

MARIA CAROLINA DE BARROS GRASSI

“ESTUDO GENÉTICO E METABÓLICO DA BACTÉRIA

Propionibacterium acidipropionici”

CAMPINAS,
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIA CAROLINA DE BARROS GRASSI

“ESTUDO GENÉTICO E METABÓLICO DA BACTÉRIA

***Propionibacterium acidipropionici*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da ~~tese defendida pelo(a) candidato (a)~~
MARIA CAROLINA DE BARROS GRASSI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética de
Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Co-Orientadora: Dra. Johana Rincones Perez

**CAMPINAS,
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G769e Grassi, Maria Carolina de Barros, 1984-
Estudo genético e metabólico da bactéria
Propionibacterium acidipropionici / Maria Carolina de
Barros Grassi. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. *Propionibacterium*. 2. Genoma. 3.
Transformação genética. 4. Ácido propiônico. 5. 1-
Propanol. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães,
1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Genetic and metabolic study of *Propionibacterium acidipropionici*

Palavras-chave em Inglês:

Propionibacterium

Genome

Genetic transformation

Propionic acid

1-Propanol

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Marcelo Brocchi

Wellington Luiz de Araújo

Gabriel Padilha

Marcelo Menossi Teixeira

Data da defesa: 30-11-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

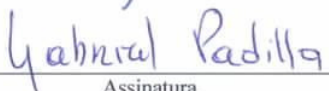
Campinas, 30 de Novembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)


Assinatura

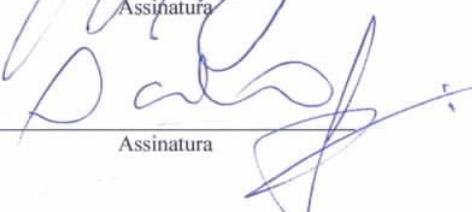
Prof. Dr. Gabriel Padilla


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira


Assinatura

Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof. Dr. Elisabete José Vicente

Assinatura

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Assinatura

Para a minha mãe, por todo apoio, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela sua orientação e ensinamentos e por todo meu desenvolvimento profissional. Agradeço à minha co-orientadora, Johana Ricones Perez, pela contribuição para o desenvolvimento e para a qualidade desse trabalho.

Um dos aspectos mais agradáveis e importantes desse trabalho foi a possibilidade de colaborar com diferentes pesquisadores de diversas áreas do conhecimento. Por isso, eu agradeço a todos os autores que colaboraram com os artigos e patente que fazem parte dessa tese, à Inês Lunardi pelo apoio e desenvolvimento do biorreator elétrico e ao Lucas P. Parizzi pela ajuda nas análises de bioinformática. Todas essas colaborações foram responsáveis, em grande parte, pela qualidade desse estudo.

Aos membros da pré-banca e banca examinadora, prof. Dr. Gabriel Padilla, prof. Dr. Marcelo Brocchi, prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, prof. Dr. Welington Luiz de Araújo, prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck, Profa. Dra. Elisabete José Vicente e prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, obrigada pela participação, contribuições e discussão.

A todos os meus amigos do Laboratório de Genômica e Expressão, em especial, a Ane, Luige, Marcelo Bassalo, Victor Negri, Beatriz L. Magalhães, Dayanne Castro e Marcelo Carazzolle, muito obrigada por todo o aprendizado, discussões, ajudas e pela amizade e horas de diversão.

À Eliane, obrigada por toda ajuda nos mais diversos assuntos.

Aos meus colegas da Braskem pelas sugestões, discussões, amizade e apoio.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial a Camila, Marilene, Verônica e Thatila, pelo apoio e incentivo.

À minha família pela paciência, pelo amor e por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês! Ao Mathias e ao Haroldo, por todo carinho, afeto e pela ajuda no desenvolvimento e na conclusão desse trabalho. Vocês são muito importantes para mim!

À Braskem e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

**“Learn from yesterday, live for today, hope
for tomorrow. The important thing is not to stop
questioning”**

Albert Einstein

RESUMO

Os problemas geopolíticos, econômicos e ambientais relacionados ao petróleo, impulsionam a busca por tecnologias alternativas para a substituição de matrizes energéticas e produção de compostos de origem petroquímica. Surge, portanto, a demanda por microrganismos capazes de produzir, com alto rendimento e produtividade, cadeias carbônicas reduzidas precursoras de polímeros químicos. Nesse contexto, destacam-se bactérias do gênero *Propionibacterium*, um microrganismo robusto e produtor de grandes quantidades de ácido propiônico, potencial precursor de compostos químicos de interesse industrial. O objetivo do presente trabalho foi o estudo genético e metabólico da bactéria *Propionibacterium acidipropionici*, visando estabelecer bases para a engenharia metabólica desse microrganismo. O sequenciamento e análise do genoma de *P. acidipropionici* revelaram características que enfatizam o uso dessa bactéria como uma plataforma para a produção de *commodities* químicas: diversas vias para utilização de matérias-primas renováveis, habilidade de fixar CO₂ e robustez. Adicionalmente, foram desenvolvidas ferramentas, como plasmídeos e um método de transformação, para manipulação genética de propionibactérias. Utilizando um biorreator acoplado a processos eletroquímicos e uma linhagem de propionibactéria manipulada geneticamente foram obtidos resultados promissores no desenvolvimento de uma via fermentativa para a produção de n-propanol, um álcool com alta demanda mundial. Os resultados aqui reportados sobre a análise genômica de *P. acidipropionici* e sobre a engenharia metabólica para produção de n-propanol, enfatizam o potencial de propionibactérias para produção de *commodities* químicas a partir de fontes renováveis de carbono.

ABSTRACT

The geopolitical, economical and environmental problems related to petroleum triggered the development of new technologies for replacing energetic sources and for producing petrochemical compounds from renewable sources. In this context, microorganisms able to produce reduced carbon chains with high yield and high productivity have received special attention in the biotechnology field. Among these microorganisms, the propionibacteria are a promising candidate because of their robustness and the production of large amounts of propionic acid, a precursor to other compounds of industrial interest. The main goal of this work was the genetic and metabolic study of *Propionibacterium acidipropionici*, aiming to establish the molecular basis for metabolic engineering. The sequencing and analysis of the genome of *P. acidipropionici* showed features that highlight the potential of this bacterium as a platform for the production of chemical commodities: many metabolic pathways to degrade renewable sources, the ability to fix CO₂, robustness and unraveled the metabolic pathway to produce propionic acid. Moreover genetic tools such as plasmids and a method for the genetic manipulation of propionibacteria were developed. Promising results of a fermentative pathway for n-propanol production were obtained using a bioreactor supported by electrochemical system and a propionibacterium strain genetically manipulated. The results presented here, on the genomic analysis of *P. acidipropionici* and metabolic engineering for n-propanol production, emphasize the potential of propionibacteria to produce chemical commodities from renewable sources.

SUMÁRIO

Introdução

Contextualização do projeto	12
Propionibactéria e a produção fermentativa de ácido propiônico	16
Genética de Propionibactéria	20
Objetivos	22
Referências bibliográficas	23

Capítulo 1 – Sequenciamento do genoma de *Propionibacterium acidipropionici*

Resumo	30
The genome sequence of <i>Propionibacterium acidipropionici</i> provides insights into its biotechnological and industrial potential	31

Capítulo 2 – Engenharia metabólica de *Propionibacterium acidipropionici* para produção de n-propanol

Introdução	52
Materiais e Métodos	58
Resultados e Discussão	74
Referências bibliográficas	91

Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	95
---	-----------

Apêndice I	99
-------------------	-----------

Apêndice II	109
--------------------	------------

Anexo I	111
----------------	------------

INTRODUÇÃO GERAL

Contextualização do projeto

A percepção de que o petróleo, um dos recursos naturais de uso mais ubíquo na sociedade atual, poderia esgotar-se, acentuou-se com a crise do petróleo na década de 1970 (Ragauskas *et al.*, 2006). Entretanto, a descoberta de novas jazidas de petróleo com potencial para alta produtividade fez com que a incerteza sobre a disponibilidade de petróleo desse lugar aos problemas geopolíticos e macroeconômicos relacionados ao seu uso (Ragauskas *et al.*, 2006; Madsen, 2007). O craqueamento do petróleo para produção de diferentes *commodities* petroquímicas e a sua utilização como combustível resultam na liberação de grandes quantidades de dióxido de carbono na atmosfera, anteriormente aprisionado no solo na forma de hidrocarbonetos. As diversas pesquisas sobre as consequências do aumento nos níveis de gás carbônico atmosférico sugerem que tais mudanças podem ter consequências desastrosas para o ambiente (Madsen, 2007 e Forsberg, 2008). O destaque mundial para este tema pode ser observado pelos numerosos estudos sobre os possíveis impactos ambientais relacionados ao aquecimento global (Meinshausen *et al.*, 2009; Solomon *et al.*, 2009; Florides & Christodoulides, 2009) e à ênfase na substituição de matrizes energéticas (Lund, 2007; Goldemberg, 2007; Escobar *et al.*, 2009). Outro exemplo da relevância dessa questão é a concessão do Prêmio Nobel da Paz de 2007 para o ex-vice-presidente americano Al Gore e para o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), que chamaram atenção para o problema do aquecimento global em resposta as emissões de gás carbônico por combustíveis fósseis (http://nobelprize.org/nobel_prizes/peace/laureates/2007/).

Perante essas questões tornam-se cada vez mais frequentes estudos para o desenvolvimento de tecnologias que permitam o uso de recursos naturais

renováveis para a obtenção de energia e de compostos químicos hoje derivados de combustíveis fósseis. Na última década foram desenvolvidas diversas tecnologias para a substituição de matrizes energéticas e para a produção de monômeros petroquímicos por vias alternativas, especialmente vias biológicas (Karakashev *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; Cameron *et al.*, 1998). Entre essas estratégias encontram-se aquelas que exploram processos fermentativos de microrganismos para a conversão de biomassa em compostos químicos utilizáveis na indústria (Field *et al.*, 2007). É possível destacar duas vias distintas para a obtenção desses compostos. A primeira é o uso de compostos naturalmente produzidos por microorganismos. Um exemplo, atual é a tecnologia para a obtenção de biopolímeros, como o poli-hidroxibutirato biodegradável (PHB). O PHB é obtido a partir da fermentação de glicose por algumas espécies de procariotos, como *Alcaligenes eutrophus* ou *Bacillus megaterium* (Sudesh *et al.*, 2000; Khanna & Srivastava, 2005; Biebl, 2001). Contudo, apesar da vantagem por ser uma via de produção que utiliza recursos renováveis, produtos como o PHB enfrentam resistências de natureza tecnológica, que refletem na incerteza dos investimentos para a sua produção. As principais limitações ao uso do PHB estão relacionadas à incerteza sobre a qualidade dos polímeros produzidos e da capacidade de processamento dos mesmos quando comparados aos produtos obtidos pela via de produção petroquímica (Khanna & Srivastava, 2005; Choi & Lee, 1997). Além disso, muitos argumentam que a biodegradação implica no retorno do CO₂ capturado no processo para a atmosfera, o que não é desejável.

O segundo caminho para obtenção de polímeros por vias biológicas é o desenvolvimento, por meio de manipulação genética, de microrganismos capazes de produzir os mesmos produtos obtidos pelas vias petroquímicas. De fato, a fermentação etanólica por leveduras já tem sido utilizada para a produção

de plásticos (Rincones *et al.*, 2009). O etanol produzido por vias biológicas é quimicamente desidratado a etileno e as moléculas deste composto são polimerizadas, gerando o que tem sido denominado de polietileno verde (Rincones *et al.*, 2009). Ao contrário de produtos como o PHB, o polietileno verde é química e fisicamente igual ao polietileno petroquímico. Embora não seja biodegradável, pode ser reciclado e resulta de matéria-prima renovável e dessa maneira também possui apelo ambiental. É estimado que a produção de uma tonelada de polietileno verde remove até 2,5 toneladas de dióxido de carbono, enquanto a produção por vias petroquímicas tradicionais resultam na emissão de 3,5 toneladas desse gás (Rincones *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novas tecnologias utilizando fontes renováveis para a produção de compostos químicos requer grande investimento em pesquisa para que as vias alternativas de produção se equiparem em custo e produtividade as vias tradicionais. Com base nos modelos citados acima e, sabendo dos desafios tecnológicos e econômicos existentes, os padrões a serem seguidos são dois dos processos fermentativos melhor estabelecidos industrialmente: a fermentação etanólica por leveduras (Wheals *et al.*, 1999) e a fermentação láctica por bactérias (Datta & Henry, 2006). A fermentação industrial etanólica consiste em um processo simples e rápido (6 a 10 horas) de fermentação em batelada utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sacarose da cana de açúcar (Carlson, 2007; Cunha *et al.*, 2006). Esse processo tem uma série de parâmetros altamente desejáveis para a aplicação em outras fermentações como, por exemplo, o fato de ser realizado em reatores abertos e sem controle atmosférico o que reduz os custos do processo fermentativo. Além disso, a fermentação por *S. cerevisiae* não necessita de grandes cuidados com esterilização, uma vez que a levedura produz o álcool rapidamente em grandes quantidades, controlando muitos dos contaminantes e mantendo-os em níveis não prejudiciais

ao processo (Laluce, 1991). Por fim, embora a fermentação seja um processo anaeróbico, a anaerobiose é naturalmente controlada pelo sistema de regulação gênica da levedura, que detecta a presença de açúcares fermentáveis no meio, e reprime a respiração e os genes responsáveis por produzir as enzimas necessárias para uso de outras fontes de carbono (Westergaard *et al.*, 2007).

Assim como a fermentação etanólica, a fermentação láctica também é um processo simples, com duração de 2 a 4 dias e utiliza microrganismos homoláticos (por exemplo, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus*, *L. leichmanii* e *Aspergillus niger*) em processo anaeróbico de batelada ou batelada alimentada para a produção de ácido láctico com altos rendimentos (Data & Henry, 2006). Entretanto, apesar de serem processos fermentativos simples e bem estabelecidos, tanto a fermentação etanólica quanto a fermentação láctica apresentam limitações. No caso da fermentação etanólica, a descarboxilação do piruvato a acetaldeído para formação de etanol reduz consideravelmente o rendimento, em carbono, do produto final (rendimento máximo teórico de etanol a partir de glicose – 55%; produtividade ~ 8g/L.h; Goldemberg & Macedo, 1994; Argueso *et al.*, 2009). A fermentação láctica, por outro lado, apresenta altos rendimentos (rendimento máximo teórico de ácido láctico a partir de glicose – 100%; produtividade ~ 2g/L.h; Ding & Tan, 2006), mas sua utilização para produção de cadeias carbônicas reduzidas, tais como hidrocarbonetos de interesse industrial, torna-se mais difícil e custosa uma vez que o ácido láctico é um composto com baixo grau de redução.

É neste contexto que surge a demanda por novos microrganismos robustos capazes de produzir, com alto rendimento e produtividades próximas às fermentações láctica e etanólica, cadeias carbônicas reduzidas para a produção de polímeros. Uma possibilidade é a busca por organismos que produzam naturalmente compostos intermediários para produção de *commodities* químicas.

Nessas buscas, destacam-se bactérias do gênero *propionibacterium* para o desenvolvimento de processos biotecnológicos, um microrganismo robusto e produtor de grandes quantidades de ácido propiônico, um possível precursor do álcool n-propanol utilizado em diversas aplicações industriais.

Propionibactéria e a produção fermentativa de ácido propiônico

Propionibactérias são bactérias gram-positivas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, não-móveis. As colônias podem ter coloração bege, vermelha, laranja ou marrom. Pertencem a classe actinobactérias e apresentam alto conteúdo GC em seu DNA, variando de 53 a 67% (Cummins e Johnson, 1986). As espécies do gênero *Propionibacterium* podem ser divididas em dois grandes grupos: propionibactérias lácteas e propionibactérias cultâneas. Propionibactérias lácteas podem ser encontradas em queijo, solo, esgoto, lodo e frutas podres (Vorobjeva, 1999). Já as propionibactérias cultâneas são espécies patogênicas que podem ser isoladas da pele humana, trato genital e fezes (Vorobjeva, 1999).

Propionibactérias apresentam grande importância em diversos processos industriais, sendo utilizadas para a produção de vitamina B12, compostos tetrapirrólicos (Murooka *et al.*, 2005; Yongsmith, *et al.*, 1982), ácido propiônico (Boyaval & Corre, 1995; Suwannakham & Yang, 2005), como cultura probiótica (Mantere-Alhonen, 1995) e na fabricação de queijo Suíço (Langsrud & Reinbold, 1973; Thierry *et al.*, 2005). Dentre as aplicações industriais citadas acima, muito vem sendo estudado sobre a produção heterofermentativa de ácido propiônico, inclusive em escala semi-industrial (10 m³; Zhu *et al.*, 2010).

O ácido propiônico é um ácido carboxílico com fórmula CH₃CH₂COOH. Em estado puro é um líquido incolor, corrosivo, com ponto de ebulição a 141°C e apresenta um odor tipicamente rançoso, forte e desagradável (Kumar & Babu,

2006; Bizzari & Gluber, 2004). Ocorre naturalmente na forma de ésteres presentes em óleos essenciais e em mamíferos como um metabólito intermediário (Bizzari & Gluber, 2004). Devido a suas propriedades químicas e físicas, o ácido propiônico apresenta inúmeras aplicações nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Seus sais, tais como propionato de sódio, cálcio e potássio são utilizados como conservantes em alimentos industrializados. Além disso, este ácido é um importante intermediário químico, sendo amplamente utilizado na produção de polímeros de celulose, herbicidas, perfumes e flavorizantes (Kumar & Babu, 2006). Ademais, o ácido propiônico por ser um composto de 3 carbonos com um grau de redução menor que o ácido láctico, pode ser convertido mais facilmente em compostos reduzidos produzidos originalmente por vias petroquímicas, tais como ácido acrílico, iso/n-propanol e propeno. Como consequência de suas diversas aplicações industriais, a demanda mundial de ácido propiônico foi estimada no ano de 2009 em 293,4 mil toneladas, representando um mercado de, aproximadamente, 530 milhões de dólares com um crescimento esperado de 3,9% até 2014 (Bizzari & Gluber, 2004).

O ácido propiônico comercializado é produzido quimicamente a partir de compostos petroquímicos, como, por exemplo, a partir da oxidação do propano, propionaldeído e propanol (Playne, 1985; Gu *et al.*, 1998). Entretanto, devido a questões ambientais, à probabilidade de escassez e à flutuação do preço do petróleo, inúmeros estudos estão sendo desenvolvidos visando à produção de ácido propiônico a partir da fermentação de fontes renováveis de energia por bactérias do gênero de *Propionibacterium* e *Propionispira*. As bactérias do gênero *Propionibacterium*, *P. acidipropionici* (Barbirato *et al.*, 1997, Suwannakham & Yang, 2005, Coral *et al.*, 2008), *P. shermanii* (Nanba *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1986), *P. freudenreichii* (Balamurugan *et al.*, 1999), e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (Himmi *et al.*, 2000) já são amplamente estudadas para a produção de ácido

propiónico. Entre as propionibactérias, *P. acidipropionici* é apontada como a espécie mais promissora para o desenvolvimento da produção industrial desse ácido (Colomban *et al.*1993). Nessas bactérias o ácido propiónico é produzido a partir da via heterofermentativa, conhecida como ciclo de Wood-Werkman ou ciclo dos ácido dicarboxílicos, com acetato, succinato e dióxido de carbono como subprodutos (Figura 1).

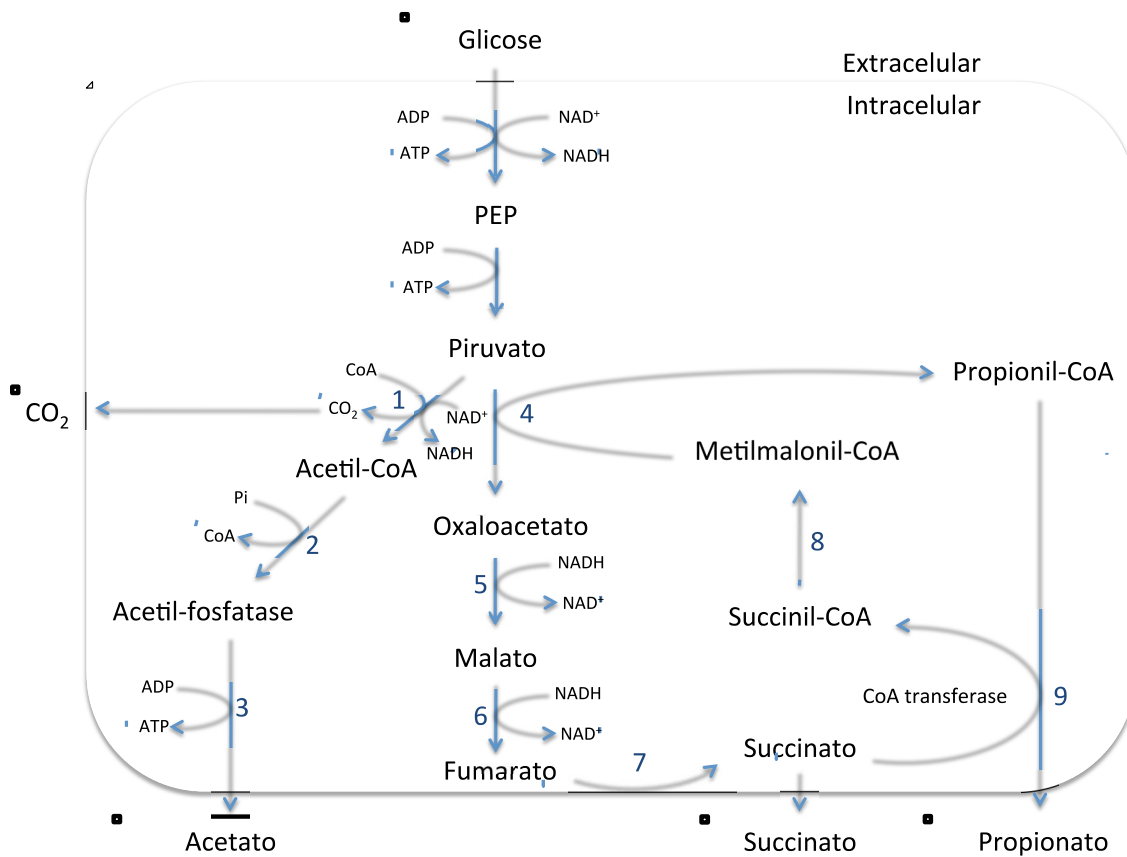


Figura 1: Via heterofermentativa dos ácidos dicarboxílicos, ou ciclo de Wood-Werkman, em *Propionibacteria*. Os números representam as enzimas que catalisam as reações correspondentes: 1. Complexo piruvato desidrogenase; 2. Fosfotransacetilase; 3. Acetato quinase; 4. Oxalacetato transcarboxilase; 5. Malato desidrogenase; 6. Fumarase; 7. Succinato desidrogenase; 8. Metilmalonil isomerase; 9. Coa transferase. (Figura adaptada da tese de doutorado de Zhang, 2009).

No entanto, como a maioria dos processos fermentativos para a produção de ácidos orgânicos, a fermentação convencional de ácido propiónico apresenta

um baixo rendimento, baixa produtividade e uma baixa concentração final do ácido, devido principalmente, a uma forte inibição do processo pelos produtos finais (Blanc & Gona, 1987; Goswami & Srivastava, 2001), inviabilizando sua produção em larga escala para fins comerciais. Logo, muitos dos esforços são direcionados para a otimização da produção de ácido propiônico por propionibacteria. Na tabela 1 estão descritos alguns resultados obtidos em estudos de fermentação utilizando *P. acidipropionici*, diferentes fontes de carbono e diferentes processos fermentativos.

Tabela 1: Resumo de resultados obtidos em estudos sobre a produção fermentativa de ácido propiônico por *P. acidipropionici*. Y: rendimento; P: produtividade.

Microorganismo	Fonte de carbono	Processo fermentativo	Y (g/g)	P (g/L.h)	Referência
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 4875)	glicose	Fermentação em batelada com células imobilizadas	0,40-0,65	0,230	Suwannakham <i>et al.</i> , 2005
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 4875) <i>knockout</i> para o gene acetato quinase	glicose	Fermentação em batelada com células imobilizadas	0,54	0,410	Zhang <i>et al.</i> , 2009
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 2562)	glicerol	Fermentação em batelada	0,70	0,180	Barbirato <i>et al.</i> , 1997
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 4965)	Glicerol e glicose (4/1 mol/mol)	Fermentação em batelada	0,57	0,152	Liu <i>et al.</i> , 2011
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 4965)	Lactato	Fermentação em batelada	0,44	0,113	Coral <i>et al.</i> , 2008
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 4965)	Melaço de cana de açúcar	Fermentação em batelada	0,55	0,052	Coral <i>et al.</i> , 2008
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 4875)	Xilose	Fermentação em batelada	0,44	0,182	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 4875)	Arabinose	Fermentação em batelada	0,46	0,115	Liu <i>et al.</i> , 2012

Melhores rendimentos foram reportados utilizando fontes de carbono

mais reduzidas, como o glicerol e maior produtividade foi alcançada utilizando células imobilizadas, fato provavelmente relacionado à maior tolerância ao ácido propiônico por bactérias cultivadas nessas condições. Ademais, a utilização de substratos baratos e renováveis como melaço de cana de açúcar, xilose e a arabinose enfatizam o potencial desse microrganismo para uso como plataforma biológica.

Com base nos estudos aqui citados, nota-se que a produção de ácido propiônico por *P. acidipropionici* a partir da fermentação de fontes renováveis de carbonos apresenta potencial para satisfazer a demanda mundial deste composto. Contudo, os valores de produtividade e à inibição da fermentação pelo produto final inviabilizam, economicamente, a utilização desse processo fermentativo em escala industrial, pelo menos até o presente momento. Sendo assim, além de estudos visando otimizar o rendimento e a produtividade do processo fermentativo em escala industrial, é fundamental a análise genética e metabólica deste organismo com a finalidade de desenvolver linhagens altamente produtoras e tolerantes aos produtos finais.

Genética de Propionibactéria

Embora diversos estudos demonstrem a importância industrial e o potencial de propionibactérias para a produção de ácido propiônico, pouco se conhece sobre a genética e o metabolismo deste organismo (Kiatpapan *et al.*, 2000). O estabelecimento de ferramentas para manipulação genética de propionibactéria encontra-se em estágio inicial. Entretanto, características como a parede celular, o alto conteúdo G+C (53-68%) (Sneath *et al.*, 1986), e o forte sistema de restrição encontrado nestas bactérias (Kiatpapan *et al.*, 2000) dificultam esse processo. Conseqüentemente, o desenvolvimento de mutantes *knockout*, *knockdown*, a superexpressão de genes e seu estudo funcional têm sido

pouco explorados.

Apesar das dificuldades em trabalhar com esses microorganismos, estudos tem sido desenvolvidos e alguns avanços já foram obtidos. Até o presente momento, os estudos genéticos concentraram-se, em sua maioria, na espécie patogênica *P. acnes* (Holger *et al.*, 2004) e nas espécies *P. freudenreichii* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (Kiatpapan & Murooka, 2001, Kiatpapan & Murooka, 2002, Jore *et al.*, 2001) as quais são utilizadas para a produção de queijo suíço. *P. acnes* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* já tiveram seus genomas seqüenciados (Holger *et al.*, 2004; Falentin *et al.* 2010) e estão disponíveis em bancos de dados públicos.

Em 1990, Rehberger & Glatz descreveram e caracterizaram alguns plasmídeos de propionibactéria com a finalidade de utilizá-los como uma plataforma para manipulação genética. Utilizando esses plasmídeos como base e visando alterações genéticas e metabólicas em propionibactérias, Kiatpapan e colaboradores (2000) e Jore e colaboradores (2001) descreveram a construção de vetores capazes de se replicarem em propionibactérias e em *E. coli*. Jore e colaboradores (2001), utilizando esses vetores, transformaram com eficiência de 10^7 transformantes/ μg de DNA a espécie *P. freudenreichii*. Já Gautier e colaboradores (1995) reportaram a transformação de *P. freudenreichii* com alta eficiência, 7×10^5 transformantes/ μg de DNA, a partir de eletrotransfecção. Recentemente, Faye e colaboradores (2008) desenvolveram o vetor pTD210 para análises *in vivo* de elementos promotores em *P. freudenreichii*, elemento essencial para expressão heteróloga e estudo funcional de genes.

Em 2008, Cheong e colaboradores testaram diversos parâmetros para aumentar a eficiência de transformação de *P. acnes* por eletroporação. Dentre os parâmetros testados, dois apresentaram-se crucial para a transformação desta espécie: a linhagem de *E.coli* utilizada para replicar o plasmídeo e a temperatura

de cultivo das células eletrocompetentes. Maior eficiência de transformação foi obtida utilizando plasmídeos isolados de linhagens de *E. coli dam-* e *dcm-*, provavelmente devido ao não reconhecimento do plasmídeo pelo sistema de restrição metil-dependente de *P. acnes*. O cultivo de células de *P. acnes* a 24°C possivelmente diminui as atividades de endonucleases que reconhecem e degradam DNA exógeno.

Alguns estudos sobre o perfil proteico e de expressão gênica de propionibactérias em determinadas condições já foram realizados e podem contribuir com dados sobre genes e enzimas relacionados à produção fermentativa de ácido propiônico. No entanto, esses estudos focam a produção do queijo suíço por *P. freudenreichii* (Dalmasso *et al.*, 2012) e investigam os fatores de patogenicidades de *P. acnes* (Holland *et al.*, 2010; Brzuszkiewicz *et al.*, 2011).

Apesar dos avanços obtidos nos estudos genéticos de propionibactérias, são poucas as informações sobre *P. acidipropionici*, a espécie com maior potencial para a produção de compostos de 3 carbonos, principalmente ácido propiônico. Nesse sentido, o sequenciamento do genoma e o estabelecimento de ferramentas para manipulação genética dessa espécie são de grande importância. Esses estudos permitirão a compreensão de seu metabolismo e funcionarão como base para o desenvolvimento da engenharia metabólica, visando seu uso em diversas aplicações industriais.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo genético e metabólico da bactéria *P. acidipropionici*, visando, principalmente, a identificação das bases moleculares desse organismo e das principais vias metabólicas. Ademais, esse trabalho teve como objetivo específico o desenvolvimento de ferramentas para manipulações genéticas de propionibactérias e o

estabelecimento de uma via metabólica para a produção de n-propanol, composto de interesse industrial com diversas aplicações. Sendo assim, no capítulo 1 são apresentados os resultados obtidos com o sequenciamento do genoma de *P. acidipropionici* e no capítulo 2 são descritas as ferramentas desenvolvidas para manipulação genética e a engenharia metabólica de propionibactéria para produção de n-propanol.

Referências Bibliográficas

Anderson TM, Bodie EA, Goodman N, Schwartz RD: **Inhibitory effect of autoclaving whey-based medium on propionic acid production by *Propionibacterium shermanii*.** *Applied and Environmental Microbiology* 1986, **51**:427-428.

Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski P a, Duarte FM, Netto OVC, Missawa SK, Galzerani F, Costa GGL, Vidal RO, Noronha MF, Dominska M, Andrietta MGS, Andrietta SR, Cunha AF, Gomes LH, Tavares FC a, Alcarde AR, Dietrich FS, McCusker JH, Petes TD, Pereira G a G: **Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production.** *Genome research* 2009, **19**:2258-70.

Balamurugan K, Venkata Dasu V, Panda T: **Propionic acid production by whole cells of *Propionibacterium freudenreichii*.** *Bioprocess Engineering* 1999, **20**:109-116.

Barbirato F, Chedaille D, Bories A: **Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997, **47**:441-446.

Biebl H: **Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies.** *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology* 2001, **27**:18-26.

Bizzari SN, Gubler R: **Propionic acid.** *Chemical Economics handbook* 2004:1-29.

Blanc P, Goma G: **Kinetics of inhibition in propionic acid fermentation.** *Bioprocess Engineering* 1987, **2**:175-179.

Boyaval P, Corre C: **Production of propionic acid.** *Lait* 1995, **75**:453-461.

Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, Hujer S, Dürre P, Gottschalk G: **The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin.** *Science (New York, N.Y.)* 2004, **305**:671-3.

Brzuszkiewicz E, Weiner J, Wollherr A, Thürmer A, Hüpeden J, Lomholt HB, Kilian M, Gottschalk G, Daniel R, Mollenkopf H-J, Meyer TF, Brüggemann H: **Comparative genomics and transcriptomics of *Propionibacterium acnes*.** *PloS one* 2011, **6**:e21581.

Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ: **Metabolic engineering of propanediol pathways.** *Biotechnology Progress* 1998, **14**:116-125.

Carlson R: **Laying the foundations for a bio-economy.** *System and Synthetic Biology* 2007, **1**:109-117.

Cheong D-E, Lee H-I, So J-S: **Optimization of electrotransformation conditions for *Propionibacterium acnes*.** *Journal of microbiological methods* 2008, **72**:38-41.

Choi JI, Lee SY: **Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation.** *Bioprocess Engineering* 1997, **17**:335-342.

Colomban A, Roger L, Boyaval P: **Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling.** *Biotechnology and bioengineering* 1993, **42**:1091-8.

Coral J, Karp SG, Porto de Souza Vandenberghe L, Parada JL, Pandey A, Soccol CR: **Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources.** *Applied biochemistry and biotechnology* 2008, **151**:333-41.

Cunha AF, Missawa SK, Pereira GAG: **Industrial potential of yeast biotechnology in the production of bioethanol in Brazil: the example of conditional flocculation.** Em *Industrial Perspectives for Bioethanol*. Editado por Franco TT. São Paulo: Instituto Uniem; 2006:61-76.

Cummins CS, Johnson JL: **Genus *Propionibacterium*.** In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2ª edição. Editado por Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Baltimore: The Williams & Willkins; 1986: 1346-1353.

Dalmasso M, Aubert J, Briard-Bion V, Chuat V, Deutsch S-M, Even S, Falentin H, Jan G, Jardin J, Maillard M-B, Parayre S, Piot M, Tanskanen J, Thierry A: **A temporal-omic study of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1 adaptation strategies in conditions mimicking cheese ripening in the cold.** *PloS one* 2012, **7**:e29083.

Datta R, Henry M: **Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006, **81**:1119-1129.

Ding S, Tan T: **L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies.** *Process Biochemistry* 2006, **41**:1451-1454.

Escobar JC, Lora ES, Venturinia OJ, Yáñezb EE, Castilloc EF, Almazand O: **Biofuels: Environment, technology and food security.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2009, **13**:1257-1287.

Falentin H, Deutsch S-M, Jan G, Loux V, Thierry A, Parayre S, Maillard M-B, Dherbécourt J, Cousin FJ, Jardin J, Siguier P, Couloux A, Barbe V, Vacherie B, Wincker P, Gibrat J-F, Gaillardin C, Lortal S: **The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications.** *PloS one* 2010, **5**:e11748.

Faye T, Asebø A, Salehian Z, Langsrud T, Nes IF, Brede DA, Åsebø A, Icrobiol APPLNM: **Construction of a reporter vector system for in vivo analysis of promoter activity in *Propionibacterium freudenreichii***. *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**:3615–7.

Field CB, Campbell JE, Lobell DB: **Biomass energy: the scale of the potential resource**. *Trends in Ecology and Evolution* 2007, **23**:65-72.

Florides GA, Christodoulides P: **Global warming and carbon dioxide through sciences**. *Environment International* 2009, **35**:390-401.

Forsberg CW: **Sustainability by combining nuclear, fossil, and renewable energy sources**. *Progress in Nuclear Energy* 2009, **51**:192-200.

Gautier M, Rouault A, Lemee R: **Electrotransfection of**. *Applied Microbiology* 1995:125–129.

Goldemberg, J: **Ethanol for a sustainable energy future**. *Science* 2007, **315**:808-810.

Goldemberg J, Macedo IC: **Brazilian alcohol program: an overview**. *Energy for Sustainable Development* 1994, **1**:17–22.

Goswami V, Srivastava AK: **Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001, **56**:676–680.

Gu Z, Glatz B a., Glatz CE: **Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation**. *Enzyme and Microbial Technology* 1998, **22**:13–18.

Himmi EH, Bories A, Boussaid A, Hassani L: **Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii***. *Applied microbiology and biotechnology* 2000, **53**:435–40.

Holland C, Mak TN, Zimny-Arndt U, Schmid M, Meyer TF, Jungblut PR, Brüggemann H: **Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes***. *BMC microbiology* 2010, **10**:230.

Jore JPM: **Efficient Transformation System for *Propionibacterium freudenreichii* based on a Novel Vector**. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, **67**:499–503.

Karakashev D, Thomsen AB, Angelidaki I: **Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass**. *Biotechnology Letters* 2007, **29**:1005-1012.

Khanna S, Srivastava AK: **Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates**. *Process Biochemistry* 2005, **40**:607-619.

Kiatpapan P, Hashimoto Y, Piao Y, Ono H, Yamashita M: **Characterization of pRGO1 , a plasmid from *Propionibacterium acidipropionici* , and its use for development of a host-vector system in propionibacteria**. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**: 4688–4695.

- Kiatpapan P, Murooka Y: **Construction of an expression vector for propionibacteria and its use in production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium freudenreichii***. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 2001, **56**:144–149.
- Kiatpapan P, Murooka Y: **Genetic manipulation system in propionibacteria**. *Journal of bioscience and bioengineering* 2002, **93**:1–8.
- Kumar S, Babu BV: **A Brief Review on Propionic Acid: A Renewal Energy Source**. *Environmental Engineering* 2006, **4**:459–464.
- Laluce C: **Current Aspects of Fuel Ethanol-Production in Brazil**. *Critical Reviews in Biotechnology* 1991, **11**:149-161.
- Langsrud T, Reinbold GW: **Flavor development and microbiology of Swiss cheese. A review III**. *Journal of Milk and Food Technology* 1973, **36**:593-609.
- Lee SY, Hong SH, Lee SH, Park SJ: **Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis**. *Macromolecular Bioscience* 2004, **4**:157-164.
- Liu Y, Zhang Y-G, Zhang R-B, Zhang F, Zhu J: **Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici***. *Current microbiology* 2011, **62**:152–8.
- Liu Z, Ma C, Gao C, Xu P: **Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici***. *Bioresource technology* 2012, **114**:711–4.
- Lund H: **Renewable energy strategies for sustainable development**. *Energy* 2007, **32**:912-919.
- Madsen, M: **The role of biomass in the future global energy supply**. *The 20th World Energy Congress: 11-15 de Novembro de 2007; Itália*. [http://vbn.aau.dk/fbspretrieve/14071392/MichaelMadsen WEC Youth Programme paper.pdf] (Último acesso Out 2012).
- Mantere-Alhonen S: **Propionibacteria used as probiotics – A review**. *Lait* 1995, **75**:447-452.
- Meinshausen M, Meinshausen N, Hare W, Raper SCB, Frieler K, Knutti R, Frame DJ, Allen MR: **Greenhouse-gas emission targets for limiting global warming to 2°C**. *Nature* 2008, **458**:1158-1162.
- Murooka Y, Piao Y, Kiatpapan P, Yamashita M: **Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of *Propionibacterium freudenreichii***. *An overview*. *Lait* 2005, **85**:9-22
- Nanba A, Nukuda R, Nagai S: **Inhibition by acetic and propionic acid of the growth of *Propionibacterium shermanii***. *Journal of Fermentation Technology* 1983, **61**:551-556.
- Playne MJ: **Propionic and butyric acid**. Em *Comprehensive biotechnology*. Volume 3. New York: Pergamon; 1985:731-755.

Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick Jr WJ, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T: **The path forward for biofuels and biomaterials.** *Science* 2006, **311**: 484.

Rehberger TG, Glatz B a: **Characterization of *Propionibacterium* plasmids.** *Applied and environmental microbiology* 1990, **56**:864–71.

Rincones J, Zeidler AF, Grassi MCB, Carazzolle MF, Pereira GAG: **The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics.** *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 2009, **49**:85–106.

Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.

Solomon S, Plattnerb G, Knutti R, Friedlingstein P: **Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions.** *PNAS* 2009, **106**:1704-1709.

Sudesh K, Abe H, Doi Y: **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters.** *Progress in Polymer Science* 2000, **25**:1503-1555.

Suwannakham S, Yang S-T: **Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor.** *Biotechnology and bioengineering* 2005, **91**:325–37.

The Nobel Foundation: The Nobel Peace Prize 2007. [http://nobelprize.org/nobel_prizes/peace/laureates/2007/index.html] (Último acesso Out. 2012)

Thierry A, Maillard M, Richoux R, Kerjean J, Lortal S: ***Propionibacterium ferudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese.** *Lait* 2005, **85**: 57-74.

Vorobjeva LI: *Propionibacteria*. Springer; 1999, **1**:291.

Westergaard SL, Oliveira AP, Bro C, Olsson L, Nielsen J: **A systems biology approach to study glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology and Bioengineering* 2007, **96**:134-145.

Wheals AE, Basso LC, Alves DMG, Amorim HV: **Fuel ethanol after 25 years.** *Trends in Biotechnology* 1999, **17**:482-487.

Zhang A: **Metabolic Engineering and Process Development for Enhanced Propionic acid Production by *Propionibacterium acidipropionici*.** Tese de doutorado. Ohio State University; 2009.

Zhu Y, Li J, Tan M, Liu L, Jiang L, Sun J, Lee P, Du G, Chen J: **Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source.** *Bioresource technology* 2010, **101**:8902–6.

CAPÍTULO 1

Sequenciamento do genoma de *Propionibacterium acidipropionici*

RESUMO

A manipulação genética de microrganismos para a produção de compostos de interesse industrial frequentemente esbarra em um problema básico: a falta do conhecimento necessário para obtenção de um perfil molecular do microrganismo. A identificação dos genes e vias metabólicas do microrganismo é um passo essencial para que saibamos os melhores caminhos para a manipulação genética, garantindo alcançar alta produtividade e rendimento do produto de interesse. Tendo em vista o potencial de *Propionibacterium acidipropionici* como biorreator para produção de commodities químicas foi realizado o sequenciamento completo do genoma desse microrganismo com o objetivo de desvendar e compreender as suas bases moleculares. Nesse capítulo são apresentados os dados do sequenciamento genômico de *P. acidipropionici* obtidos utilizando as plataforma 454 Life Science e Illumina/Solexa. A montagem do genoma de *P. acidipropionici* resultou em um cromossomo circular de 3.656.170 bp com conteúdo GC de 68,8%, e um plasmídeo de 6.868 bp. Foram identificados 3.336 genes que codificam para proteínas, aproximadamente 1000 a mais do que encontrado nas espécies *Propionibacterium freudenreichii* e *Propionibacterium acnes*. Dentre os genes identificados podem ser destacados aqueles envolvidos com a adaptação às diferentes condições ambientais, com a manutenção da integridade do genoma (sistema CRISPR/Cas), com o metabolismo fermentativo de ácido propiônico e com a fixação de CO₂. Os dados obtidos nesse trabalho indicam que *P. acidipropionici* tem diversas características requeridas para a utilização como uma plataforma para a produção de compostos de interesse industrial como ácido propiônico e n-propanol.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential

Lucas P Parizzi^{1,2†}, Maria Carolina B Grassi^{1,2†}, Luige A Llerena¹, Marcelo F Carazzolle¹, Verônica L Queiroz², Inês Lunardi², Ane F Zeidler², Paulo JPL Teixeira¹, Piotr Mieczkowski³, Johana Rincones² and Gonçalo AG Pereira^{1*}

Abstract

Background: Synthetic biology allows the development of new biochemical pathways for the production of chemicals from renewable sources. One major challenge is the identification of suitable microorganisms to hold these pathways with sufficient robustness and high yield. In this work we analyzed the genome of the propionic acid producer Actinobacteria *Propionibacterium acidipropionici* (ATCC 4875).

Results: The assembled *P. acidipropionici* genome has 3,656,170 base pairs (bp) with 68.8% G + C content and a low-copy plasmid of 6,868 bp. We identified 3,336 protein coding genes, approximately 1000 more than *P. freudenreichii* and *P. acnes*, with an increase in the number of genes putatively involved in maintenance of genome integrity, as well as the presence of an invertase and genes putatively involved in carbon catabolite repression. In addition, we made an experimental confirmation of the ability of *P. acidipropionici* to fix CO₂, but no phosphoenolpyruvate carboxylase coding gene was found in the genome. Instead, we identified the pyruvate carboxylase gene and confirmed the presence of the corresponding enzyme in proteome analysis as a potential candidate for this activity. Similarly, the phosphate acetyltransferase and acetate kinase genes, which are considered responsible for acetate formation, were not present in the genome. In *P. acidipropionici*, a similar function seems to be performed by an ADP forming acetate-CoA ligase gene and its corresponding enzyme was confirmed in the proteome analysis.

Conclusions: Our data shows that *P. acidipropionici* has several of the desired features that are required to become a platform for the production of chemical commodities: multiple pathways for efficient feedstock utilization, ability to fix CO₂, robustness, and efficient production of propionic acid, a potential precursor for valuable 3-carbon compounds.

Keywords: Genome, *Propionibacterium acidipropionici*, Propionic acid, Biotechnology

Background

A major challenge of white (industrial) biotechnology is the production with high yield of reduced carbon chains able to replace fossil hydrocarbons. Two examples of well-established processes able to produce high volumes of useful carbon chains are ethanol fermentation by yeast and lactate fermentation by lactic acid bacteria.

Ethanol is used mainly as a biofuel and more recently as a substrate in polyethylene production [1]. Lactic acid is used mainly in the food industry, but is currently employed as the building block for the biodegradable plastic polylactic acid (PLA) [1].

Though economically viable, both processes have weaknesses. Ethanol production has a low carbon recovery (51% w/w) due to the decarboxylation of pyruvate being a mandatory step for ethanol formation. Carbon recovery in lactate fermentation is much higher (100% w/w from glucose); however lactic acid has a high oxygen content, which makes its conversion into other

* Correspondence: goncalo@unicamp.br

†Equal contributors

¹Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

industrially relevant 3-carbon molecules difficult. For that reason, it is important to search for new fermenting organisms capable of producing reduced carbon chains with higher efficiency in carbon recovery.

In this context, *Propionibacterium acidipropionici* is a good candidate to be developed for biotechnological processes (Figure 1). *P. acidipropionici* has been widely studied for the heterofermentative production of propionic acid, including fermentation on a semi-industrial scale (10 m^3) [2]. Propionic acid is more reduced than lactic acid and can be produced with higher yields than ethanol in yeast: a yield of 0.65 g/g of propionic acid was obtained from glucose [3], 0.72 g/g from glycerol and 0.55 g/g from molasses [4]. Propionic acid and its salts are valuable industrial products with several applications such as mold-inhibitors, preservatives for animal and human food, fruit flavorings, essence base, additives in cellulosic plastics, herbicides and medications for animal therapy [5]. Annual world consumption of propionic acid was estimated at 293.4 thousand tonnes in 2009, representing a market of approximately 530 million dollars with an expected growth rate of 3.9% until 2014 [6].

Propionibacterium are classified under the high GC division (class Actinobacteria) of bacteria and are overall characterized as Gram-positive, rod-like, pleomorphic, non-spore-forming, non-motile and facultative anaerobic or aerotolerant bacteria. These bacteria are further classified into two groups: cutaneous, found on different areas of human skin; and dairy, isolated mainly from cheese and milk. *P. acidipropionici* is classified in the dairy group. Although differentiated by their typical natural habitats, all species of *Propionibacterium* produce propionic acid as the major fermentative product, with acetic acid and carbon dioxide as the main subproducts [7].

It is noteworthy that even after 100 years of accumulated research on propionibacteria, propionic acid is still produced via petrochemical routes and no industrial biotechnology process for these organisms has been established. The main hindrances have been low productivity,

low final product concentration, slow growth, high end-product inhibition, and costly downstream separation from sub products [8,9]. To improve propionic acid fermentation by *P. acidipropionici* it is necessary to obtain more detailed information about the organism's basic biology, especially its molecular biology with only a few studies focusing on the genetics of *P. acidipropionici* [10-12].

Consequently, in this work the molecular biology of *P. acidipropionici* was investigated mainly through genome sequencing and its comparative analysis with three close related and fully sequenced bacteria species. Experimental confirmation of key pathways were performed by a preliminary proteome analysis, fermentation tests with and without 2-Deoxy-D-Glucose and/or C^{13} flux analysis of C^{13}O_2 supplemented fermentation. We identified physiological and metabolic traits that characterize *P. acidipropionici* as a bioreactor for the production of C3 compounds and discuss the possibility of genetically modifying this species to convert propionic acid into more valuable products such as propionaldehyde, n-propanol, acrylic acid and propylene.

Results and discussion

General genome features

The genome of *P. acidipropionici* comprises a circular chromosome of 3,656,170 base pairs (bp) with 68.8% GC content and a low-copy plasmid of 6,868 bp with 65.4% GC content. The chromosome contains 3,336 protein coding sequences (CDSs) with an average length of 967.5 bp, 53 tRNAs and four 16S-23S-5S rRNA operons, accounting for 88.8% of genomic DNA. Putative functions were assigned to 2,285 (68.5%) of the CDSs, while 556 (16.7%) were classified as conserved hypothetical and 495 (14.8%) had no significant similarity with data in the public databases (e-value $>1\text{E}-10$) (Table 1).

Preliminary proteomic analysis of *P. acidipropionici* growing on different carbon sources allowed the identification of 649 (19.5%) of the CDSs (Methods; Additional

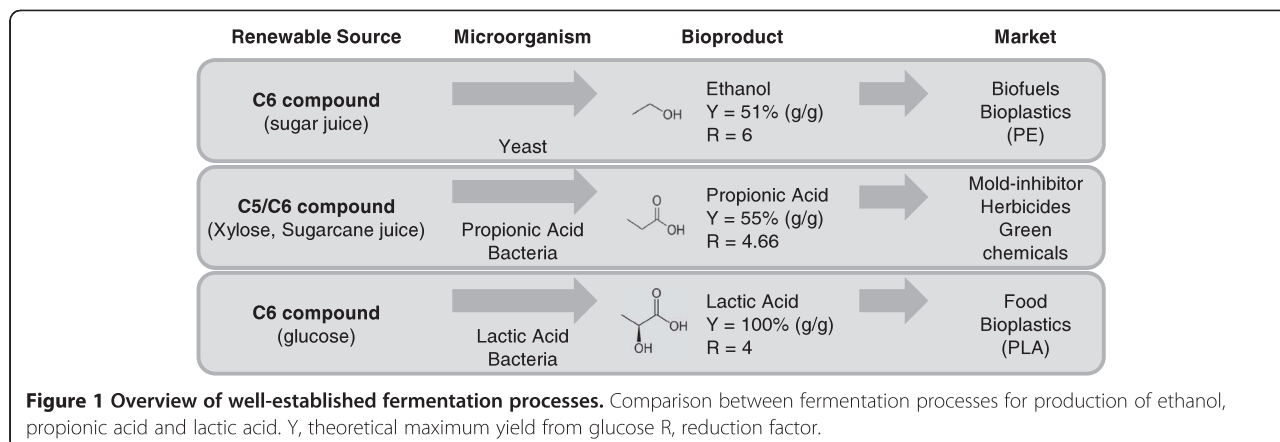


Table 1 General features of *P. acidipropionici* genome

	Chromosome	pRGO1
Length (bp)	~3,656,170	6,868
Copy number	1	~7.4
Coding content (%)	88.8	50.5
G + C content of total genome (%)	68.8	65.4
G + C content of coding regions (%)	69.0	70.8
G + C content of non-coding regions (%)	66.9	59.7
rRNA	4 X (16S-23S-5S)	0
Pseudogenes	32	0
Genes	3389	8
tRNAs	53	0
Protein Coding (CDS)	3336	8
conserved with assigned function	2285 (68.5%)	5
conserved with unknown function	556 (16.7%)	0
Nonconserved	495 (14.8%)	3
Average CDS length (bp)	967.5	519.4

file 1). The assembled plasmid matched exactly the previously sequenced pRGO1 [13] from *P. acidipropionici* and pLME106 from *P. jensenii* [14]. The number of plasmid copies per cell was estimated to be 7.4 based upon relative read coverage. We identified one new CDS [Genbank:AB007909.1; 1292–1552] in the plasmid coding for an 87 amino acid peptide similar to an InterPro family of proteins putatively involved in plasmid stabilization [InterPro: IPR007712]. This peptide sequence may be useful for the development of *P. acidipropionici* vectors, a fundamental molecular biology tool for the biotechnological use of any organism.

Comparative analysis

The genome of *P. acidipropionici*, a species that can live in several environments such as soil, rumen and cheese, was compared with the genomes of three closely related species, but with different habitats and ecology: (i) *P. acnes* [GenBank: NC_006085.1], a major inhabitant of human skin and considered to be an opportunistic pathogen that has been associated with acne vulgaris [15]; (ii) *P. freudenreichii* subs. *shermanii* CIRM-BIA1^T [GenBank: FN806773.1] which has known use in cheese manufacture and, more recently, as a probiotic [16]; and

(iii) *Microbacterium phosphovorius* [GenBank: NC_015635.1], a species that belongs to the same family (*Propionibacteriaceae*), which is found in soil and has been isolated from activated sludge by its ability to accumulate polyphosphate and polyhydroxyalkanoates (PHA) [17]. The general features of these genomes are summarized in Table 2.

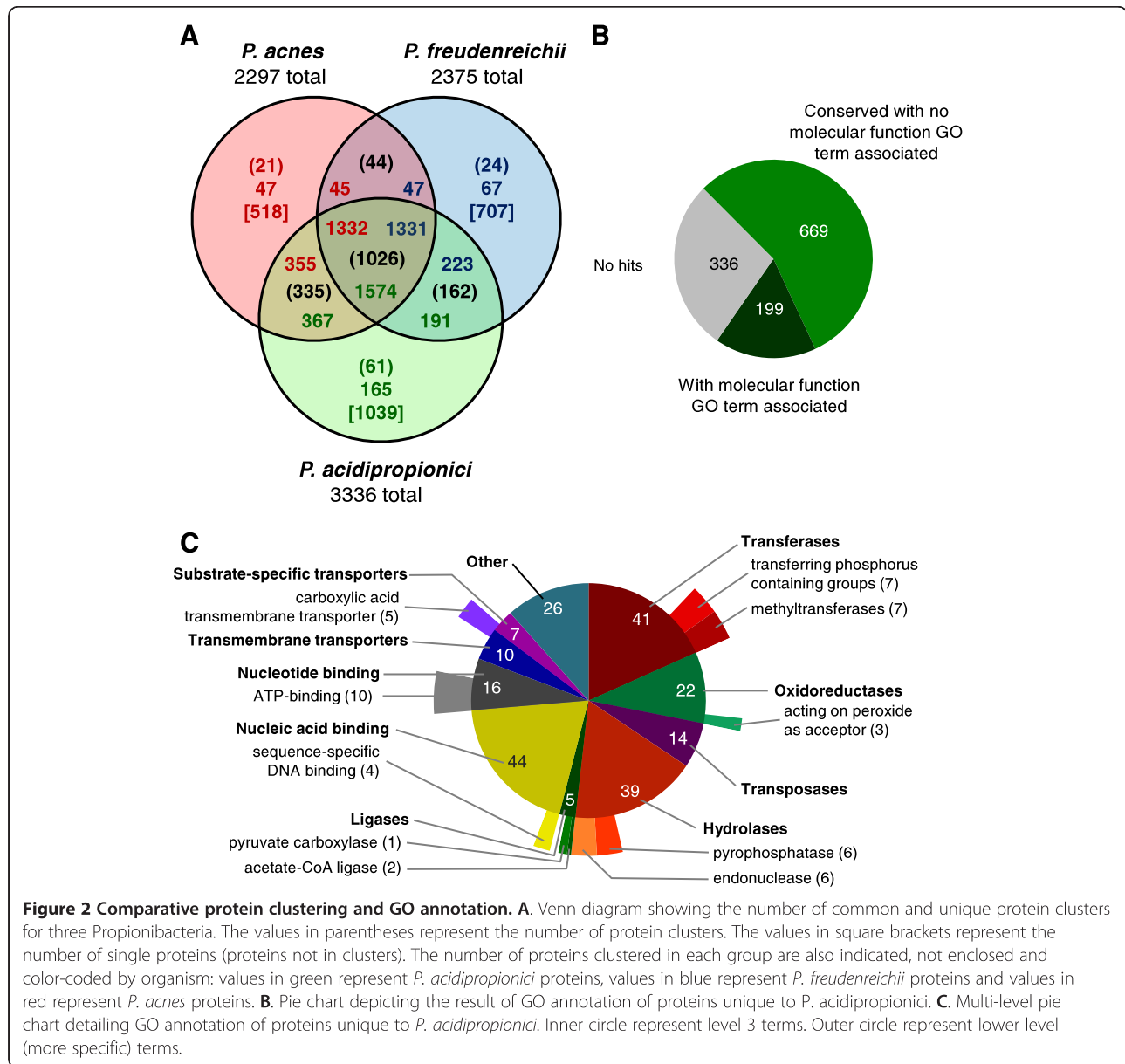
Clustering of all proteins encoded by these four bacteria resulted in 6469 families. From the total proteins encoded by *P. acidipropionici*, 1009 were clustered into 296 families containing 2 to 54 members. The comparative clustering of proteins from *P. acidipropionici*, *P. acnes* and *P. freudenreichii* is summarized in Figure 2A, and a four-set Venn diagram including *M. phosphovorius* is presented in an additional figure (Figure S1 in Additional file 2). *P. acidipropionici* shows great expansion in families shared by the three *Propionibacteria*, most notably in transport proteins, two-component regulatory systems, transcriptional regulators and proteins with oxidoreductase activity (Table 3). Families of transport proteins were compared in detail using the Transporter Classification (TC) system. A total of 469 transport proteins were annotated in *P. acidipropionici* genome and almost half (46.9%) of these proteins were classified as members of the ATP-binding cassette family (ABC). This proportion is greater than in any of the other three bacteria species used in the comparison (Table 4). The complete comparison of transport proteins in these four bacteria species is presented in an additional file (Additional file 3).

The assignment of Gene Ontology terms to proteins unique to *P. acidipropionici* is depicted in Figures 2B and 2C. Two proteins that distinguish the central fermentative pathway of *P. acidipropionici* from that of *P. acnes* and *P. freudenreichii* have ligase activity and are discussed in the section “Propionic acid fermentation”. Proteins with sequence-specific DNA binding and methyltransferase activities could be involved in DNA repair, gene expression and chromosome replication. These proteins could also compose a restriction modification system serving as defense against foreign DNA. Therefore, the study of these proteins that are unique to *P. acidipropionici* may be important in developing genetic tools suitable for this strain.

The number of common genes is consistent with the previously reported phylogeny [18]. *P. acidipropionici* is

Table 2 General features of four species used in comparative analysis

Organism	Genome size (Mb)	%GC	No. of Proteins	No. of rRNA operons	No. of tRNAs
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ATCC4875	3.6	68.8	3336	4	53
<i>Propionibacterium acnes</i> KPA171202	2.6	60.0	2297	3	45
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> CIRM-BIA1	2.6	67.3	2375	2	45
<i>Microbacterium phosphovorius</i> NM-1	5.7	67.3	5338	1	46



more closely related to *P. acnes* and colinearity of genes was observed most of the time (Figure 3). However, *P. acnes* has approximately 1,000 genes fewer than *P. acidipropionici*, a fact that could reflect the specialization of this species as an opportunistic pathogen of human skin. It is generally considered that specialization leads to gene loss [19], a process that can be very fast in bacteria. For example, in *Lactobacillus* the transition of strains to nutritionally rich environments leads to metabolic simplification and the loss of several genes [20]. Although *P. freudenreichii* has all the enzymes needed for the de novo biosynthesis of amino acids and vitamins [16], the metabolic simplification premise may indicate that the reduced number of genes found in *P. freudenreichii* in

comparison to *P. acidipropionici* is suggestive of the beginning of a specialization process as a consequence of the continuous use of this species in cheese ripening. This reasoning is consistent with the analysis of the *M. phosphovorus* genome, a soil bacterium, with 5,338 annotated genes. Most of the gene clusters that were conserved in the three *Propionibacterium* are also present in *M. phosphovorus* (895 out of the 1,026) (Figure 2A; Figure S1 in Additional file 2). *P. acidipropionici*, with 3,336 genes, would seem to hold an intermediary position. The 32 pseudogenes identified in *P. acidipropionici* are disrupted by a single frameshift or point mutation, suggesting that these events are recent and that some genome reduction is underway.

Table 3 A selection of paralogous families of *P. acidipropionici* and close related genomes

Cluster functional annotation	Number of proteins found in:			
	<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. freudenreichii</i>	<i>M. phosphovorus</i>
ABC transporters	54	45	34	59
ABC transporters	20	11	1	13
ABC transporters	18	9	1	12
ABC transporters	9	8	4	19
ABC transporters	8	2	4	3
ABC transporters	7	3	2	6
ABC transporters	7	3	2	6
ABC transporters	5	1	2	1
ABC transporters	4	2	1	1
MFS transporters	10	3	10	21
Proton antiporters	3	1	1	2
Anaerobic C4-dicarboxylate transporters	0	2	2	0
Two-component system regulators	24	13	14	48
Two-component system kinases	8	3	4	11
Transcriptional regulators	27	10	4	22
Transcriptional regulators	9	5	5	12
Transcriptional regulators	5	2	1	1
MarR family transcriptional regulators	7	4	4	13
ArsR family transcriptional regulators	3	1	3	20
Oxidoreductases	23	9	8	29
Oxidoreductases	12	8	10	36
Oxidoreductases	12	4	4	21
Oxidoreductases	11	5	7	21
Dehydrogenases	8	2	4	15
Catalases	1	1	1	0
Catalases	1	0	0	1
Glycerol-3-phosphate dehydrogenases	2	1	1	0
Glutathione S-transferases	3	0	1	1
Aminotransferases	8	3	5	8
Aminotransferases	4	1	1	1
Amidotransferases	3	1	1	1
Glycosyl transferases	6	4	3	1
Glycosyl transferases	3	1	0	0
Sugar kinases	4	2	2	0
Polyphosphate kinases	1	1	1	1
Polyphosphate kinases 2	1	1	1	3
Polyphosphate-dependent glucokinases	1	1	1	2
Lipase esterases	3	1	0	0
Alpha-galactosidase	3	0	0	1
Putative sucrose-6-phosphate hydrolases (invertases)	1	0	0	2
Plasmid maintenance system antidote proteins	3	0	0	0
DNA-binding proteins	2	0	0	11
HNH endonucleases	6	0	0	0

Table 3 A selection of paralogous families of *P. acidipropionici* and close related genomes (Continued)

HNH endonucleases	2	0	0	0
Hypothetical proteins	5	1	1	0
Hypothetical proteins	5	0	0	0
Hypothetical proteins	4	3	0	2
Hypothetical proteins	3	0	0	1
Methylases	0	0	2	2
S-layer proteins	0	0	2	0
cAMP factors	0	5	0	0
Adhesion proteins	0	4	0	0
Magnesium chelatase	0	2	0	1
Alpha-L-fucosidases	0	2	0	1
Sialic acid transporters	0	2	0	0
Endoglycoceramidases	0	2	0	0
Adhesion proteins	0	2	0	0
Lysophospholipases	0	2	0	0
Triacylglycerol lipase precursors	0	2	0	0

The horizontal transfer of DNA fragments might supply the recipient microorganism with the necessary genetic resources to be able to adapt to new environments; for example, an antibiotic resistance gene and/or a gene that encodes a peptide in a biodegradative pathway [21]. Furthermore, Jain *et al.* [22] described the horizontal transfer of genes as a mechanism to spread genetic diversity across species and showed that horizontal gene transfer occurs between organisms that share similar factors like G/C content, genome size, oxygen tolerance and carbon utilization. Predicted genomics islands account for 3.8% (126) of total *P. acidipropionici* genes. This number is similar to predictions in *P. acnes* and *M. phosphovorus* genomes (3.0% and 4.8%, respectively) but lower than the prediction in the *P. freudenreichii* genome (6.7%).

Defense of genome integrity

Analysis of the *P. acidipropionici* genome revealed some defense mechanisms that may allow it to withstand viral and nucleic acid invasion; these include restriction enzymes and the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs). CRISPRs can provide the cell with an acquired resistance against bacteriophages and conjugative plasmids, possibly acting as a RNA interference-like mechanism. The spacers between direct repeats are derived from invader sequences and determine the specificity of the system. In addition, the mechanism is composed by CRISPR-related sequences (Cas), which are proteins encoded in the vicinity of CRISPR loci [23]. Some of these proteins show similarity to helicases and repair proteins. Seven CRISPR-associated proteins were annotated in the *P. acidipropionici* genome

(Cas1, Cas2, Cas3, Cas5, Cse1, Cse3, Cse4), while only two were identified in the *P. freudenreichii* and *M. phosphovorus* genomes. Moreover, using the CRISPR finder tool (crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php, [24]), three CRISPR loci were annotated in *P. acidipropionici* genome. The CRISPR1 locus contains 1248 bp and harbors 20 spacer sequences, the CRISPR2 locus contains 2043 bp and harbors 33 spacer sequences and the CRISPR3 locus contains 3689 bp and harbors 60 spacer sequences. The length of direct repeat sequence in all CRISPR loci is 29 bp. The spacers do not show strong similarity to phage and bacteria sequences available in databases from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Since Cas genes and CRISPRs are known to have undergone extensive horizontal transfer and the identified proteins do not share high sequence similarity (were not clustered together), these regions could have been acquired horizontally from different sources, explaining this inequality. No CRISPR-related proteins were found in the *P. acnes* genome.

The most common cause of slow or incomplete bacterial fermentations in the dairy industry is bacteriophage infections that lead to substantial economic loss [25]. To deal with phage diversity, lactic acid bacteria have developed several systems to withstand the infections; one of these is the CRISPR/Cas system. CRISPR/Cas loci have been identified in many lactic acid bacteria, such as *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus rhamnosus* [26]. The CRISPR/Cas system was found in the genome of *P. acidipropionici*, and could thus be interpreted as another feature of this bacterium that

Table 4 A selection of transporter families of *P. acidipropionici* and close related genomes

TC system	Description	Number of proteins found in:			
		<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. freudenreichii</i>	<i>M. phosphovorus</i>
1.C.70	CAMP Factor	0	5	0	0
2.A.1	Major Facilitator Superfamily	38	21	36	68
2.A.1.1	Sugar Porter (SP)	8	5	5	8
2.A.1.3	Drug:H + Antiporter-2 (14 Spanner) (DHA2)	10	3	12	21
2.A.1.6	Metabolite:H + Symporter (MHS)	7	2	4	10
2.A.13	C4-Dicarboxylate Uptake	0	2	2	0
2.A.2	Glycoside-Pentoside-Hexuronide :Cation Symporter	4	1	1	1
2.A.3	Amino Acid-Polyamine-Organocation	12	12	10	6
2.A.47	Divalent Anion:Na+	0	0	2	1
2.A.66	Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide Flippase	5	1	1	2
3.A.1	ATP-binding Cassette (ABC)	220	137	105	219
3.A.1.1	Carbohydrate Uptake Transporter-1 (CUT1)	57	29	7	40
3.A.1.2	Carbohydrate Uptake Transporter-2 (CUT2)	17	7	4	9
3.A.1.3	Polar Amino Acid Uptake Transporter (PAAT)	19	5	8	11
3.A.1.4	Hydrophobic Amino Acid Uptake Transporter (HAAT)	5	0	5	5
3.A.1.5	Peptide/Opine/Nickel Uptake Transporter (PepT)	28	14	9	29
3.A.1.12	Quaternary Amine Uptake Transporter (QAT)	13	6	7	6
3.A.11	Bacterial Competence-related DNA Transformation Transporter	0	2	2	2
3.B.1	Na + -transporting Carboxylic Acid Decarboxylase	7	3	4	4
4.A.1	PTS Glucose-Glucoside	1	8	1	0
4.A.2	PTS Fructose-Mannitol	2	4	0	0
4.A.3	PTS Lactose-N,N'-Diacetylchitobiose- β -glucoside	0	3	0	0
4.A.4	PTS Glucitol	5	4	0	0
4.A.5	PTS Galactitol	4	2	0	0
4.A.6	PTS Mannose-Fructose-Sorbose	0	0	1	0
4.A.7	PTS L-Ascorbate	0	2	0	0
5.A.3	Prokaryotic Molybdopterin-containing Oxidoreductase	3	6	2	7
8.A.9	rBAT Transport Accessory Protein	4	2	2	6
9.A.10	Iron/Lead Transporter	5	0	2	5
9.A.40	HlyC/CorC Putative Transporters	4	2	2	2

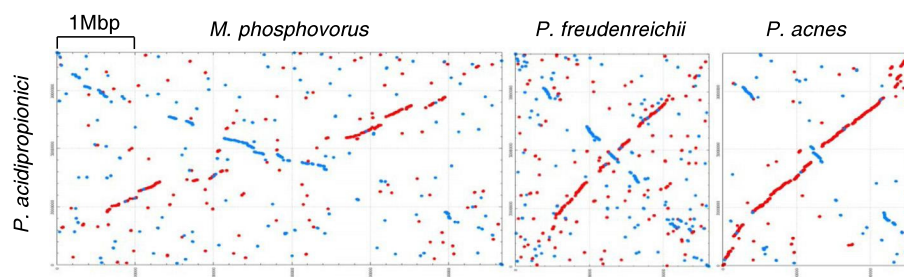


Figure 3 Syntenic dot plot. Dot plot alignment between the chromosome of *P. acidipropionici* (vertical) against the chromosomes of *M. phosphovorus*, *P. freudenreichii* and *P. acnes* (horizontal) at protein level. The *dnaA* gene is located at the beginning of all four sequences.

could render it robustness against phage infections in an industrial setting for the production of chemical commodities. Furthermore, the genomic data for the CRISPR/Cas system found in *P. acidipropionici* will provide information about the defense mechanism of this bacterium and allow the development of studies to improve its resistance to phage infections.

Lifestyle and environmental adaptation

Many of the annotated proteins families in *P. acidipropionici* have the potential to render this species flexibility to adapt to different environments (Tables 3 and 4). Among these protein families are the carbohydrate ABC transporters, transcriptional regulators, two-component response regulators, and oxidoreductases; all of these families had greater numbers of members in *P. acidipropionici* when compared with *P. acnes* or *P. freudenreichii*. Moreover, there are more rRNA operons and tRNA genes in *P. acidipropionici* compared with the other three species (Table 2). This feature could potentially confer competitive advantages such as a faster growth rate and quick response to environmental changes [27]. *M. phosphovorius* contains the same set of 45 tRNAs as *P. acnes* and *P. freudenreichii*, plus a selenocysteine tRNA that could be present solely to support formate dehydrogenase expression and is unique to *M. phosphovorius* among the four species that were compared.

Other protein families that appear expanded in *P. acidipropionici* in comparison to the other three species are glutathione-S-transferases (GSTs) and HNH endonucleases. Compared with the single copy of a glutathione S-transferases (GST) coding gene found in *P. freudenreichii* genome, three copies of the gene were found in the *P. acidipropionici* genome (Table 3). In bacteria, this enzyme has been reported to be involved on growth on recalcitrant chemicals and in the degradation of aromatic compounds [28]. HNH endonucleases coding genes were absent from the genome of *P. freudenreichii*, *P. acnes* e *M. phosphovorius*, while eight copies grouped into two clusters were found in *P. acidipropionici* (Table 3). This enzyme is a type of homing endonuclease that could be potentially involved in DNA rearrangements or could act as bacteriocin [29,30]. Taken together, the notable expansion of these two gene families may confer to *P. acidipropionici* robustness in its capacity for growth under adverse conditions and competitiveness against other bacterial species. However, further studies are needed to establish the function of these enzymes in the lifestyle of *P. acidipropionici*.

On the other hand, previously reported probiotic related genes were found only in the *P. freudenreichii* genome (gluconate kinase, S-layer proteins, cell-wall peptidase NlpC/p60, sortase and microcin resistance) [16], thus agreeing with the possible adaptation of the

species to the nutritional environment of the gut. Similarly, some protein families that were identified only in *P. acnes* are probably related to pathogenicity and host specialization. Some examples of these families include cAMP factor, endoglycoceramidases, sialic acid transporter, sialidases, and lysophospholipase.

Energy reserve and stress resistance

Polyphosphates (polyPs) are linear polymers composed of orthophosphate residues. PolyPs are not only used as energy reserves, but also have been related to stress resistance and adaptation to extreme environments [31]. *P. freudenreichii* ST33 has been reported to accumulate up to 3% of cell dry weight of polyP [32] and *M. phosphovorius* NM-1 has been reported to accumulate up to 11.8% [33]. Falentin et al. [16] identified the genes related to polyphosphate metabolism in *P. freudenreichii* CIRM-BIA1; all of these genes were present in the four genomes that were compared in the present study. Similar numbers of the Nudix hydrolases were present in all four organisms, suggesting that they had similar levels of metabolic complexity and adaptability [34]. In addition to the one copy of polyphosphate kinase (PPK) per genome that we found, PPK2 genes were also identified in the four genomes. PPK is an important enzyme in bacterial polyP synthesis, transferring reversibly the terminal phosphate of ATP to polyP. PPK2 differs from PPK by its use of either GTP or ATP, its preference for Mn^{2+} over Mg^{2+} and for being stimulated by polyP [34]. *P. acidipropionici* (PACID_16380), *P. acnes* (GenBank: NC_006085.1; locus: PPA1186) and *P. freudenreichii* (GenBank: FN806773.1; locus PFREUD_12510; annotated as hypothetical) have one PPK2 copy each. *M. phosphovorius* contains three PPK2 copies (Genbank: NC_015635.1; loci: MLP_05750, MLP_23310 and MLP_50300), which may play an important role in the large polyP accumulation in this organism.

Metabolic reconstruction

The predicted metabolic map of *P. acidipropionici* contained 221 pathways and 1,207 enzymatic reactions. The gene annotations and metabolic maps revealed that the complete pathways of glycolysis, gluconeogenesis, pentose-phosphate and all *de novo* amino acid biosynthesis were represented in the *P. acidipropionici* genome. The TCA cycle was also complete and genes corresponding to aerobic and anaerobic respiration pathways were detected. The biosynthetic pathways for most vitamins were found; however, pathways for biotin and pantothenic acid synthesis were notably absent, as has been reported for other species from this genus [16]. Figure 4 summarizes the basic metabolic pathways that were present in *P. acidipropionici*.



that two families within ABC superfamily concerned exclusively with carbohydrate uptake are present in greater number in the genome of *P. acidipropionici*. The carbohydrate uptake transporter-1 (CUT1) and -2 (CUT2) families exhibit specificity for oligosaccharides and monosaccharides, respectively. There are two principal amino acid uptake families in the ABC superfamily. The family specific for polar amino acids uptake (PAAT) is more numerous in the *P. acidipropionici* genome. The family concerned with hydrophobic amino acids uptake (HAAT) had the same number of genes identified in all bacteria compared, except in *P. acnes*, where no members were identified [35]. The propanediol utilization operon of *P. freudenreichii*, probably acquired through horizontal transfer [16], is not present in *P. acidipropionici*, *P. acnes* or *M. phosphovorius*.

P. acidipropionici possesses one invertase coding gene (PACID_33010) and could thus potentially use sucrose as a carbon source, while *M. phosphovorius* has two copies of putative invertase coding genes (MLP_06620 and MLP_06630). *P. acnes* and *P. freudenreichii* lack such a gene, and for that reason, the growth of these species in sucrose containing feedstocks like molasses needs pretreatment, with consequent cost increase [36]. This feature enables the development of *P. acidipropionici* fermentations at low cost from renewable feedstocks, such as sugarcane juice readily available in Brazil. Experimental batch fermentations using *P. acidipropionici* with sugarcane juice showed a significant yield and productivity of propionic acid, although significant amounts of acetic and succinic acids still emerged as by-products (Figure 5). In addition, the ability of this bacterium to

metabolize the C5 sugar xylose has also been previously reported [37], which makes this species a strong candidate for the metabolization of second generation feedstocks derived from biomass. Industrial ethanol fermentations are commonly contaminated by indigenous yeasts, which many times are less productive than the commercial yeasts used in ethanol fermentation. This causes considerable yield losses and in some cases indigenous yeasts are even able to replace commercial yeasts [38]. Preliminary experiments showed that the production of propionic acid inhibited the growth of indigenous yeasts in sugarcane juice (data not shown). Hence, industrial fermentation to produce propionic acid with *P. acidipropionici* using sugarcane juice could be performed without strict microbial control, potentially reducing production costs.

In summary, we report here the genetic basis for the ability of *P. acidipropionici* to metabolize many carbon sources, confirming previous studies of carbon source utilization by this species. These carbon sources include the readily available sucrose from sugar cane juice [7] and the C5 sugar xylose that is abundant in second generation feedstocks derived from biomass [37]. These results coupled to the preliminary findings suggesting that the propionic acid produced by propionibacteria may help control possible contamination by indigenous yeast species in an industrial setting emphasizes the potential of *P. acidipropionici* as a biological reactor of industrial interest.

Catabolic repression and phosphotransferase system

Given the wide range of substrates that *P. acidipropionici* is able to metabolize, we performed a preliminary study

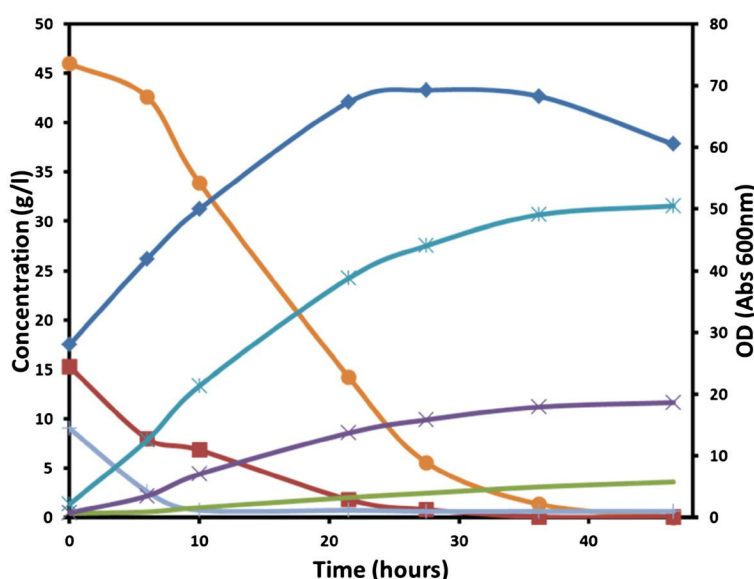


Figure 5 Preliminary results of *P. acidipropionici* experimental batch fermentation with sugarcane juice. Biomass A600 (blue diamond); sucrose (orange circle); glucose (red square); fructose (gray line); propionic acid (blue asterisk); acetic acid (purple cross); succinic acid (green line).

to verify the presence of carbon catabolite repression. *P. acidipropionici* was grown in various carbon sources (glucose, fructose, sucrose, lactate and glycerol) with or without addition of the hexose analogous 2-deoxy-glucose (2-DG). 2-deoxyglucose is taken up by cell and phosphorylated into 2-DG 6-phosphate. This molecule cannot be metabolized; however it is able to trigger the glucose repression phenomenon [39]. Therefore, the presence of 2-DG in the cultures led to a clear decrease in the *P. acidipropionici* growth rate, suggesting the presence of a possible mechanism of carbon catabolite repression by glucose (Figure S2 in Additional file 2). The analysis of variance test (ANOVA) indicated that there was a significant difference between the growth rate of *P. acidipropionici* grown in the media containing glucose and in the media containing glucose with 2-DG (ANOVA factorial: $F_{7,32} = 8.346$; $p < 0.0001$); fructose and fructose with 2-DG (ANOVA factorial: $F_{7,32} = 22.363$; $p < 0.0001$); sucrose and sucrose with 2-DG (ANOVA factorial: $F_{7,32} = 35.70$; $p < 0.0001$); lactate and lactate with 2-DG (ANOVA factorial: $F_{7,32} = 24.53$; $p < 0.0001$) and glycerol and glycerol with 2-DG (ANOVA factorial: $F_{7,32} = 11.46$; $p < 0.0001$).

The molecular basis of this phenomenon is generally related to a multiprotein phosphorelay system, the phosphotransferase system (PTS). At least three enzymes, enzyme I (EI), histidine protein (HPr) and enzyme II (EII), that are responsible for carbohydrate transporting, phosphorylation and triggering the catabolic repression respectively, are present in the PTS [40]. Twenty-three genes coding for general proteins of the PTS were identified in the *P. acidipropionici* genome (Additional file 4). Moreover, two transcriptional factors probably involved in this system (CRP – cyclic AMP receptor factor and ccpA – catabolite control protein A) and 1 PTS-regulatory domains (PRDs), which could act as antitermination proteins or as transcriptional activators, were found in the genome of *P. acidipropionici*. In addition, carbon catabolite repression can regulate the expression of virulence factors in many pathogenic bacteria [40], and this could explain the great number of PTS related genes (31 genes) found in the *P. acnes* genome. On the other hand, *P. freudenreichii* has only 5 genes related to the PTS. These observations could suggest that *P. acidipropionici* has the potential ability for selective carbon source utilization and genome plasticity to adapt to different environments, but further studies would be necessary in order to confirm this hypothesis.

Aerobic metabolism

P. acidipropionici is a facultative anaerobic micro-organism. In practical terms, the cells need anaerobic conditions to grow on solid media; however, they can grow in liquid media with oxygen added (data not shown) [41]. Inspection of its genome showed that all the

genes related to aerobic respiration and oxidative stress are present. *P. acidipropionici* had two putative catalase genes while *P. acnes* and *P. freudenreichii* contained only one copy. Thus, the susceptibility of *P. acidipropionici* to oxygen could be related to deficient expression of the oxidative defense genes or to a redox imbalance. These preliminary data are encouraging in suggesting oxygen resistance in this species. However, further studies on the oxygen resistance of *P. acidipropionici* will be needed in order to establish non-strict anaerobic conditions for growth in an industrial setting, where the maintenance of a strict anaerobic atmosphere would be too costly.

Electron transport chain

The electron transport chains of prokaryotes vary widely, having multiple terminal oxidases. This variation allows bacteria to adapt their respiratory systems to different environmental growth conditions [42] by choosing the composition of enzymes that will achieve: (i) the highest possible coupling efficiency (H^+/e^- ratio); (ii) the rapid removal of excess reducing equivalents such as NADH/NADPH; and (iii) the regulation of intracellular oxygen concentration [43].

Cytochrome bd (PACID_05290 and PACID_05280) is present in all four organisms that were compared. In *E. coli*, this oxidase has a high affinity for oxygen but it does not pump protons being preferred in low-oxygen conditions because the respiratory chain is then still able to provide energy, even in low amounts [44]. Although the cytochrome bd complex does not pump protons in *E. coli*, there is a net proton transfer ($1 H^+/e^-$) by this oxidase due to quinol oxidation and oxygen reduction on the periplasmic and the cytoplasmic sides of membrane, respectively [44-46].

On the other hand, cytochrome c oxidase (CcO) reduces molecular oxygen to water coupled with the pumping of four protons across the membrane, generating more energy [47]. The four subunits of CcO (PACID_12210-12230 and PACID_12290), the cytochrome C reductase (PACID_12260, PACID_12280 and PACID_12290) and cytochrome c biogenesis and assembly proteins were found in *P. acidipropionici*, *P. acnes* and *M. phosphovorius*, suggesting a greater flexibility of these strains to adapt to different oxygen conditions in comparison to *P. freudenreichii*, which lacks these genes. However, *P. acidipropionici* showed a frameshift in CcO subunit I (Figure S3 in Additional file 2). Because the CcO subunit I is a strongly conserved protein and the *P. acidipropionici* version have lost most of its domain identity and its copper-binding site, this oxidase is probably not functional. The alignment of the 454 and Illumina reads against the frameshift region can be viewed in the additional figure S4 (Additional file 2).

A recent transcriptome work using *P. acnes* [48] detected expression of the whole respiratory chain under anaerobic growth conditions, including NADH dehydrogenase/complex I (NDH-1) and succinate dehydrogenase/fumarate reductase (SdhABC). Wackwitz and colleagues [49] showed that NDH-1 is stimulated under fumarate-dependent respiration in *E. coli*. Brzuszkiewicz and colleagues [48] hypothesized a scenario of *P. acnes* metabolism with ATP generation via F_0F_1 ATP synthase and proton translocation by NDH-1 and SdhABC, with the former feeding reducing equivalents to the respiratory chain, and the latter using fumarate as terminal electron acceptor. These proteins were also detected in our proteome analysis of anaerobic fermentation samples, indicating a similar behavior in *P. acidipropionici*, capable to use different electron acceptors (NDH-1: PACID_26280-26410; F_0F_1 ATP synthase: PACID_19340-19410; SdhABC: PACID_21310-21330). *P. acidipropionici* has two SdhABC/FrdABC gene clusters, SdhABC (PACID_21310-21330) and SdhA2B2C2 (PACID_18400-18420). Only SdhABC was detected in the anaerobic fermentation samples and hence could be acting as fumarate reductase, while SdhA2B2C2 could be used in the oxidation of succinate to fumarate. The membrane anchor subunits SdhC and SdhC2 have five transmembrane helices each and predicted molecular weight of 25 and 28 kDa respectively, characteristic for Sdh/Frd proteins lacking Subunit D. When the cluster contains a SdhD/FrdD subunit, the SdhC/FrdC proteins are distinctly smaller (13 to 18 kDa) and contain only three transmembrane helices each [50]. Given its importance in propionibacteria metabolism, a better understanding of electron transport chain can help design engineered strains with fine-tuned redox balance.

Nitrate and sulfate reduction

Kaspar (1982) [51] demonstrated that strains of *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. shermanii* and *P. thoenii* can reduce nitrate to nitrite and further to nitrous oxide. This ability was later shown to vary from strain to strain, being strongly affected by environmental factors [52]. *P. acidipropionici* ATCC 4875 seems to be able to use nitrate as an electron acceptor, since all the genes of the respiratory nitrate reduction to nitrous oxide were all found: respiratory nitrate reductase (EC:1.7.99.4; PACID_02700-02730), nitrite reductase (cytochrome) (EC:1.7.2.1; PACID_02330) and nitric-oxide reductase (cytochrome c) (EC:1.7.2.5; PACID_31710 and PACID_27170). These genes are also present in *P. acnes* and *M. phosphovor*, while *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* cannot reduce nitrate due to lack of a functional nitrate reductase [16]. Also, *P. acidipropionici* could reduce the nitrite to ammonium through the enzyme nitrite/sulfite reductase (EC:1.7.7.1; PACID_27260)

and incorporate the ammonium formed into amino acids. This gene is also present in *P. freudenreichii* and *M. phosphovor*, but not in *P. acnes*. Additionally, genes coding for an assimilatory nitrite reductase (EC:1.7.1.4; PACID_33080 and PACID_33090) are found in *P. acidipropionici* and *M. phosphovor*. However, the enzyme of the former is nonfunctional due to a frameshift in the large subunit.

The sulfur assimilation pathway also varies among propionibacteria, with species utilizing from the most oxidized sources (sulfate) to the most reduced ones (sulfide) [53]. An adenylylsulfate kinase (EC:2.7.1.25) was only found in *M. phosphovor*. The coding genes for nitrite/sulfite reductase (EC:1.7.7.1; PACID_27260), sulfate adenylyltransferase (EC:2.7.7.4; PACID_01720 and PACID_01730) and phosphoadenylyl-sulfate reductase (EC:1.8.4.8; PACID_01710) coding genes were found in the genomes of *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii* and *M. phosphovor*, but not in *P. acnes*. However, it was not possible to identify the complete pathway of sulfate reduction in *P. acidipropionici*, thus requiring more studies.

P. freudenreichii and *P. acnes* have genes coding for all three subunits of anaerobic dimethyl sulfoxide (DMSO) reductase, allowing these bacteria to use DMSO and other highly oxidized substrates as electron acceptors.

Vitamin B12 biosynthesis

Cobalamin (vitamin B12) is one of the most structurally complex nonpolymeric biomolecule described and is an essential cofactor for several important enzymes like methylmalonyl-CoA mutase [48]. The complexity of its synthesis makes a chemical production too challenging and expensive. Hence, the industrial production of this vitamin is currently performed by biosynthetic fermentation processes using two organisms: *Propionibacterium freudenreichii* (*P. shermanii*) and *Pseudomonas denitrificans*. Since some *Propionibacterium* species do not produce either endo- or exotoxins, they are preferred for the production of food additives or medicines. *Pseudomonas* produce Vitamin B12 by the aerobic pathway, whereas *Propionibacteria* use the anaerobic one, which differs from the first in that the cobalt ion is inserted much earlier, at the precorrin-2 intermediate. The oxidation step also differs as it cannot use O_2 and generates a 6- rather than a 5-membered lactone [54].

M. phosphovor uses the aerobic pathway and the characteristic oxygen-requiring C-20 hydroxylase CobG and the distinct cobalt insertion complex (cobNST) were identified [Genbank: AP012204.1]. The organization of B12 biosynthesis genes of *P. acidipropionici* is similar to that of *P. acnes*, with genes grouped into two clusters (Figure S5 in Additional file 2), while *P. freudenreichii* has its genes grouped into four gene clusters. The small cluster (PACID_28120-28220) harbors genes responsible

for providing aminolaevulinic acid and converting it to uroporphyrinogen III, as well as the interconversion of uroporphyrinogen III into haem. The large cluster (PACID_08770-09000) harbors genes responsible for cobalt transport and adenosylcobalamin synthesis from uroporphyrinogen III. Some genes coding for transport proteins are only present in the cluster from *P. acnes*. Fused genes also differ between the three genomes. While *cbiEGH* appears in the three *Propionibacteria*, *cobT*, *cobU* and *bluB* are organized differently. *P. acnes* large cluster harbors *cobT* and *cobU* genes fused into a single protein (*cobTU*), while *P. acidipropionici* large cluster contains two separate adjacent genes (*cobT*: PACID_08960 and *cobU*: PACID_08970). *P. freudenreichii* have *cobU* as a separate gene inside one cluster, and *cobT* fused to the *bluB* gene and located elsewhere in its genome. This fused gene, *cobT/bluB*, is also present in the *P. acnes* genome, but a *bluB* homolog was not found in *P. acidipropionici* genome. *BluB*, first identified in *Rhodobacter capsulatus*, was shown to be required for the conversion of cobinamide to cobalamin in various organisms, being responsible for the oxygen-dependent synthesis of dimethylbenzimidazole from reduced flavin mononucleotide (FMN_{H2}) [55]. Since *P. acidipropionici* does not possess this gene, another unidentified enzyme may catalyze this reaction.

Propionic acid fermentation

As expected, the dicarboxylic acid pathway, known as Wood Werkman cycle, was identified in the *P. acidipropionici* genome (Figure 4). Many bacteria of different genera as *Rhodospirillum*, *Mycobacterium*, *Rhizobium*, *Micrococcus* and *Propionibacterium* have the mechanisms required for propionic acid fermentation metabolism [56]. Nonetheless, it is only in *Propionibacterium* that this is the main pathway for energy generation, resulting in high propionic acid production. Propionic acid production is a cyclic process, in which propionate formation is related to the oxidation of pyruvate to acetate and to reduction of fumarate to succinate. We identified thirteen genes in the *P. acidipropionici* genome that could encode the enzymes involved in propionate production from pyruvate: methylmalonyl-CoA carboxyl-transferase (EC:2.1.3.1; PACID_07970-08000), malate dehydrogenase (EC:1.1.1.37; PACID_24560), fumarate hydratase (EC:4.2.1.2; PACID_33440), succinate dehydrogenase (EC:1.3.99.1; PACID_21310-21330), propionyl-CoA:succinate CoA-transferase (EC:2.8.3.-; PACID_06950), methylmalonyl-CoA epimerase (EC:5.1.99.1; PACID_19260) and methylmalonyl-CoA mutase (EC: 5.4.99.2; PACID_11200 and PACID_11210).

Importantly, two main divergences from the literature were found. The phosphoenolpyruvate carboxytransferase (PEPC) that would lead to the formation of

oxalacetate from CO₂ and phosphoenolpyruvate is not present in *P. acidipropionici*, *P. acnes*, *P. freudenreichii* or *M. phosphovorius* genomes. In addition, the acetate dissimilation pathway differs from previous reports [7,57]. *P. acidipropionici* does not contain the phosphate acetyltransferase (PTA) and acetate kinase (ACK) genes; therefore, the two step PTA-ACK pathway cannot be the one that is used for acetate assimilation or dissimilation as was thought previously. Instead, this bacteria seems to dissimilate acetate using an ADP-forming acetyl-CoA synthetase (ADP-ACS, EC:6.2.1.13 PACID_02150), an enzyme that is distinct from the broadly distributed AMP-ACS and which is instead related to the ADP-forming succinyl-CoA synthetase complex (SCSC) [58]. Unlike PTA and ACK, ADP-ACS converts acetyl-CoA, inorganic phosphate and ADP into acetate, ATP and CoA in one step [59]. The protein encoded by ADP-ACS gene was found in all proteome samples of *P. acidipropionici*, where acetate production was also observed. The PTA and ACK genes were identified in the genomes of *P. freudenreichii* and *M. phosphovorius* but not in the genomes of *P. acidipropionici* and *P. acnes*. An ADP-ACS gene was only identified in *P. acidipropionici* and related genes from the SCSC (α and β subunits) were also found in all the compared organisms except *P. freudenreichii*. The acetate assimilation is probably performed by AMP-forming ACS enzymes (6.2.1.1; PACID_13940 and PACID_13950). Although reversible in vitro, the reaction carried out by these enzymes is irreversible in vivo because of the presence of intracellular pyrophosphatases. In *E. coli*, this high affinity pathway scavenges small amounts of environmental acetate, while PTA-ACK pathway works only with large concentrations of the substrate [60]. In this way, *P. acidipropionici* resembles some halophilic archaea which do not have the PTA-ACK pathway and use AMP-ACS and ADP-ACS enzymes to assimilate and dissimilate acetate, respectively.

n-Propanol production

In addition to propionic, succinic and acetic acid, it has been reported that n-propanol might be produced under specific conditions; for example, in the fermentation of *P. acidipropionici* using glycerol as the carbon source [61]. In this case, n-propanol production by *P. acidipropionici* could have resulted by a necessity to balance the intracellular redox potential, since glycerol is more reduced when compared to glucose [62]. The genome analysis identified a possible metabolic pathway for n-propanol production: propionyl-CoA could be converted to propionaldehyde and then to n-propanol by oxidation-reduction reactions catalyzed by the aldehyde and alcohol dehydrogenase enzymes. Genes coding for aldehyde dehydrogenases that could act on propionyl-CoA are PACID_33630, PACID_02980 and PACID_24580.

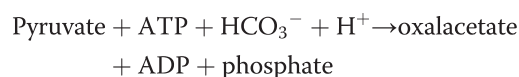
The genome of *P. acidipropionici* contains many alcohol dehydrogenase enzymes, and one or more could be responsible for producing propanol, including PACID_02970, PACID_04160, PACID_05040, PACID_05370, PACID_05800, PACID_06750, PACID_07130, PACID_08230, PACID_11040, PACID_11390, PACID_14120, PACID_16510, PACID_30120, PACID_30260, PACID_30590, PACID_30730, PACID_30890, PACID_31640, PACID_32980, PACID_33650 and PACID_33970.

Indeed, to change the fermentation pattern of *P. acidipropionici* towards higher yields of reduced compounds like propionic acid and n-propanol, it would be necessary to modify the NAD(P)H:NAD(P) cofactor ratio. The influence of the NAD(P)H:NAD(P) ratio in metabolic pathways has been demonstrated, for example, by using substrates with different oxidation states [61] or by supplementing anaerobic growth with electron acceptors, such as nitrate and fumarate [62]. Some studies have also report that the cofactor ratio can be varied through NADH regeneration by the NAD-dependent formate dehydrogenase found in some species of yeast and bacteria. This enzyme catalyzes the oxidation of formate to CO₂ and the reduction of NAD to NADH [63]. Moreover, the intracellular redox potential could be modified in the presence of a low-potential electron mediator, which transfers electrons between a working electrode and a bacterial cell. Fermentation studies carried out with different strains of *Propionibacterium* in a three-electrode amperometric culture system showed that high yields of the reduced compounds could be produced from oxidized substrates, such as glucose and lactate [64,65]. n-propanol production was also observed in bioelectrical reactors with *P. acidipropionici* ATCC4875 fermenting sucrose in different mediator concentrations [66].

CO₂ fixation

Heterotrophic CO₂ fixation was reported for the first time in *P. pentosaceum*, later renamed as *P. acidipropionici* [67]. Wood and Leaver [68] tested the fermentation of 3, 4, 5 and 6 carbon compounds by this bacterium and found that the best CO₂ assimilation occurred when cells were grown on a medium containing glycerol, yeast extract, phosphate and vitamin B. In the same study, they also reported the inhibition of CO₂ fixation by NaF (Sodium Fluoride). In 1961, Siu *et al.* [69] reported that the PEPC enzyme obtained from sonic extracts of *P. shermanii* was able to catalyze the formation of oxaloacetate from CO₂ and phosphoenolpyruvate. PEPC is widespread in plants, algae, cyanobacteria, bacteria and protozoa and has a highly conserved domain; the bacterial proteins have approximately 870 residues [70]. However, similarity searches did not identify a homolog of PEPC in the genomes of *P. acidipropionici*, *P. acnes*, *P. freudenreichii* and *M. phosphovorus*.

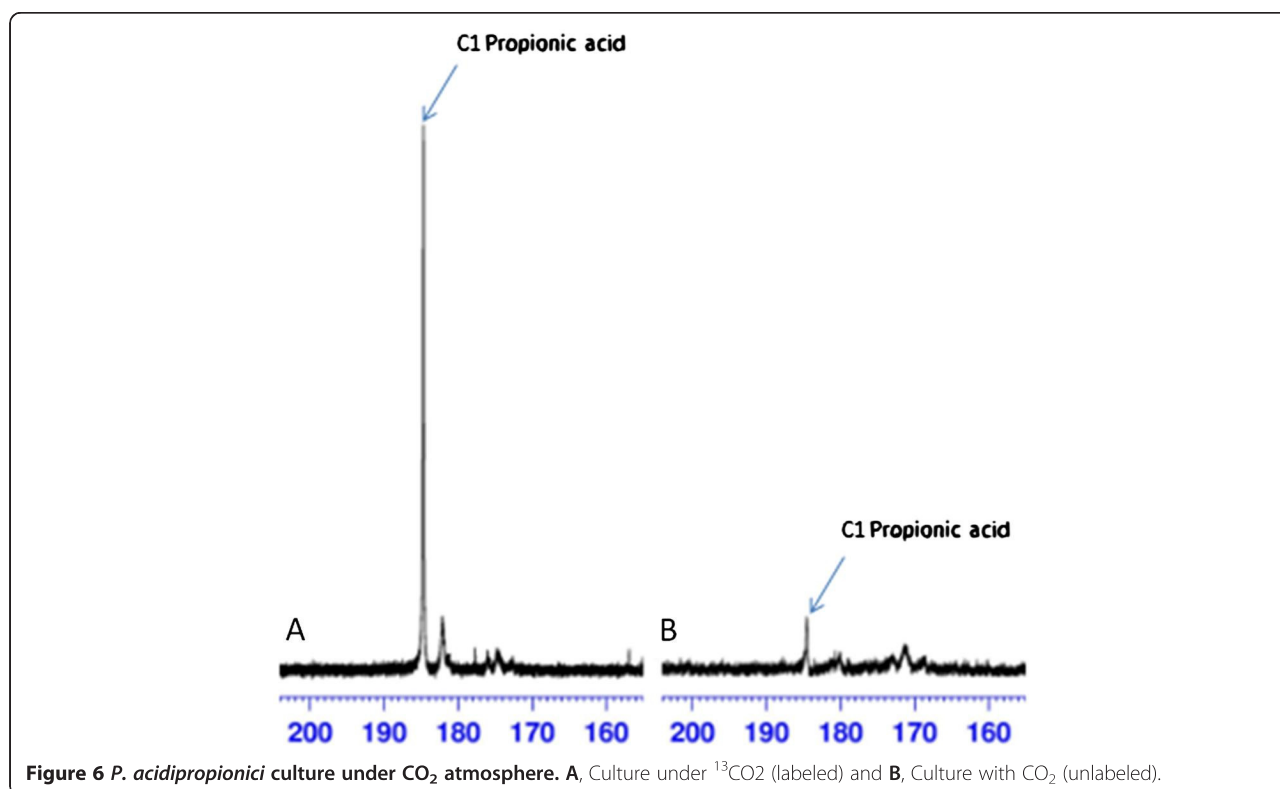
To investigate the CO₂ assimilation by *P. acidipropionici* we performed fermentation assays using glycerol as the substrate in the presence of ¹³CO₂. The NMR results (Figure 6) revealed an increase in the carbonyl group peak of propionic acid in relation to the control, indicating that a certain amount of isotope ¹³C was fixed by the CO₂ assimilation pathway. Hence, we concluded that *P. acidipropionici* can indeed fix CO₂; however, the enzyme responsible for this reaction may not be PEPC. An inspection of the *P. acidipropionici* genome led to the identification of a gene encoding pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1, PACID_00400), an enzyme that catalyzes the following reaction:



A pyruvate carboxylase was also identified in the *M. phosphovorus* genome (MLP_46180) but not in the *P. acnes* and *P. freudenreichii* genomes. CO₂ assimilation by *P. acidipropionici* occurs mainly when glycerol is used as the carbon source [68]. Therefore, this pathway could be related to the necessity to balance the intracellular redox potential when the glycerol reaches a high reduction potential. Moreover, in the presence of glucose as carbon source the gene for carbon dioxide fixation could be repressed due to a carbon catabolite repression mechanism [71]. The proteome experiments led to the identification of this protein in all samples obtained from *P. acidipropionici* cells growing in glycerol, but not from cells grown in glucose (data not shown). Although this result supports our hypothesis, further experiments should be performed to elucidate the CO₂ assimilatory pathway and its regulation.

The pyruvate carboxylase is member of the biotin-dependent carboxylase family. Members of this family are post-transcriptionally biotinylated by a biotin protein ligase, usually present at one copy in prokaryotes and able to biotinylate different carboxylases. Prokaryotes have either one monofunctional protein that only performs the biotinylation or a bifunctional protein containing an N-terminus regulatory domain that participates in the transcriptional control of genes involved in biotin biosynthesis [72]. The four bacteria compared seem to have one copy each of the monofunctional protein, since the typical N-terminal biotin operon repressor domain [TIGRFAMs: TIGR00122] was not found in these proteins.

The heterotrophic CO₂ fixation emphasizes the potential use of *P. acidipropionici* in industrial applications, once it enables the industrial propionic acid production from low feedstock amounts and fermentation released CO₂.



Conclusions

The genome-scale information that we have obtained combined with already developed physiological, genetic and metabolic approaches will increase our knowledge of *P. acidipropionici* and may help establish strategies that will increase and optimize its use in industrial processes. The experimental results and genome annotations have revealed some *P. acidipropionici* features that may explain the plasticity and hardiness of this specie. *P. acidipropionici* has about 1,000 genes more than *P. acnes* and *P. freudenreichii*, suggesting less specialization and a more flexible metabolism. Genes for the defense of genome integrity by the CRISPR/Cas system, polyphosphate accumulation, and the large amount of rRNA and carbohydrate ABC transporters that were identified might also render some competitive advantages and allow the bacterium to adapt in different environments. In addition, the high acid tolerance, wide range of substrates metabolized, hardiness and microaerophilic life style suggest that *P. acidipropionici* is a microorganism that has a potential use in the industrial fermentation of commodities, such as propionic acid. Moreover the anti-fungal property of propionic acid will help avoid the contamination of the process by indigenous yeast, the main source of contamination in sugarcane juice [38]. Propionic acid fermentation from sugarcane juice, therefore, could be performed without strict microbial control and, consequently, in a cost-effective manner.

Worldwide interest in chemical compounds produced by biological reactors has increased considerably, especially in the petrochemical industry that has as a main objective, the low cost production of compounds that could be fixed in high durable materials. In this context, propionic acid fermentation by *P. acidipropionici* shows a great potential to satisfy the world demand for this commodity.

Methods

Bacterial strain

The strain, *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875TM, was acquired from the Global Bioresource Center (ATCC). The genomic DNA was isolated from exponential-phase cultures using previously described methods [73].

Sequencing and assembly

The genome of *P. acidipropionici* was sequenced by the whole genome shotgun approach using the 454 Life Sciences platform [74] generating single-end 400 bp reads (18.0-fold coverage) and the Illumina/Solexa platform [75] generating mate-pairs of 2 × 75 bp from 3500 bp fragments (108.6-fold coverage). The Illumina reads were submitted to the k-mer based correction tool of SOAPdenovo [76] and trimmed at various lengths prior to assembly. The best results were obtained with reads trimmed to 62 bp. The 454 reads were assembled

using *GS de novo* Assembler [NEWBLER version 2.0.00; Roche], resulting in 1,117 contigs and a N50 of 5,274 bp. A hybrid assembly using Velvet version 1.0.04 [77] was then performed to combine the 454 contigs and the Illumina mate-pair reads. Using the VelvetOptimiser tool with the k-mer parameter varying from 35 to 65 bp, the k-mer and coverage cutoff parameters of the final assembly were optimized to 49 bp and 54.3, respectively. The eight resulting chromosome scaffolds were ordered using the *P. acnes* genome as a reference with help of PROmer alignment [78] and dot plot graph tools. The copy number of plasmid per cell was estimated based on the coverage ratio between the corresponding contig and the chromosome contigs. Remaining gaps were closed with just 25 rounds of polymerase chain reactions (PCR) followed by Sanger sequencing.

Genome annotation

P. acidipropionici putative protein-coding sequences were predicted using Glimmer version 3.02 [79]. The training set was composed by *P. acidipropionici* long ORFs and ORFs with complete alignment against *P. acnes* genome found using the Exonerate program [80]. A position weight matrix (PWM) representing ribosome binding sites was constructed by running ELPH [81] on the 25 bp regions upstream of the predicted start sites. The PWM and start codon distribution were supplied to Glimmer to help improve the accuracy of start site predictions. The predicted gene models were manually verified using BLASTX searches against the protein databases Uniprot [82] and NCBI-nr [83]. Automated annotation was performed by AutoFACT [84] which applies similarity searches against UniRef [85], KEGG [86], NCBI-nr [83], Pfam, Smart and COG databases [87], Gene Ontology (GO) terms were assigned using Blast2GO program [88]. The annotations were complemented by searches for conserved domains using RPS-BLAST against the CDD database [87] and important genes were manually verified. Transfer RNA genes were annotated using tRNAscan-SE version 1.23 [89] with the default parameters for bacteria. Ribosomal RNA genes were annotated with RNAmmer version 1.2 [90]. Pseudogenes were identified by direct comparison with homologs and subsequent verification against original sequencing data. Transport protein coding genes were annotated using similarity searches against the Transporter Classification Database (TCDB) [91].

Comparative analysis

Similarity-based clustering of translated protein sequences was carried out using the Blastclust program [92], with minimum identity ranging from 25–40% and length coverage ranging from 50–80%. The final set of protein families was generated with identity and coverage

parameters of 30% and 60%, respectively. Venn diagrams (Figure 2 and Additional file 2: Figure S1) were constructed based on the protein clustering to indicate: (i) protein clusters, text in parenthesis; (ii) proteins not in clusters, text in brackets; (iii) proteins clustered in each group, text not enclosed; (iv) In Figure 2, proteins clustered in each group and separated by organism, color-coded text not enclosed. A detailed comparison of transporter proteins was performed using the TC system [91]. Putative genomic islands were predicted using IslandViewer [93].

Metabolic maps

The metabolic maps of *P. acidipropionici* were predicted using Pathway Tools version 13.0 [94] and searches against the KEGG database. Metabolic pathways of interest were manually annotated to eliminate false positives and to search for missing enzymes and reactions.

Culture conditions and media

P. acidipropionici was grown in a synthetic medium containing (per liter): 1 g KH₂PO₄, 2 g (NH₄)₂HPO₄, 5 mg FeSO₄·7H₂O, 10 mg MgSO₄·7H₂O, 2.5 mg MnSO₄·H₂O, 10 mg CaCl₂·6H₂O, 10 mg CoCl₂·6H₂O, 5 g yeast extract (HiMedia Laboratories, Mumbai, India), 5 g peptone S (Acumedia Manufacturers Inc, Michigan), and a carbon source (glucose, fructose, sucrose, lactose or glycerol). The medium (without a carbon source) was autoclaved at 121°C and 15 psig for 20 min. The carbon source was autoclaved separately to avoid undesirable reactions, and mixed with the medium aseptically.

Sugarcane juice batch fermentation

Batch fermentation was performed using sugarcane juice as the carbon source. The synthetic medium described above was supplemented with the juice and the culture mixture was then autoclaved inside the culture vessel. Sugarcane juice free-cell batch fermentation was conducted in a Biostat B. 2.5 L fermenter vessel (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) containing 2 L of culture medium. The temperature was set at 30°C and the pH was maintained at 6.5 by automatic addition of 4 M NaOH, with 100 rpm agitation. Anaerobiosis was maintained by N₂ sparing through the culture medium before fermentation began and after each sampling. The bioreactor was inoculated with 200 mL of *P. acidipropionici* cells in the exponential phase (OD ~ 2 to 3); the cells had been grown in PP-test tubes at 30°C. Samples were collected every 24 hours. After measuring the optical density (OD), the remaining volume of the sample was centrifuged at 10,000 g for 6 min. The supernatant was stored at -20°C until high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

Analytical methods

Cell biomass was calculated by measuring the absorbance at 600 nm in a ULTROSPEC 2000 spectrophotometer UV/visible (Pharmacia Biotech) after appropriate dilution in water. For HPLC-RI analysis, the samples were filtered through a 0.2 µm filter (Millipore). Propionic, succinic and acetic acids and sugars were determined by HPLC (Waters 600 Chromatograph), using an ion exclusion column Aminex HPX-87 H (Bio-Rad). The operation temperature was 35°C and 0.16 M H₂SO₄ was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min.

Catabolic repression assays

The bacteria were cultured in media (described above) containing 6 mM 2-deoxy-glucose (2-DG) and one of the following carbon sources: glucose, fructose, sucrose, lactose or glycerol at a concentration of 5 g/L. The cultures were incubated, without agitation or pH regulation, at 30°C for 9 days. Bacterial growth in the different carbon sources was analyzed by OD₆₀₀ determination in a ULTROSPEC 2000 spectrophotometer UV/visible (Pharmacia Biotech) after appropriate dilution in water. The results were tested by analysis of variance (ANOVA).

CO₂ assimilation assays

The cultures were carried out in 9 mL sterile serum tubes with rubber caps, containing 6 mL of culture medium with 10 g/L of glycerol as the carbon source and 3 mL of headspace for CO₂ or N₂ injection. The culture medium was injected with a sterile syringe. The tubes were inoculated with 1 mL of *P. acidipropionici* cells in the exponential growth phase (OD₆₀₀ ~ 2 to 3); the cells had been grown in polypropylene test tubes at 30°C. Immediately, the headspace was saturated with the respective gas at room temperature. The headspace gas was mixed with the medium by vigorous agitation before starting the culture. The cultivation tests were performed with carbon-¹³C dioxide (99 atom % ¹³C, 3 atom % ¹⁸C, Sigma-Aldrich) so that the nuclear magnetic resonance (NMR) determination of CO₂ absorption by analysis of fermentation products could be performed. As controls, other test tubes were inoculated following the same procedure but using either the standard CO₂ or N₂ gases. Each cultivation test was performed in triplicate. The tubes were incubated without agitation or pH regulation at 30°C for 3 days. Afterwards, the tubes were centrifuged at 10,000 g for 6 min, and the supernatant was lyophilized and resuspended in D₂O for NMR analysis.

NMR spectroscopy

The ¹³C NMR spectra at 500 MHz (11.740 Tesla) were obtained in a Varian INOVA spectrometer (Varian) with

a 5 mm diameter probe. The spectrum consisted of 5000 pulses, and the span between pulses was 1.5 s.

Proteome experiments

The bacterial cells were grown in two different media, one containing 60 g/L of glucose and the other 60 g/L of glycerol both at 37°C, 200 rpm and keeping the pH at 6.5. The fermentation was performed in a 2 L batch fermenter (Labfors, Infors, AG, Switzerland). The glucose culture was grown for 168 h (OD₆₀₀ = 17) and the glycerol culture was grown for 216 h (OD₆₀₀ = 12). Samples of the glucose fermentation were taken after 11 (OD₆₀₀ = 0,6), 24 (OD₆₀₀ = 8,8), 72 (OD₆₀₀ = 22,1) and 120 (OD₆₀₀ = 22,7) hours and the glycerol fermentation was sampled after 11 (OD₆₀₀ = 1,5), 72 (OD₆₀₀ = 6,7), 144 (OD₆₀₀ = 19,3) and 216 (OD₆₀₀ = 12,1) hours. The fermentation samples for proteome analysis (UPLC-ESI-Q/TOF) were treated according to the protocol for mammalian cultured cells described previously [95], except that the sonication was done 3 times for 50 s with a 3 min rest in between using output 20%. The samples were fractionated by strong cation exchange chromatography before injection in the UPLC-ESI-Q/TOF system.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequence of *P. acidipropionici* strain ATCC 4875 genome is available in GenBank under the accession number CP003493.

Additional files

Additional file 1: Table S1. *P. acidipropionici* proteins identified by UPLC-ESI-Q/TOF. List of proteins identified using UPLC-ESI-Q/TOF experiments.

Additional file 2: Figures S1 to S5. **S1.** Comparative protein clustering. Four-set Venn diagram with protein families including *P. acidipropionici*, *P. acnes*, *P. freudenreichii* and *M. phosphovorus*. **S2.** Catabolic Repression in *P. acidipropionici*. Growth of *P. acidipropionici* in different carbon sources with or without addition of the hexose analogous 2-deoxy-glucose (2-DG). Error bars represent standard errors of the mean. **S3.** Alignment of CcO subunit I with homologs. Alignment of cytochrome C oxidase subunit I proteins of *Propionibacterium acidipropionici* ATCC4875 (Pacidi_2fr), *P. avidum* ATCC25577 (Pavidum; ZP_08938124.1), *P. acnes* KPA171202 (Pacnes; YP_055417.1) and *Microlunatus phosphovorus* NM-1 (Mphosp; YP_004574620.1). **S4.** CcO subunit I frameshift region. Alignment of 454 and Illumina reads with the frameshift region of cytochrome C oxidase subunit I. The combination of both technologies avoids the common 454 homopolymer error, supporting the existence of the frameshift. First ten reads are from 454 sequencing. Last ten reads are from Illumina sequencing. **S5.** Gene clusters comprising B12 biosynthesis genes. The small cluster (red) harbors genes responsible for providing aminolaevulinic acid and converting it to uroporphyrinogen III, as well as the interconversion of uroporphyrinogen III into haem. The large cluster (green) harbors genes responsible for cobalt transport and adenosylcobalamin synthesis from uroporphyrinogen III.

Additional file 3: Table S2. Transporter proteins comparison. Complete list of transporter families identified by annotation with TCDB classification.

Additional file 4: Table S3. PTS protein-coding genes. List of annotated genes related to phosphotransferase system in *P.acidipropionici* genome.

Abbreviations

PLA: Polylactic acid; bp: Base pairs; CDSs: Protein coding sequences; PHA: Polyhydroxyalkanoates; TC: Transporter Classification; ABC: ATP-binding cassette; CRISPRs: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats; NCBI: National Center for Biotechnology Information; GST: Glutathione S-transferase; PolyPs: Polyphosphates; PPK: Polyphosphate kinase; CUT1: Carbohydrate uptake transporter-1; CUT2: Carbohydrate uptake transporter-2; PAAT: Polar amino acids uptake transporter; HAAT: Hydrophobic amino acids uptake transporter; 2-DG: 2-deoxy-glucose; ANOVA: Analysis of variance; PTS: Phosphotransferase system; EI: Enzyme I; HPr: Histidine protein; Eli: Enzyme II; CcO: Cytochrome c oxidase; NDH-1: NADH dehydrogenase/complex I; SdhABC: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase; DMSO: Dimethyl sulfoxide; PEPC: Phosphoenolpyruvate carboxytransphosphorylase; PTA: Phosphate acetyltransferase; ACK: Acetate kinase; ADP-ACS: ADP-forming acetyl-CoA synthetase; SCSC: ADP-forming succinyl-CoA synthetase complex; ATCC: The Global Bioresource Center; GO: Gene Ontology; TCDB: Transporter Classification Database; OD: Optical density; HPLC: High-performance liquid chromatography; NMR: Nuclear magnetic resonance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LPP conceived and designed the experiments, carried out the bioinformatics analysis, analyzed the genome data and wrote the manuscript; MCBG conceived and designed the experiments, carried out the molecular experiments, analyzed the genome data and wrote the manuscript; VLQ performed the proteome experiment; LLC performed the batch fermentation; MFC contributed to the assembly, protein clustering and gene ontology analysis; IL carried out the NMR assay; AFBZ contributed to draft the manuscript; PJLT performed the DNA library preparation and sequencing; PM coordinated the sequencing experiment; JR participated in design of experiments and helped to write the manuscript; GAGP coordinated, conceived and designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Antônio Morschbacker and Avram Michael Slovic for comments and suggestions. The research was funded by Braskem S.A. and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). We acknowledge the Mass Spectrometry Laboratory at Brazilian Biosciences National Laboratory, CNPEM-ABTLus - Campinas, Brazil for their support with the mass spectrometric analyses.

Author details

¹Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil. ²Braskem S.A, CP 6192, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil. ³Department of Genetics, School of Medicine, Carolina Center for Genome Sciences, University of North Carolina, Wilson Hall, Rm 341, CB#3280, Chapel Hill, NC 27599-3280, USA.

Received: 27 June 2012 Accepted: 10 October 2012

Published: 19 October 2012

References

- Rincones J, Zeidler AF, Grassi MCB, Carazzolle MF, Pereira GAG: **The golden bridge for nature: the New biology applied to Bioplastics.** *Polym Rev* 2009, **49**:85–106.
- Zhu Y, Li J, Tan M, Liu L, Jiang L, Sun J, Lee P, Du G, Chen J: **Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source.** *Bioresour Technol* 2010, **101**:8902–8906.

- Suwannakham S, Yang S-T: **Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor.** *Biotechnol Bioeng* 2005, **91**:325–337.
- Coral J, Karp SG, Porto de Souza Vandenbergh L, Parada JL, Pandey A, Socclo CR: **Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources.** *Appl Biochem Biotechnol* 2008, **151**:333–341.
- Boyaval P, Corre C: **Production of propionic acid.** *Lait* 1995, **75**:453–461.
- Bizzari SN, Gubler R: **Propionic acid.** In *Chemical Economics handbook*. Englewood: IHS Chemical; 2004:1–29.
- Vorobjeva LI: *Propionibacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; 1999.
- Blanc P, Goma G: **Kinetics of inhibition in propionic acid fermentation.** *Bioprocess Eng* 1987, **2**:175–179.
- Goswami V, Srivastava AK: **Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, **56**:676–680.
- Jore JPM: **Efficient transformation system for propionibacterium freudenreichii based on a novel vector.** *Society* 2001, **67**:499–503.
- Rehberger TG, Glatz Ba: **Characterization of *Propionibacterium* plasmids.** *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**:864–871.
- Kiatpapan P, Murooka Y: **Genetic manipulation system in propionibacteria.** *J Biosci Bioeng* 2002, **93**:1–8.
- Kiatpapan P, Murooka Y: **Construction of an expression vector for propionibacteria and its use in production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium freudenreichii*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, **56**:144–149.
- Miescher S, Stierli MP, Teuber M, Meile L: **Propionacin SM1, a Bacteriocin from *Propionibacterium jensenii* DF1: Isolation and Characterization of the Protein and its Gene.** *Syst Appl Microbiol* 2000, **23**:174–184.
- Bruggemann H: **Insights in the pathogenic potential of *Propionibacterium acnes* from its complete genome.** *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 2005, **24**:67–72.
- Falentin H, Deutsch S-M, Jan G, Loux V, Thierry A, Parayre S, Maillard M-B, Dherbécourt J, Cousin FJ, Jardin J, Siguier P, Couloux A, Barbe V, Vacherie B, Wincker P, Gibrat J-F, Gaillardin C, Lortal S: **The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications.** *PLoS One* 2010, **5**:e11748.
- Akar A, Akkaya EU, Yesiladali SK, Celikyilmaz G, Cokgor EU, Tamerler C, Orhon D, Cakar ZP: **Accumulation of polyhydroxyalkanoates by *Microlunatus phosphovorus* under various growth conditions.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006, **33**:215–220.
- De Soete G: **A least squares algorithm for fitting additive trees to proximity data.** *Psychometrika* 1983, **48**:621–626.
- Merhej V, Royer-Carenzi M, Pontarotti P, Raoult D: **Massive comparative genomic analysis reveals convergent evolution of specialized bacteria.** *Biology direct* 2009, **4**:13.
- Callanan M, Kaleta P, O'Callaghan J, O'Sullivan O, Jordan K, McAuliffe O, Sangrador-Vegas A, Slattery L, Fitzgerald GF, Beresford T, Ross RP: **Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion.** *J Bacteriol* 2008, **190**:727–735.
- de la Cruz F, Davies J: **Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria.** *Trends Microbiol* 2000, **8**:128–133.
- Jain R, Rivera MC, Moore JE, Lake JA: **Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution.** *Mol Biol Evol* 2003, **20**:1598–1602.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ: **CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:181–190.
- Grissal, Vergnaud G, Pourcel C: **CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:W52.
- Moineau S, Tremblay S, Labrie S: **Phages of lactic acid bacteria: from genomics to industrial applications.** *ASM News* 2002, **68**:388–393.
- Garneau JE, Moineau S: **Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations.** *Microbial Cell Factories* 2011, **10**(Suppl 1): S20.
- Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM: **rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:1328–1333.
- Vuilleumier S: **Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for?** *J Bacteriol* 1997, **179**:1431–1441.

29. Pommer AJ, Cal S, Keeble AH, Walker D, Evans SJ, Kuhlmann UC, Cooper A, Connolly BA, Hemmings AM, Moore GR, James R, Kleanthous C: **Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9.** *J Mol Biol* 2001, **314**:735-749.
30. Belfort M, Roberts RJ: **Homing endonuclease: keeping the house in order.** *Nucleic Acid Research* 1997, **25**(17):3379-3388.
31. Seufferheld MJ, Alvarez HM, Farias ME: **Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:5867-5874.
32. Clark JE, Beegen H, Wood HG: **Isolation of intact chains of polyphosphate from "Propionibacterium shermanii" grown on glucose or lactate.** *J Bacteriol* 1986, **168**:1212-1219.
33. Nakamura K, Ishikawa S, Kawaharasaki M: **Phosphate uptake and release activity in immobilized polyphosphate-accumulating bacterium Microlunatus phosphovorus strain NM-1.** *J Ferment Bioeng* 1995, **80**:377-382.
34. McLennan AG: **The Nudix hydrolase superfamily.** *Cell Mol Life Sci: CMLS* 2006, **63**:123-143.
35. Lorca GL, Barabote RD, Zlotopolski V, Tran C, Winnen B, Hovorup RN, Stonestrom AJ, Nguyen E, Huang L-W, Kim DS, Saier MH: **Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1768**:1342-1366.
36. Feng X, Chen F, Xu H, Wu B, Li H, Li S, Ouyang P: **Green and economical production of propionic acid by Propionibacterium freudenreichii CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor.** *Bioresour Technol* 2011, **102**:6141-6146.
37. Liu Z, Ma C, Gao C, Xu P: **Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using Propionibacterium acidipropionici.** *Bioresour Technol* 2012, **114**:711-714.
38. Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML: **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil.** *FEMS Yeast Research* 2008, **8**:1155-1163.
39. Rendez-Gil F, Prieto JA, Sanz P: **The expression of a specific 2-deoxyglucose-6P phosphatase prevents catabolite repression mediated by 2-deoxyglucose in yeast.** *Curr Genet* 1995, **28**(2):101-107.
40. Görke B, Stülke J: **Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients.** *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**:613-624.
41. Ye K, Shijo M, Miyano K, Shimizu K: **Metabolic pathway of Propionibacterium growing with oxygen: enzymes, ¹³C NMR analysis, and its application for vitamin B12 production with periodic fermentation.** *Biotechnol Prog* 1999, **15**:201-207.
42. García-Horsman JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J, Gennis RB: **The superfamily of heme-copper respiratory oxidases.** *J Bacteriol* 1994, **176**:5587-5600.
43. Belevich I, Verkhovsky MI: **Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2008, **10**:1-29.
44. Miller MJ, Gennis RB: **The cytochrome d complex is a coupling site in the aerobic respiratory chain of Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1985, **260**:14003-14008.
45. Puustinen A, Finel M, Haltia T, Gennis RB, Wikstrom M: **Properties of the two terminal oxidases of Escherichia coli.** *Biochemistry* 1991, **30**:3936-3942.
46. Bekker M, de Vries S, Ter Beek A, Hellingwerf KF, Teixeira de Mattos MJ: **Respiration of Escherichia coli can be fully uncoupled via the nonelectrogenic terminal cytochrome bd-II oxidase.** *J Bacteriol* 2009, **191**:5510-5517.
47. Michel H: **The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase.** *Proc Natl Acad Sci* 1998, **95**:12819-12824.
48. Brzuszkiewicz E, Weiner J, Wollherr A, Thürmer A, Hüpeden J, Lomholt H, Kilian M, Gottschalk G, Daniel R, Mollenkopf HJ, Meyer TF, Brüggemann H: **Comparative Genomics and Transcriptomics of Propionibacterium acnes.** *PLoS One* 2011, **6**:e21581.
49. Wackwitz B, Bongaerts J, Goodman SD, Uden G: **Growth phase-dependent regulation of nuoA-N expression in Escherichia coli K-12 by the Fis protein: upstream binding sites and bioenergetic significance.** *Mol Gen Genet* 1999, **262**:876-883.
50. Hägerhäll C: **Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme.** *Biochim Biophys Acta* 1997, **1320**(2):107-141.
51. Kaspar HF: **Nitrite reduction to nitrous oxide by propionibacteria: Detoxication mechanism.** *Arch Microbiol* 1982, **133**:126-130.
52. Swarta R, Riedela K-H, Britzb T: **Optimized standard conditions for determination of nitrate reduction in propionibacteria.** *Lait* 1998, **78**:217-226.
53. Charakhchyan I, Verobyeva L: **Sulfate assimilation by propionic bacteria.** *Mikrobiologiya* 1984, **53**:38-42.
54. Murooka Y, Piao Y, Kiatpapan P, Yamashita M: **Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of Propionibacterium freudenreichii. An overview.** *Lait* 2005, **85**:9-22.
55. Scott AI, Roessner CA: **Recent discoveries in the pathways to cobalamin (coenzyme B₁₂) achieved through chemistry and biology.** *Pure Appl Chem* 2007, **79**(12):2179-2188.
56. Wegener WS, Reeves HC, Rabin R, Ajl SJ: **Alternate pathways of metabolism of short-chain fatty acids.** *Bacteriol Rev* 1968, **32**:1-26.
57. Suwannakham S, Huang Y, Yang S-T: **Construction and characterization of ack knock-out mutants of Propionibacterium acidipropionici for enhanced propionic acid fermentation.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **94**:383-395.
58. Bräsen C, Schönheit P: **Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea.** *Arch Microbiol* 2001, **175**:360-368.
59. Schönheit P, Schafer T: **Metabolism of hyperthermophiles.** *World J Microbiol Biotechnol* 1995, **11**:26-57.
60. Wolfe AJ: **The acetate switch.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, **69**(1):12-50.
61. Barbiato F, Chedaille D, Bories A: **Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1997, **47**:441-446.
62. de Graef MR, Alexeeva S, Snoep JL, Teixeira de Mattos MJ: **The Steady-State Internal Redox State (NADH/NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1999, **181**:2351-2357.
63. Berrios-rivera SJ, San KY, Bennett GN: **The effect of carbon sources and lactate dehydrogenase deletion on 1,2-propanediol production in Escherichia coli.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003, **30**:34-40.
64. Emde R, Schink B: **Enhanced Propionate Formation by Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii in a Three-Electrode Amperometric Culture System.** *Appl Envir Microbiol* 1990, **56**:2771-2776.
65. Schuppert B, Schink B, Troesch W: **Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by Propionibacterium acidipropionici in a three-electrode amperometric culture system.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1992, **37**:549-553.
66. Pereira GAG, Perez JR, Carazzolle MF, Zeidler AFB, Parizzi LP, Calderón LAL, Grassi MCB, Lunardi I, De Oliveira LG, Rodrigues JAR, Moran PJS, Morschbacker ALRC, Roza L, Andrade MHS: **Microorganism and process for producing n-propanol.** WIPO: World Intellectual Property Organization; 2011. publication number WO/2011/029166.
67. Stackebrandt E, Cummins CS, Johnson JL: **Family Propionibacteriaceae: The genus propionibacterium.** In *Prokaryotes*. Edited by Dworkin M. New York: Springer Science; 2006:400-418.
68. Wood HG, Leaver FW: **CO₂ turnover in the fermentation of 3, 4, 5 and 6 carbon compounds by the propionic acid bacteria.** *Biochim Biophys Acta* 1953, **12**:207-222.
69. Siu PML, Wood HG, Stjernholm RL: **Fixation of CO₂ by Phosphoenolpyruvic Carboxytransphosphorylase.** *J Biol Chem* 1961, **236**:PC21-PC22.
70. Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y: **Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology.** *Annu Rev Plant Biol* 2004, **55**:69-84.
71. Bowien B, Kusian B: **Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph Ralstonia eutropha.** *Arch Microbiol* 2002, **178**:85-93.
72. Lombard J, Moreira D: **Early evolution of the biotin-dependent carboxylase family.** *BMC Evol Biol* 2011, **11**:232.
73. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore D, Seidman JG, Struhl K: *Current Protocols in Molecular Biology*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2004.
74. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim J-B, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, et al: **Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.** *Nature* 2005, **437**:376-380.
75. Bennett S: **Solexa Ltd.** *Pharmacogenomics* 2004, **5**:433-438.

76. Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z, Li Y, Li S, Shan G, Kristiansen K, Li S, Yang H, Wang J, Wang J: **De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing.** *Genome Res* 2010, **20**:265–272.
77. Zerbino DR, Birney E: **Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs.** *Genome Res* 2008, **18**:821–829.
78. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL: **Versatile and open software for comparing large genomes.** *Genome Biol* 2004, **5**:R12.
79. Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL: **Improved microbial gene identification with GLIMMER.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:4636–4641.
80. Slater GSC, Birney E: **Automated generation of heuristics for biological sequence comparison.** *BMC Bioinforma* 2005, **6**:31.
81. *ELPH: Estimated Locations of Pattern Hits.* <http://www.cbc.umd.edu/software/elph/>.
82. Magrane M, Consortium U: *UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data.* Oxford: Database; 2011:bar009.
83. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Geer LY, Kapustin Y, Khovayko O, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Miller V, Pruitt KD, Schuler GD, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusov RL, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E: **Database resources of the National Center for Biotechnology Information.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:D5–D12.
84. Koski LB, Gray MW, Lang BF, Burger G: **AutoFACT: an automatic functional annotation and classification tool.** *BMC Bioinforma* 2005, **6**:151.
85. Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH: **UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2007, **23**:1282–1288.
86. Ogata H: **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:29–34.
87. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH: **CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:D237–D240.
88. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M: **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2005, **21**:3674–3676.
89. Lowe TM, Eddy SR: **tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:955–964.
90. Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt H-H, Rognes T, Ussery DW: **RNAmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:3100–3108.
91. Saier MH, Tran CV, Barabote RD: **TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:D181–D186.
92. *BLAST executables.* <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>.
93. Langille MGI, Brinkman FSL: **IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2009, **25**:664–665.
94. Karp PD, Paley S, Romero P: **The Pathway Tools software.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2002, **18**(Suppl 1):S225–S232.
95. Villén J, Gygi SP: **The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry.** *Nat Protoc* 2008, **3**:1630–1638.

doi:10.1186/1471-2164-13-562

Cite this article as: Parizzi et al.: The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC Genomics* 2012 **13**:562.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CAPÍTULO 2

Engenharia metabólica de propionibactéria para produção de n-propanol

INTRODUÇÃO

Cadeias carbônicas reduzidas, são a matéria prima para diversos produtos de interesse comercial. O álcool n-Propanol (1-propanol ou propanol) é um solvente químico de fórmula $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ amplamente utilizado em diversos setores industriais. Dentre as principais aplicações estão a produção de tintas, adesivos, herbicidas, inseticidas, como intermediário na produção de ésteres, resinas termoplásticas e compostos farmacêuticos. Atualmente esse álcool é produzido a partir de derivados do petróleo em um processo conhecido como Oxo, o qual compreende a hidroformilação do etileno a propionaldeído seguida pela hidrogenação do propionaldeído a propanol (Saito *et al.*, 1981; Unruh *et al.*, 1999). A alta demanda por n-propanol juntamente com o interesse na produção de compostos químicos a partir de fontes renováveis de carbono, estimulam o desenvolvimento de processos fermentativos para a produção desse composto. Além de todas as aplicações industriais citadas acima, o n-propanol obtido por rotas biológicas, poderia ser convertido por desidratação a propileno, uma olefina utilizada para a produção de diversos químicos no setor petroquímico.

Alguns microrganismos produzem, naturalmente, pequenas quantidades de n-propanol como sub-produto de fermentações. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, o n-propanol é produzido como um sub-produto da degradação do ácido 2-cetobutirato (Hazelwood *et al.*, 2008). Alguns estudos manipularam geneticamente essa via metabólica para aumentar a produção de n-propanol utilizando glicose como fonte de carbono. No entanto, esse álcool foi produzido com um rendimento considerado baixo (4 g/g de glicose; Hawkins *et al.*, 2009).

Em bactérias do gênero *propionibacterium*, a produção de n-propanol, com um baixo rendimento (4 g/g de glicerol), é observada durante a fermentação

propiónica a partir de glicerol (Barbirato *et al.*, 1997). Não é reportada a produção de n-propanol utilizando glicose, sacarose ou lactato como fonte de carbono (Barbirato *et al.*, 1997). Muitos estudos explicam esse perfil fermentativo como um resultado da necessidade da célula em balancear o potencial redox já que sob condições anaeróbicas, alguns metabólitos são utilizados como aceptores finais de elétrons. Logo, maior quantidade de compostos oxidados será produzida utilizando glicose (grau de redução = 4,66) ou lactato (grau de redução = 4) como substrato, enquanto compostos mais reduzidos serão obtidos ao utilizar fontes de carbono como maior grau de redução, como por exemplo, o glicerol (grau de redução igual a 4,7).

Apesar do baixo rendimento da produção fermentativa de n-propanol por propionibactéria, esse microrganismo surge como possível candidato a biorreator para produção desse composto. Além do potencial apresentado por propionibactéria para a produção de compostos de 3 carbonos essa bactéria possui, naturalmente, vias metabólicas para a produção de n-propanol. Dentre as possíveis estratégias para aumentar a produção desse álcool em *P. acidipropionici* destacam-se como mais promissoras a engenharia metabólica para otimização da via de n-propanol e a alteração do padrão fermentativo a partir da regulação do balanço redox.

Durante a fermentação, um substrato como a glicose é oxidado por várias reações enzimáticas em moléculas menores, com concomitante liberação de energia. Essas reações não ocorrem simultaneamente e os elétrons liberados são transferidos de uma reação para outra por meio de carreadores como Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NAD) e Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NADP). No catabolismo, a glicose é oxidada por enzimas que usam NAD(P)^+ como cofator, gerando equivalentes reduzidos na forma de NAD(P)H . Para dar continuidade ao metabolismo fermentativo o

cofator NAD(P)⁺ deve ser regenerado através de enzimas que utilizam NAD(P)H e reduzem metabólitos intermediários. Logo, é muito importante que a razão NAD(P)⁺/NAD(P)H seja mantida para o funcionamento das funções metabólicas normais. A necessidade da manutenção do balanço NAD(P)⁺/NAD(P)H, portanto, limita as possibilidades de manipulação das vias metabólicas do microrganismo

Dada essa limitação diversos estudos reportam estratégias para regular o balanço redox celular, alterando, principalmente, a razão NAD(P)⁺/NAD(P)H para aumentar a produção de compostos reduzidos. Entre essas estratégias estão o uso de diferentes substratos, o controle da concentração de O₂, e uso de faixas de temperatura e pH (Wang *et al.*, 2008; Piveteau, 1999). Uma das estratégias mais promissoras (Wang *et al.*, 2008) descrita para regular a quantidade de cofatores reduzidos e oxidados é a adição ao meio de cultura de aceptores ou doadores de elétrons artificiais, tais como complexos metálicos (por exemplo, eletrodos) e compostos orgânicos. Esses compostos atuam como mediadores reduzindo ou oxidando cofatores como NAD(P)⁺/NAD(P)H.

De fato, alguns estudos estão sendo desenvolvidos acoplando sistemas eletroquímicos a processos fermentativos para alterar o balanço redox celular. Esses sistemas são denominados biorreatores elétricos (Figura 2.1). O metabolismo microbiano pode ser estimulado pelas reações de redução que ocorrem no cátodo ou pelas reações de oxidação que acontecem no ânodo (Thrash & Coates, 2008).

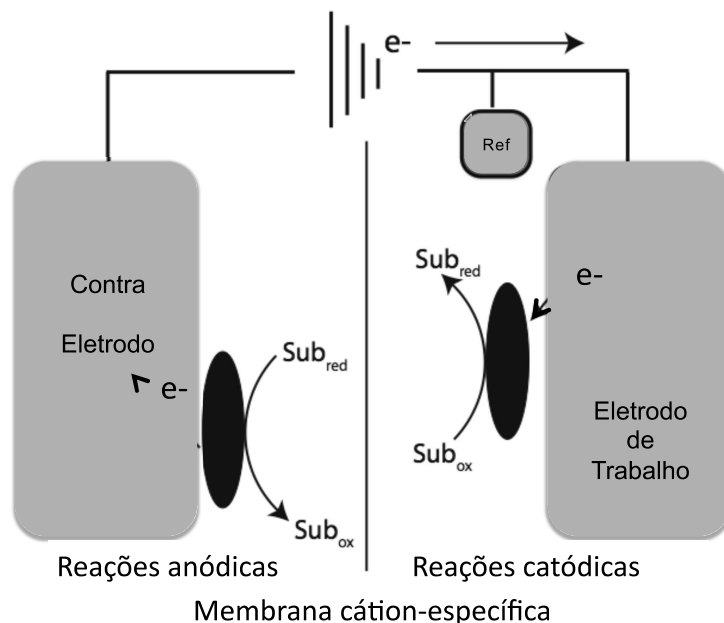


Figura 2.1: Representação esquemática de um biorreator elétrico (Figura adaptada do artigo de Thrash & Coates, 2008).

Com o objetivo de direcionar o padrão fermentativo de *P. acidipropionici* para produção de maiores quantidades de ácido propiônico, Emde & Schink (1990) fizeram o cultivo dessa bactéria em fermentador acoplado a um sistema eletroquímico de 3 eletrodos. Utilizando eletrodo de trabalho de platina e sepulcrato de cobalto como mediador para a transferência de elétrons, reportaram o aumento de 68% e uma diminuição de 90% na quantidade de ácido propiônico e ácido acético produzidos, respectivamente. Schuppert e colaboradores (1992) também reportaram um resultado similar. Com o cultivo de *P. acidipropionici* em biorreator acoplado a um sistema eletroquímico de 3 eletrodos, Schuppert *et al.* (1992) obtiveram um aumento de 42% na produção de ácido propiônico e o ácido acético não foi produzido. Com resultados como esses relatados, a regulação eletroquímica do metabolismo de diversos microrganismos tem ganhado muita atenção, com grande potencial de aplicação

em diversos setores industriais. Uma outra aplicação é a conversão eletroquímica de CO₂ em formato, e a utilização deste composto pela bactéria *Ralstonia eutropha* para a produção dos combustíveis isobutanol e 3-metil-1-butanol (Li *et al.*, 2012). Nesse contexto, um processo eletroquímico integrado a fermentação de propionibactéria apresenta grande potencial para aumentar a produção de n-propanol, uma vez que seria capaz de suprir equivalentes redutores na forma de NAD(P)H necessários para a produção desse álcool reduzido a partir de açúcar.

Apesar da influência que o processo eletroquímico pode exercer sobre o metabolismo de *P. acidipropionici* direcionando-o para formação de compostos reduzidos, modificações genéticas para aumentar a produção de n-propanol também são de grande importância. Como apresentado no capítulo 1, através da análise do genoma de *P. acidipropionici* foi identificada uma possível via metabólica para a produção de n-propanol. O intermediário para a produção de ácido propiônico, propionil-CoA, deve ser convertido a propionaldeído e este convertido a n-propanol através de reações de oxi-redução catalisadas pelas enzimas aldeído e álcool desidrogenase, respectivamente. A superexpressão dos genes responsáveis para a produção de n-propanol poderia contribuir significativamente para aumentar a concentração final desse compostos. Entretanto, estudos adicionais devem ser feitos para identificar quais dentre as enzimas identificadas estão envolvidas nessa via metabólica.

Uma alternativa é a expressão heteróloga, em *P. acidipropionici*, de genes envolvidos na produção de álcoois. Para isso é necessária a busca por vias metabólicas em organismos que produzam grandes quantidades de solventes. Nesse contexto, é possível destacar bactérias do gênero *Clostridium*, produtoras de grandes quantidades etanol, butanol, acetona e isopropanol. Dentre as bactérias desse gênero, destaca-se a espécie *Clostridium acetobutylicum*. Isolados de *C. acetobutylicum* foram identificados pela primeira vez entre 1912 e 1914

(Weitzmann, 1915; Gabriel, 1928), desde então passaram a ser utilizados em fermentações de escala industrial para produção de acetona e butanol (Jones & Woods, 1986). No entanto, na década de 1950, a produção fermentativa desses compostos foi descontinuada devido ao estabelecimento de processos petroquímicos de baixo custo para produção de acetona e butanol (Nölling et al., 2001).

Durante um cultivo contínuo, o metabolismo de *C. acetobutylicum* pode ser dividido em 3 principais fases: (i) fase acidogênica, a qual é caracterizada por pH neutro e produção dos ácidos acético e butírico; (ii) fase solventogênica, na qual ocorre produção dos solventes acetona, butanol e etanol, em pH baixo, a partir dos ácido orgânicos produzidos na fase acidogênica; (iii) fase alcoologênica, caracterizada pela produção dos álcoois butanol e etanol em pH neutro e alta disponibilidade de NAD(P)H (Girbal *et al.*, 1995; Fontaine *et al.*, 2002). Durante a fase solventogênica e alcoologênica, a produção dos álcoois etanol e butanol por *C. acetobutylicum* ocorre em dois passos catalisados pelas enzimas aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase. Os metabólitos acetil-CoA e butiril-CoA são reduzidos, a acetaldeído e butiraldeído e então a etanol e butanol, respectivamente (Fontaine *et al.*, 2002). Um dos genes responsável por essa conversão é o gene *adhE2*, o qual codifica para a enzima bifuncional aldeído/álcool desidrogenase (Fontaine *et al.*, 2002). Esse gene está expresso e é responsável pela produção de butanol especificamente na fase alcoologênica (Fontaine *et al.*, 2002).

Apesar de estritamente relacionada à produção de solventes como etanol e butanol, Holt e colaboradores (1984) demonstraram que ao adicionar ácido propiônico a uma cultura de *C. acetobutylicum* foi obtido um rendimento de 50% (g/g) de n-propanol. Esse resultado é uma evidência que enzimas álcool/aldeído desidrogenase de *C. acetobutylicum* além de converter os ácidos orgânicos,

naturalmente produzidos em seu metabolismo (ácidos butírico e acético), nos seus respectivos álcoois, apresenta certa afinidade por ácido propiônico convertendo-o em n-propanol.

O conjunto de evidências apresentadas indica que uma estratégia combinando o uso de biorreatores elétricos com a expressão heteróloga do gene *adhE2* em *P. acidipropionici* é promissora para a obtenção de maiores rendimentos de n-propanol. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho consistiu em testar a eficiência dessa estratégia para a produção de n-propanol.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Linhagens de bactérias e meios de cultivo

Neste estudo foram utilizadas as bactérias *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875TM e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 9614TM, adquiridas do centro de coleção de organismos “Global Bioresource Center (ATCC)”. Para o cultivo dessas bactérias foi estabelecido o seguinte meio de cultura (denominado meio padrão): 2% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 0,1% de KH₂PO₄, 0,2% de (NH₄)₂HPO₄, 0,1% das soluções salinas 1 e 2 (solução 1: 1% de MgSO₄.7H₂O e 0,25% de MnSO₄.H₂O; solução 2: 1% de CaCl₂.2H₂O e 1% de CoCl₂.6H₂O; pH 6,8), 1% de ágar, quando necessário. Para seleção de bactérias *P. acidipropionici* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* transformadas com plasmídeo, foram adicionados ao meio 250 µg/mL de higromicina B (Invitrogen) ou 100 µg/mL de Ampicilina (Sigma-Aldrich), quando necessário. A bactéria *P. freudenreichii* foi incluída nesse estudo devido às dificuldades encontradas na transformação da espécie *P. acidipropionici* (Ver item 1 na seção Resultados e Discussão). A escolha de *P. freudenreichii* deve-se ao fato

de essa possuir um metabolismo fermentativo similar ao de *P. acidipropionici* (Falentin *et al.*, 2010; Parizzi *et al.*, 2012) e ter sido transformada geneticamente com sucesso por outros grupos de pesquisa (Jore *et al.*, 2001).

Para construção e a propagação de plasmídeos foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* DH10 β e JM110 (*dcm*⁻ e *dam*⁻), essa última cedida gentilmente pelo Laboratório Nacional de Biociências (<http://www.lnbio.org.br/site/home.aspx>). Células de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani: 1% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de Cloreto de sódio (NaCl) e 1,5% de ágar, quando necessário. Para seleção de transformantes foram adicionados ao meio 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 20 minutos em autoclave Eletrolab vertical modelo 503/3.

2. Plasmídeos

Abaixo estão descritos os plasmídeos utilizados e construídos nesse estudo:

- **pUC18:** plasmídeo comercial de 2686 bp contendo o gene de resistência a ampicilina (*bla*) e sítio de clonagem múltipla inserido no gene *lacZ*.
- **pRGO1:** plasmídeo de baixa cópia isolado de *P. acidipropionici* ATCC 4875 com 6868 bp e conteúdo GC de 65,4% (Kiatpapan *et al.*, 2000). Contém 7 diferentes ORFs, entretanto apenas 4 apresentam homologia com sequências depositadas em bancos de dados. Duas ORFs codificam, provavelmente, para proteínas de replicação (Rep A e RepB), uma ORF apresenta alto nível de similaridade com enzimas DNA invertase e a quarta ORF identificada codifica para um peptídeo de 87 aminoácidos possivelmente envolvido na estabilização do plasmídeo.

- **pJOE826:** plasmídeo híbrido de 7361 bp com origem de replicação para propagação em *Streptomyces* ssp. e *E. coli*. Apresenta sítio de clonagem múltipla, gene de resistência a ampicilina (*bla*) para seleção em *E. coli* e gene de resistência a higromicina (*hph* de *Streptomyces hygroscopicus*) para seleção em *Streptomyces* ssp. Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Josef Altenbuchner da Universidade de Stuttgart (Alemanha).
- **pFLØACT4:** plasmídeo híbrido de 7500 bp com origem de replicação para propagação em *Streptomyces* ssp. e *E. coli*. Apresenta sítio de clonagem múltipla, gene de resistência a ampicilina (*bla*) para seleção em *E. coli* e gene de resistência a tiostreptona (*tsr* de *Streptomyces laurentii*) para seleção em *Streptomyces* ssp. Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gabriel Padilla da Universidade de São Paulo.
- **pCG1:** plasmídeo híbrido de 8458 bp construído nesse estudo para expressão de genes em *P. acidipropionici*. Esse plasmídeo consiste em parte do vetor pRGO1 de *P. acidipropionici* ATCC 4875 (genes que codificam para proteínas RepA e RepB) fusionado com o plasmídeo comercial pUC18. Apresenta origem de replicação para propagação nessas duas bactérias.
- **pCG2:** plasmídeo híbrido de 10211 bp construído nesse estudo para expressão de genes em *P. acidipropionici*. Formado pelo plasmídeo pJOE826 contendo o gene sintético *adhE2* de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

3. Preparo e transformação de *Escherichia coli* eletrocompetente

O preparo e a transformação de células eletrocompetentes da bactéria *E. coli* foi realizado de acordo com o protocolo “Basic Protocol 2: High-Efficiency Transformation By Electroporation” descrito no livro *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 2004).

4. Preparo e transformação de propionibactéria eletrocompetente

Com base nos protocolos estabelecidos por Kiatpapan e colaboradores (2000) para a eletroporação de *P. freudenreichii* e Cheong e colaboradores (2008) para a transformação de *P. acnes*, foi desenvolvido método de transformação para espécies de propionibactéria. Propionibactérias apresentam um sistema de metilação/restrrição provavelmente ativo, que dificulta a transformação por DNA exógenos. Uma evidência para essa hipótese, é a presença do sistema CRISPR/Cas, um mecanismo de defesa contra DNA invasor identificado no genoma de *P. freudenreichii* (Falentin *et al.*, 2010) e *P. acidipropionici* (Parizzi *et al.*, 2012). Para amenizar a resposta do sistema de metilação/restrrição de *P. acnes*, Cheong e colaboradores (2008) utilizam plasmídeos construídos em *E. coli* que não metilam o DNA (*dcm⁻* e *dam⁻*). Padrões diferentes de metilação de DNA podem ativar o sistema de restrrição como uma forma de defesa da bactéria e então prejudicar o ensaio de transformação. Outro ponto a ser considerado é quantidade de plasmídeo utilizada. Altas concentrações de plasmídeo também podem ativar o sistema de restrrição levando a degradação do DNA exógeno. Cheong e colaboradores (2008) também reportam a importância do tampão de eletroporação e a cubeta a ser utilizada. Em cubetas de 1mm, o campo elétrico é maior, impossibilitando a ativação de enzimas que degradariam o vetor de transformação. Tendo em vista essas informações foram testados diversos métodos para transformação de propionibactérias, considerando as variáveis quantidade de DNA, pulso elétrico, cubeta e tampão para eletroporação, temperatura de crescimento de células de propionibactérias e linhagens de *E. coli* para replicação do plasmídeo. Após diversos testes foi o estabelecido o protocolo descrito a seguir.

Para a preparação de propionibactérias eletrocompetentes, as células foram cultivadas, anaerobicamente, a 30°C em meio padrão até atingir a fase estacionária.

Posteriormente, foi feito um inóculo de 10% dessa cultura em um novo meio e as células foram incubadas por 5-6 horas a 30°C em atmosfera anaeróbica. As células foram, então, precipitadas por centrifugação e lavadas 2 vezes com tampão de eletroporação (272 mM de sacarose, 7 mM de fosfato de sódio – pH 6,8 e 1 mM de cloreto de magnésio). Ao final, as células foram ressuspensas em 200 µL deste mesmo tampão. Visando maior eficiência no processo de transformação, sempre foram utilizadas células eletrocompetentes recém-preparadas. As células não foram estocadas e/ou mantidas a -80 °C para posterior transformação.

A eletroporação foi realizada em eletroporador Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad). Em um tubo de 1,5 mL, 100µL de células foram misturadas a 1-5 ng de DNA isolados de células de *E. Coli* JM110 (*dcm*⁻ e *dam*⁻) e mantidas por 5 minutos no gelo. Após esse procedimento as células foram transferidas para cubetas de eletroporação geladas de 1 mm (Bio-Rad) e eletroporadas utilizando os seguintes parâmetros: 1,5 kV durante, 200 Ω e 25 F. Em seguida, 1mL de meio de cultura padrão líquido foi adicionado e as células foram incubadas por 5 horas a 30°C, em atmosfera anaeróbica. As placas foram incubadas de 7 a 12 dias e a seleção de transformante foi feita em meio padrão sólido com 250 µg/ml de higromicina B (Invitrogen) ou 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich).

5. PCR de colônia de bactérias

Um vez obtidas colônias isoladas de *E.coli* ou *P. acidipropionici*, foram realizados PCR de colônia como primeiro teste para confirmação da transformação com o plasmídeo de interesse. Com a finalidade de obter pequena quantidade de massa celular, cada colônia foi tocada rapidamente utilizando ponteiros de 10 µL e a massa celular obtida foi dispensada em tubos de PCR de 200 µL contendo 20 µL de água. Os tubos foram aquecidos a 94°C durante 6 minutos e logo em seguida resfriados a - 20°C por 10 minutos. A variação de temperatura tem como objetivo a

liberação e a desnaturação da fita de DNA assim como a inativação de proteases e nucleases (Sambrook *et al.*, 2001). Posteriormente os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 2 minutos e 2 µL do sobrenadante foi utilizado como molde para a reação de PCR.

Os componentes utilizados para reação de amplificação foram: 1X tampão para PCR (Invitrogen), 3 mM de cloreto de magnésio, 2 mM de dNTPs, 200 nM de *primer forward*, 200 nM de *primer reverse*, e 1 u de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen), em um volume total de 10 µL. As amostras foram colocadas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem) com o seguinte programa: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C seguido por 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de hibridização dos *primers* e 1 minuto para cada 1000 bp que se deseja amplificar a 72°C. O programa foi finalizando com um passo de extensão de 5 minutos a 72°C. Como controles negativos da reação, foi realizada a mesma reação sem o DNA molde e utilizando uma colônia de *E.coli* ou *Propionibacterium ssp.* selvagem.

6. Extração de plasmídeo de *Escherichia coli* em mini escala por lise alcalina – miniprep

A extração de plasmídeos de *E. coli* foi realizada utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) ou a partir do protocolo “*Minipreps of Plasmid DNA – alkaline lyses miniprep*” descrito no livro *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 2004). A concentração e a pureza do DNA plasmidial foram determinadas a partir da análise em espectrofotômetro (Nanodrop – Thermo Scientific) a 260 e 280 nm, respectivamente.

7. Extração do DNA total de espécies de propionibactéria

A extração do DNA total de espécies de propionibactéria foi realizada a partir do protocolo desenvolvido por Ausubel e colaboradores (2004) com algumas modificações. Inicialmente foi feito um inóculo da bactéria em meio adequado para o seu crescimento (descrito acima). A cultura foi mantida durante 2 dias em uma atmosfera anaeróbica, sob uma temperatura de 30°C e sem agitação. Para a extração do DNA genômico, foi retirada uma alíquota de 2 mL ($OD_{600} \sim 2,0$), as células foram precipitadas e em seguida ressuspendidas em 400 μ L de tampão TE pH 8,0. Para quebra da parede celular, foram adicionados 50 μ L de lisozima 10 mg/mL (Sigma-Aldrich) e a suspensão foi mantida *overnight* a 37°C com agitação de 100 rpm.

Posteriormente foram acrescentados 70 μ L de 10% SDS e 5 μ L de Proteinase K a 10 mg/mL (Sigma-Aldrich). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 65°C durante 10 minutos. Em seguida adicionou-se 100 μ L de NaCl 5M e 100 μ L de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl (0,8 g/L de CTAB e 0,4 g/L de NaCl). Esta suspensão foi agitada e incubada novamente a 65°C por mais 10 minutos. Foram adicionados 750 μ L de uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (v/v) e a mistura foi agitada. Em seguida, essa mistura foi centrifugada a 12000 x g e o sobrenadante (cerca de 600 μ L) foi transferido para outro tubo. Para precipitação do DNA genômico, foram adicionados 500 μ L de isopropanol a -20°C e a amostra foi mantida a temperatura de -20°C durante 30 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000 x g durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% a temperatura de -20°C. O DNA extraído foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μ L de água MiliQ esterilizada. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas a partir da análise em espectrofotômetro (Nanodrop – Thermo Scientific) a 260 e 280 nm, respectivamente.

8. Reações utilizando enzimas de restrição

As reações de digestão utilizando enzimas de restrição foram feitas em um volume final de 20 μL contendo 1 μg de DNA, 2 μL do tampão de digestão apropriado para cada enzima e 0,5 μL de cada enzima de restrição. As reações foram incubadas *overnight* a 37°C (temperatura de atividade ótima para todas as enzimas utilizadas) e os produtos foram analisados através de eletroforese utilizando géis de agarose.

9. Preparo de gel de agarose e eletroforese

Para análise dos produtos obtidos nas reações de PCR e nas reações utilizando enzimas de restrição, 5 μL de cada amostra de DNA foram adicionados a 1 μL de *Loading buffer* 6x (Fermentas). As amostras foram aplicadas em gel de agarose com concentração de 0,8 a 2% contendo brometo de etídio ou GelRed™ (Biotium) e a eletroforese foi realizada em tampão TAE 1x (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de Na₂ EDTA, pH 8,5) sob uma voltagem de 5V/cm, utilizando a fonte PowerPac HC (Bio-Rad). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta utilizando o fotodocumentador Image Master VDS (Pharmacia Biotech) ou o fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (UVP).

10. Construção do plasmídeo pCG1

A estratégia utilizada para construir o vetor de transformação para espécies de propionibactéria foi baseada no estudo realizado por Kiatpapan e colaboradores (2000). Esses autores reportam a alta homologia entre os produtos das *orf1*, *orf2* presentes em pRGO1, e as proteínas RepA e RepB, as quais apresentam um papel importante na replicação do plasmídeo em *E. coli*. Logo, constroem o vetor pPK705 o qual contém o plasmídeo comercial pUC18, ORFs 1, 2, 5 e 6 do plasmídeo pRGO1 e o gene de resistência a higromicina (*hph*) como marcador.

Sendo assim, para a construção do vetor de transformação de propionibactéria, o primeiro passo foi a extração do plasmídeo pRGO1 de *P. acidipropionici*. Entretanto, várias dificuldades foram encontradas para a extração do DNA plasmidial, devido, provavelmente, ao baixo número de cópias de plasmídeo por célula. Consequentemente, foi amplificado apenas o fragmento de interesse contendo a orf1(RepA), orf2 (RepB), orf5, orf6, conforme descrito por Kiatpapan e colaboradores (2000). Para amplificação foram utilizados os *primers* pRGO1-F (5'-TGTACATGAGGCTGCCGTAG-3') e pRGO1-R (5'-TGGCATATCCAGTGATGCTC-3'), gerando um fragmento de 5879bp. Os componentes para reação de PCR foram: 1X tampão para PCR (Invitrogen), 4,4 mM cloreto de magnésio, 2 mM dNTPs, 1X BSA, 5µl de uma solução DMSO 20X, 200 nM *primer forward*, 200 nM *primer reverse*, 150 ng de DNA e 1 u de *Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), em um volume total de 50 µL. As amostras foram colocadas em termociclador (Veriti Thermal Cycler) com o seguinte programa: 7 minutos de desnaturação inicial a 94°C seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 seg a 59°C e 6 minutos a 68°C, e finalizando com um passo de extensão final por 15 minutos a 68°C. Como controle negativo da reação, fizemos a mesma reação sem o DNA molde. A confirmação do fragmento amplificado foi feita a partir de análise de restrição utilizando as enzimas SphI (Fermentas) e SacI (Fermentas).

Em seguida, o fragmento amplificado do plasmídeo pRGO1 e o plasmídeo pUC18 foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI (Fermentas) e EcoRI (Fermentas), purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e quantificados a partir da análise em espectrofotômetro (Nanodrop – Thermo Scientific) a 260 nm. A reação de ligação dos fragmentos foi realizada com base na proporção 3:1 inserto:vetor – fragmento pRGO1:pUC18 – adicionada de 1 µL de tampão 10x e 1 µL de T4 DNA ligase (promega), em volume final de 10 µL.

A reação de ligação foi transformada em *E. coli* eletrocompetente e os possíveis transformantes selecionados em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Para confirmação da construção o DNA plasmidial foi extraído de algumas colônias crescidas no meio sólido e em seguida foi realizada análise de restrição utilizando as enzimas PvuII (Fermentas) e SalI (Fermentas). Abaixo a representação esquemática do plasmídeo pCG1 (Figura 2.2).

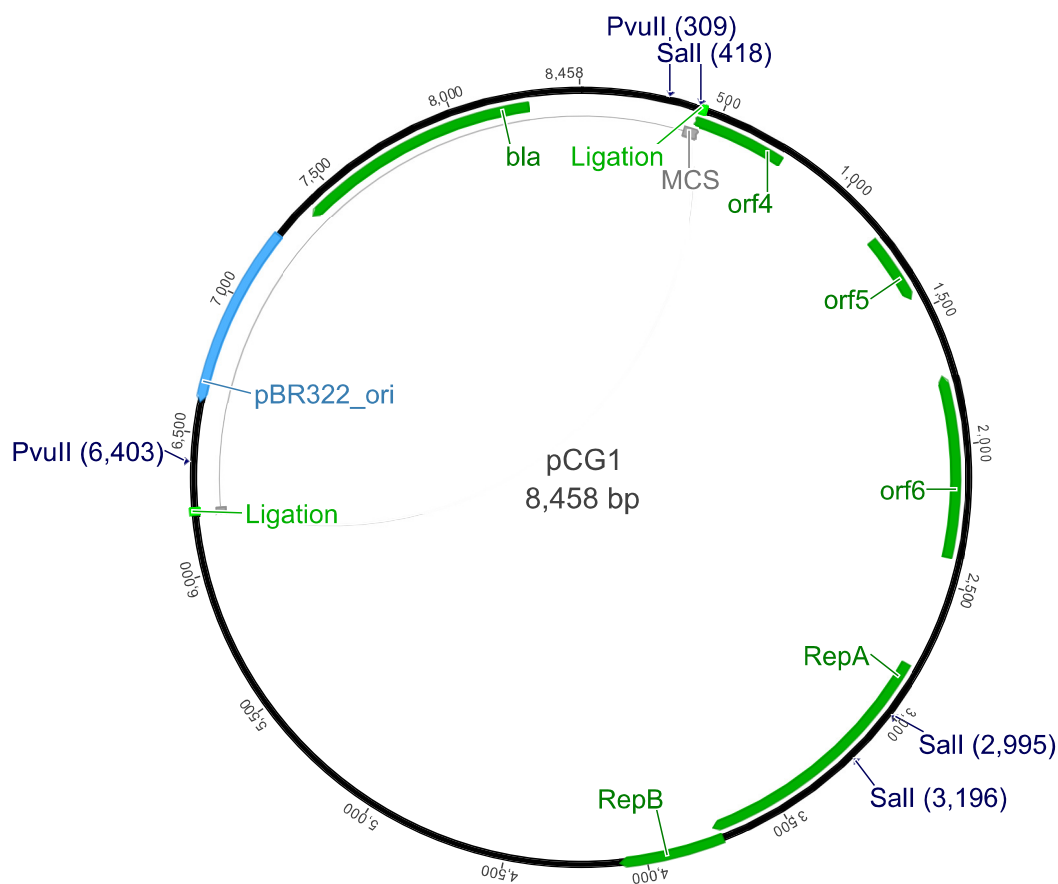


Figura 2.2: Representação esquemática da construção do plasmídeo pCG1 (representação obtida utilizando o *software* Geneious versão 5.6).

11. Construção do plasmídeo pCG2

Para construção do plasmídeo pCG2 foi utilizado o esqueleto do plasmídeo pJOE826 e o gene sintético *adhE2* de *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Uniprot Accesion No. P33744), controlado pelo promotor e terminador do gene metilmalonil-CoA carboxitransferase de *P. acidipropionici*. Essa construção poderia ter sido feita utilizando o plasmídeo pFLØACT4 ao invés do plasmídeo pJOE826. No entanto, as análises do crescimento de propionibactérias em diferentes concentrações dos antibióticos tiostreptona e higromicina B demonstraram que bactérias do gênero *Propionibacterium* são resistentes a tiostreptona e susceptíveis a higromicina B. Logo, foi escolhido gene *hph* para seleção de transformantes de propionibactérias e consequentemente o plasmídeo pJOE826.

Devido à diferença entre o conteúdo GC das bactérias *C. acetobutylicum* e *Propionibacterium* ssp., o gene álcool/aldeído desidrogenase precisou ser otimizado e sintetizado. A otimização do gene foi feita utilizando o programa GeneDesigner (Villalobos *et al.*, 2006) e seguindo os seguintes critérios: código genético adaptado ao das proteínas ribossomais de *P. acidipropionici*, que são altamente expressas; foram evitados sítios de restrição das enzimas BamHI, AclI e AaeI e todos os sítios que não aparecem no genoma de *P. acidipropionici*; o início do gene (24 nucleotídeos iniciais) não contem códons usados menos de 62% das vezes para seu aminoácido; nenhum códon que contribua com menos de 27% para seu aminoácido foi utilizado; alguns códons para A, G e T foram alterados manualmente para evitar sobrecarga dos tRNAs. A sequência gênica otimizada, acrescida do promotor e terminador do gene metilmalonil-CoA carboxitransferase foi sintetizada pela empresa Epoch Life Science.

Para ligação do cassete de expressão do gene *adhE2* ao plasmídeo pJOE826, foi realizada a digestão dessas duas moléculas de DNA utilizando as enzimas NdeI e XbaI. Em seguida os fragmentos foram purificados utilizando o kit Wizard® SV

Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e quantificados a partir da análise em espectrofotômetro (Nanodrop – Thermo Scientific) a 260 nm. A reação de ligação dos fragmentos foi realizada com base na proporção 3:1 inserto:vetor adicionada de 1 µL de tampão 10x e 1 µL de T4 DNA ligase (Promega), em volume final de 10 µL. Após a diálise da reação de ligação para retirada do sal, células de *E.coli* foram transformadas e plaqueadas em meio de cultura sólido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Uma vez obtida as colônias foi feita a extração do plasmídeo seguida da análise de restrição utilizando a enzima SalI (Fermentas) para confirmação a construção. Abaixo a representação esquemática do plasmídeo pCG2 (Figura 2.3).

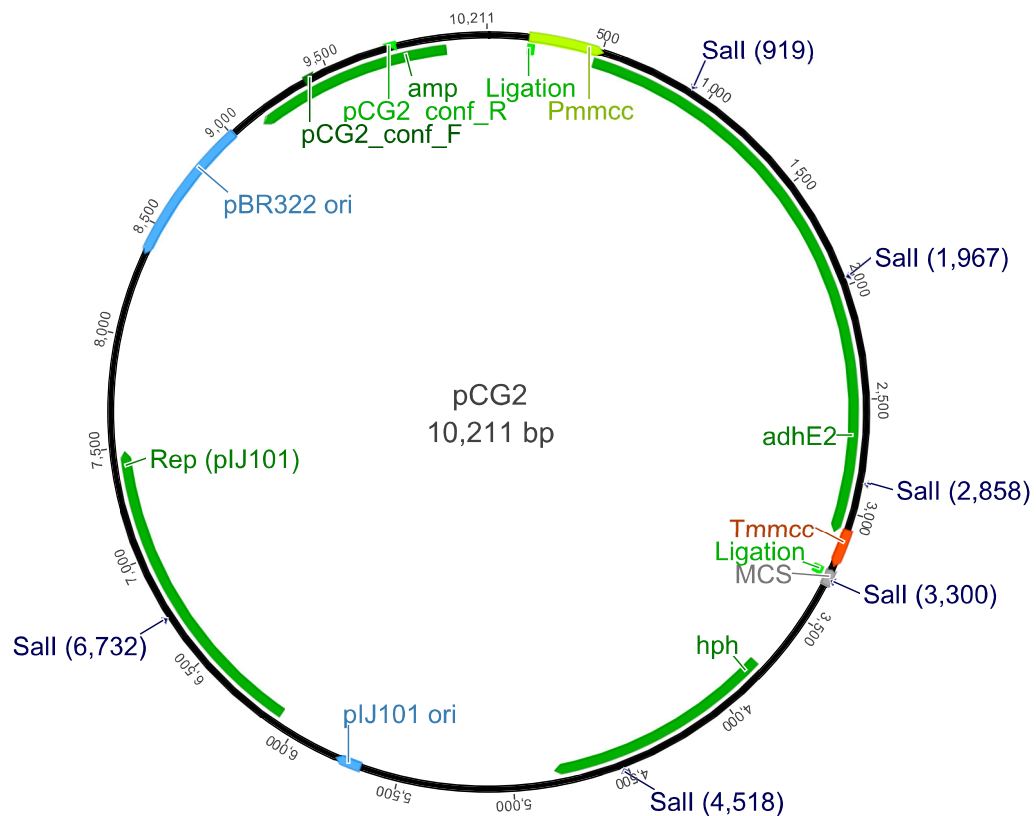


Figura 2.3: Representação esquemática do plasmídeo pCG2 (representação obtida utilizando o *software* Geneious versão 5.6).

A presença do plasmídeo em espécies de propionibactéria foi confirmada a partir de PCR de colônia com a utilização dos seguintes *primers*: pCG2_conf_F (5'-TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA-3') e pCG2_conf_R (5'-GCTATGTGGCGCGGTATTAT-3'). Devido ao alto conteúdo de nucleotídeos GC presente no genoma de propionibactérias e no plasmídeo pCG2, foi utilizado para a confirmação dos transformantes os *primers* pCG2_conf_F e pCG2_conf_R para a amplificação do gene de resistência a ampicilina (*bla*), proveniente de *E. coli*. Dessa maneira é possível evitar a amplificação de bandas inespecíficas e resultados falsos positivos. A amplificação do plasmídeo com esses *primers* gerou um fragmento de 391 bp. Após a confirmação por PCR de colônia, foi realizado um PCR a partir do DNA genômico extraído de possíveis colônias transformantes. Foram utilizados os mesmos *primers* e os seguintes componentes: 5X tampão para AccuPrime GC-Rich DNA polymerase (Invitrogen), 200 nM primer forward, 200 nM primer reverse, 3 µl do lisado celular ou 50 ng de DNA total e 1 u de AccuPrime GC-Rich DNA polymerase (Invitrogen), num volume total de 10 µL. As amostras foram colocadas em termociclador pré-aquecido com o seguinte programa: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C seguido por 30 ciclos de 50 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, e finalizando com um passo de extensão final por 5 minutos a 72°C. Como controles negativo da reação foi realizada a mesma reação sem o DNA molde e uma reação utilizando uma colônia ou DNA total de *Propionibacterium* ssp. selvagem.

12. Metilação de DNA plasmidial a partir de extrato proteico

Lartigue e colaboradores (2009) descrevem que para tornar o DNA exógeno mais receptivo pelo organismo e evitar a ativação do sistema de metilação/restrrição deve-se metilar o DNA utilizando as metilases presentes no organismo receptor. Visando uma maior eficiência de transformação de propionibactérias, foi realizado

um ensaio de metilação de acordo com o protocolo descrito por Lartigue e colaboradores (2009).

Nesse experimento, o DNA a ser usado para transformação foi tratado com extrato proteico de propionibactéria adicionado de S-adenosilmetionina (SAM) (Sigma-Aldrich), doador do radical metil. Como resultado, espera-se que a metilação do DNA ocorra conforme o padrão encontrado em propionibactérias. Para verificar se a metilação do DNA ocorreu conforme o esperado, o plasmídeo pCG2, utilizado nesse experimento, foi submetido a digestão pela enzima de restrição NaeI (Fermentas). Essa enzima foi escolhida devido a sua presença no genoma de *P. acidipropionici*. Estando essa enzima ativa no metabolismo de *P. acidipropionici*, para evitar degradação do seu próprio DNA, a enzima deve ser inibida pela metilação do material genético. Sendo assim, a metilação do plasmídeo pCG2 pelo extrato proteico de *P. acidipropionici* deve impedir a digestão pela enzima NaeI (Fermentas).

13. Fermentação em biorreator de bancada

Após a obtenção de propionibactérias transformadas com o plasmídeo pCG2 foram realizadas fermentações para verificar e quantificar a produção de n-propanol. Para isso, 1mL de cultura permanente de *P. freudenreichii* selvagem ou transformada (armazenada a -80°C com 20% glicerol na concentração final) foi ressuspensionado em 10 mL de meio de cultura padrão contendo 10 g/L de glicose e 150 µg/ml de higromicina B. A cultura foi mantida em atmosfera anaeróbica e a 30°C durante 24 horas. Após este período, 10 mL dessa cultura foram transferidos para 40 mL do mesmo meio e a cultura foi novamente incubada em atmosfera anaeróbica, a 30 °C por cerca de 40 horas. As células da bactéria foram então centrifugadas por 30 minutos a 5000 rpm e ressuspensionadas em 100 mL de meio de cultura padrão. A suspensão celular obtida foi inoculada no biorreator.

O meio de cultivo utilizado para o processo fermentativo em biorreator foi o meio de cultura padrão contendo 20 g/L de glicose e 150 µg/ml de higromicina B. Apesar da concentração de higromicina B (Invitrogen) utilizada para seleção de transformantes ser 250 µg/ml, foi utilizada uma concentração menor durante o processo fermentativo para não prejudicar o crescimento da bactéria. A fermentação foi realizada em Biorreator Labfors 4 (Infors) com volume de trabalho de 1 L, inóculo de 10% v/v, agitação de 100 rpm, pH 6,5 mantido com adição de NaOH 4M e HCl 1M e atmosfera de N₂. Antes de serem utilizados, o biorreator e todos os seus componentes foram autoclavados a 121°C por 20 minutos em autoclave Eletrolab vertical modelo 503/3.

14. Fermentação em biorreator elétrico de bancada

A fermentação em biorreator elétrico foi realizada da mesma maneira que a fermentação em biorreator descrita no item acima, salvo algumas modificações. Para acoplar um sistema eletroquímico ao Biorreator Labfors 4 (Infors) foram realizadas algumas modificações na tampa do biorreator. Uma das chicanas que compunha o biorreator foi substituída por uma barra de grafite (5,5 cm x 3,0 cm x 0,3 cm) utilizada como eletrodo de trabalho, local onde ocorre a reação de redução. Outra chicana da tampa do biorreator foi substituída por um tubo de vidro contendo um disco de vidro sinterizado e agarose na extremidade inferior. Esse tubo foi utilizado como ponte salina e em seu interior continha solução de KCl 3 M e outra barra de grafite (25 cm x 1 cm x 0,3 cm) denominada contra-eletrodo. A função da solução de KCl é permitir a passagem de íons e fechar o circuito elétrico, mantendo a corrente elétrica contínua. A transferência de elétrons entre a célula da bactéria e o sistema eletroquímico foi feita adicionando ao meio o mediador sepulcrato de cobalto (III) (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 mM, o qual apresenta potencial de redução igual a -0,35 V.

O bom funcionamento do sistema eletroquímico depende da aplicação de um potencial no eletrodo de trabalho que garanta a redução das moléculas do mediador sepulcrato de cobalto (III). Para isso, o potencial aplicado ao eletrodo foi mantido e controlado a -0,6V, utilizando o potenciostato PGSTAT302N (AUTOLAB). Sendo o potencial de redução do NAD^+ aproximadamente -0,32V, os elétrons são transferidos do eletrodo de trabalho para o sepulcrato de cobalto (III) e então para o NAD^+ , reduzindo-o a NADH. Com a finalidade de garantir a redução de todo mediador, as células foram inoculadas somente 19 horas após os eletrodos estarem ligados. Antes de serem utilizados, o biorreator elétrico e todos os seus componentes foram autoclavados a 121°C por 20 minutos em autoclave Eletrolab vertical modelo 503/3.

15. Análise do consumo de substratos e de metabólitos produzidos durante a fermentação

As análises de consumo de substrato e de produção de metabólitos foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI). As amostras coletadas para análise foram centrifugadas e filtradas (filtro Millipore de 0,22 μ) para total retirada das células. As amostras foram injetadas no cromatógrafo Waters (Waters 600 Chromatograph), contendo a coluna Aminex HPX-87H (BioRad), operando a 35°C e com 0,16 M de H_2SO_4 como fase móvel, a um fluxo de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$. A quantificação dos compostos foi possível pela comparação com as curvas padrão feitas para cada compostos de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Transformação genética de propionibactéria

A construção dos plasmídeos pCG1 e pCG2 para transformação de propionibactérias foi confirmada a partir da análises de restrição utilizando as enzimas PvuII e SalI (pCG1) e SalI (pCG2). Os fragmentos gerados apresentaram tamanho próximo ao tamanho esperados como indicado nas figuras 2.4 e 2.5.

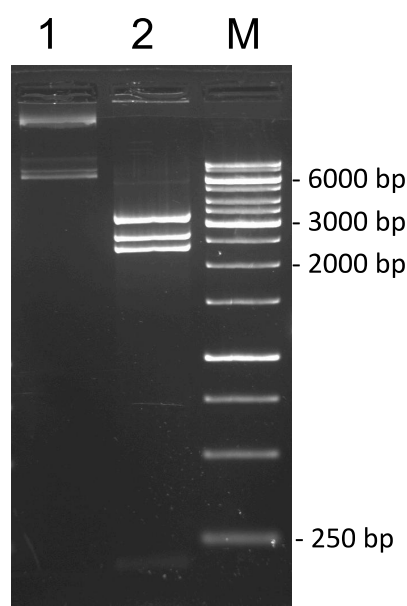


Figura 2.4: Análise de restrição do plasmídeo pCG1 desenvolvido para de transformação genética de *P. acidipropionici*. Os fragmentos resultantes apresentam tamanho próximo ao esperado (113 bp, 205 bp, 2364 bp, 2581 bp e 3207 bp). **1** – Plasmídeo pCG1 não digerido; **2** – Plasmídeo pCG1 digerido com as enzimas PvuII e SalI; **M** – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

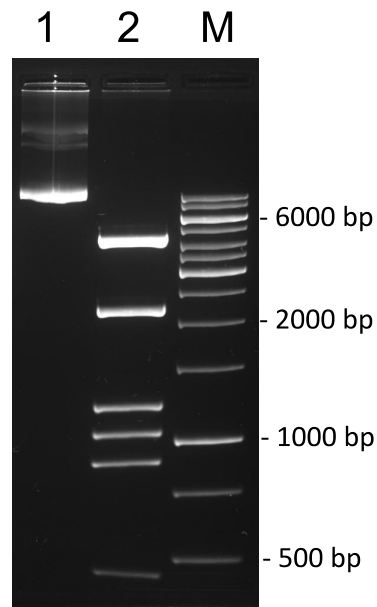


Figura 2.5: Análise de restrição do plasmídeo pCG2 utilizando a enzima SalI. Os fragmentos resultantes apresentam tamanho próximo ao esperado (446 bp, 895 bp, 1052 bp, 1222 bp, 2218 bp e 4402 bp). **1** – Plasmídeo pCG2 não digerido; **2** – Plasmídeo pCG2 digerido com a enzima SalI; **M** – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Não foram obtidos resultados satisfatórios no experimento de transformação de *P. acidipropionici* e *P. freudereichii* com o plasmídeo pCG1, *i.e.*, não houve crescimento de nenhuma colônia transformante. A transformação com o plasmídeo pCG2 também não resultou em transformantes de *P. acidipropionici*, entretanto, foram obtidos transformantes de *P. freudenreichii* com uma eficiência de 2×10^3 transformantes/ μg de DNA, usando esse mesmo plasmídeo (Figura 2.6).

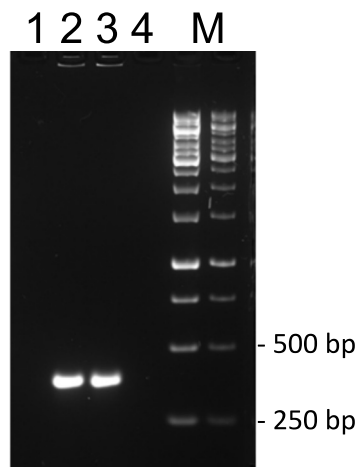
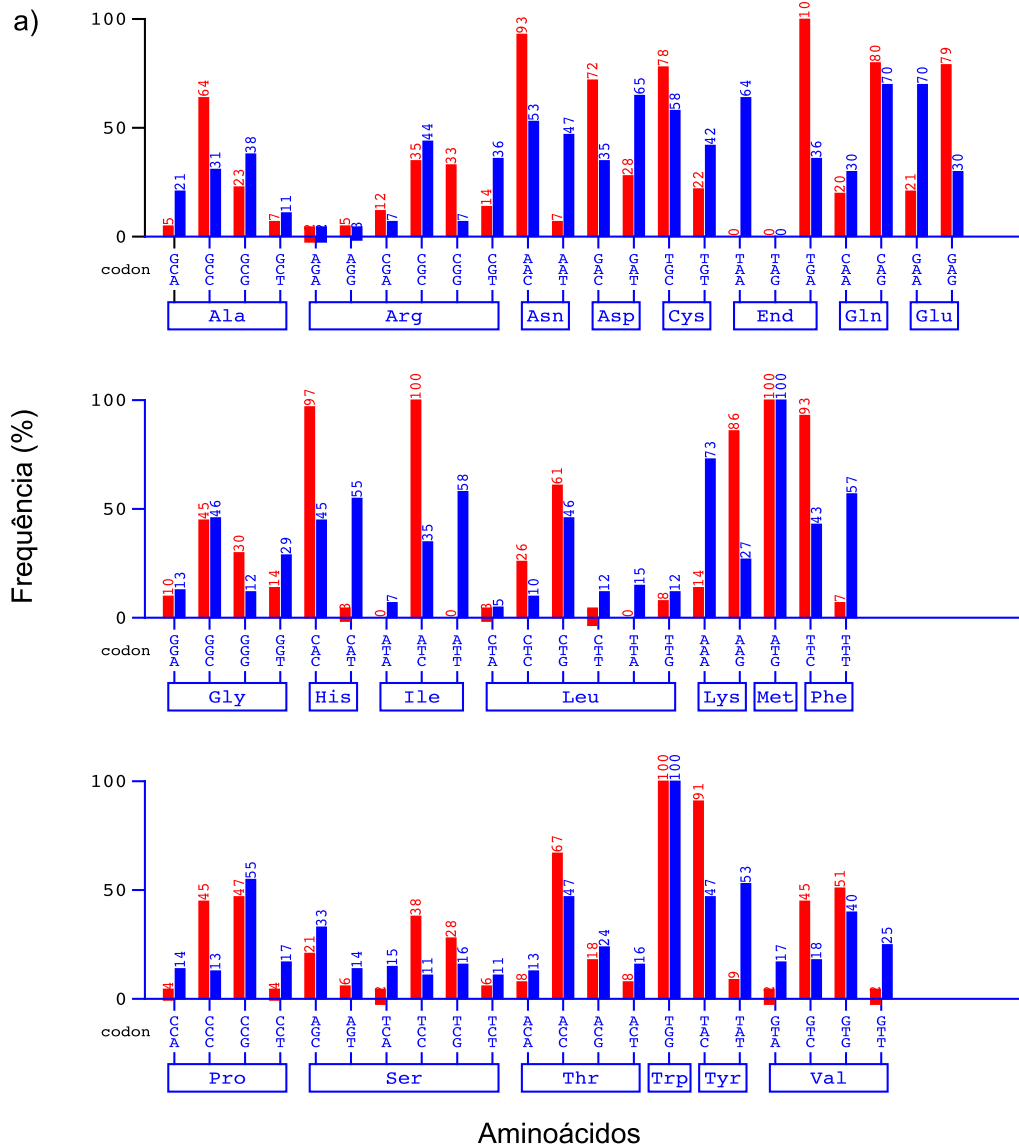


Figura 2.6: Confirmação da transformação genética de *P. freudenreichii* através da amplificação *in vitro* de fragmento do gene de resistência a ampicilina (*bla*) presente no plasmídeo pCG2. **1** – Colônia selvagem, **2** – colônia transformante 1, **3** – colônia transformante 2, **4** – controle negativo e **M** – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Resultados negativos de transformação para a bactéria *P. acidipropionici* também foram descrito por Jore e colaboradores (2001), que desenvolveram um plasmídeo similar ao pCG1 para transformação de espécies de propionibactérias. Uma explicação para a não obtenção de transformantes de propionibactérias utilizando o plasmídeo pCG1 pode ser a não expressão do gene de resistência a ampicilina pelas por essas espécies. Esse gene é proveniente de plasmídeos de *E. coli* e, portanto, apresenta baixo conteúdo de nucleotídeos GC, o que dificultaria sua expressão em bactérias com alta porcentagem de nucleotídeos GC como as propionibactérias. Essa hipótese é corroborada pela diferença significativa de, aproximadamente, 23% entre o uso de códons de *E. coli* e *P. acidipropionici* (Figura 2.7a) (www.kazusa.or.jp/codon/) e está de acordo com o trabalho de Jore e colaboradores (2001), que utilizam para seleção de transformantes o gene de resistência a eritromicina proveniente de *Saccharopolyspora erythraea*, um

microrganismo com alto conteúdo GC. Sendo assim, escolha do gene marcador correto é de extrema importância para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de transformação. Por esse motivo foi escolhido o gene de resistência a higromicina (*Hygromycin phosphotransferase* - *hph*) provenientes de *S. hygrosopicus*, como marcador de seleção. A diferença entre o uso de códons de bactérias do gênero *Propionibacterium* e *Streptomyces* é de apenas 5% (Figura 2.7b) (www.kazusa.or.jp/codon/), o que aumenta a probabilidade de expressão dos genes de resistência em propionibactérias.



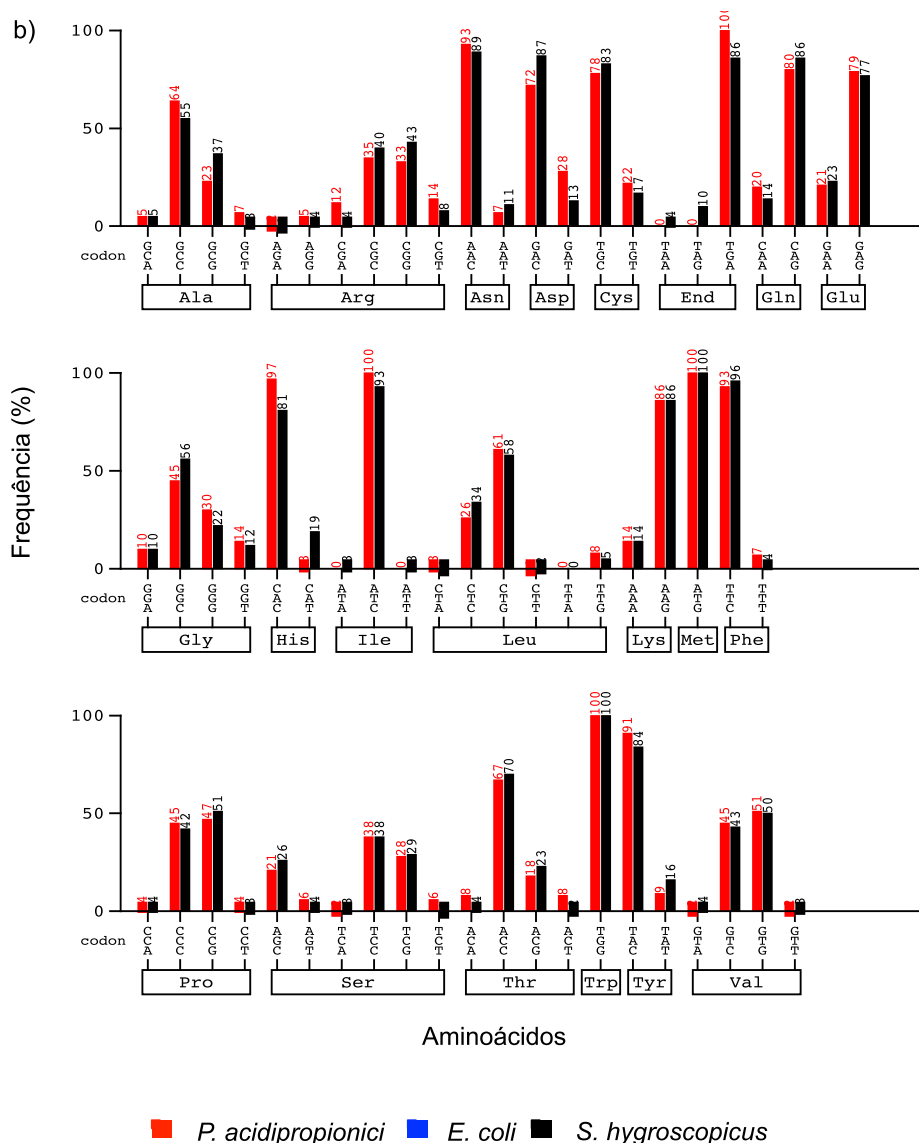


Figura 2.7: Representação gráfica da frequência de uso de códon pelas bactérias *P. acidipropionici*, *E. coli* e *S. hygroscopicus*. **a)** Comparação entre *P. acidipropionici* e *E. coli*; **b)** comparação entre *P. acidipropionici* e *S. hygroscopicus*. Gráficos obtidos através do programa *Graphical Codon Usage Analyser* (GCUA - <http://gcua.schoedl.de/>).

Os transformantes de *P. freudenreichii* não são estáveis em concentrações de higromicina B abaixo de 200 µg/mL e apresentaram um menor crescimento quando comparado com a linhagem selvagem (Figura 2.8). Esse fato pode estar relacionado com o metabolismo de resistência ao antibiótico higromicina. A

enzima codificada pelo gene de resistência a higromicina, higromicina fosfotransferase, fosforila um grupo hidroxila do antibiótico para inativá-lo (Leboul et al., 1982) o que requer a utilização de ATP. Logo, parte do ATP que poderia ser utilizado no crescimento da bactéria estaria sendo desviado para a via responsável por conferir resistência ao antibiótico. Estudos futuros devem testar o uso de novos genes marcadores, como cloranfenicol e eritromicina, utilizados por Brede e colaboradores (2005) e Jore e colaboradores (2001), respectivamente, na transformação de *P. freudenreichii*. Além disso, devem ser desenvolvidas estratégias para integração de genes no genoma de propionibactérias, obtendo dessa maneira, transformantes geneticamente estáveis.

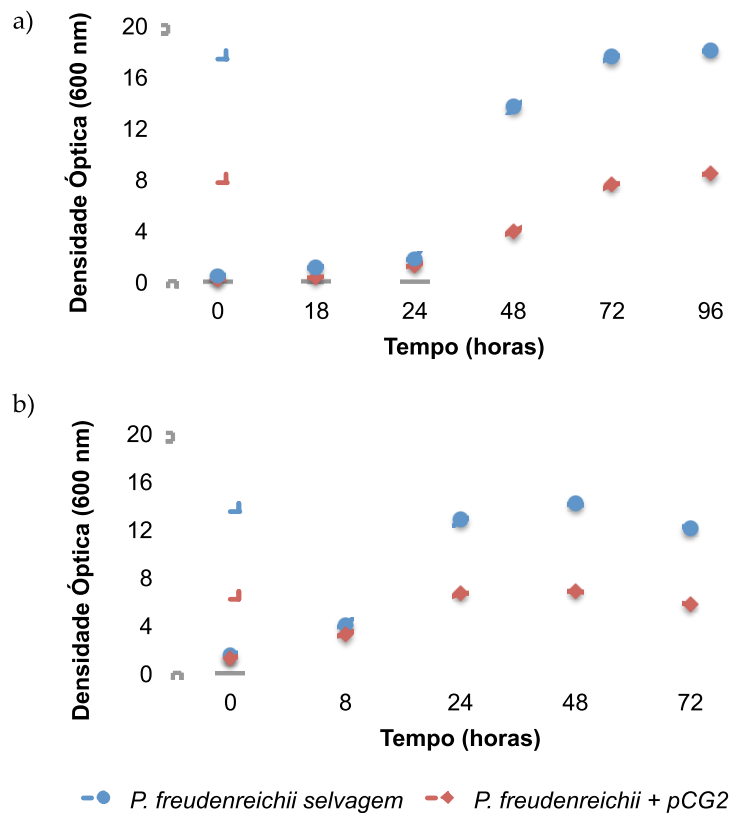


Figura 2.8: Gráfico do crescimento de *P. freudenreichii* selvagem e *P. freudenreichii* modificada cultivadas em (a) biorreator e (b) biorreator elétrico de bancada.

Outro ponto a ser abordado para aumentar a eficiência de transformação de *P. freudenreichii* e *P. acidipropionici* é a inativação do sistema de metilação/restrrição dessas bactérias. A metilação do DNA através de metilases presentes no organismo receptor, no caso propionibactérias, deve evitar a ação de enzimas de restrição também presentes nesse organismo. A partir da análise dos resultados apresentados abaixo, conclui-se que de fato, metilases presentes no extrato proteico de *P. acidipropionici* inibem a digestão do DNA por enzimas de restrição presentes no genoma dessa bactéria (Figura 2.9). Resultados preliminares utilizando essa técnica indicam um potencial caminho para a obtenção de melhores resultados nas transformações de propionibactérias.

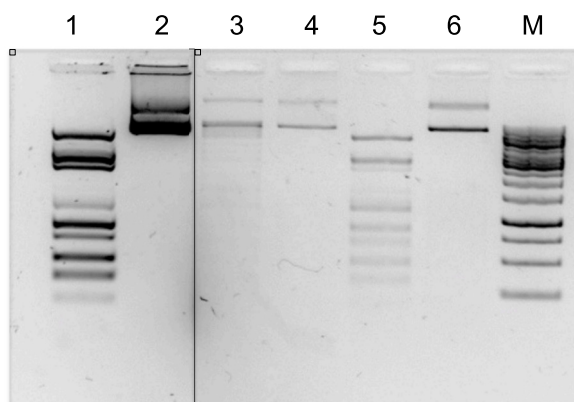


Figura 2.9: Análise de restrição do plasmídeo pCG2 tratado com extrato proteico de *P. acidipropionici* adicionado de SAM. 1 – plasmídeo pCG2 não tratado com extrato proteico e digerido com NaeI, 2 – plasmídeo pCG2 não tratado com extrato proteico e não digerido com NaeI, 3 – plasmídeo pCG2 tratado com extrato proteico com SAM e digerido com NaeI, 4 – plasmídeo pCG2 tratado com extrato proteico com SAM e não digerido com NaeI, 5 – plasmídeo pCG2 tratado com extrato proteico sem SAM e digerido com NaeI, 6 – plasmídeo pCG2 tratado com extrato proteico sem SAM e não digerido com NaeI M – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Apesar da baixa eficiência de transformação obtida para *P. freudenreichii*, os resultados apresentados e discutidos aqui mostram o progresso no

desenvolvimento de um protocolo de transformação para espécies de propionibactérias, organismo de difícil manipulação genética. Esses resultados são base para experimentos futuros e mostram o caminho que deve ser seguido para otimizar o protocolo de transformação.

2. Fermentação em biorreator de bancada

Conforme esperado, a linhagem mutante de *P. freudenreichii* contendo o gene *adhE2* de *C. acetobutylicum* consumiu toda a glicose disponível no meio e produziu n-propanol, mesmo que em pequenas quantidades (0,3 g/L), produto que não é observado no perfil metabólico da linhagem selvagem de *P. freudenreichii* (Figura 2.10). Esses resultados confirmam que a transformação foi de fato bem sucedida e representam o primeiro registro da produção de n-propanol por essa bactéria a partir de glicose como fonte de carbono. Além de n-propanol houve a produção de etanol (Figura 2.10b) pela cepa modificada de *P. freudenreichii*, produto que não está presente no perfil fermentativo da linhagem selvagem. Os demais metabólitos, ácido succínico ácido acético, foram produzidos em quantidades similares pelas linhagens mutante e selvagem.

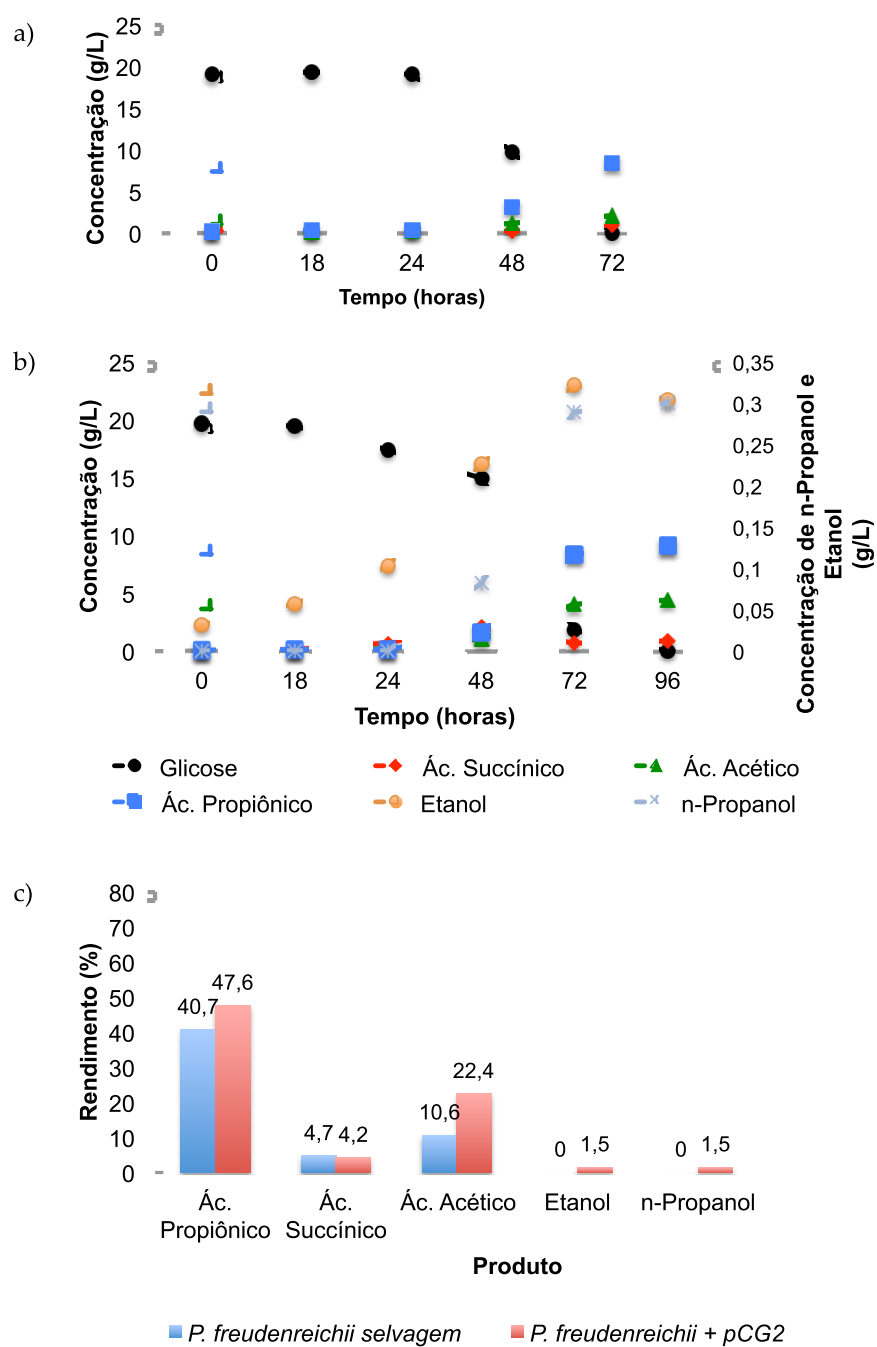


Figura 2.10: Representação gráfica do perfil metabólico de (a) *P. freudenreichii* selvagem e de (b) *P. freudenreichii* transformada com o plasmídeo pCG2. (c) Gráfico de rendimentos de todos os metabólitos produzidos durante as fermentações. Ambas as cepas foram cultivadas em biorreator de bancada utilizando glicose como fonte de carbono.

O mecanismo mais plausível descrito para explicar a produção de n-propanol é a ação da enzima bifuncional álcool/aldeído desidrogenase que converteria o precursor do ácido propiônico, o metabólito propionil-CoA em propionaldeído e então a n-propanol. Logo, a baixa concentração final obtida do álcool n-propanol (0,3 g/L), pode ser resultado da competição pelo precursor propionil-CoA para a produção de ácido propiônico. Ademais, o propionil-CoA é essencial para manter o metabolismo do ciclo do ácidos dicarboxílicos (também conhecido como *Wood-Werkamn Pathway*), principal via metabólica para a produção de energia, manutenção do balanço redox celular, e produção de diversos outros compostos utilizados no metabolismo de aminoácidos e lipídeos (Parizzi *et al.*, 2012; Vorobjeva, 1999; Figura 2.11).

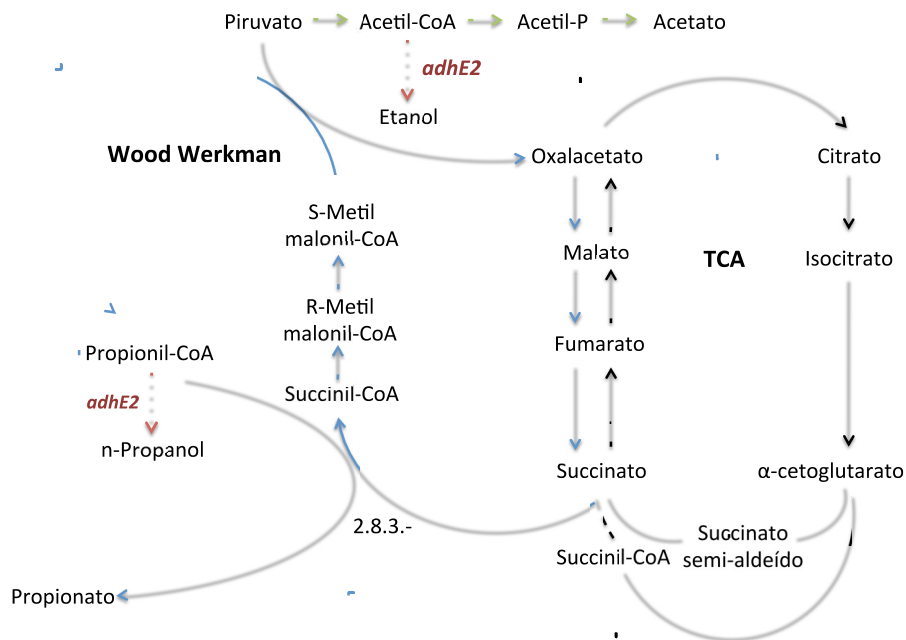


Figura 2.11: Representação esquemática do metabolismo central de *P. freudenreichii*. As setas azuis representam o ciclo dos ácidos dicarboxílicos (*Wood Werkman Cycle*); as setas pretas representam o metabolismo aeróbico (o ciclo do ácido cítrico); as setas verdes representam a via para produção de ácido acético; as setas vermelhas representam as possíveis vias metabólicas para a produção de n-propanol e etanol pela enzima álcool/aldeído desidrogenase (codificada pelo gene *adhE2* de *C. acetbutylicum* (Figura adaptada do artigo de Falentin e colaboradores (2010)).

Com esses resultados e observando a via metabólica acima (Figura 2.11) é possível sugerir alternativas para aumentar a disponibilidade do metabólito propionil-CoA e consequentemente a produção de n-propanol. A primeira delas seria a deleção do gene que codifica para a enzima propionato-succinato CoA transferase (2.8.3.-) e a adição da enzima CoA ligase (6.2.1.-). Dessa maneira não haveria produção de ácido propiônico e o ciclo dos ácidos dicarboxílicos seria linear com propionil-CoA como produto final. No entanto o microrganismo teria um maior gasto de energia (ATP), devido a utilização de uma molécula de ATP para ligação do substrato CoA ao succinato. A segunda alternativa seria a manutenção do ciclo dos ácidos dicarboxílicos e a adição de enzimas, como propionato CoA ligase, (6.1.2.17) que convertem o ácido propiônico em propionil-CoA. Contudo, da mesma maneira que a alternativa anterior, é necessária uma molécula de ATP para a ligação do substrato CoA ao propionato. Uma terceira alternativa, é a superexpressão de genes envolvidos na produção de n-propanol por propionibactérias quando cultivadas na presença de glicerol (Barbirato *et al.*, 1997). Com o sequenciamento do genoma de *P. acidipropionici* (Parizzi *et al.*, 2012 descrito no capítulo 1), foi possível identificar prováveis enzimas envolvidas na via metabólica do n-propanol em *P. acidipropionici*. Devido à similaridade existente entre *P. acidipropionici* e *P. freudenreichii*, é plausível que os mesmos genes estejam envolvidos na via metabólica do n-propanol em *P. freudenreichii*. No entanto são necessários análises do genoma de *P. freudenreichii* para que a superexpressão dos possíveis genes responsáveis pela produção de n-propanol seja possível. Ademais, pesquisas futuras que analisem o transcriptoma total de propionibactéria crescida em diferentes fontes de carbono ajudarão a identificar e estudar os genes envolvidos na produção de n-propanol por essas bactérias.

Como descrito acima, além da produção de n-propanol pela cepa *P.*

freudenreichii transformada com o plasmídeo pCG2, também foi observado, pela primeira vez, a produção de etanol por essa bactéria. Uma hipótese para explicar a produção desse metabólito é a conversão de acetil-CoA em acetaldeído e então a etanol pela enzima aldeído/álcool desidrogenase (*adhE2*) de *C. acetobutylicum* (Figura 2.11). Um dos subprodutos da fermentação propiônica é o ácido acético, produzido a partir de acetil-CoA. Como podemos observar na figura 2.10, há uma produção significativa de ácido acético pela bactéria (Concentração final igual a 4,37 g/L), sugerindo que há disponibilidade do substrato acetil-CoA para produção de etanol pela enzima álcool/aldeído desidrogenase.

Esses resultados são a primeira evidência que o gene álcool/aldeído desidrogenase (*adhE2*) de *C. acetobutylicum* está funcional e deve converter propionil-CoA em n-propanol durante a fermentação de glicose pela bactéria *P. freudenreichii*. Estudos adicionais como análise da expressão do gene *adhE2* e o ensaio enzimático *in vitro* e *in vivo* da enzima codificada por esse gene serão importantes para melhor compreensão da produção de n-propanol por *P. freudenreichii* transformada.

Fermentação em biorreator elétrico de bancada

A fermentação de *P. freudenreichii* selvagem em biorreator elétrico, utilizando glicose como fonte de carbono, produziu ácido succínico, ácido acético, ácido propiônico e n-propanol em pequenas quantidades (0,25g/L) (Figura 2.12a). Como pode ser observado na figura abaixo, o perfil metabólico da cepa *P. freudenreichii* contendo o plasmídeo pCG2 foi bastante alterado durante o cultivo em biorreator elétrico e os principais compostos produzidos a partir do consumo da glicose, foram ácido láctico, ácido acético e etanol. Não foi observada a produção de n-propanol (Figura 2.12b).

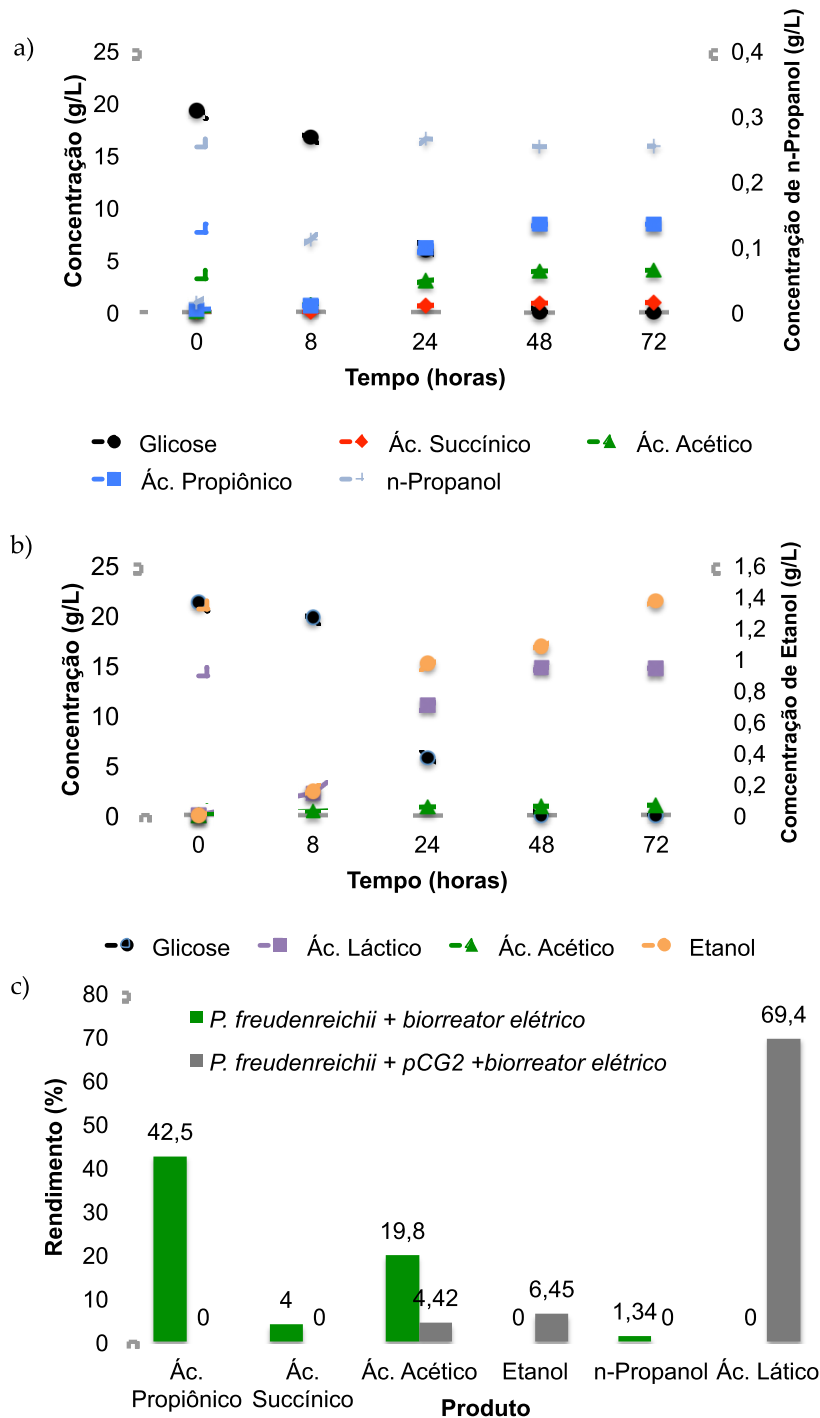


Figura 2.12: Representação gráfica do perfil metabólico de (a) *P. freudenreichii* selvagem cultivada em biorreator elétrico e (b) *P. freudenreichii* transformada com o plasmídeo pCG2 e cultivada em biorreator elétrico. (c) Gráfico de rendimentos de todos os metabólitos produzidos durante a fermentação de *P. freudenreichii* selvagem e *P. freudenreichii* contendo o plasmídeo pCG2 em biorreator elétrico.

O objetivo da fermentação em biorreator elétrico é alterar o metabolismo do microrganismo por meio da modulação do balanço redox celular. Nesse sentido a manipulação artificial gerada pela eletroquímica pode ser comparada a fermentação natural utilizando substratos que possuem diferentes graus de redução. Barbirato e colaboradores (1997) ao comparar as fermentações de *P. acidipropionici* em glicose e glicerol, reportam a produção de n-propanol e um maior rendimento de ácido propiônico utilizando glicerol como fonte de carbono. Esse resultado provavelmente está relacionado com o maior grau de redução do glicerol (grau de redução igual a 4,7) em relação à glicose (grau de redução igual a 4,0). Consequentemente, para a manutenção do balanço redox celular, uma maior quantidade de compostos reduzidos deve ser produzida a partir de glicerol. Comparando os resultados que obtivemos (Figura 2.12) com os dados descritos no trabalho de Barbirato e colaboradores (1997), é possível sugerir que a eletroquímica age de forma análoga ao interferir no balanço redox celular disponibilizando elétrons e consequentemente uma maior quantidade de cofatores reduzidos (NADH⁺). Como resultado é possível obter uma maior produção de metabólitos com alto grau de redução, como o ácido propiônico (grau de redução igual a 4,7) e n-propanol (grau de redução igual a 6). Schuppert e colaboradores (1992) reportam um aumento de 42% na concentração de ácido propiônico e a ausência de ácido acético em fermentação de *P. acidipropionici* suportada com processo eletroquímico. Apesar da diferença do perfil metabólico entre os dados desses autores e os resultados aqui apresentados, ambos demonstram que a eletroquímica é uma ferramenta com grande potencial para direcionar o metabolismo de microrganismos tanto para produzir composto reduzidos como oxidados.

Conforme reportado no item acima, ao transformar a bactéria *P. freudenreichii* com a enzima álcool/aldeído desidrogenase de *C. acetobutylicum*

houve produção de n-propanol. Isto ocorreu mesmo ao utilizar glicose, uma fonte de carbono com baixo grau de redução. Sendo assim, é possível inferir que em fermentações de *P. freudenreichii* contendo o plasmídeo pCG2 e suportadas com eletroquímica teríamos uma produção maior de n-propanol. Afinal, estaria sendo adicionada a enzima responsável por essa reação e suprindo o metabolismo com co-fator NADH^+ , necessário para redução de propionil-CoA em n-propanol. No entanto, esse resultado não foi obtido. Como pode ser observado nos gráficos acima (Figura 2.12), a fermentação de *P. freudenreichii* transformada juntamente com eletroquímica não resultou na produção n-propanol. Porém foram produzidas quantidades significativas de etanol (1,37 g/L) e ácido láctico (14,63 g/L), nunca antes reportado para essa bactéria.

A produção de etanol, conforme explicado anteriormente, deve estar relacionada a conversão de acetil-CoA a acetaldeído e etanol pela enzima álcool/aldeído desidrogenase de *C. acetobutylicum*. Com base na produção de ácido láctico e ausência de ácido propiônico, é possível sugerir que na presença de grande quantidade de cofatores reduzidos, como por exemplo NAD(P)H^+ a célula fica impossibilitada de oxidar e metabolizar a fonte de carbono, já que necessita do cofator oxidado para oxidar substratos como a glicose e/ou glicerol. Logo, para a regeneração de NAD(P)^+ , provavelmente seja, energética e metabolicamente mais favorável a produção de ácido láctico a partir de piruvato do que a produção de ácido propiônico e n-propanol; isso porque a conversão de piruvato a ácido láctico é feita apenas em um único passo, através da enzima lactato desidrogenase (Figura 2.13).

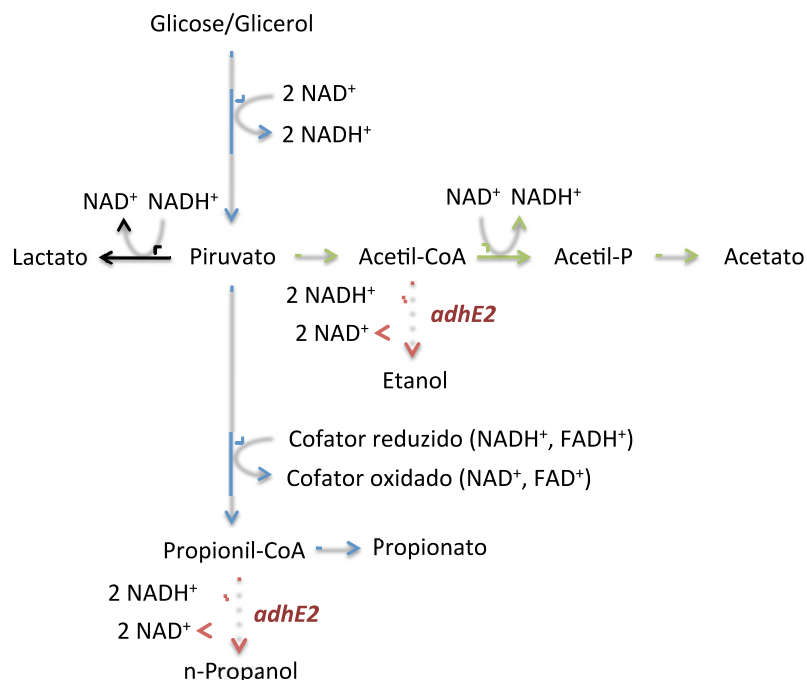


Figura 2.13: Representação simplificada do metabolismo fermentativo de *P. freudenreichii*. As setas azuis representam, de modo simplificado, o ciclo dos ácidos dicarboxílicos (Wood-Werkman Cycle); as setas verdes representam a via para produção de ácido acético; as setas pretas representam a produção de ácido láctico a partir de piruvato; as setas vermelhas representam as possíveis vias metabólicas para a produção de n-propanol e etanol pela enzima álcool/aldeído desidrogenase (codificada pelo gene *adhE2* de *C. acetbutylicum*).

Foram identificadas no genoma de *P. freudenreichii* 3 prováveis genes que codificam para enzimas lactato desidrogenase (GenBank: FN806773.1; locus tag: PFREUD_11570, PFREUD_12840 e PFREUD_16710) e poderiam estar envolvidas na produção de lactato a partir de piruvato. Ao comparar as fermentações em biorreator elétrico da cepa selvagem e transformada de *P. freudenreichii*, percebe-se que apenas esta última produziu ácido láctico. No entanto, as duas cepas foram submetidas a altas concentrações de cofatores reduzidos. Diante desses resultados, outra hipótese, além da regeneração de cofatores oxidados, pode ser

sugerida para explicar a produção de ácido láctico: o ácido láctico pode ser um metabólito produzido quando a bactéria é exposta a uma situação de estresse. A fermentação da cepa de *P. freudenreichii* contendo o plasmídeo pCG2 foi feita na presença de um processo eletroquímico e em meio de cultura contendo 150 µg/mL de higromicina B. Como explicado anteriormente, a resistência a esse antibiótico é dada pela fosforilação de um grupo hidroxila presente na molécula (Leboul *et al.*, 1982). Portanto, a bactéria estava submetida a uma situação de estresse energético e do balanço redox celular. Outra evidência a favor dessa hipótese é que em fermentações com a bactéria *P. acidipropionici*, espécie próxima a *P. freudenreichii*, em atmosfera com grandes concentrações de oxigênio, condições possivelmente estressantes para uma bactéria microaerófila, também foi reportada a produção de ácido láctico (*dados não publicados*).

Apesar das dificuldades relacionadas à transformação de propionibactérias, os resultados apresentados aqui demonstram e confirmam a possibilidade do uso desse microrganismo para a produção de produtos de interesse industrial, como o n- propanol. Ademais foi reportada pela primeira vez a produção de outros metabólitos, como etanol e ácido láctico, demonstrando a flexibilidade metabólica desse microrganismo e o potencial para a exploração de diversas vias, por meio de engenharia genética, para a produção de compostos de interesse. Com base nesses resultados devem ser desenvolvidos estudos para compreendermos melhor o metabolismo de propionibactérias e para que sejam definidos protocolos eficientes de transformação, superexpressão e deleção de genes de interesse. Com esse objetivo, devem ser planejados e desenvolvidos testes fermentativos que alterem a fonte de carbono, a concentração de antibiótico, as condições eletroquímicas e até mesmo o plasmídeo utilizado para transformação. Além disso, o estudo funcional de genes, como os que codificam para enzimas lactato desidrogenase e

álcool/aldeído desidrogenase, é fundamental para compreensão desses resultados. Em resumo, apesar de serem necessários diversos passos até a implementação de propionibactérias como uma plataforma industrial os resultados reportados aqui configuram o ponto de partida para pesquisas promissoras com o metabolismo desse microrganismo que apresenta características desejadas para uso como reator biológico. Devido à esse potencial industrial os conceitos e os procedimentos relacionados a produção de n-propanol por propionibactérias já são objeto de aplicação de pedido de patente (Apêndice I).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore D, Seidman JG, Struhl K: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons; 2004:1600.

Barbirato F, Chedaille D, Bories A: **Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997, **47**:441–446.

Brede DA, Faye T, Stierli MP, Dasen G, Theiler A, Nes IF, Meile L, Holo H: **Heterologous production of antimicrobial peptides in *Propionibacterium freudenreichii***. *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**:8077–84.

Cheong D-E, Lee H-I, So J-S: **Optimization of electrotransformation conditions for *Propionibacterium acnes***. *Journal of microbiological methods* 2008, **72**:38–41.

Emde R, Schink B: **Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system**. *Appl. Envir. Microbiol.* 1990, **56**:2771–2776.

Falentin H, Deutsch S-M, Jan G, Loux V, Thierry A, Parayre S, Maillard M-B, Dherbécourt J, Cousin FJ, Jardin J, Siguier P, Couloux A, Barbe V, Vacherie B, Wincker P, Gibrat J-F, Gaillardin C, Lortal S: **The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications**. *PloS one* 2010, **5**:e11748.

Fontaine L, Meynial-Salles I, Girbal L, Yang X, Croux C, Soucaille P: **Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**. *Journal of bacteriology* 2002, **184**:821–30.

Gabriel CL: Butanol Fermentation Process. *Ind. Eng. Chem* 1928, **20**:1063-1067.

Geneious versão 5.6 [<http://www.geneious.com/>]

Girbal L, Croux C, Vasconcelos I, Soucaille P: **Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.** *FEMS Microbiology Reviews* 1995, **17**:287-297.

Hawkins AC, Peters MW, Meinhold P, Buelter T, Glassner DA, Gruber PR, Wade J, Aristidou A, Subbian E: **Engineered microorganism for producing isopropanol.** *WIPO: World Intellectual Property Organization* 2009, No. WO2009/103026.

Hazelwood LA, Daran J-M, van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR: **The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.** *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**:2259–66.

Holt R a, Stephens GM, Morris JG: **Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH.** *Applied and environmental microbiology* 1984, **48**:1166–1170.

Jones DT, Woods DR: **Acetone-butanol fermentation revisited.** *Microbiol. Rev.* 1986 **50**:484-524.

Jones DT, Woods DR: **Acetone-butanol fermentation revisited.** *Microbiological reviews* 1986, **50**:484–524.

Jore JPM: **Efficient transformation system for *Propionibacterium freudenreichii* based on a novel vector.** *Applied and Environmental Microbiology* 2001, **67**:499–503.

Kiatpapan P, Hashimoto Y, Piao Y, Ono H, Yamashita M: **Characterization of pRGO1 , a plasmid from *Propionibacterium acidipropionici* , and its use for development of a host-vector system in propionibacteria.** *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**: 4688–4695.

Lartigue C, Vashee S, Algire MA, Chuang R-Y, Benders GA, Ma L, Noskov VN, Denisova EA, Gibson DG, Assad-Garcia N, Alperovich N, Thomas DW, Merryman C, Hutchison CA, Smith HO, Venter JC, Glass JI: **Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast.** *Science (New York, N.Y.)* 2009, **325**:1693–6.

Leboul J, Davies J: **Enzymatic modification of hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*.** *The Journal of antibiotics* 1982, **35**:527–8.

Li H, Opgenorth PH, Wernick DG, Rogers S, Wu T-Y, Higashide W, Malati P, Huo Y-X, Cho KM, Liao JC: **Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols.** *Science (New York, N.Y.)* 2012, **335**:1596.

Nölling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV, Smith DR: **Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*.** *Journal of bacteriology* 2001, **183**:4823–38.

Parizzi LP, Grassi MC, Llerena LA, Carazzolle MF, Queiroz VL, Lunardi I, Zeidler AF, Teixeira PJ, Mieczkowski P, Rincones J, Pereira GA: **The genome sequence of *Propionibacterium***

acidipropionici provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC genomics* 2012, **13**:562.

Pereira GAG, Perez JR, Carazzolle MF, Zeidler AFB, Parizzi LP, Calderón LAL, Grassi MCB, Lunardi I, De Oliveira LG, Rodrigues JAR, Moran PJS, Morschbacker ALRC, Roza L, Andrade MHS: **Microorganism and process for producing n-propanol**. *WIPO: World Intellectual Property Organization*, 2011. No. WO/2011/029166.

Piveteau P: **Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review**. *Le Lait* 1999, **79**:23–41.

Saito T, Tsutsumi Y, Arai S: **Process for producing alcohols**. *United States Patent* 1981, No. 4,263,449.

Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (3 volume set)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001:2344.

Schuppert B, Schink B, Trosch W: **Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidi-propionici* in a three-electrode amperometric culture system**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, **37**.

Thrash JC, Coates JD: **Direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism**. *Environmental Science and Technology* 2008, **42**:3921-3931.

Unruh JD, Ryan DA, Dugan SL: **Process for the production of n-propanol**. *United States Patent* 1999, No. 5,866,725.

Villalobos A, Ness JE, Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S: **Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments**. *BMC bioinformatics* 2006, **7**:285.

Vorobjeva LI: *Propionibacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; 1999.

Wang Y-F, Masuda M, Tsujimura S, Kano K: **Electrochemical regulation of the end-product profile in *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 with an endogenous mediator**. *Biotechnology and bioengineering* 2008, **101**:579–86.

Weitzmann C: **Improvements in the bacterial fermentation of carbo- hydrates and in bacterial culture for same**. Great Britain patent 1915, No. 4845

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O interesse por compostos químicos produzidos por biorreatores tem crescido consideravelmente. Os resultados aqui apresentados demonstram grandes avanços na busca por novos microrganismos robustos capazes de produzir, com alto rendimento e produtividade, cadeias carbônicas reduzidas para a produção de polímeros químicos.

Os dados obtidos a partir do sequenciamento e análise do genoma da linhagem *P. acidipropionici* propiciam as bases de conhecimento necessárias para realizar modificações dirigidas no metabolismo dessa espécie e de outras propionibactérias. Ademais, a anotação do genoma e os resultados experimentais aqui reportados revelaram muitas características que explicam a plasticidade e robustez dessa cepa. *P. acidipropionici* contém, aproximadamente, 1000 genes a mais que espécies *P. acnes* e *P. freudenreichii*, sugerindo uma maior flexibilidade do seu metabolismo. Genes relacionados à defesa da integridade genômica (sistema CRISPR/Cas), vias de acumulação de polifosfato e a grande quantidade de rRNA e transportadores de carboidratos podem conferir a essa bactéria vantagens competitivas e adaptação a diferentes condições. Finalmente, o potencial uso dessa espécie para fermentação de *commodities* químicas é ressaltado pela alta tolerância a ácidos orgânicos, pela metabolização de diversos substratos e pela produção de ácido propiônico, um antifúngico natural que pode evitar contaminações em dornas industriais.

Os resultados promissores obtidos no desenvolvimento da via fermentativa para a produção de n-propanol corroboram o potencial uso de propionibactérias como biorreatores. A compreensão do metabolismo fermentativo de ácido propiônico, a partir do sequenciamento do genoma de *P. acidipropionici*, foi de extrema importância para o desenvolvimento da via de produção de n-propanol e para prospecção de futuros experimentos necessários para otimizá-la. Além disso, o estabelecimento de ferramentas genéticas (pCG1,

pCG2 e protocolo de eletroporação) para a engenharia metabólica de propionibactérias gerou informações sobre a fisiologia e a genética desses microrganismos. Apesar da necessidade de estudos adicionais para a otimizar a transformação genética de propionibactérias, os resultados aqui descritos são os primeiros passos e a base para o desenvolvimento desses estudos futuros. Para a otimização da transformação genética devem ser exploradas novas técnicas de transformação, desenvolvidos novos vetores e genes marcadores, além de serem testadas diferentes cepas de propionibactérias.

Muitos estudos ainda devem ser desenvolvidos até que o uso de propionibactérias para produção de n-propanol em larga escala se concretize. Entretanto, a produção de 300 µg/L (rendimento de 1,5%) de n-propanol por *P. freudenreichii* transformada com o plasmídeo pCG2 é muito promissora e o início de um projeto para o estabelecimento de um processo industrial economicamente viável. Adicionalmente, os resultados obtidos nas fermentações utilizando reatores bioelétricos, como a produção de 250 µg/L de n-propanol (rendimento de 1,34%), demonstram a flexibilidade metabólica que pode ser atingida com o uso dessa tecnologia e destacam a importância em contemplar novos experimentos para o desenvolvimento de fermentações acopladas a processos eletroquímicos.

Um dos maiores objetivos da indústria petroquímica consiste na produção, a baixo custo, de compostos que possam ser utilizados para a produção de materiais duráveis. Nesse contexto e frente a todos esses resultados aqui apresentados, o uso de propionibactérias para a fermentação de compostos de 3 carbonos destaca-se como grande potencial para, no futuro, satisfazer a demanda de *commodities* químicas como o n-propanol.

APÊNDICE I

Microorganisms and Process for producing n-propanol

(51) International Patent Classification:
C12P 7/04 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/BR2010/000289(22) International Filing Date:
9 September 2010 (09.09.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/240,811 9 September 2009 (09.09.2009) US(71) Applicants (*for all designated States except US*):
BRASKEM S.A. [BR/BR]; Rua Eteno, 1561, Complexo Petroquímico de Camaçari, 42810-000 Camaçari - BA (BR). **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP** [BR/BR]; Av. Roxo Moreira, 1831, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, 13083-970 Campinas - SP (BR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **PEREIRA, Gonçalo, Amarante, Guimarães** [BR/BR]; Rua Francisco Humberto Zuppi, 816, Cidade Universitária, 13083-350 Campinas - SP (BR). **PEREZ, Johana, Rincones** [VE/BR]; Rua Dr. Gabriel Porto # 7, Cidade Universitária, 13083-210 Campinas - SP (BR). **CARAZ-ZOLLE, Marcelo, Falsarella** [BR/BR]; Rua Minas Gerais, 378, Vila Santana, 13270-000 Valinhos - SP (BR). **ZEIDLER, Ane, Fernanda, Beraldi** [BR/BR]; Rua Buarque de Macedo 1011 ap. 52, Vila Nova, 13073-010 Campinas - SP (BR). **PARIZZI, Lucas, Pedersen** [BR/BR]; Rua Flaviano Lisbon, 90, Jardim Boa Esperança, 13486-466 Limeira - SP (BR). **CALDERÓN, Luige, Armando, Llerena** [PE/BR]; Rua Dr. Shigeo Mori, 1822, Cidade Universitária, 13083-770 Campinas - SP (BR). **GRASSI, Maria, Carolina, de Barros** [BR/BR]; Av. Imperatriz Leopoldina, 145 - ap. 61, Vila Nova, 13073-035 Campinas - SP (BR). **LUNARDI, Inês** [BR/BR]; Rua Frei Antônio de Pádua, 1573 ap. 42, Bairro Guanabara, 13073-330 Campinas - SP (BR). **DE***[Continued on next page]*

(54) Title: MICROORGANISMS AND PROCESS FOR PRODUCING N-PROPANOL

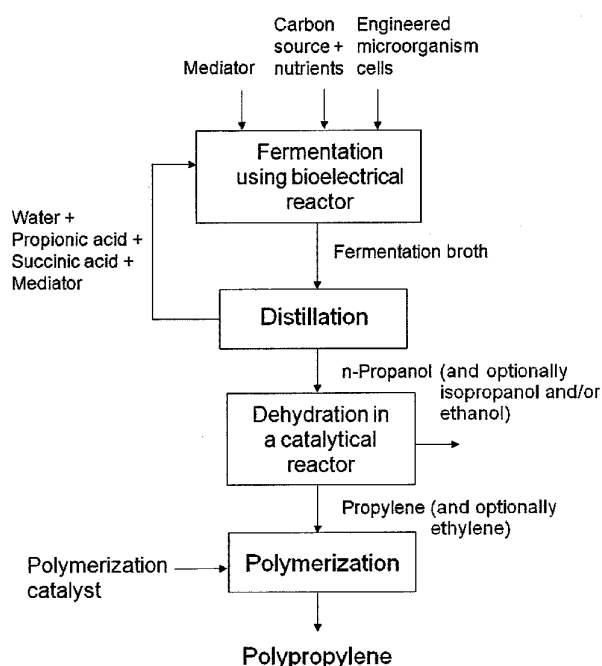


Figure 4

(57) Abstract: The invention provides fermentative methods for producing n-propanol. The methods of the invention involve providing a suitable carbon source, a microorganism expressing the dicarboxylic acid pathway, reducing equivalents, and at least one gene coding for an enzyme that catalyzes the conversion of propionate/propionyl-CoA into n-propanol. The methods further involve contacting the carbon source and reducing equivalents with the microorganism under conditions favorable for the production of n-propanol. Also provided are methods for producing propylene and polypropylene from the n-propanol and microorganisms suitable for use in the methods of the invention



OLIVEIRA, Luciana, Gonzaga [BR/BR]; Rua Almirante Noronha, 233, Cidade Universitária II - Barão Geraldo, 13083-270 Campinas - SP (BR). **RODRIGUES, José, Augusto, Rosário** [BR/BR]; Rua João Simões da Fonseca, 489, Residencial Barão do Café - Barão Geraldo, 13085-050 Campinas - SP (BR). **MORAN, Paulo, José, Samenho** [BR/BR]; Rua Roxo Moreira, 593, Cidade Universitária, 13083-590 Campinas - SP (BR). **MORSCHBACKER, Antonio, Luiz, Ribeiro, de Castro** [BR/BR]; Rua Dr. Alfredo Antonio Martinelli, 880, 13083-330 Campinas - SP (BR). **ROZA, Luiza** [BR/BR]; Rua Gal. Couto de Magalhães, 1283, 90540-131 Porto Alegre - RS (BR). **ANDRADE, Márcio, Henrique, dos Santos** [BR/BR]; Rua do Sossego, 461, casa 16, Bairro Pinheiros, 57057-420 Maceió - AL (BR).

(74) **Agent: MOMSEN, LEONARDOS & CIA.;** Rua Teófilo Otoni 63, 10th floor, 20090-080 Rio de Janeiro RJ (BR).

(81) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,

ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

CLAIMS

1. A method for producing n-propanol comprising:
 - (a) providing a suitable carbon source for fermentation by a
5 microorganism expressing the dicarboxylic acid pathway, reducing equivalents,
and at least one gene coding for an enzyme that catalyzes the conversion of
propionate/propionyl-CoA into n-propanol;
 - (b) contacting the carbon source and reducing equivalents with
the microorganism under conditions favorable for the production of n-propanol
10 by the microorganism; whereby a fermentation broth is produced; and
 - (c) recovering n-propanol from the fermentation broth.
2. The method of claim 1, wherein the microorganism has been
genetically engineered to express one or more enzymes, whereby the
15 microorganism is capable of converting propionate/propionyl-CoA to n-
propanol.
3. The method of claim 2, wherein the microorganism is selected from the
group consisting of: *Propionigenium* spp., *Propionispira arboris*,
20 *Propionibacterium* spp., and *Selenomonas*.
4. The method of claim 2, wherein the enzyme is selected from the
group consisting of:

aldehyde dehydrogenases that are capable of using propionic acid as a substrate;

aldehyde dehydrogenases that are capable of using an acyl-CoA intermediate as a substrate;

5 alcohol dehydrogenases that catalyze the conversion of an aldehyde to its corresponding primary alcohol; and

multifunctional enzymes that possess both aldehyde/alcohol dehydrogenase domains.

10 5. The method of claim 4, wherein the enzyme has alcohol dehydrogenase protein domain with e-value threshold below $1e-2$.

6. The method of claim 4, wherein the enzyme has aldehyde dehydrogenase protein domain with e-value threshold below $1e-2$.

15

7. The method of claim 4, wherein the aldehyde dehydrogenases are capable of using propionic acid as a substrate are selected from the group consisting of: *Mus musculus* (GenBank Accession No. AC162458.4); *Clostridium botulinum* A str. American Type Culture Collection (ATCC) No. 20 3502 (GenBank Accession No. AM412317.1); and *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank Accession No. EU255273.1).

8. The method of claim 4, wherein the aldehyde dehydrogenases that are capable of using acyl-CoA intermediate as a substrate are selected from the

group consisting of: *Rhodococcus opacus* (GenBank Accession No. AP011115.1); *Entamoeba dispar* (GenBank Accession No. DS548207.1); and *Lactobacillus reuteri* (GenBank Accession No. ACHG01000187.1).

5 9. The method of claim 4, wherein the alcohol dehydrogenases that catalyze the conversion of an aldehyde to its corresponding primary alcohol are selected from the group consisting of: *Aspergillus niger* (GenBank Accession No. AM270229.1); *Streptococcus pneumoniae* Taiwan19F-14 (GenBank Accession No. CP000921.1); and *Salmonella enterica* (GenBank Accession No.
10 CP001127.1).

10 10. The method of claim 4, wherein the multifunctional enzymes that posses both aldehyde/alcohol dehydrogenase domains are selected from the group consisting of: *Lactobacillus sakei* (GenBank Accession No. CR936503.1);
15 *Giardia intestinalis* (GenBank Accession No. U93353.1); *Shewanella amazonensis* (GenBank Accession No. CP000507.1); *Thermosynechococcus elongatus* (GenBank Accession No. BA000039.2); *Clostridium acetobutylicum* (GenBank Accession No. AE001438.3); and *Clostridium carboxidivorans* ATCC No. BAA-624T (GenBank Accesion No. ACVI01000101.1).

20

11. The method of claim 1, wherein the fermentation broth further comprises ethanol and/or isopropanol.

12. The method of claim 11, wherein ethanol and/or isopropanol are recovered from fermentation broth.

13. The method of claim 1, wherein the microorganism has the expression
5 of its gene encoding for an enzyme acetate kinase (E.C. 2.7.2.1) altered so as to diminish its activity.

14. The method of any one of claims 1-13, wherein the reducing equivalents comprise NAD(P)H.

10

15. The method of claim 14, wherein the NAD(P)⁺ is reduced to NAD(P)H comprising the use of electrodes and a mediator molecule, an overpressure of H₂, or a microorganism expressing a NAD⁺-dependent formate dehydrogenase in the presence of formate.

15

16. The method of claim 14, further comprising contacting the fermentation broth with electrodes and a mediator molecule.

17. The method of claim 16, wherein mediator molecules are benzyl
20 viologen, methyl viologen, anthraquinone 2,6-disulfonic acid, neutral red, cobalt sepulchrate, 1,4 dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) and flavins.

18. The method of claim 16, wherein mediator molecules are compounds present in yeast extract and *Propionibacterium* spp. extract.

19. The method of any one of claims 1-18, wherein the carbon source is sugarcane juice, sugarcane molasses, hydrolyzed starch, hydrolyzed ligno-cellulosic materials, glucose, sucrose, fructose, lactate, lactose, xylose or
5 glycerol in any form or a mixture thereof.

20. A microorganism for using in the method as defined in any one of claims 1 to 19.

10 21. A method for producing propylene comprising:
dehydrating the n-propanol produced by the method as defined in any one of claims 1 to 19 to produce propylene.

22. A method for producing propylene comprising:
15 dehydrating in the same reactor n-propanol and isopropanol and/or ethanol produced by the method as defined in any of claims 1 to 19 to produce propylene.

23. A method for producing polypropylene comprising:
20 polymerizing the propylene produced by the method as defined in any one of claims 21 and 22 to produce polypropylene.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/BR2010/000289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P7/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, FSTA, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BR PI0 604 284 A (BRASKEM S.A.) 3 June 2008 (2008-06-03) * See Figure 1 and page 11 *	21-23
X,P	US 2009/246842 A1 (HAWKINS ET AL) 1 October 2009 (2009-10-01) * See [0002], [0132-0133], [0139-0169], [0200], and [0241-0242] * ----- -/--	21-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2011

Date of mailing of the international search report

31/01/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Korsner, Sven-Erik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/BR2010/000289

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Zhang et al: "Metabolic engineering and process development for enhanced propionic acid production by Propionibacterium acidipropionici (cover page + pages 176 and 249) / Dissertation, The Ohio State University, 2009" Scirus, [Online] 2009, page 176, 249, XP002617100 Retrieved from the Internet: URL:etd.ohiolink.edu/send-pdf.cgi/Zhang%20An.pdf?osu1230919153> [retrieved on 2011-01-17] * See page 176 (second paragraph); the date of publication has not yet been established, but may possibly have been in February 2009 (?) * -----	1-20

APÊNDICE II

The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to

Bioplastics

Reviews

The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics

JOHANA RINCONES,¹ ANE F. ZEIDLER,¹ MARIA CAROLINA B. GRASSI,¹ MARCELO F. CARAZZOLLE,^{1,2} GONÇALO A. G. PEREIRA¹

¹Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil

²Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo, Universidade Estadual de Campinas, CP 6141, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil

There is a common concept in life: large and complex molecules result from the synthesis of units that are later joined together. Mankind learned this principle and employed it to develop language, culture, and technology. This same principle is applied in the petrochemical industry by fractionating the fossilized carbon chains into small molecules and then polymerizing them in order to develop synthetic polymers, which are much more flexible, resistant, and durable than natural polymers. Recent developments in molecular biology have opened the possibility of modifying organisms in order to create new biosynthetic routes for the production of monomers that would fit the biggest challenge in modern society: the production of high quality polymers from renewable feedstocks. This review focuses on the latest advances in molecular biology and the new knowledge and technologies that enable the possibility of converting cells into efficient and sustainable chemical reactors. The first examples of this technological advancement are already in the market.

Keywords omics approach, synthetic biology, system biology, fermentation, CO₂ mitigation, green polymers

1. Introduction

Fossil oil is the most important energy source for our society and during the last decades we have faced the concern of depleting our reserves, a threat that was illustrated by the oil crisis of the 1970s. Nowadays, it has become apparent that fossil oil is still abundant but

Address correspondence to Gonçalo A. G. Pereira, Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil; Fax: +55 19 35216235. E-mail: goncalo@unicamp.br.

ANEXO I

Declaração de Biossegurança

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada Estudo genético e metabólico da bactéria *Propionibacterium acidipropionici*:

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

Tem autorização da seguinte Comissão:

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

() 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.*

Maria Carolina de Barros Grassi

Aluno: Maria Carolina de Barros Grassi

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura