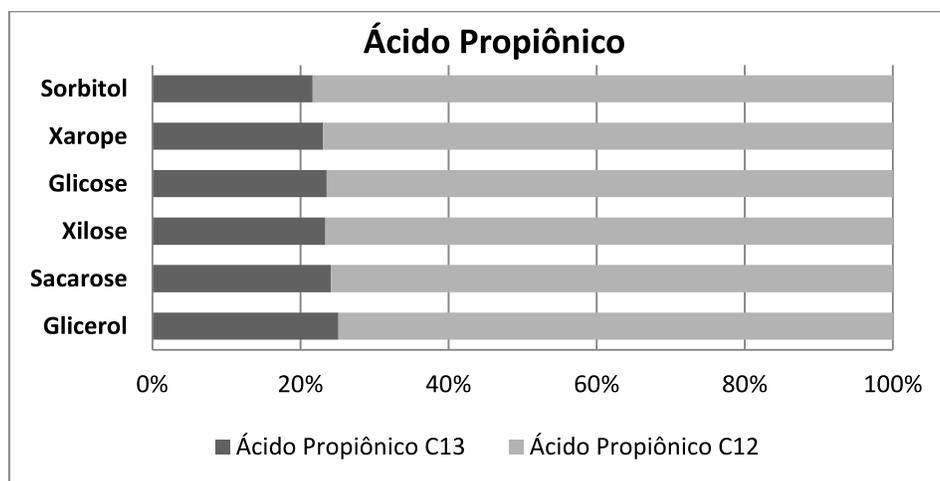


Figura 51- Proporção média, em porcentagem, da concentração de moléculas de ácidos propiônico produzidas por *P. acidipropionici* em ambiente rico em bicarbonato de sódio marcado ($NaHC^{13}O_3$) apresentando pelo menos um carbono marcado (C^{13} , ácido propiônico 13) ou não apresentando nenhum carbono marcado (C^{12} , ácido propiônico 12).

É interessante que em todas as fontes de carbono estudadas ocorra a assimilação de CO₂ em uma mesma proporção, principalmente quando comparamos com nossos dados de transcriptoma. Em glicose e xarope não encontramos uma carboxilase com altos níveis de expressão dentro do ciclo de *Wood-Werkman* que poderia realizar esse fenômeno, ao contrário da piruvato carboxilase encontrada dentro do ciclo do ácido propiônico e altamente expressa em glicerol. Nesse contexto, é possível que a assimilação possa ser realizada por enzimas não presentes nas vias principais do metabolismo de carbono dessa bactéria. Em adição, propomos aqui que não podemos descartar a possibilidade da metilmalonil-CoA carboxitransferase (MMC) estar envolvida na fixação de CO₂ em *Propionibacteria*, uma vez que a mesma apresenta uma origem em comum com a piruvato carboxilase (Toh, Kondo, and Tanabe 1993) e outras carboxilases dependentes de biotina e pouco se sabe sobre seu funcionamento em propionibactérias.

Entretanto, é importante ressaltar que o experimento aqui apresentado foi realizado em condições diferentes dos demais experimentos relatados no presente trabalho. A bactéria foi cultivada em um ambiente rico em NaHCO₃ e é possível que a alta disponibilidade de CO₂ estimule o aumento da fixação do mesmo ou a alteração do perfil fermentativo da bactéria. Por outro lado, se a disponibilidade de CO₂ alterasse a atividade da piruvato carboxilase seria esperado um deslocamento de carbono para a produção de ácido propiônico e ácido succínico, mas, através da análise da produção final do ácido propiônico, não vemos essa alteração visível, principalmente em xarope e glicose (Tabela 13 e Figura 52). A única fonte que de fato apresenta um perfil diferenciado e que chama a atenção é o glicerol em que se vê uma porcentagem alta de ácido succínico em suas culturas. Uma vez observado essa tendência também nos primeiros experimentos com bicarbonato de sódio (Seção 4.7.1), decidimos investigar esse fenômeno de maneira mais aprofundada.

Tabela 13 – Produção em gramas/Litro de ácidos orgânicos nos experimentos realizados com bicarbonato de sódio marcado. As triplicatas biológicas referentes ao controle (sem isótopos C-13) e ao marcado (com isótopos C-13) foram separadas para evidenciar o mesmo perfil de produção encontrado em ambas situações.

Fonte de Carbono	Ácido Propiônico (g/L)		Ácido Succínico(g/L)		Ácido Acético (g/L)	
	Controle	Marcado	Controle	Marcado	Controle	Marcado
Glicose	4,74 ± 0,07	4,59 ± 0,20	1,16 ± 0,11	1,13 ± 0,05	1,16 ± 0,11	1,09 ± 0,10
Glicerol	6,52 ± 0,30	6,70 ± 0,40	1,91 ± 0,35	2,1 ± 0,20	0,26 ± 0,03	0,13 ± 0,06
Xarope	4,18 ± 0,9	4,52 ± 0,19	0,81 ± 0,1	0,70 ± 0,13	1,35 ± 0,19	1,59 ± 0,13
Sacarose	4,66 ± 0,25	4,36 ± 0,24	1,17 ± 0,07	1,21 ± 0,04	1,15 ± 0,04	1,20 ± 0,17
Sorbitol	4,12 ± 1,5	5,35 ± 0,19	0,96 ± 0,29	1,14 ± 0,01	0,50 ± 0,18	0,60 ± 0,03
Xilose	4,06 ± 0,44	4,45 ± 0,38	1,15 ± 0,18	1,09 ± 0,28	0,94 ± 0,25	1,31 ± 0,08

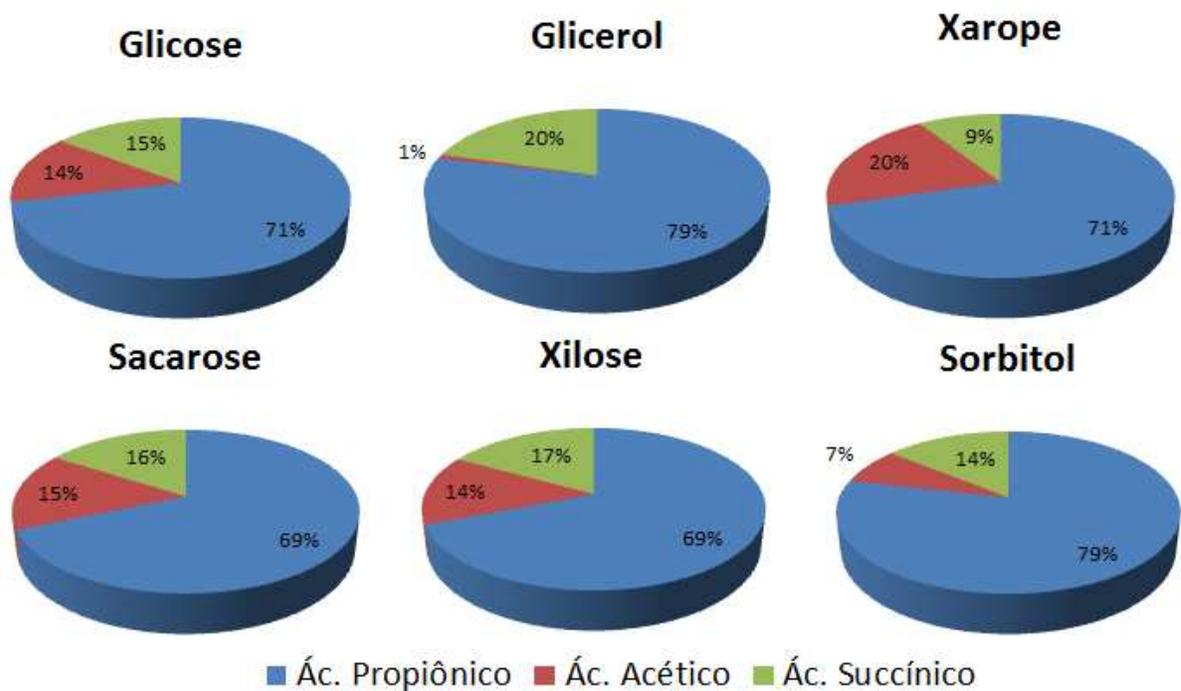


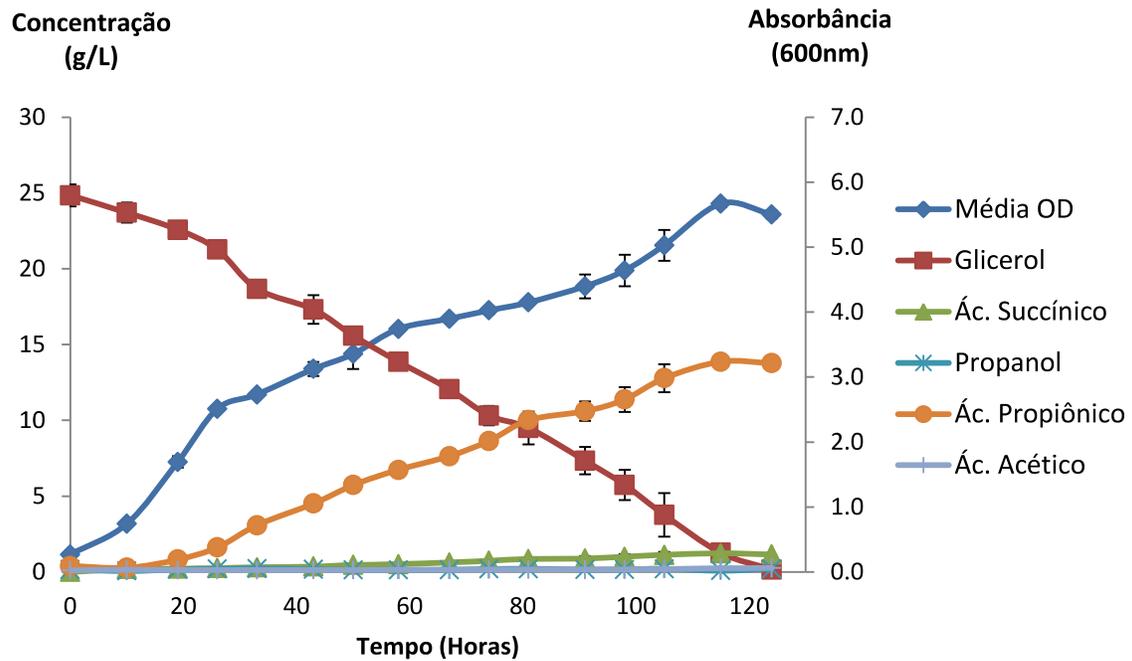
Figura 52 - Distribuição molar do carbono entre os produtos das fermentações realizadas em bicarbonato de sódio. Para os cálculos da distribuição molar (Materiais e Métodos, seção 3.5) foram consideradas para cada fonte de carbono a média das concentrações tanto das culturas cultivadas em NaHCO_3 quanto em $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$.

4.6.3 Cultivo de *P. acidipropionici* com bicarbonato de sódio em biorreatores

Alguns grupos de bactérias necessitam de concentrações elevadas de CO₂ para o funcionamento do seu metabolismo e respondem de maneira diferenciada a alterações na concentração disponível desta molécula (Xi et al. 2011; Talley and Baugh 1975; Schulzand and Richnow 2012). Em fermentações realizadas em biorreatores é comum a utilização de CO₂ em sua forma gasosa, através do borbulhamento do mesmo no meio de cultivo. Em adição, outra fonte fornecedora de CO₂ muito utilizado em processos industriais utilizando biorreatores são alguns tipo de bicarbonatos, como é o caso do MgCO₃ e do NaHCO₃. Esses compostos são recorrentemente utilizados pelo fato de sua diluição oferecer uma quantidade adicional e maior de CO₂, uma vez que a solubilidade de CO₂ na forma gasosa é relativamente baixa (Zou et al. 2011).

Visando um teste inicial do comportamento de *P. acidipropionici* em concentrações elevadas de CO₂ foi realizado o cultivo da cultura em três diferentes condições: cultivo em meio contendo 120mM de NaHCO₃ (1) , em meio com 120mM NaHCO₃ junto de um borbulhamento constante de CO₂ gasoso (0.05 VVM)(2) e um cultivo controle (3), sem adição de fontes adicionais de dióxido de carbono. Todas as culturas foram cultivadas em glicerol como fonte de carbono. Optou-se por uma das condições receberem um suprimento constante de CO₂ gasoso devido ao fato do biorreator apresentar uma abertura de saída de ar. O suprimento constante de CO₂ poderia evitar a perda de CO₂ diluído para a atmosfera, garantindo uma elevada concentração constante de CO₂/HCO₃⁻, apesar de estudos mais recentes ressaltarem que em altas concentrações de bicarbonato em solução não há a necessidade de um fornecimento constante de CO₂ gasoso (Zou et al. 2011). Os perfis de crescimento e fermentativos obtidos estão evidenciados nas figuras 53, 54 e 55.

A. Controle



B.

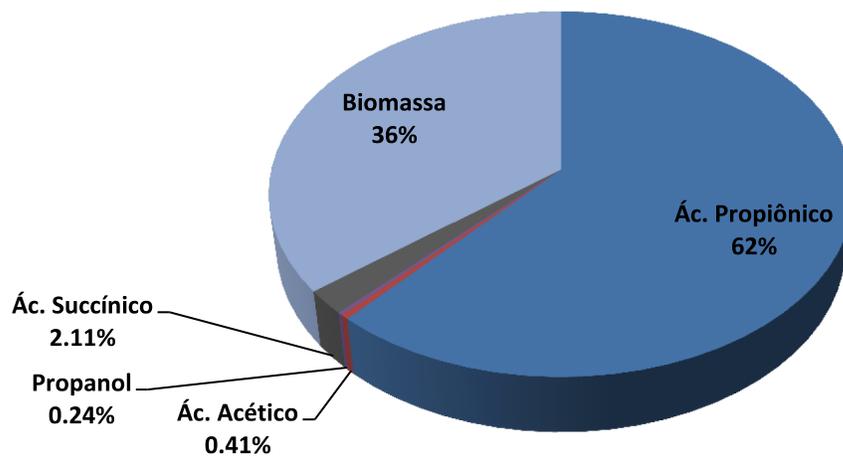
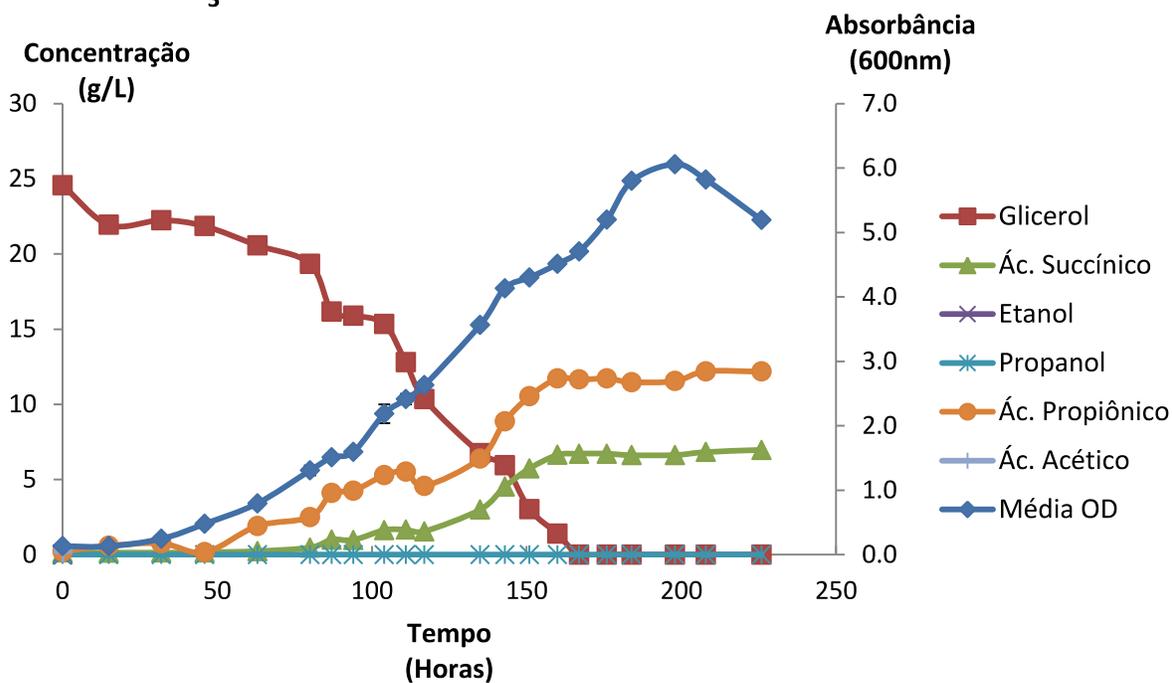


Figura 53 - Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em anaerobiose utilizando glicerol (20 g/L) como fonte de carbono. A. Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato, a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD600). B. Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação

A. NaHCO₃ 120mM



B

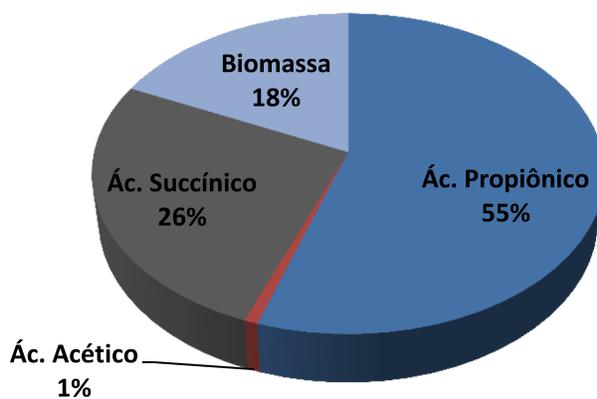


Figura 54 - Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em anaerobiose utilizando glicerol (20 g/L) como fonte de carbono. A. Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato, a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD600). B. Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação

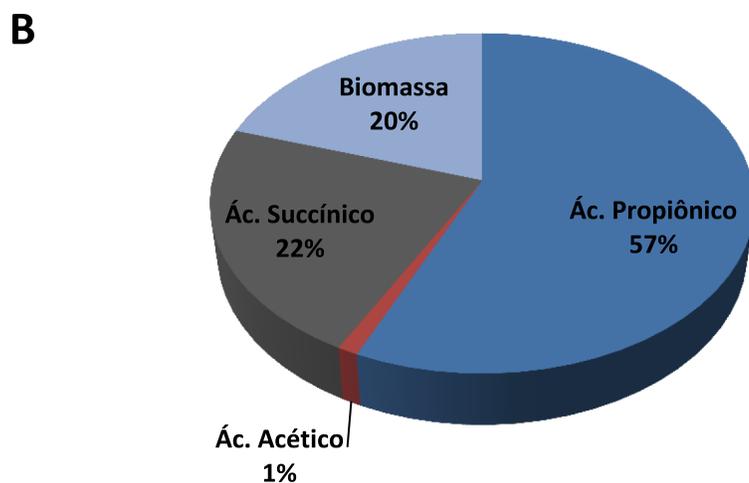
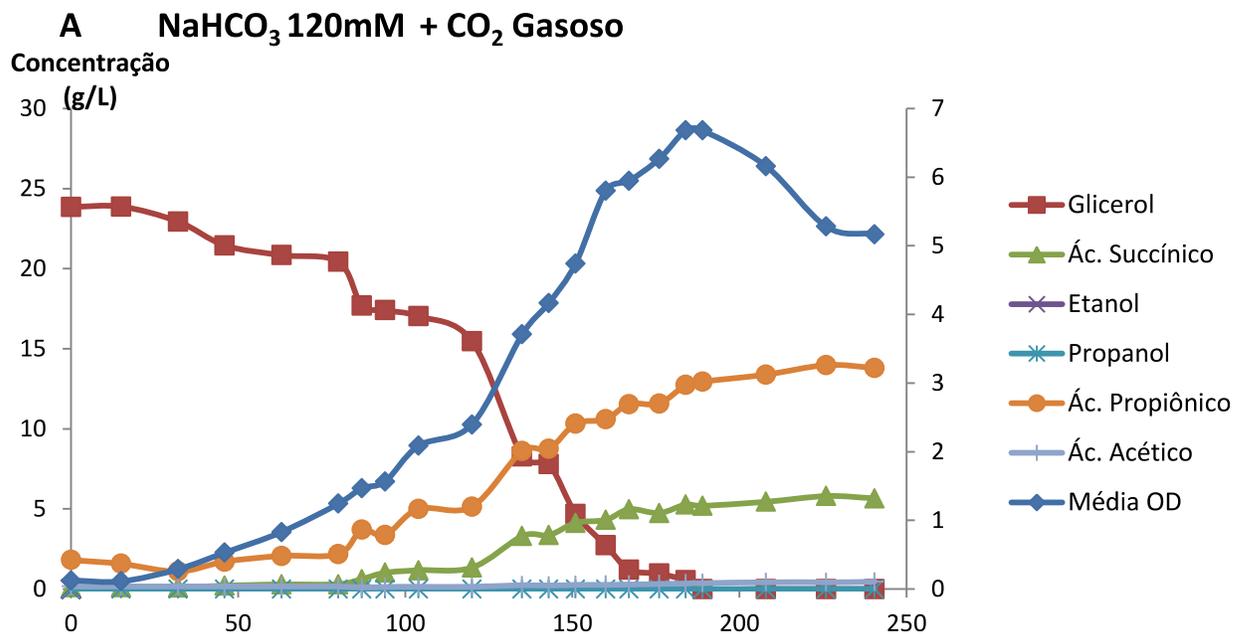


Figura 55 - Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em anaerobiose utilizando glicerol (20 g/L) como fonte de carbono. A. Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato, a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD600). B. Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação

Através da análise do perfil de crescimento observamos um aumento expressivo do tempo de fermentação nas culturas cultivadas em ambientes ricos em CO₂ quando comparadas com o controle (Figura 53 a 55 e figura 57). O aumento do tempo da fase de adaptação metabólica (fase *lag*) é relatado em outros microrganismos em ambientes similares (Schulz, Vogt, and Richnow 2012). Quanto ao perfil fermentativo, foi observado nas duas condições com suplementação de fontes externas de CO₂ um expressivo aumento na produção de ácido succínico (Figuras 53 a 56).

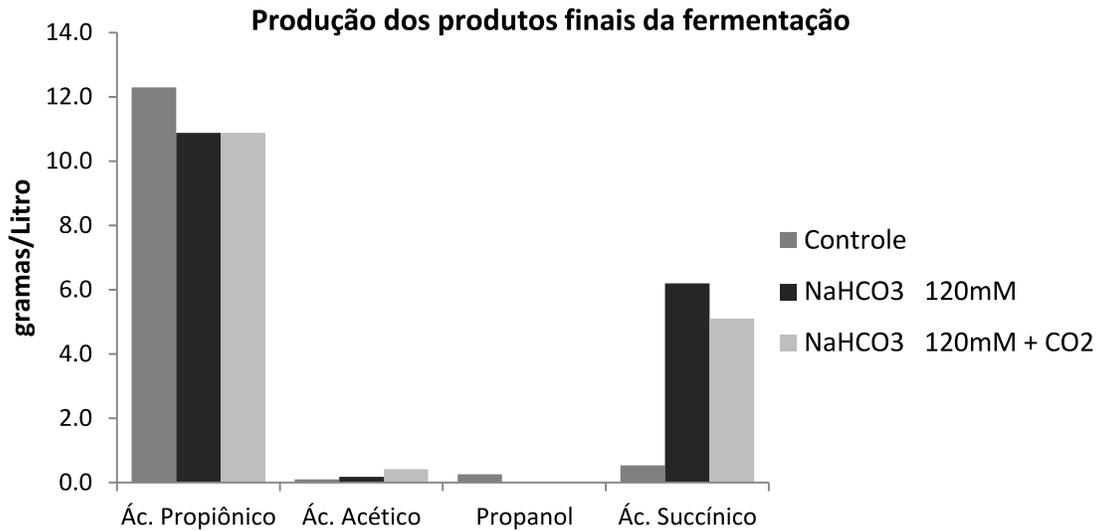


Figura 56- Produção em gramas/litro de ácidos e propanol nas fermentações em biorreator de *P. acidipropionici* cultivada anaerobicamente em meio rico contendo glicerol como fonte de carbono sem suplementação de CO₂ (controle), com suplementação de 120mM de NaHCO₃ e com suplementação de NaHCO₃ com adição constante de CO₂ gasoso.

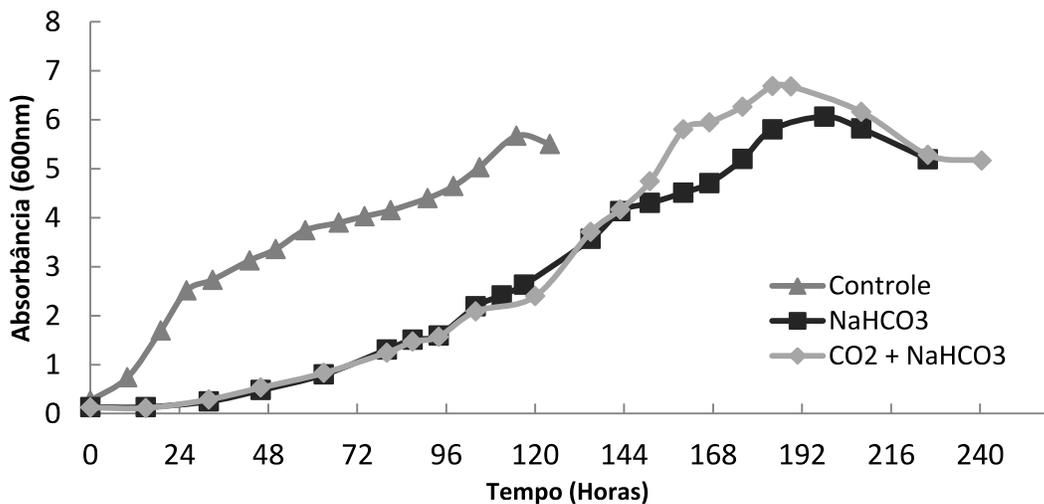


Figura 57 – Perfil de crescimento de *P. acidipropionici* em anaerobiose tendo glicerol como fonte de carbono sem suplementação de CO₂ (controle), com suplementação de 120mM de NaHCO₃ e com suplementação de NaHCO₃ com adição constante de CO₂ gasoso.

É reportado que um ambiente contendo altas concentrações de espécies de CO_2 e HCO_3^- pode afetar o fluxo de carbono e o perfil fermentativo em bactérias (Xi et al. 2011). Esse fenômeno é principalmente observado e estudado em bactérias anaeróbicas e pertencentes ao trato digestivo de animais ruminantes, um ambiente que contém altas concentrações de CO_2 . Entre os principais exemplos destacam-se as espécies *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Samuelov et al. 1991), *Actinobacillus succinogenes* (Xi et al. 2011) e *Mannheimia succiniciproducens* (Song et al. 2007). Curiosamente, em todas essas bactérias é destacado que em concentrações elevadas de CO_2 há uma maior produção de ácido succínico. Esse aumento observado é ocasionado principalmente pelo aumento da expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPkinase), que carboxila uma molécula de fosfoenolpiruvato à oxaloacetato, importante substrato da via fermentativa de ácido succínico destas bactérias (Figura 58). Em algumas linhagens geneticamente modificadas de *E. coli*, é observado também que o aumento na disponibilidade de dióxido de carbono ocasiona o aumento de oxaloacetato pela atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), resultando também em um aumento na produção final de ácido succínico (Wang et al. 2009)

Apesar de ambas as enzimas estarem ausentes no genoma de *P. acidipropionici*, o aumento da produção de ácido succínico em altas concentrações de CO_2 também poderia estar associado ao aumento da expressão e atividade de uma carboxilase (Figura 58). Nesse contexto, uma possibilidade é a de que a piruvato carboxilase poderia estar envolvida nesse processo, já que assimilaria também uma molécula de CO_2 e formaria oxaloacetato. A produção de ácido succínico em *P. acidipropionici* ocorre na via fermentativa do ácido propiônico em passos semelhantes ao observado nas bactérias anaeróbicas fixadoras de CO_2 anteriormente relatadas (Figura 58). Uma diferença crucial entre as duas vias fermentativas é que ocasiona a formação de ácido propiônico é a presença das duas enzimas bifuncionais a MMC e a Propionil-CoA:Succinato CoA transferase (Figura 58). É possível que um aumento da atividade da piruvato carboxilase ocasione uma competição com o complexo MMC pelo piruvato disponível. A menor disponibilidade de piruvato afetaria a atividade da MMC que diminuiria a concentração intracelular de propionil-CoA. A ausência na formação de propionil-CoA afetaria a segunda enzima bifuncional da via de *Wood-Werkman* (Propionil-CoA:Succinato CoA transferase), que diminuiria a conversão de succinato em succinil-CoA. Em resumo, a ausência de piruvato

disponível para a MMC poderia levar a um aumento na formação ácido succínico (succinato) por afetar o funcionamento das duas principais enzimas da via do ácido propiônico. Esse fenômeno pode ser visualizado também na diminuição da produção de ácido propiônico e propanol nas fermentações com alta concentração de espécies de CO₂, compostos dependentes das duas enzimas bidirecionais para sua formação (Figura 56 e 58). Ademais, é descrito que o aumento da produção de ácido succínico ocorre quando há uma inibição da enzima Propionil-CoA:Succinato CoA transferase, o que reforça a nossa hipótese (Buvkle 1984).

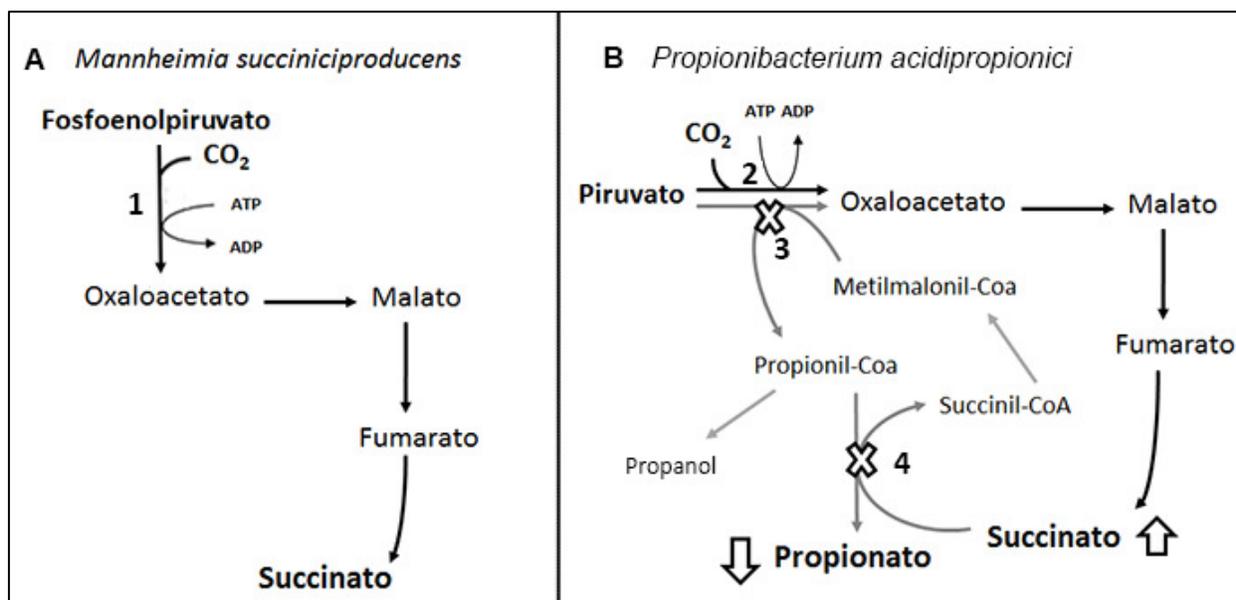


Figura 58 – Vias fermentativas que levam à produção de succinato/ácido succínico em *M. succiniproducens* e *P. acidipropionici*. **A.** Via fermentativa do succinato em *M. succiniproducens*. **B.** Via heterofermentativa do propionato/ Via de Wood-Werkman destacando-se os efeitos que o aumento da competição por piruvato poderia gerar na via fermentativa.

Entretanto, como ressaltado anteriormente, esse é um experimento prévio. As fermentações aqui apresentadas precisam ainda ser repetidas com triplicatas biológicas antes de serem realizadas discussões mais aprofundadas. Em adição, seria interessante realizar fermentações contendo diferentes concentrações do bicarbonato de sódio e também avaliar o comportamento fermentativo diante de outros tipos de bicarbonato. Outro teste de grande importância aqui não realizado é o crescimento de *P. acidipropionici* em altas concentrações de sódio. Através dos dados obtidos e relatados não podemos distinguir se o efeito visualizado foi ocasionado pelo aumento da disponibilidade de CO₂ ou pela alta concentração de sódio presente no ambiente, pois a alta concentração de bicarbonato de sódio também culminaria na elevada disponibilidade do mesmo.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de *P. acidipropionici* ser o primeiro microrganismo heterotrófico em que foi descrita a fixação de dióxido de carbono, pouco conhecimento havia sido gerado acerca dos mecanismos envolvidos neste fenômeno. O presente trabalho explorou diferentes aspectos da assimilação de CO₂ em *P. acidipropionici*, apresentando uma quantidade de dados relevantes e promissores que servem de base para estudos posteriores que visem explorar esse fenômeno em *Propionibacterium*.

Tendo identificado a enzima piruvato carboxilase no genoma de *P. acidipropionici*, o presente estudo focou na realização de experimentos que visaram caracterizar possíveis elementos envolvidos na fixação de CO₂, visualizar em quais condições ocorreria esse fenômeno e avaliar os efeitos de cofatores importantes envolvidos na fixação, como é o caso da biotina.

Análises do genoma e da expressão gênica indicaram que a piruvato carboxilase é potencialmente uma enzima envolvida na fixação de CO₂ em *P. acidipropionici*. Além de estar presente na via de produção de ácido propiônico, dados preliminares apontaram um aumento de sua expressão em bactérias cultivadas em glicerol como fonte única de carbono, condição em que foi descrita a assimilação de CO₂ e em que há uma maior produção desse ácido. Tais dados sugerem que essa enzima pode estar relacionada não só com assimilação de CO₂ como pode também ser uma das responsáveis pela maior produção de ácido propiônico, tornando-a um importante alvo biotecnológico. Com o desenvolvimento de técnicas de manipulação genética em propionibactérias, experimentos de deleção e superexpressão permitiriam a análise funcional dessa enzima e evidenciariam sua importância na fixação de CO₂ e produção de ácido propiônico. Ademais, é indispensável a validação por *RealTime-PCR* do resultado de expressão da piruvato carboxilase quanto dos demais genes aqui analisados, sendo certamente esse o nosso próximo passo.

Adicionalmente, análises complementares do genoma apontaram a ausência de genes envolvidos na síntese de biotina, importante cofator da piruvato carboxilase e outras carboxilases. A dependência por biotina foi visualizada tanto experimentalmente quanto por dados preliminares de expressão global, onde, genes envolvidos da obtenção dessa vitamina estão visivelmente expressos ao fim da fermentação, sugerindo uma carência por nutrientes nessa fase do crescimento bacteriano. Uma vez que a biotina é também um cofator de uma das principais enzimas do ciclo do ácido propiônico, novos experimentos visando a suplementação de biotina em biorreatores e até mesmo a inserção, no genoma de *P. acidipropionici*, dos genes ausentes da sua via de síntese, poderiam gerar resultados interessantes relacionados tanto ao metabolismo de fixação de CO₂ quanto na formação de ácido propiônico.

Uma vez visualizado que a piruvato carboxilase apresenta-se diferencialmente expressa em glicerol como fonte única de carbono, foram realizados experimentos tendo como objetivo analisar se o fenômeno de assimilação de CO₂ é restrito a essa fonte de carbono. Ao contrário da hipótese inicial, foi demonstrado que a fixação de dióxido de carbono ocorre em diferentes fontes de carbono, entre elas, o xarope de cana-de-açúcar e a xilose, importantes substratos para a indústria biotecnológica. Esse experimento evidenciou que o fenômeno é provavelmente recorrente em *P. acidipropionici* e estudos futuros em outras condições fermentativas poderiam explorar ainda mais a recorrência do fenômeno.

No mesmo experimento foi evidenciado que a fixação de CO₂ além de possivelmente recorrente é relevante no metabolismo da bactéria, já que os resultados obtidos mostraram que até 25% do ácido propiônico e 37% de ácido succínico apresentam pelo menos um carbono proveniente do dióxido de carbono. Nos próximos passos, é preciso investigar se essa alta proporção de CO₂ assimilado está diretamente relacionada a um ambiente rico em espécies de CO₂ ou ocorre também em outras condições, principalmente sem adições externas de CO₂.

Por fim, experimentos prévios demonstraram um acúmulo de ácido succínico em fermentações realizadas em um ambiente contendo altas concentrações de bicarbonato de sódio, fenômeno nunca antes descrito em propionibactérias. Experimentos adicionais são necessários para comprovar o ocorrido e, se comprovado, a assimilação de CO₂ pode também ser explorada visando a produção industrial desse ácido orgânico, também de grande importância para a indústria química.

Em suma, os dados gerados pelo presente trabalho sugerem que a assimilação de CO₂ em *P. acidipropionici* é um fenômeno de relevância no metabolismo e fisiologia desta bactéria e enfatiza a sua importância como uma importante plataforma industrial. Em um momento em que se busca por alternativas sustentáveis para a produção de compostos hoje provenientes do petróleo, a utilização de um microrganismo que converta fontes de energia renováveis como cana-de-açúcar e CO₂ em um produto de interesse industrial, tornam-se extremamente interessante e atraente do ponto de vista econômico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenore, S, C Molina-Jouve, S E Guillouet, J-L Uribelarrea, G Goma, and L Benbadis. 2002. "Improving Ethanol Production and Viability of *Saccharomyces Cerevisiae* by a Vitamin Feeding Strategy During Fed-Batch Process." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (1-2) (October): 67–72.
- Barbirato, F, D Chedaille, and A Bories. 1997. "Propionic Acid Fermentation from Glycerol: Comparison with Conventional Substrates." *Applied Microbiology and Biotechnology* 47 (4): 441–446.
- Beckett, Dorothy. 2007. "Biotin Sensing: Universal Influence of Biotin Status on Transcription." *Annual Review of Genetics* 41 (January): 443–64.
- Blankschien, M D, J M Clomburg, and R Gonzalez. 2010. "Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for the Production of Succinate from Glycerol." *Metabolic Engineering* 12 (5) (September): 409–419.
- Bower, S, J B Perkins, R R Yocum, C L Howitt, P Rahaim, and J Pero. 1996. "Cloning, Sequencing, and Characterization of the *Bacillus Subtilis* Biotin Biosynthetic Operon." *Journal of Bacteriology* 178 (14) (July): 4122–30.
- Boyaval, P., and C. Corre. 1995. "Production of Propionic Acid." *Le Lait* 75 (4-5): 453–461. doi:10.1051/lait:19954-535.
- Boyaval, P, C Corre, and M-N Madec. 1994. "Propionic Acid Production in a Membrane Bioreactor." *Enzyme and Microbial Technology* 16 (10) (October): 883–886.
- Brautaset, T, O M Jakobsen, K F Degnes, R Netzer et al 2010. "Bacillus Methanolicus Pyruvate Carboxylase and Homoserine Dehydrogenase I and II and Their Roles for L-Lysine Production from Methanol at 50°C." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (3): 951–964.
- Brewster, N K, D L Val, M E Walker, and J C Wallace. 1994. "Regulation of Pyruvate Carboxylase Isozyme (PYC1, PYC2) Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae* During Fermentative and Nonfermentative Growth." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 311 (1) (May 15): 62–71.
- Brüggemann, H, A Henne, F Hoster, H Liesegang, A Wiezer, A Strittmatter, S Hujer, P Dürre, and G Gottschalk. 2004. "The Complete Genome Sequence of *Propionibacterium Acnes*, a Commensal of Human Skin." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5684) (July 30): 671–3.

- Brune, I, S Götter, J Schneider, D Rodionov, and A Tauch. 2012. "Negative Transcriptional Control of Biotin Metabolism Genes by the TetR-Type Regulator BioQ in Biotin-Auxotrophic *Corynebacterium Glutamicum* ATCC 13032." *Journal of Biotechnology* 159 (3) (June 15): 225–34.
- Brzuszkiewicz, E, J Weiner, A Wollherr, Andrea Thürmer, Jennifer Hüpeden, Hans B Lomholt, Mogens Kilian, et al. 2011. "Comparative Genomics and Transcriptomics of *Propionibacterium Acnes*." *PloS One* 6 (6) (January): e21581.
- Cameron, D C, N E Altaras, M L Hoffman, and A J Shaw. 1998. "Metabolic Engineering of Propanediol Pathways." *Biotechnology Progress* 14 (1): 116–25. Carey, P R, F D Sönnichsen, and V C Yee. 2004. "Transcarboxylase: One of Nature's Early Nanomachines." *IUBMB Life* 56 (10) (October): 575–83.
- Carrondo, M J T, J.P.S.G. Crespo, and M J Moura. 1988. "Production of Propionic Acid Using a Xylose utilizing *Propionibacterium*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 17 (1-3): 295–312.
- Colomban, A, L Roger, and P Boyaval. 1993. "Production of Propionic Acid from Whey Permeate by Sequential Fermentation, Ultrafiltration, and Cell Recycling." *Biotechnology and Bioengineering* 42 (9) (November 5): 1091–8.
- Connor, M R, and S Atsumi. 2010. "Synthetic Biology Guides Biofuel Production." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010 (January).
- Coral, J, S G Karp, L P S Vandenberghe, J L Parada, A Pandey, and C R Soccol. 2008. "Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by *Propionibacterium Acidipropionici* in Different Carbon Sources." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151 (2-3) (December): 333–41.
- Dessinioti, C, and A D Katsambas. 2010. "The Role of *Propionibacterium Acnes* in Acne Pathogenesis: Facts and Controversies." *Clinics in Dermatology* 28 (1) (January): 2–7.
- Dherbécourt, J, M-B Maillard, D Catheline, and A Thierry. 2008. "Production of Branched-Chain Aroma Compounds by *Propionibacterium Freudenreichii*: Links with the Biosynthesis of Membrane Fatty Acids." *Journal of Applied Microbiology* 105 (4) (October): 977–85..
- Dietrich, C, A Nato, B Bost, P L Maréchal, and A Guyonvarch. 2009. "Regulation of Ldh Expression During Biotin-Limited Growth of *Corynebacterium Glutamicum*." *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 4) (April): 1360–75.
- Dodd, I B, and JB Egan. 1990. "Improved Detection of Helix-Turn-Helix DNA-Binding Motifs in Protein Sequences." *Nucleic Acids Research* 18 (17): 5019–5026.
- Doran, P. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press Limited.
- Eden, G, and G Fuchs. 1983. "Autotrophic CO₂ Fixation in *Acetobacterium Woodii*." *Archives of Microbiology* 135 (1): 68–73.
- Falentin, H, S-M Deutsch, G Jan, V Loux, A Thierry, S Parayre, et al. 2010. "The Complete Genome of *Propionibacterium Freudenreichii* CIRM-BIA1, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications." *PloS One* 5 (7) (January): e11748.
- Falkow, S, E Rosenberg, K-H Schleifer, and M Dworkin. 2006. *The Prokaryotes: Vol. 3: A Handbook on The Biology of Bacteria: Archaea; Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3rd ed.

- Fuchs, G. 2011. "Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life?" *Annual Review of Microbiology* 65 (January): 631–58.
- Gartland, K M A, F Bruschi, M Dunder, P B Gahan, M p Viola Magni, and Y Akbarova. 2013. "Progress Towards the 'Golden Age' of Biotechnology." *Current Opinion in Biotechnology* 24 Suppl 1 (July): S6–13.
- Geer, L Y, A Marchler-Bauer, R C Geer, L Han, J H, S He, C Liu, W Shi, and S H Bryant. 2010. "The NCBI BioSystems Database." *Nucleic Acids Research* 38 (Database issue) (January): D492–6.
- Gibson, D G, L Young, R-Y Chuang, J C Venter, C A Hutchison, and H O Smith. 2009. "Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases." *Nature Methods* 6 (5) (May): 343–5.
- Goldemberg, J. 2008. "The Brazilian Biofuels Industry." *Biotechnology for Biofuels* 1 (1) (January): 6.
- Goswami, V, and A K Srivastava. 2001. "Propionic Acid Production in an in Situ Cell Retention Bioreactor." *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (5-6) (September): 676–80.
- Gupta, M N, and S Raghava. 2007. "Relevance of Chemistry to White Biotechnology." *Chemistry Central Journal* 1 (January): 17.
- Han, S O, M Inui, and H Yukawa. 2007. "Expression of *Corynebacterium Glutamicum* Glycolytic Genes Varies with Carbon Source and Growth Phase." *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 7) (July): 2190–202.
- Hebbeln, P, D Rodionov, A Alfandega, and T Eitinger. 2007. "Biotin Uptake in Prokaryotes by Solute Transporters with an Optional ATP-Binding Cassette-Containing Module." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (8) (February 20): 2909–14.
- Huang, Y L, Z Wu, L Zhang, C M Cheung, and S-T Yang. 2002. "Production of Carboxylic Acids from Hydrolyzed Corn Meal by Immobilized Cell Fermentation in a Fibrous-Bed Bioreactor." *Bioresource Technology* 82 (1) (March): 51–59.
- Hunyadkürti, J, Z Feltóti, B Horváth, M Nagymihály, A Vörös, A McDowell, SPatrick, Edit Urbán, and István Nagy. 2011. "Complete Genome Sequence of *Propionibacterium Acnes* Type IB Strain 6609." *Journal of Bacteriology* 193 (17) (September): 4561–2. .
- Jackson, W R., and T J. Macek. 1944. "B Complex Vitamins in Sugar Cane and Sugar Cane Juice." *Industrial & Engineering Chemistry* 36 (3) (March): 261–263.
- Jan, G, P Leverrier, V Pichereau, and P Boyaval. 2001. "Changes in Protein Synthesis and Morphology During Acid Adaptation of *Propionibacterium Freudenreichii*." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5) (May): 29–36. Jin, Z, and S T Yang. 2008. "Extractive Fermentation for Enhanced Propionic Acid Production from Lactose by *Propionibacterium Acidipropionici*." *Biotechnology Progress* 14 (3): 457–65.
- Jitrapakdee, S, A Vidal-Puig, and J C Wallace. 2006. "Anaplerotic Roles of Pyruvate Carboxylase in Mammalian Tissues." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 63 (7-8) (April): 843–54..
- Jones, R T, and R S Talley. 1977. "Effects of Gaseous CO₂ and Bicarbonate on the Growth of Effects of Gaseous CO₂ and Bicarbonate on the Growth of *Neisseria Gonorrhoeae*" 5 (4).

- Jones, R P., and P I F. Greenfield. 1982a. "Effect of Carbon Dioxide on Yeast Growth and Fermentation." *Enzyme and Microbial Technology* 4 (4) (July): 210–223..
- Jore, J P, N van Luijk, R G Luiten, M J van der Werf, and P H Pouwels. 2001. "Efficient Transformation System for Propionibacterium Freudenreichii Based on a Novel Vector." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2) (February): 499–503.
- Karakashev, D, A Be Thomsen, and I Angelidaki. 2007. "Anaerobic Biotechnological Approaches for Production of Liquid Energy Carriers from Biomass." *Biotechnology Letters* 29 (7) (July): 1005–12.
- Keech, B, and M Utter. 1963. "Pyruvate Carboxylase: I. Nature of the Reaction." *J. Biol. Chem.* 238: 2603–2608.
- Kennedy, S, and O Nick. 2011. *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. Caister Academic Press.
- Kiatpapan, P, Y Hashimoto, H Nakamura, Y Z Piao, H Ono, M Yamashita, and Y Murooka. 2000. "Characterization of pRGO1, a Plasmid from Propionibacterium Acidipropionici, and Its Use for Development of a Host-Vector System in Propionibacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11) (November): 4688–95.
- Kiatpapan, P, and Y Murooka. 2002. "Genetic Manipulation System in Propionibacteria." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93 (1) (January): 1–8.
- Knowles, J R. 1989. "The Mechanism of Biotin-Dependent Enzymes." *Annual Review of Biochemistry* 58 (January): 195–221.
- Koffas, G. A. 1998. "Sequence of the Corynebacterium Glutamicum Pyruvate Carboxylase Gene." *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 346–352.
- Kondo, Hiroki, Yasuaki Kazuta, Akihiko Saito, and Ken-ichiro Fuji. 1997. "Cloning and Nucleotide Sequence of Bacillus Stearotherophilus Pyruvate Carboxylase." *Gene* 191 (1) (May 20): 47–50.
- Kumar, S, and B V Babu. 2006. "A Brief Review on Propionic Acid : A Renewal Energy Source." *Proceedings of National Conference on Environmental Conservation* 4: 459–464.
- Langmead, B, C Trapnell, M Pop, and S L Salzberg. 2009. "Ultrafast and Memory-Efficient Alignment of Short DNA Sequences to the Human Genome." *Genome Biology* 10 (3) (January): R25.
- Langsrud, T., and G.W. Reinbold. 1973. "Flavor Development and Microbiology of Swiss Cheese. A Review III." *Journal of Milk and Food Technology* 36: 593–609.
- Lee, Sang Y, S H Hong, S H Lee, and S J Park. 2004. "Fermentative Production of Chemicals That Can Be Used for Polymer Synthesis." *Macromolecular Bioscience* 4 (3) (March 15): 157–64.
- Leonardi, R, Y-M Zhang, C O Rock, and S Jackowski. 2005. "Coenzyme A: Back in Action." *Progress in Lipid Research* 44 (2-3): 125–53.
- Lewis, V P, and S T Yang. 1992. "Continuous Propionic Acid Fermentation by Immobilized Propionibacterium Acidipropionici in a Novel Packed-Bed Bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* 40 (4) (August 5): 465–74.

- Lietzan, A D, Ann L Menefee, Tonya N Zeczycki, Sudhanshu Kumar, Paul V Attwood, John C Wallace, W Wallace Cleland, and Martin St Maurice. 2011. "Interaction Between the Biotin Carboxyl Carrier Domain and the Biotin Carboxylase Domain in Pyruvate Carboxylase from *Rhizobium Etli*." *Biochemistry* 50 (45) (November 15): 9708–23.
- Lin, S, Ryan E Hanson, and J E Cronan. 2010. "Biotin Synthesis Begins by Hijacking the Fatty Acid Synthetic Pathway." *Nat Chem Biol* 6 (9) (September): 682–688.
- Liu, L, Y Zhu, J Li, M Wang, P Lee, G Du, and J Chen. 2012. "Microbial Production of Propionic Acid from Propionibacteria: Current State, Challenges and Perspectives." *Critical Reviews in Biotechnology* 32 (4) (December): 374–81..
- Liu, R, L Liang, M Wu, K Chen, M Jiang, J Ma, P Wei, and P Ouyang. 2013. "CO₂ Fixation for Succinic Acid Production by Engineered *Escherichia Coli* Co-Expressing Pyruvate Carboxylase and Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase." *Biochemical Engineering Journal* 79 (October): 77–83..
- López, J A., J M. Naranjo, J C. Higueta, M A. Cubitto, C A. Cardona, and M A. Villar. 2012. "Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus Megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17 (2) (April 3): 250–258.
- Modak, H V, and D J Kelly. 1995. "Acetyl-CoA-Dependent Pyruvate Carboxylase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter Capsulatus*: Rapid and Efficient Purification Using Dye-Ligand Affinity Chromatography." *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 1 (October): 2619–28.
- Mordarska, H, and M Paściak. 1994. "A Simple Method for Differentiation of *Propionibacterium Acnes* and *Propionibacterium Propionicum*." *FEMS Microbiology Letters* 123 (3) (November 1): 325–9.
- Mortazavi, A, B A Williams, K McCue, L Schaeffer, and B Wold. 2008. "Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by RNA-Seq." *Nature Methods* 5 (7) (July): 621–8.
- Nevoigt, Elke. 2008. "Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 72 (3) (September): 379–412. doi:10.1128/MMBR.00025-07.
- "OPEC Outlook." 2012. *World Oil Outlook*.
- Ördögh, L, and J Hunyai. 2013. "Complete Genome Sequence of *Propionibacterium Avidum* Strain 44067, Isolated from a Human Skin Abscess." *Genome Announc.* 1 (3): 5–6.
- Owen, O E, S C Kalhan, and R W Hanson. 2002. "The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (34) (August 23): 30409–12.
- Parizzi, L P, M C B Grassi, L Llerena, M F Carazzolle, V L Queiroz, I Lunardi, A F Zeidler, et al. 2012. "The Genome Sequence of *Propionibacterium Acidipropionici* Provides Insights into Its Biotechnological and Industrial Potential." *BMC Genomics* 13 (January): 562.
- Paściak, M, O Holst, B Lindner, H Mordarska, and A Gamian. 2003. "Novel Bacterial Polar Lipids Containing Ether-Linked Alkyl Chains, the Structures and Biological Properties of the Four Major Glycolipids from *Propionibacterium Propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T)." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (6) (February 7): 3948–56.
- Payne, J. 1969. "Pyruvate Carboxylase in *Rhodospseudomonas Spheroides*": 97–101.

- Petersen, S, A A de Graaf, L Eggeling, M Möllney, W Wiechert, and H Sahm. 2000. "In Vivo Quantification of Parallel and Bidirectional Fluxes in the Anaplerosis of *Corynebacterium Glutamicum*." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (46) (November 17): 35932–41.
- Peters-Wendisch, P. G., C Kreutzer, J Kalinowski, M Patek, H Sahm, and B. J. Eikmanns. 1998. "Pyruvate Carboxylase from *Corynebacterium Glutamicum*: Characterization, Expression and Inactivation of the Pyc Gene." *Microbiology* 144 (4) (April 1): 915–927.
- Playne, Mmoo-Young M. 1985. "Propionic and Butyric Acids." In *Comprehensive Biotechnology*, 731–759. New York: Pergamon.
- Polyak, S W, A D Abell, M C J Wilce, L Zhang, and G W Booker. 2012. "Structure, Function and Selective Inhibition of Bacterial Acetyl-Coa Carboxylase." *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (3):
- Quesada-Chanto, A., J. P. C. L. Da Costa, M. M. Silveira, A. G. Schroeder, A. C. Schmid-Meyer, and R. Jonas. 1998. "Influence of Different Vitamin-Nitrogen Sources on Cell Growth and Propionic Acid Production from Sucrose by *Propionibacterium Shermanii*." *Acta Biotechnologica* 18 (3): 267–274.
- Quevillon, E, V Silventoinen, S Pillai, N Harte, N Mulder, R Apweiler, and R Lopez. 2005. "InterProScan: Protein Domains Identifier." *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server issue) (July 1): W116–20.
- Ragauskas, A J, C K Williams, B H Davison, G Britovsek, J Cairney, C A Eckert, W J Frederick, et al. 2006. "The Path Forward for Biofuels and Biomaterials." *Science (New York, N.Y.)* 311 (5760) (January 27): 484–9.
- Rodionov, D a. 2007. "Comparative Genomic Reconstruction of Transcriptional Regulatory Networks in Bacteria." *Chemical Reviews* 107 (8) (August): 3467–97.
- Rodionov, D, and M S Gelfand. 2006. "Computational Identification of BioR, a Transcriptional Regulator of Biotin Metabolism in Alphaproteobacteria, and of Its Binding Signal." *FEMS Microbiology Letters* 255 (1) (February): 102–7..
- Rodionov, D, A Mironov, and M S Gelfand. 2002. "Conservation of the Biotin Regulon and the BirA Regulatory Signal in Eubacteria and Archaea." *Genome Research* 12 (10) (October): 1507–16.
- Saini, R, R Kapoor, Rita Kumar, T O Siddiqi, and A Kumar. 2011. "CO₂ Utilizing Microbes--a Comprehensive Review." *Biotechnology Advances* 29 (6): 949–60.
- Samuelov, N S, R Lamed, S Lowe, and J G Zeikus. 1991. "Influence of CO₂-HCO₃ Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum Succiniciproducens*." *Applied and Environmental Microbiology* 57 (10) (October): 3013–9.
- Sauer, U, and B J Eikmanns. 2005. "The PEP-Pyruvate-Oxaloacetate Node as the Switch Point for Carbon Flux Distribution in Bacteria." *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4) (September):
- Schneider, J, P Peters-Wendisch, K C Stansen, S Götter, S Maximow, R Krämer, and V F Wendisch. 2012. "Characterization of the Biotin Uptake System Encoded by the Biotin-Inducible bioYMN Operon of *Corynebacterium Glutamicum*." *BMC Microbiology* 12 (1) (January):
- Schulz, A, C Vogt, and H-Hermann Richnow. 2012. "Effects of High CO₂ Concentrations on Ecophysiologicaly Different Microorganisms." *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 169 (October): 27–34.

- Siu, P M, and H G Wood. 1962. "Phosphoenolpyruvic Carboxytransphosphorylase, a CO₂ Fixation Enzyme from Propionic Acid Bacteria." *The Journal of Biological Chemistry* 237 (October): 3044–51.
- Sneath, P, N. S. Mair, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Vol. 2.* Williams & Wilkins, Baltimore.
- Song, Hyohak, Jeong Wook Lee, Sol Choi, Jong Kyun You, and Won Hi Hong. 2007. "Effects of Dissolved CO₂ Levels on the Growth of Mannheimia Succiniciproducens and Succinic Acid Production" *Journal of Microbiology and Biotechnology* 98 (6): 1296–1304.
- Stephanopoulos, Gregory. 2007. "Challenges in Engineering Microbes for Biofuels Production." *Science (New York, N.Y.)* 315 (5813) (February 9): 801–4. doi:10.1126/science.1139612.
- Streit, W R, and P Entcheva. 2003. "Biotin in Microbes, the Genes Involved in Its Biosynthesis, Its Biochemical Role and Perspectives for Biotechnological Production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 61 (1) (March): 21–31..
- Suwannakham, S, and -T Yang. 2005. "Enhanced Propionic Acid Fermentation by Propionibacterium Acidipropionici Mutant Obtained by Adaptation in a Fibrous-Bed Bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* 91 (3) (August 5): 325–37.
- Swick, R., and H. G. Wood. 1960. "The Role of Transcarboxylation in Propionic Acid Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 46 (1): 28–41.
- Talley, R S, and C L Baugh. 1975. "Effects of Bicarbonate on Growth of Neisseria Gonorrhoeae: Replacement of Gaseous CO₂ Atmosphere." *Applied Microbiology* 29 (4) (April): 469–71.
- Toh, Hiroyuki, H Kondo, and T Tanabe. 1993. "Molecular Evolution of Biotin-Dependent Carboxylases." *European Journal of Biochemistry* 215 (3) (August): 687–696.
- Wang, Dan, Q Li, W Li, J Xing, and Z Su. 2009. "Improvement of Succinate Production by Overexpression of a Cyanobacterial Carbonic Anhydrase in Escherichia Coli." *Enzyme and Microbial Technology* 45 (6-7) (December): 491–497.
- Willard, J M., J J. Davis, and H G Wood. 1969. "Phosphoenolpyruvate Carboxytransphosphorylase. IV. Requirement for Metal Cations." *Biochemistry* 8 (8) (August): 3137–3144.
- Wood, H G. 1979. "The Anatomy of Transcarboxylase and the Role of Its Subunits." *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 7 (2) (December): 143–160.
- Wood, H G, and C H Werkman. 1936. "The Utilisation of CO₂ in the Dissimilation of Glycerol by the Propionic Acid Bacteria." *The Biochemical Journal* 30 (1) (January): 48–53.
- Wood, H. G., and R. Stjernholm. 1961. "Transcarboxylase, II. Purification and Properties of Methylmalonyl-Oxaloacetic Transcarboxylase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47 (3): 289–303.
- Wood, H. G., C. H. Werkman, Allan Hemingway, and Nier A. O. 1941. "Heavy Carbon As Tracer In Heterotrophic Carbon Dioxide Assimilation." *J. Biol. Chem.* 139: 365–376.
- Xi, Y, K Chen, J Li, X Fang, X Zheng, S Sui, M Jiang, and P Wei. 2011. "Optimization of Culture Conditions in CO₂ Fixation for Succinic Acid Production Using Actinobacillus Succinogenes." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (9) (September): 1605–12..

- Xiang, S, and L Tong. 2008. "Crystal Structures of Human and Staphylococcus Aureus Pyruvate Carboxylase and Molecular Insights into the Carboxyltransfer Reaction." *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (3) (March): 295–302.
- Yu, J-H, Z Hamari, K-H Han, J-A Seo, Y Reyes-Domínguez, and C Scazzocchio. 2004. "Double-Joint PCR: a PCR-Based Molecular Tool for Gene Manipulations in Filamentous Fungi." *Fungal Genetics and Biology* 41 (11) (November): 973–981..
- Zempleni, J, S S K Wijeratne, and Yousef I Hassan. 2009. "Biotin." *BioFactors (Oxford, England)* 35 (1): 36–46.
- Zou, W, L-W Zhu, H-M Li, and Y-J Tang. 2011. "Significance of CO₂ Donor on the Production of Succinic Acid by *Actinobacillus Succinogenes* ATCC 55618." *Microbial Cell Factories* 10 (January): 87.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Estudo do metabolismo de CO₂ em *Propionibacterium acidipropionici* visando o aumento no rendimento da produção de ácido propiônico":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(x) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2011/03, Instituição: Universidade Estadual de Campinas

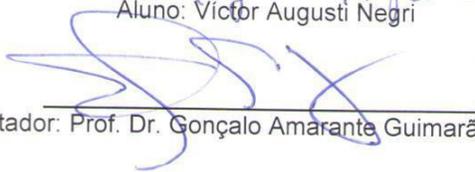
() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Victor Augusti Negri



Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura