

Marcelo Colika Bassalo

**“ESTUDO DO METABOLISMO AERÓBICO DA BACTÉRIA
ANAERÓBICA FACULTATIVA
Propionibacterium adicipropionici”**

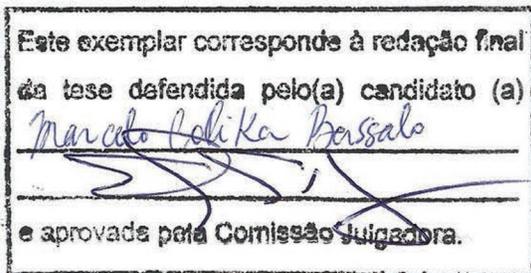
**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARCELO COLIKA BASSALO

“ESTUDO DO METABOLISMO AERÓBICO DA BACTÉRIA
ANAERÓBICA FACULTATIVA
***Propionibacterium acidipropionici*”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

CAMPINAS,
2013

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

B293e Bassalo, Marcelo Colika, 1989-
Estudo do metabolismo aeróbico da bactéria anaeróbica facultativa
Propionibacterium acidipropionici / Marcelo Colika Bassalo. – Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

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

1. *Propionibacterium*. 2. Elétrons – Transporte. 3. Aerobiose. 4. Complexo IV
da cadeia de transporte de elétrons. 5. Fermentação. I. Pereira, Gonçalo
Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Characterization of the aerobic metabolism of the facultative anaerobe
Propionibacterium acidipropionici

Palavras-chave em inglês:

Propionibacterium

Electron Transport

Aerobiosis

Electron transport complex IV

Fermentation

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Marcelo Lancellotti

Luiz Carlos Basso

Data de defesa: 20-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 20 de Junho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti



Assinatura

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso



Assinatura

Prof. Dr. Gabriel Padilla

Assinatura

Prof. Dr. André Luis Berteli Ambrosio

Assinatura

Dedico este trabalho a meus pais, Antonio Carlos e Maria Aparecida, por todo o amor e suporte em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, pela excelente oportunidade e aprendizado que vem sendo construído desde a minha iniciação científica, uma pessoa fundamental na minha formação profissional e pessoal, cujos conselhos motivadores farão parte de mim como futuro pesquisador. Obrigado por ter sempre acreditado em mim mais do que eu mesmo acreditei.

Agradeço a todos os membros de minha pré-banca e banca de defesa, Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, Prof. Dr. Fábio Papes, Prof. Dr. Marcelo Lancellotti e Prof. Dr. Luiz Carlos Basso.

Agradeço a todos os amigos do LGE, os quais foram de fundamental importância para o cumprimento desta etapa de vida.

À Bruno Vaz de Oliveira, agradeço enormemente pela amizade e pela paciência ao ter me orientado e me ensinado durante a iniciação científica, cujos ensinamentos foram essenciais para a realização de meu mestrado.

À Gleidson Silva Teixeira, por todo o companheirismo e amizade, por todas as conversas que me ajudaram em minhas escolhas de vida, e por todo o suporte científico no laboratório.

À Joan Grande Barau, por toda a amizade, o suporte e o ensinamento crítico, além da ajuda no planejamento deste trabalho.

À Luige Armando Llerena Calderón, pela amizade e por todo o apoio no planejamento e execução deste projeto, sem o qual este trabalho não seria possível.

À Marcelo Falsarella Carazzolle, por toda a ajuda e suporte.

À Daniela Paula de Toledo Thomazella, por toda a ajuda, apoio e motivação dada desde o meu início no laboratório. Agradeço a Daniela e a Paula Favoretti Vital do Prado pela ajuda na elaboração de experimentos pertencentes a este projeto.

À Maria Carolina de Barros Grassi, por toda a ajuda e motivação desde o início de meu mestrado, e também pelas sugestões e correções que acrescentaram enormemente para esta dissertação.

À André Prause, Angélica Martins Gomes, Beatriz Temer, Giselle de Arruda Rodrigues, Jorge Lepikson Neto, Leandro Vieira dos Santos e Pedro Augusto Galvão Tizei, por toda a amizade e risadas que tornaram deste trabalho uma fase mais prazerosa.

À Eliane e Sílvia, pela dedicação e ajuda desde a minha iniciação científica até a conclusão de meu mestrado.

Agradeço enormemente ao Prof. Dr. Fábio Papes e a Dra. Johana Rincones Perez, duas pessoas essenciais na minha formação, modelos de cientista que eu gostaria de ser, sempre dispostos em me ajudar.

Agradeço a todos os meus amigos, essenciais em minha vida. Sem vocês, jamais teria chegado até aqui. À Caio Guilherme Pereira, Fernando Suzuki, Gabriel Francisco Zaniboni, Mateus Milani e Vinicius Miessler de Andrade Carvalho.

Agradeço à Lucas Bernardes Alfaro e Rafael Gimenes, irmãos que pude escolher, pessoas de importância inestimável para mim. Agradeço também ao Adam.

Em especial, gostaria de agradecer duas pessoas que são de fundamental importância em minha vida, sem as quais meus últimos anos, tanto no laboratório quanto em minha vida pessoal, não seriam os mesmos. Independente do rumo que tomemos em nossas vidas com o doutorado, tenho certeza que preservarei as nossas amizades da forma mais sincera e saudosa possível.

À Victor Augusti Negri, agradeço enormemente pela verdadeira amizade e por todo o apoio no meu mestrado e nas minhas escolhas pessoais. São raras as pessoas que dizem o que precisa ser dito. Seu suporte foi essencial em minha vida. Agradeço também por toda a ajuda e discussões em meu mestrado.

À Nádia Maria Vieira Sampaio, pelo fato de o maior fruto desses dois anos de mestrado ter sido a minha aproximação com você. Por toda a amizade, companheirismo, ajuda nas horas difíceis, discussões sobre projetos, discussões sobre meus futuros passos e escolhas e pelas muitas risadas que tornaram da vinda ao laboratório uma etapa que sempre lembrarei positivamente e terei saudade em minha vida.

Agradeço a meu pai, Antonio Carlos Bassalo, o maior exemplo que tenho como pessoa, cujo apoio e motivação foi essencial em minha vida. Agradeço a minha mãe, Maria Aparecida Colika, por todo o carinho e apoio que me motivaram a perseguir meus objetivos. Agradeço enormemente toda a ajuda de vocês. Sem isso, jamais poderia ter realizado nada. Agradeço a minha irmã, Heloísa Colika Bassalo, por ser uma das pessoas mais essenciais em minha vida, por toda a ajuda e segurança de ter você por perto.

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

***“You can’t connect the dots looking forward;
you can only connect them looking backwards”***

Steve Jobs

RESUMO

A sociedade atual é fundamentalmente dependente do petróleo, recurso natural inserido na grande maioria dos setores da economia. Entretanto, fatores como a limitada disponibilidade deste recurso, sua instabilidade no mercado devido a problemas de natureza geopolítica e a emissão de dióxido de carbono ocasionada pela utilização deste combustível, acentuaram as iniciativas para substituir o petróleo por fontes alternativas e renováveis de matéria prima. A bactéria *Propionibacterium acidipropionici* surge como uma excelente candidata para a substituição de compostos petroquímicos, através da produção do ácido propiônico. No entanto, antes de transformar esta bactéria em uma plataforma industrial, é necessário aprofundar a compreensão do metabolismo deste microrganismo e desenvolver ferramentas de manipulação genética. No que diz respeito à compreensão do metabolismo, poucos estudos avaliaram o perfil aeróbico desta bactéria, considerada anaeróbica estrita até recentemente. No presente trabalho, foi identificada nesta bactéria a presença de todos os componentes de uma cadeia transportadora de elétrons. No entanto, a citocromo c oxidase identificada apresenta-se mutada e os testes realizados confirmaram a não funcionalidade deste complexo. A existência de uma oxidase alternativa, a citocromo bd oxidase, caracterizada pela alta afinidade ao oxigênio, surge então como uma hipótese promissora acerca da microaerofilia desta bactéria. O trabalho também avaliou o perfil fermentativo dessa bactéria em condições aeróbicas com diferentes fontes de carbono, o que ressaltou a enorme flexibilidade metabólica apresentada por *P. acidipropionici*, capaz de redirecionar o fluxo de carbono para diferentes produtos finais a depender da necessidade de manutenção do balanço redox. Este estudo também revelou uma propriedade bastante peculiar e industrialmente relevante do xarope de cana-de-açúcar. A fermentação aeróbica com este substrato, ao contrário de todas as outras fontes de carbono, apresentou um crescimento superior ao das condições anaeróbicas e, adicionalmente, exibiu um perfil fermentativo próximo ao observado em ausência de oxigênio. A identificação do composto presente no xarope de cana-de-açúcar, responsável por simular o metabolismo anaeróbico, poderia viabilizar a produção do ácido propiônico em dornas de fermentação aeróbicas, o que traria enormes benefícios para a produção economicamente viável do ácido propiônico e na implementação de *P. acidipropionici* como uma plataforma industrial.

ABSTRACT

The dependence of contemporary society on petroleum is axiomatic, and this natural resource could be found intrinsically embedded in the vast majority of economic sectors. Nonetheless, the limited availability of this natural resource, the instability in the stock market due to geopolitical problems, and also the carbon dioxide emissions associated with the use of fossil fuels have highlighted the need to search for renewable energy sources. The bacteria *Propionibacterium acidipropionici* arises as an excellent strategy for the substitution of petrochemical compounds, through the production of propionic acid. Before we could implement this bacterium as an industrial platform, however, it becomes necessary to enhance the knowledge regarding the metabolism of *P. acidipropionici*, and thus create a backbone for the development of genetic manipulation tools. Regarding the metabolism of this bacterium, there aren't comprehensive studies about its aerobic metabolism, thus being considered strict anaerobes until recently. In the present work, it was identified that *P. acidipropionici* has all required components for a functional electron transport chain. However, the cytochrome c oxidase of this bacterium has a frameshift mutation, and the functional studies proved that this complex is not operative. The presence of an alternative oxidase of high oxygen affinity, called cytochrome bd oxidase, is then suggested as a hypothesis to explain the microaerophilic habit of this bacterium. This work has also shed light into the fermentative profile showed by this bacterium under aerobic cultivation with different carbon sources, bringing attention to the highly flexible metabolism of *P. acidipropionici*. This bacterium has shown to be capable of completely changing its carbon flux to different end products, as a strategy to maintain the redox balance. In addition, this work has also unveiled an interesting and industrially-relevant property of the sugar cane syrup. It was demonstrated that the aerobic cultivation of *P. acidipropionici* with sugar cane syrup increased the culture growth, as well as it changed the fermentation end products in a way more similar to the anaerobic cultivation. It was hypothesized that this unusual property found in the sugar cane syrup was due to the presence of a mineral compound that could be used as a final electron acceptor by *P. acidipropionici*. The identification of this specific compound would allow the aerobic production of propionic acid in industrial conditions, and thus could be a major breakthrough to turn its industrial production into an economically viable process.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Estudo do metabolismo aeróbico da bactéria anaeróbica facultativa *Propionibacterium acidipropionic*":

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

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

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

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

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

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



Aluno: Marcelo Colika Bassalo



Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

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

Carimbo e assinatura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
3.1. A cadeia respiratória de <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	9
3.2. Análise da expressão dos genes da cadeia respiratória em anaerobiose	11
3.3. As oxidases terminais de <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	16
3.4. Crescimento aeróbico de <i>P. acidipropionici</i> em diferentes fontes de carbono	22
3.5. Análise do perfil de produtos da fermentação em cultivo aeróbico	26
3.6. Perspectivas futuras na elucidação da reversão do ciclo do ácido propiônico	37
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1. Linhagens de bactérias utilizadas e condições de cultivo	42
5.2. Análise da expressão global dos genes de <i>P. acidipropionici</i> por RNAseq.....	43
5.3. Análise e teste funcional da citocromo c oxidase.....	44
5.4. Teste de crescimento aeróbico em diferentes fontes de carbono	45
5.5. Cultivo de <i>P. acidipropionici</i> em biorreatores.....	45
5.6. Confirmação da identidade das bactérias fermentadas por sequenciamento.....	47
5.7. Quantificação dos substratos e produtos da fermentação por HPLC	49
5.8. Cálculo dos parâmetros de desempenho fermentativo	50
5.9. Clonagem e expressão heteróloga da CoA transferase de <i>P. acidipropionici</i>	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

A sociedade atual é fundamentalmente dependente do petróleo, recurso natural inserido na grande maioria dos setores da economia. Sua utilização no setor energético é notável, com uma participação estimada em 34,7% da energia mundial total utilizada em 2010, atingindo 87% se adicionada a outros combustíveis fósseis (OPEC Outlook, 2012). Adicionalmente, o craqueamento do petróleo para geração de diferentes *commodities* petroquímicas, como por exemplo, os monômeros para fabricação do plástico, estabelecem esse recurso como primordial para a sustentação e desenvolvimento da sociedade.

Entretanto, fatores como a limitada disponibilidade deste recurso, sua instabilidade no mercado devido a problemas de natureza geopolítica e a emissão de dióxido de carbono ocasionada pela utilização deste combustível, acentuaram as iniciativas para substituir o petróleo por fontes alternativas e renováveis de matéria prima. Nesse cenário, diversas estratégias exploram processos fermentativos de microrganismos para a conversão de biomassa em compostos químicos de interesse para a indústria (Field, Campbell, & Lobell, 2008). Dois exemplos de processos estabelecidos baseados nesta estratégia são a fermentação alcoólica e a fermentação láctica.

A fermentação alcoólica, realizada por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, resulta na produção de etanol, um álcool de dois carbonos com alto grau de redução ($R = 6$), utilizado como combustível e recentemente na produção de polietileno (Rincones, Zeidler, Grassi, Carazzolle, & Pereira, 2009). A fermentação láctica, realizada por bactérias do gênero *Lactobacillus*, resulta na produção de ácido láctico, um ácido de três carbonos utilizado principalmente na indústria alimentícia e como monômero para construção do plástico biodegradável PLA (Rincones et al., 2009). Entretanto, o baixo grau de redução dessa molécula ($R = 4$), decorrente da presença de maiores quantidades de átomos de oxigênio, dificulta sua conversão em hidrocarbonetos de três carbonos de interesse para a indústria.

Na busca por monômeros de três carbonos de interesse industrial, surge o ácido propiônico, composto com um grau de redução relativamente superior ($R = 4,66$) produzido através da fermentação propiônica. Devido a suas propriedades químicas e físicas, o ácido propiônico apresenta diferentes aplicações nas indústrias alimentícia,

química e farmacêutica. Os sais derivados deste composto, tais como propionato de sódio, cálcio e potássio são utilizados como conservantes em alimentos industrializados. Além disso, esse ácido é um importante intermediário químico, sendo amplamente utilizado na produção de polímeros de celulose, herbicidas, perfumes e flavorizantes (Kumar & Babu, 2006). Atualmente, o ácido propiônico é produzido quimicamente a partir de compostos petroquímicos como, por exemplo, a partir da oxidação do propano, propionaldeído e propanol (Playne, 1985).

Dentre as bactérias capazes de realizar uma fermentação propiônica, as pertencentes ao gênero *Propionibacterium* se destacam pela alta capacidade de produzir esse ácido. Essas bactérias são descritas como gram-positivas, não formadoras de esporos e não móveis. Morfologicamente, são descritas como bacilos, mas apresentam pleiomorfismo (L. I. Vorobjeva, 1959). Na Figura 1, pode ser visualizada uma foto de microscopia óptica das culturas utilizadas neste projeto.

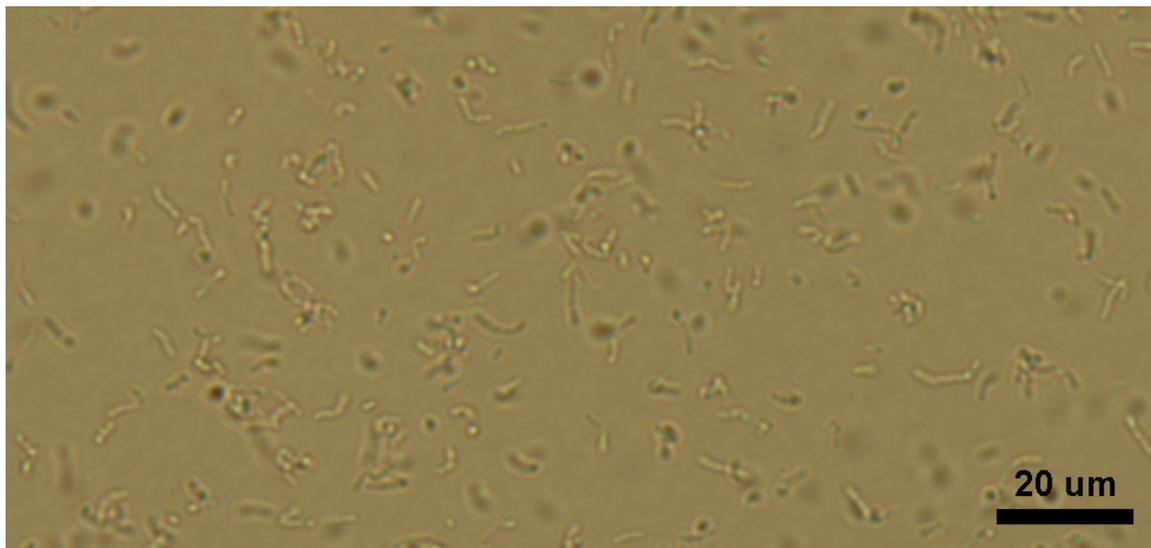


Figura 1: Foto de microscopia óptica de uma cultura de *P. acidipropionici* ATCC 4875, utilizada neste trabalho.

Adicionalmente, são descritas como anaeróbicas facultativas ou como aerotolerantes, embora a resistência ao oxigênio varie entre espécies. Podem ser encontradas em queijos, solo, esgoto, estômago de ruminantes e na pele humana como, por exemplo, a espécie patogênica oportunista *Propionibacterium acnes* (Lena I Vorobjeva, 1999). Propionibactérias apresentam grande importância em diversos processos industriais, sendo utilizadas para a produção de vitamina B12, compostos tetrapirrólicos

(Murooka, Piao, Kiatpapan, & Yamashita, 2005; Yongsmith, Sonomoto, Tanaka, & Fukui, 1982), ácido propiônico (Boyaval & Corre, 1995; Suwannakham & Yang, 2005), como cultura probiótica (Mantere-Alhonen, 1995) e na fabricação do queijo suíço (Langsrud & Reinbold, 1973; Thierry, Maillard, Richoux, Kerjean, & Lortal, 2005). Dentre as aplicações citadas, muitos esforços estão sendo direcionados para estabelecer as propionibactérias como uma plataforma industrial para produção de ácido propiônico (Zhu et al., 2010). A espécie *P. acidipropionici* se destaca dentre as propionibactérias pela alta capacidade de produzir o ácido propiônico, o que é realizado através da via conhecida como ciclo de Wood-Werkman ou ciclo dos ácidos dicarboxílicos, apresentando o acetato, succinato e dióxido de carbono como subprodutos (Figura 2).

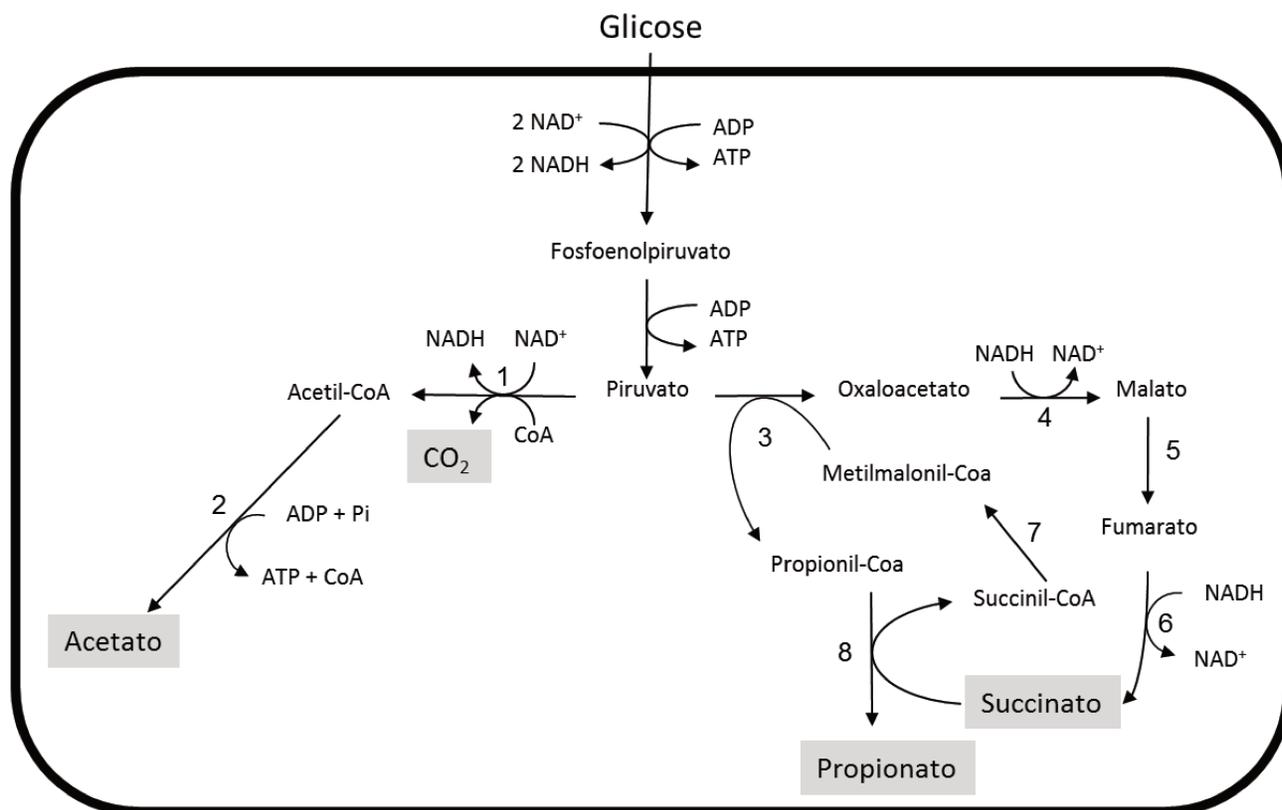


Figura 2: Via heterofermentativa dos ácidos dicarboxílicos encontrada em *P. acidipropionici*. Estão destacados em cinza os principais produtos e subprodutos da fermentação por esta via. 1. Piruvato desidrogenase. 2. Acetil-CoA sintetase. 3. Metilmalonil-CoA carboxitransferase. 4. Malato desidrogenase.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

No entanto, a fermentação convencional de ácido propiônico apresenta um baixo rendimento e produtividade, além de uma baixa concentração final do ácido ocasionada pela forte inibição dos produtos finais da fermentação (Blanc & Goma, 1987). Essas características inviabilizam a produção em escala industrial de forma economicamente competitiva com a produção petroquímica desse ácido. Logo, muitos esforços estão sendo direcionados para a otimização da produção de ácido propiônico, tanto através do aprimoramento do processo fermentativo (Liu, Zhang, Zhang, Zhang, & Zhu, 2011; Suwannakham & Yang, 2005; Zhang & Yang, 2009) quanto através da manipulação genética dessa bactéria (Cheong, Lee, & So, 2008; Murooka et al., 2005).

Entretanto, a manipulação genética de propionibactérias é um processo difícil, cujos estudos encontram-se em estágio inicial. Fatores como a presença de uma espessa parede celular, o alto conteúdo G+C (68,8%), e o forte sistema de restrição encontrado nestas bactérias dificultam o processo (Parizzi et al., 2012). Ademais, pouco se conhece sobre a fisiologia e metabolismo dessas bactérias, um conhecimento crucial para a elaboração de ferramentas de manipulação genética.

Frente a esses gargalos, aprofundar o conhecimento sobre o metabolismo dessa bactéria é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética e o estabelecimento de *P. acidipropionici* como uma plataforma industrial para produção de compostos químicos de interesse. Os estudos existentes focaram principalmente na avaliação das vias fermentativas apresentadas por esta bactéria em anaerobiose (Lena I Vorobjeva, 1999), sendo pouca atenção atribuída ao metabolismo aeróbico da mesma.

Por muitos anos consideradas anaeróbias estritas, os primeiros estudos de propionibactérias na presença de oxigênio foram realizados em 1959 (L. I. Vorobjeva, 1959). Desde então, os estudos realizados confirmaram a capacidade dessas bactérias sobreviverem em condições microaeróbicas, embora a sensibilidade ao oxigênio varie entre espécies diferentes.

Em um estudo realizado com o objetivo de avaliar o comportamento de *P. freudenreichii* em culturas com aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), foi reportado o acúmulo de ácido pirúvico e não foi observada a produção de ácido propiônico (De Vries, Wijck-Kapteijn, & Stouthamer, 1972). Em outro trabalho, com objetivo de aumentar a produção de vitamina B12 por *P. freudenreichii*, foram realizados cultivos em dois estágios: um anaeróbico, produzindo ácido acético e propiônico, e um

segundo aeróbico em que se observou o aumento da produção de vitamina B12 e o consumo do ácido propiônico formado (Kaiming Ye, Shijo, Jin, & Shimizu, 1996). Com o cultivo de *P. shermanii* em altos níveis de oxigênio dissolvido (24 nmol O₂/L.h), foi observada a produção de ácido acético e lactato como produtos principais (Quesada-Chanto et al., 1998). Outro estudo significativo na área mostrou a oscilação da produção de ácido propiônico em função da oscilação na concentração de oxigênio dissolvido em culturas de *P. freudenreichii*, e sugeriu uma possível inversão no sentido das reações do ciclo do ácido propiônico em aerobiose (K Ye, Shijo, Miyano, & Shimizu, 1999). Uma representação da inversão do ciclo do ácido propiônico pode ser visualizada na Figura 3.

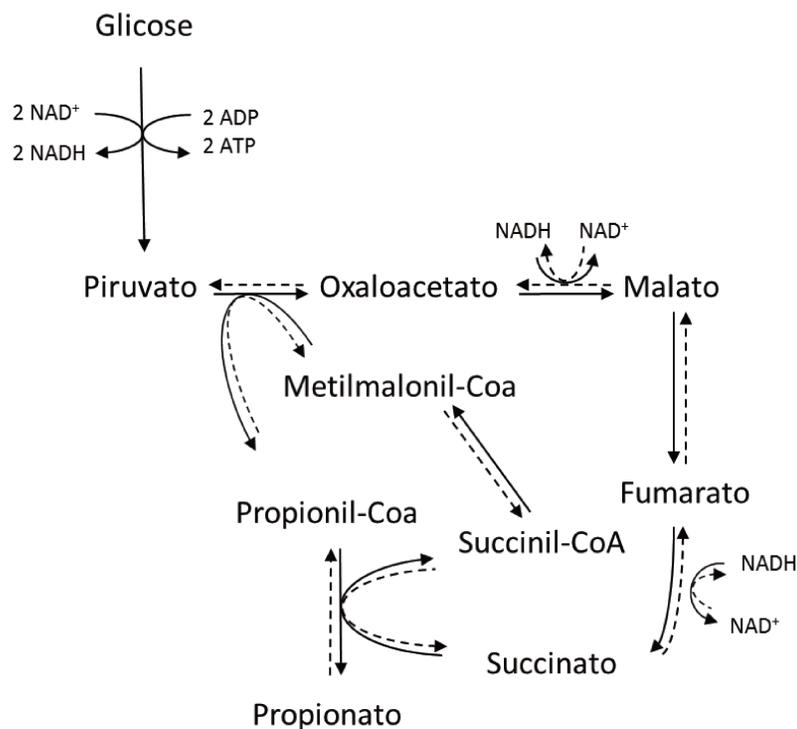


Figura 3: Esquema representando a inversão do ciclo do ácido propiônico. As setas cheias representam as reações do ciclo em anaerobiose. As setas pontilhadas representam as reações do ciclo invertido, em aerobiose.

Claramente, pode-se notar o impacto que a aerobiose provoca na fisiologia e perfil fermentativo das propionibactérias, mas faltam estudos que investigam esse aspecto mais profundamente a nível metabólico e genético. Com o recente sequenciamento do genoma de *P. acidipropionici* pelo nosso grupo (Parizzi et al., 2012), foi identificado que essa bactéria apresenta todos os componentes necessários para um metabolismo aeróbico.

Especificamente, foram identificados alguns aspectos interessantes na cadeia transportadora de elétrons dessa bactéria.

O esquema geral de uma cadeia transportadora de elétrons típica, presente em eucariotos, está representado na Figura 4. A NADH desidrogenase, conhecida como complexo I, funciona como entrada de elétrons na cadeia respiratória, reoxidando o NADH para regenerar o cofator NAD^+ . O complexo II, formado pela succinato desidrogenase, também funciona como entrada de elétrons para a cadeia respiratória, através da oxidação do succinato, intermediário do ciclo de Krebs. Os elétrons provenientes do complexo I e do complexo II são capturados pela ubiquinona, uma proteína lipossolúvel responsável pelo transporte de elétrons na membrana. O complexo III, ou bc_1 , é formado pela citocromo c redutase, funcionando como um complexo de transferência de elétrons da ubiquinona para o citocromo c. Por fim, o complexo IV, ou citocromo c oxidase, é o responsável por transportar os elétrons do citocromo c para o oxigênio, reduzindo-o a água.

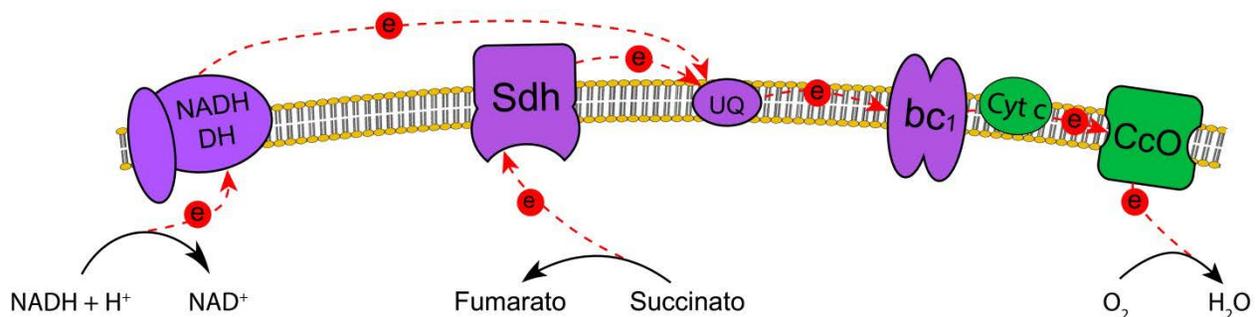


Figura 4: Esquema de uma cadeia transportadora de elétrons típica. **NADH DH:** NADH desidrogenase. **Sdh:** Succinato desidrogenase. **UQ:** Ubiquinona. **bc_1 :** Citocromo c redutase. **Cyt c:** Citocromo c. **CcO:** Citocromo c oxidase. As setas em vermelho representam a passagem de elétrons (e^-) pela cadeia.

Embora a cadeia transportadora de elétrons de bactérias apresente a mesma estrutura geral, estas se caracterizam por serem altamente ramificadas, apresentando múltiplas oxidases terminais. Essa variação permite que bactérias adaptem seu sistema respiratório a diferentes condições de crescimento, escolhendo uma composição de enzimas que resultam (1) no maior acoplamento com a translocação de prótons (razão H^+/e^-), (2) na rápida reoxidação dos cofatores reduzidos NADH/NADPH e (3) na regulação da concentração intracelular de oxigênio (Belevich & Verkhovsky, 2008; Blanca, Jon, Ma, & Gennis, 1994).

Em *P. acidipropionici*, a análise do genoma feita por Parizzi e colaboradores (2012) acusou a presença de duas oxidases terminais, a citocromo c oxidase convencional (complexo IV) e uma oxidase alternativa denominada citocromo bd oxidase ou citocromo d ubiquinol oxidase. A citocromo c oxidase se caracteriza por apresentar uma baixa afinidade por oxigênio, o que permite uma respiração em pressões atmosféricas desse gás, sendo consequentemente observada em organismos aeróbicos (Blanca et al., 1994). No entanto, foi identificada uma mutação de mudança no quadro de leitura (*frameshift*) nessa oxidase, possivelmente inativando sua função. A oxidase alternativa identificada, citocromo bd oxidase, por sua vez, se caracteriza por apresentar uma alta afinidade ao oxigênio, viabilizando a respiração em pressões sub atmosféricas, sendo observadas em organismos microaeróbicos (Borisov, Gennis, Hemp, & Verkhovsky, 2011).

A presença de uma citocromo c oxidase possivelmente não funcional, associada a presença da citocromo bd oxidase, devem ter fortes relações com a microaerofilia de *P. acidipropionici*, exigindo investigações mais aprofundadas. A espécie filogeneticamente próxima, *P. freudenreichii*, interessantemente, não possui em seu genoma a citocromo c oxidase, o que pode sugerir que as propionibactérias, por estarem presentes em habitats que não apresentam altas concentrações de oxigênio, estão perdendo este complexo enzimático.

Compreender o funcionamento do metabolismo aeróbico desta bactéria, desde os impactos no perfil fermentativo até as implicações fisiológicas que resultam na mudança no crescimento, é uma etapa essencial na compreensão do metabolismo geral dessa bactéria. Essa compreensão do metabolismo contribuirá com informações para o estabelecimento de *P. acidipropionici* como plataforma industrial e possivelmente para o desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética dessa bactéria. Nesse cenário, o presente projeto busca aprofundar o conhecimento acerca do metabolismo aeróbico de *P. acidipropionici*, uma área pouco investigada até o presente.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral aprofundar o conhecimento acerca do metabolismo aeróbico de *Propionibacterium acidipropionici*. Especificamente, o trabalho buscou fornecer indícios sobre a presença e funcionamento dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, a capacidade de crescimento da bactéria em aerobiose e o impacto que a aerobiose provoca a nível metabólico.

Ademais, o projeto teve como objetivo adicional iniciar estudos de caracterização das enzimas do ciclo do ácido propiônico. Esse estudo foi realizado visando fornecer indícios para futuramente correlacionar a atividade dessas enzimas com a presença e ausência do oxigênio e também contribuir com a identificação de possíveis alvos para manipulação genética.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. A cadeia respiratória de *Propionibacterium acidipropionici*

A análise do genoma de *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 revelou a presença de todos os componentes típicos de uma cadeia transportadora de elétrons, representados na Figura 5: NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, ubiquinona, citocromo c redutase, citocromo c e citocromo c oxidase.

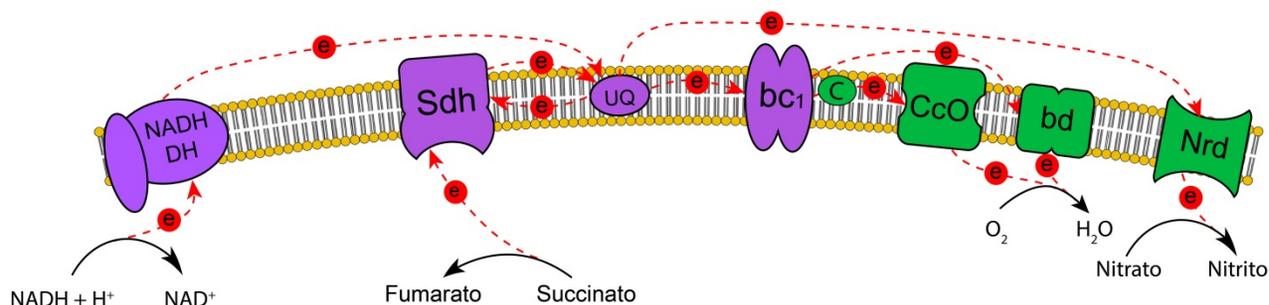


Figura 5: Componentes da cadeia transportadora de elétrons encontrados no genoma de *P. acidipropionici* ATCC 4875. **NADH DH:** NADH desidrogenase. **Sdh:** Succinato desidrogenase. **UQ:** Ubiquinona. **bc₁:** Citocromo c redutase. **C:** Citocromo c. **CcO:** Citocromo c oxidase. **bd:** Citocromo bd oxidase (citocromo d ubiquinol oxidase). **Nrd:** Nitrato redutase. As flechas em vermelho representam a passagem de elétrons (e^-) pela cadeia.

A NADH desidrogenase encontrada é um complexo enzimático contendo 14 subunidades, da mesma forma como a NADH desidrogenase codificada pelo locus *nuo* de *Escherichia coli* (Falk-krzesinski & Wolfe, 1998). A anotação dos genes de *P. acidipropionici* e sua correspondência com as subunidades de *E. coli* pode ser verificada na Tabela 1. Adicionalmente, foi encontrada também uma possível NADH desidrogenase do tipo-II (PACID_04960), a qual se diferencia da primeira principalmente pelo fato de não contribuir para a formação do gradiente eletroquímico, uma vez que esta não bombeia prótons (Kerscher, Dröse, Zickermann, & Brandt, 2007).

Com relação à succinato desidrogenase, foram encontrados dois *clusters* no genoma, cada um codificando as três subunidades distintas desta enzima. O *cluster* SDH I corresponde as subunidades codificadas pelo PACID_21310 à PACID_21330 e o *cluster* SDH II de PACID_18400 à PACID_18420. Como discutido por Parizzi e colaboradores (Parizzi et al., 2012), é possível que uma dessas enzimas esteja envolvida com o metabolismo anaeróbico da bactéria e a outra com o metabolismo aeróbico.

Tabela 1: Subunidades da NADH desidrogenase em *P. acidipropionici* e as correspondentes em *E. coli*

Subunidade em <i>E. coli</i>	Gene ID em <i>P. acidipropionici</i>
<i>nuoA</i>	PACID_26410
<i>nuoB</i>	PACID_26400
<i>nuoC</i>	PACID_26390 / PACID_26130
<i>nuoD</i>	PACID_26380 / PACID_28420
<i>nuoE</i>	PACID_26370
<i>nuoF</i>	PACID_26360
<i>nuoG</i>	PACID_26350
<i>nuoH</i>	PACID_26340
<i>nuoI</i>	PACID_26330 / PACID_26120
<i>nuoJ</i>	PACID_26320
<i>nuoK</i>	PACID_26310
<i>nuoL</i>	PACID_26300
<i>nuoM</i>	PACID_26290
<i>nuoN</i>	PACID_26280

A prospecção de genes pelo genoma também evidenciou a capacidade de codificar as vias biossintéticas de ubiquinona e de citocromo c. O complexo enzimático responsável pela transferência de elétrons entre a ubiquinona e o citocromo c, conhecido como citocromo c redutase ou bc₁, foi também identificado no genoma, contendo três subunidades (de PACID_12260 até PACID_12280).

A oxidase terminal clássica da cadeia respiratória, citocromo c oxidase, foi encontrada no genoma como contendo as quatro subunidades esperadas, descritas na Tabela 2. Por similaridade das sequências com as de outras bactérias, *P. acidipropionici* possivelmente apresenta uma citocromo c oxidase do tipo Caa3, contendo dois grupamentos heme (a e a₃), sendo o segundo associado a um íon cobre para formar o centro bimetálico Fe-Cu, responsável pela redução do oxigênio à água (Thöny-Meyer, 1997).

Tabela 2: Subunidades da citocromo c oxidase observadas no genoma de *P. acidipropionici*

Subunidade	Gene ID <i>P. acidipropionici</i>
<i>coxA</i>	PACID_12220
<i>coxB</i>	PACID_12210
<i>coxC</i>	PACID_12290
<i>coxD</i>	PACID_12230

Além desses componentes clássicos de uma cadeia respiratória, foi observada pela análise do genoma a presença de outras oxidases terminais. A citocromo d ubiquinol oxidase (citocromo bd oxidase), de alta afinidade por oxigênio, foi encontrada contendo duas subunidades (PACID_05280 e PACID_05290). Foram também encontradas as quatro subunidades de uma nitrato redutase (de PACID_02700 até PACID_02730), a qual poderia utilizar o nitrato como acceptor final de elétrons e reduzi-lo à nitrito.

Todos estes componentes teriam papel fundamental na regeneração de cofatores oxidados, como o NAD⁺, e no balanço redox de *P. acidipropionici*. Outras enzimas identificadas, que merecem destaque por sua capacidade de regenerar NAD⁺ durante a fermentação da bactéria, são a lactato desidrogenase (três possíveis genes codantes encontrados, PACID_00350, PACID_00390 e PACID_05230) e a álcool desidrogenase (21 possíveis genes codantes encontrados).

3.2. Análise da expressão dos genes da cadeia respiratória em anaerobiose

A partir das bibliotecas geradas pelos sequenciamentos de RNA realizados em um projeto em andamento no laboratório (dados não publicados), foi investigada a expressão dos genes envolvidos com a cadeia respiratória em *P. acidipropionici*. As bibliotecas foram geradas a partir do cultivo da bactéria em meio de cultura contendo glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono, todos em condições anaeróbicas. Todos os componentes da cadeia transportadora de elétrons apresentaram algum nível de expressão, outra evidência da participação da mesma no metabolismo anaeróbico da bactéria. Os valores de expressão aqui referidos estão todos na medida de RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*), um método de quantificar a expressão que leva em consideração a normalização a partir do tamanho do fragmento sequenciado e o total de número de *reads* gerados na biblioteca.

Como o experimento foi conduzido em condições anaeróbicas, independente da fonte de carbono testada, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão da NADH desidrogenase, citocromo c redutase e citocromo c oxidase, responsáveis pelo transporte de elétrons do NADH ao oxigênio. É interessante ressaltar que a subunidade I da citocromo c oxidase (*coxA*) não foi detectada em nenhuma das bibliotecas analisadas, o que condiz com a mutação de *frameshift* encontrada por Parizzi

e colaboradores (2012), possivelmente inviabilizando a transcrição de um mRNA estável na região.

A análise das bibliotecas revelou uma expressão diferencial entre os dois *clusters* de succinato desidrogenase encontrados no genoma. Embora ambos tenham sido encontrados nas bibliotecas, os níveis de expressão do *cluster* SDH I é muito superior aos níveis observados para o *cluster* SDH II (Figura 6A-C). Essa diferença de expressão está de acordo com a detecção de apenas uma dessas enzimas no proteoma realizado por Parizzi e colaboradores (2012) a partir de culturas anaeróbicas de *P. acidipropionici*. Possivelmente, o *cluster* SDH I atua no metabolismo anaeróbico da bactéria como uma fumarato redutase, como parte do ciclo do ácido propiônico, doando elétrons provenientes da cadeia respiratória para o fumarato. O *cluster* SDH II poderia atuar no metabolismo aeróbico da bactéria, como uma succinato desidrogenase (Figura 6D), oxidando o succinato e fornecendo elétrons para a cadeia respiratória.

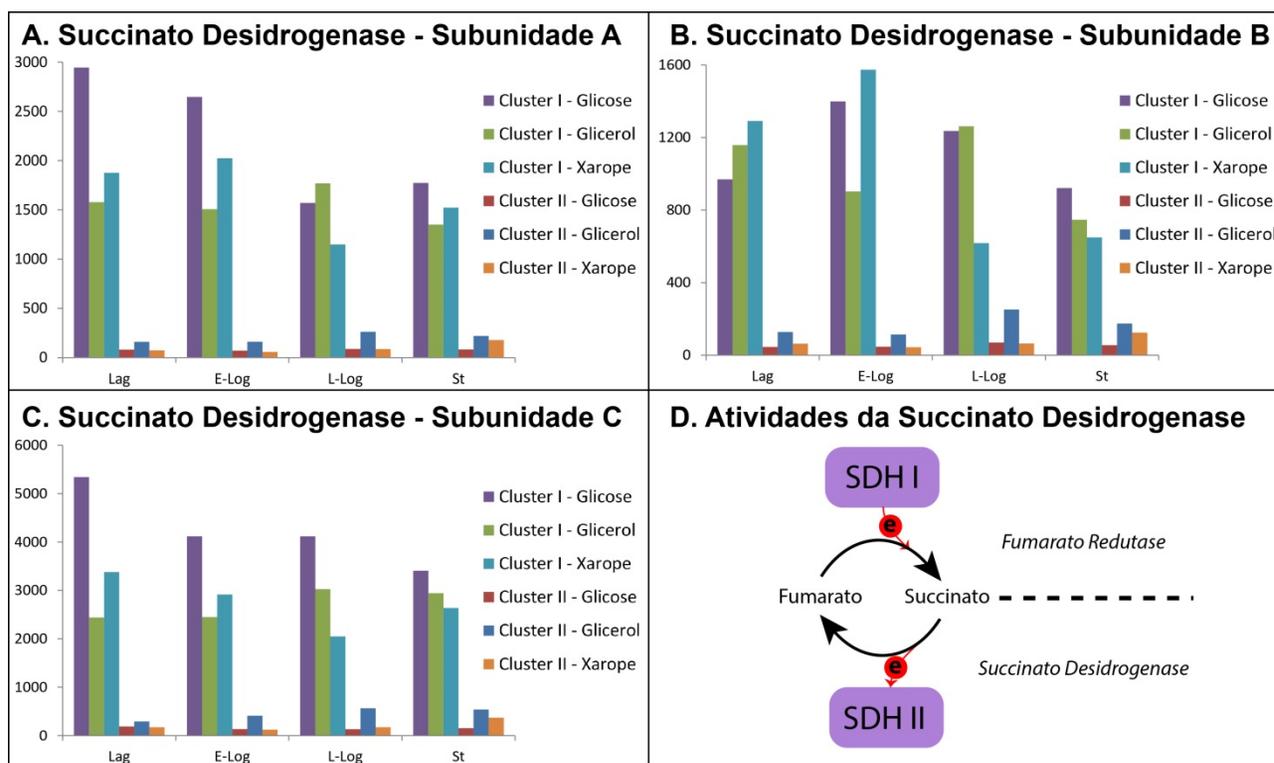


Figura 6: Expressão dos dois *clusters* de succinato desidrogenase em fermentações anaeróbicas realizadas com as 3 fontes de carbono testadas. Os pontos das fermentações representados são: fase de latência (Lag), início da fase exponencial (E-Log), final da fase exponencial (L-Log) e fase estacionária (St). **A.** Subunidade A nos *clusters* SDH I e SDH II. **B.** Subunidade B nos *clusters* SDH I e SDH II. **C.** Subunidade C nos *clusters* SDH I e SDH II. **D.** Esquema representando as atividades de fumarato redutase e succinato desidrogenase possivelmente desempenhadas pelos *clusters* SDH I e SDH II.

Essas possíveis diferenças de atividades entre os *clusters* SDH, se mutuamente exclusivas, poderiam alterar completamente o sentido do ciclo do ácido propiônico no metabolismo anaeróbico e aeróbico da bactéria (ver representação na Figura 3). A impossibilidade de reduzir o fumarato em aerobiose poderia ser um dos mecanismos envolvidos com essa reversão do ciclo, já reportada anteriormente (K Ye et al., 1999).

A nitrato redutase foi também detectada nos transcriptomas analisados. É interessante destacar que ocorreu um aumento de expressão da enzima na fase estacionária da fermentação com glicerol e xarope quando comparadas com glicose. Na Figura 7, pode ser observado os níveis de expressão da subunidade alfa da nitrato redutase. As outras subunidades da enzima seguiram o mesmo perfil da subunidade alfa.

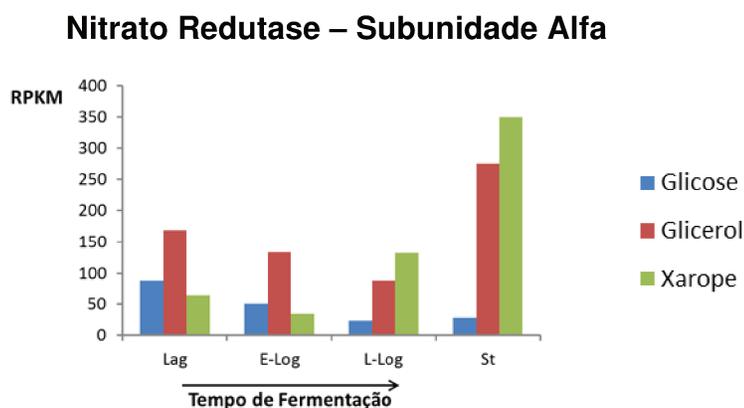


Figura 7: Expressão da subunidade alfa da nitrato redutase em fermentações anaeróbicas com as três fontes de carbono testadas. Os pontos das fermentações representados são: fase de latência (Lag), início da fase exponencial (E-Log), final da fase exponencial (L-Log) e fase estacionária (St).

Considerando o papel do nitrato como acceptor final de elétrons, é possível que o aumento da expressão da nitrato redutase nessas condições esteja relacionado com uma maior necessidade de regenerar cofatores oxidados no final da fermentação, ativando outros sistemas de regeneração. Isso estaria de acordo com o fato de que o glicerol é uma fonte mais reduzida e, com isso, produz maior quantidade de cofatores NADH, enquanto o xarope de cana-de-açúcar poderia apresentar maior disponibilidade de nitrato para ser utilizado como acceptor de elétrons.

Os três genes codificantes para lactato desidrogenase foram encontrados em todas as bibliotecas analisadas. No entanto, um dos genes (PACID_00350) apresentou um nível

de expressão significativamente menor do que os outros dois em todas as fontes de carbono testadas (Figura 8).

Comparação da Expressão das LDHs nas fermentações anaeróbicas

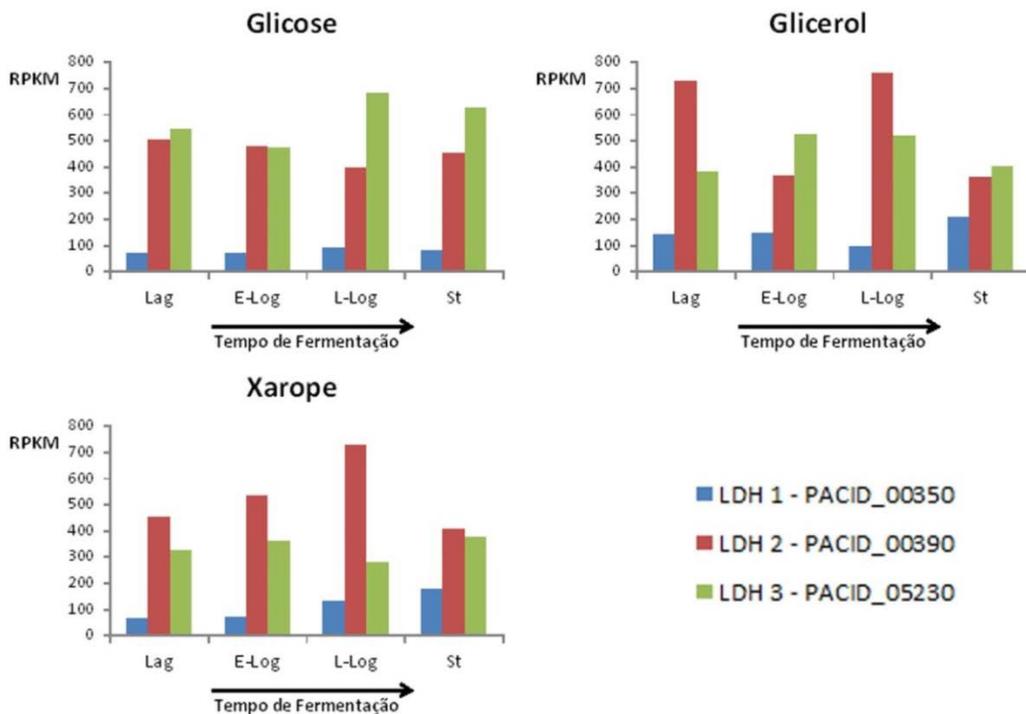
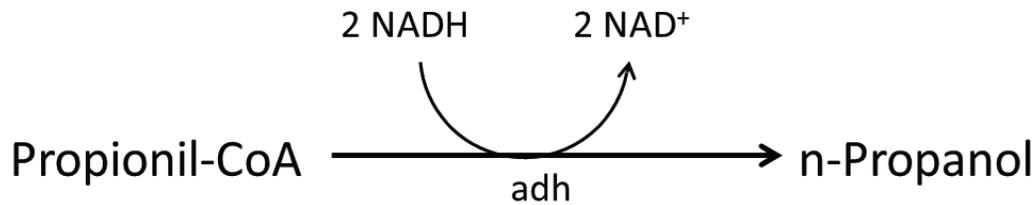


Figura 8: Comparação da expressão dos três genes codificantes para lactato desidrogenase em fermentações anaeróbicas realizadas com glicose, glicerol ou xarope como fonte de carbono. Os pontos das fermentações representados são: fase de latência (Lag), início da fase exponencial (E-Log), final da fase exponencial (L-Log) e fase estacionária (St).

É interessante observar essa expressão dos genes que codificam para lactato desidrogenase em condições anaeróbicas, uma vez que não é possível detectar a produção de lactato em fermentações anaeróbicas da bactéria. Tal fato pode sugerir que a regulação desta enzima ocorra a nível pós transcricional.

Por fim, a expressão dos genes codantes para álcool desidrogenase também foi avaliada nos transcriptomas. Muitos desses genes chamaram a atenção por apresentar uma expressão superior em glicerol quando comparadas com as demais fontes de carbono. Uma maior expressão de álcool desidrogenase (*adh*) em glicerol poderia ser um resultado do alto grau de redução desta fonte de carbono, sendo o excesso de cofatores reduzidos gerados (NADH) utilizados por estas enzimas para a produção de propanol a

partir do propionil-CoA produzido pelo ciclo do ácido propiônico, de acordo com a seguinte reação:



Dois dos genes que apresentaram uma diferença mais expressiva estão representados na Figura 9.

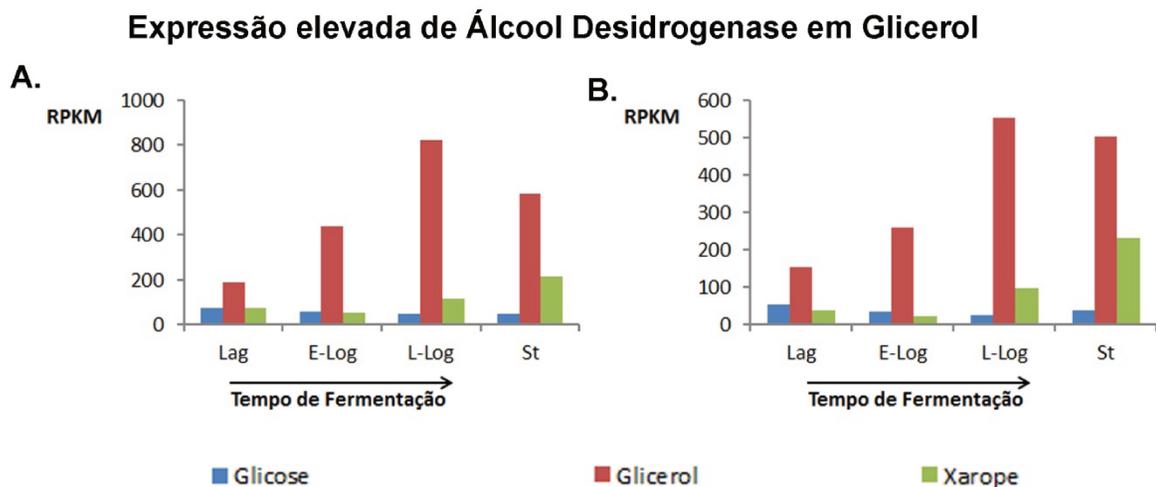


Figura 9: Expressão de álcool desidrogenase em fermentações anaeróbicas realizadas com glicose, glicerol ou xarope como fonte de carbono. Os pontos das fermentações representados são: fase de latência (Lag), início da fase exponencial (E-Log), final da fase exponencial (L-Log) e fase estacionária (St). **A.** Expressão da álcool desidrogenase codificada pelo gene PACID_31640. **B.** Expressão da álcool desidrogenase codificada pelo gene PACID_08230.

Todos os dados aqui descritos sobre a expressão dos genes relacionados à cadeia respiratória de *P. acidipropionici* em fermentações anaeróbicas ainda necessitam de validações por *Real-Time* PCR (Q-PCR). No entanto, a análise dessas bibliotecas forneceu indícios importantes sobre o papel da cadeia respiratória no metabolismo da bactéria. A expressão elevada em anaerobiose de apenas um dos *clusters* de succinato desidrogenase suporta a hipótese de uma separação de função entre os dois *clusters*, podendo o *cluster* SDH II estar envolvido no metabolismo aeróbico da bactéria. Entender mais profundamente o *switch* que ocorre em aerobiose no ciclo do ácido propiônico é fundamental para compreender o metabolismo da bactéria como um todo, e a cadeia

respiratória pode ter um papel fundamental na elucidação desse mecanismo. Adicionalmente, uma maior expressão de álcool desidrogenase em glicerol pode ser um mecanismo essencial para manter o balanço redox em fontes de carbonos mais reduzidas. Dessa forma, fica evidente a importância da cadeia respiratória no metabolismo anaeróbico da bactéria. A construção de bibliotecas de transcriptoma provenientes de culturas aeróbicas, juntamente com um proteoma nas mesmas condições, deve ser o próximo passo para compreender o metabolismo da bactéria, com potencial de gerar resultados extremamente promissores acerca das mudanças subjacentes à cadeia respiratória e correlacioná-las às alterações no perfil fermentativo de *P. acidipropionici*.

3.3. As oxidases terminais de *Propionibacterium acidipropionici*

A análise das sequências dos genes que codificam os componentes da cadeia respiratória de *P. acidipropionici* revelou uma mutação de mudança no quadro de leitura (*frameshift*) na subunidade I da citocromo c oxidase (*coxA*, PACID_12220), como descrito por Parizzi e colaboradores (2012). Foi realizado o alinhamento da sequência de aminoácidos dessa subunidade de *P. acidipropionici* em comparação com a mesma subunidade de duas bactérias filogeneticamente próximas (*Microlunatus phosphovorus* e *Propionibacterium acnes*), representado na Figura 10.

Evidentemente, a mutação provocou uma drástica alteração na sequência dos aminoácidos após o resíduo 166, além de gerar um *stop codon* prematuro que resultaria em uma proteína menor (529 aminoácidos) do que o esperado caso não houvesse *frameshift* (578 aminoácidos). Por ser uma subunidade altamente conservada, e tendo em vista a presença dos grupos prostéticos (heme a e heme a₃) e do íon cobre, possivelmente esta mutação inativou a subunidade I e conseqüentemente todo o complexo da citocromo c oxidase.

completa de diversas α hélices após o ponto de *frameshift*. Na Figura 11, pode ser observado em destaque algumas das hélices perdidas com a mutação.

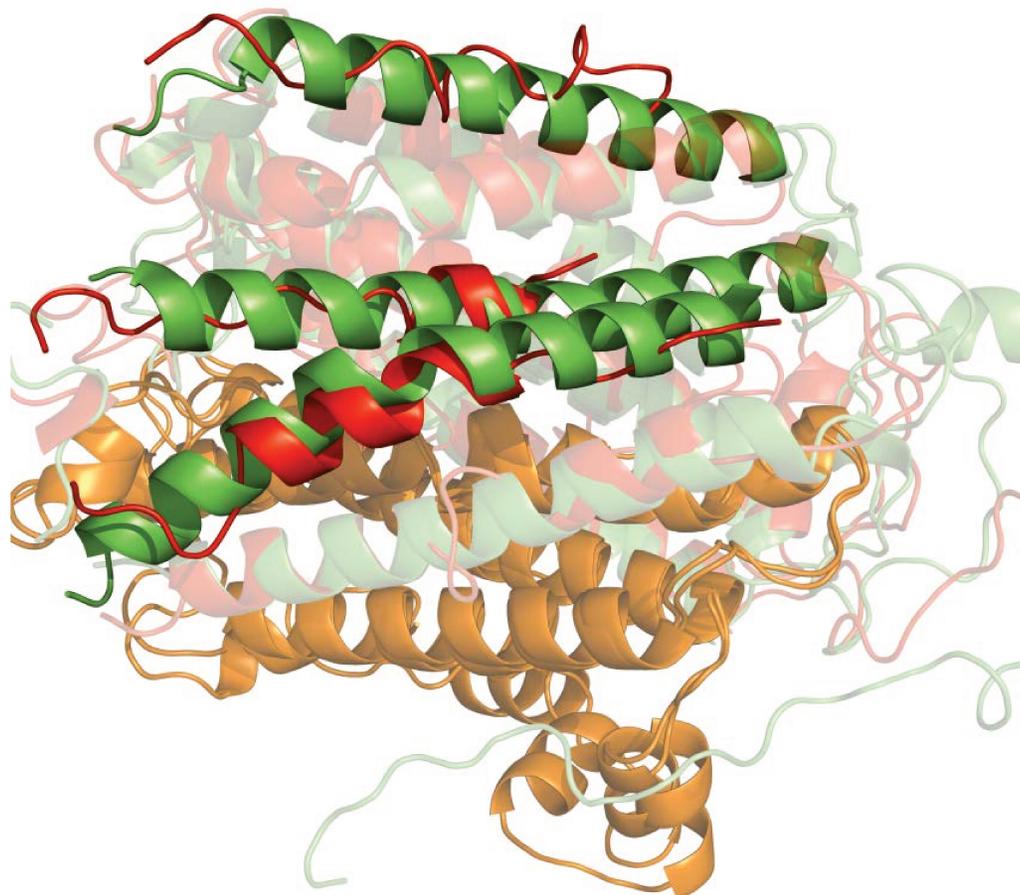


Figura 11: Alterações estruturais provocadas pela mutação de *frameshift* na subunidade I da citocromo c oxidase. Em verde, estão destacadas as hélices da proteína teoricamente funcional (modelo *coxA_Ct*). Em vermelho, estão destacadas as regiões correspondentes na proteína com *frameshift* (modelo *coxA_FS*). Em laranja, está representado o alinhamento das regiões antes do *frameshift* nos dois modelos.

Na Figura 12, está representada a estrutura da proteína sem o *frameshift* (modelo *coxA_Ct*), destacando em roxo a região que seria alterada pela mutação. Essa região alterada inclui sítios importantes para a ancoragem dos grupos heme, como os resíduos destacados em verde (Figura 12B). Sem uma ancoragem precisa dos grupos heme na subunidade I, a citocromo c oxidase seria incapaz de transportar os elétrons para o oxigênio e, portanto, resultaria em um complexo não funcional.

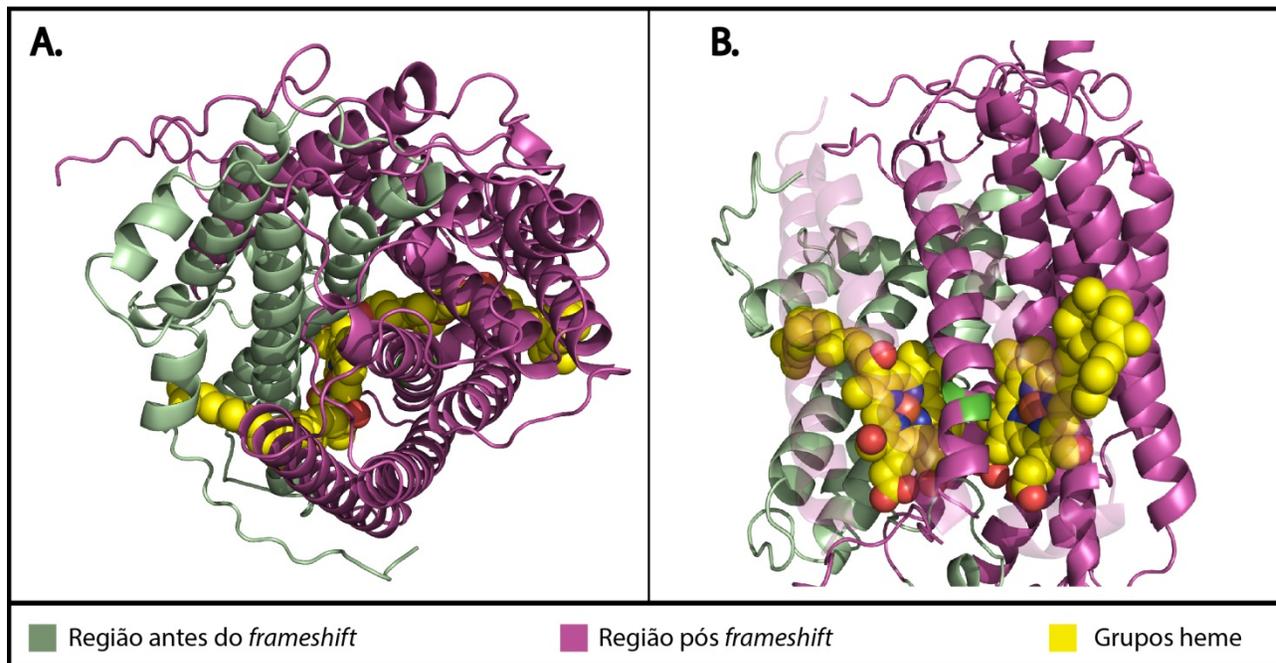


Figura 12: Ancoragem dos grupos heme na subunidade I da citocromo c oxidase. Representação gráfica do modelo com a mutação corrigida (coxA_Ct). Em roxo está destacada a região que seria alterada pelo *frameshift*. **A.** Ancoragem dos grupos heme (amarelo) na proteína. **B.** Destaque para resíduos importantes (verde) para a ancoragem dos grupos heme na proteína.

Tendo em vista as evidências de uma citocromo c oxidase não funcional, e os impactos que isto acarretaria para a cadeia respiratória de *P. acidipropionici*, foi realizada a aferência do consumo de oxigênio de culturas da bactéria na presença e ausência do inibidor cianeto de potássio (KCN). O KCN atua se ligando ao íon ferro do grupo heme da citocromo c oxidase, impedindo a transferência de elétrons para o oxigênio (Lehninger, Nelson, & Cox, 2000). Como a bactéria possui uma citocromo c oxidase potencialmente não funcional e uma oxidase alternativa do tipo bd (citocromo d ubiquinol oxidase), que é conhecida pela sua resistência elevada ao KCN (Borisov et al., 2011), a adição deste inibidor deve ter pouca influência na taxa respiratória de *P. acidipropionici*.

Como pode ser observado na Figura 13, a adição do KCN em culturas de *P. acidipropionici* (curva PA + KCN) não alterou significativamente a respiração da bactéria, resultando em um perfil muito similar à cultura não tratada (curva PA – KCN) e não alterando as taxas de consumo de oxigênio com a adição do inibidor.

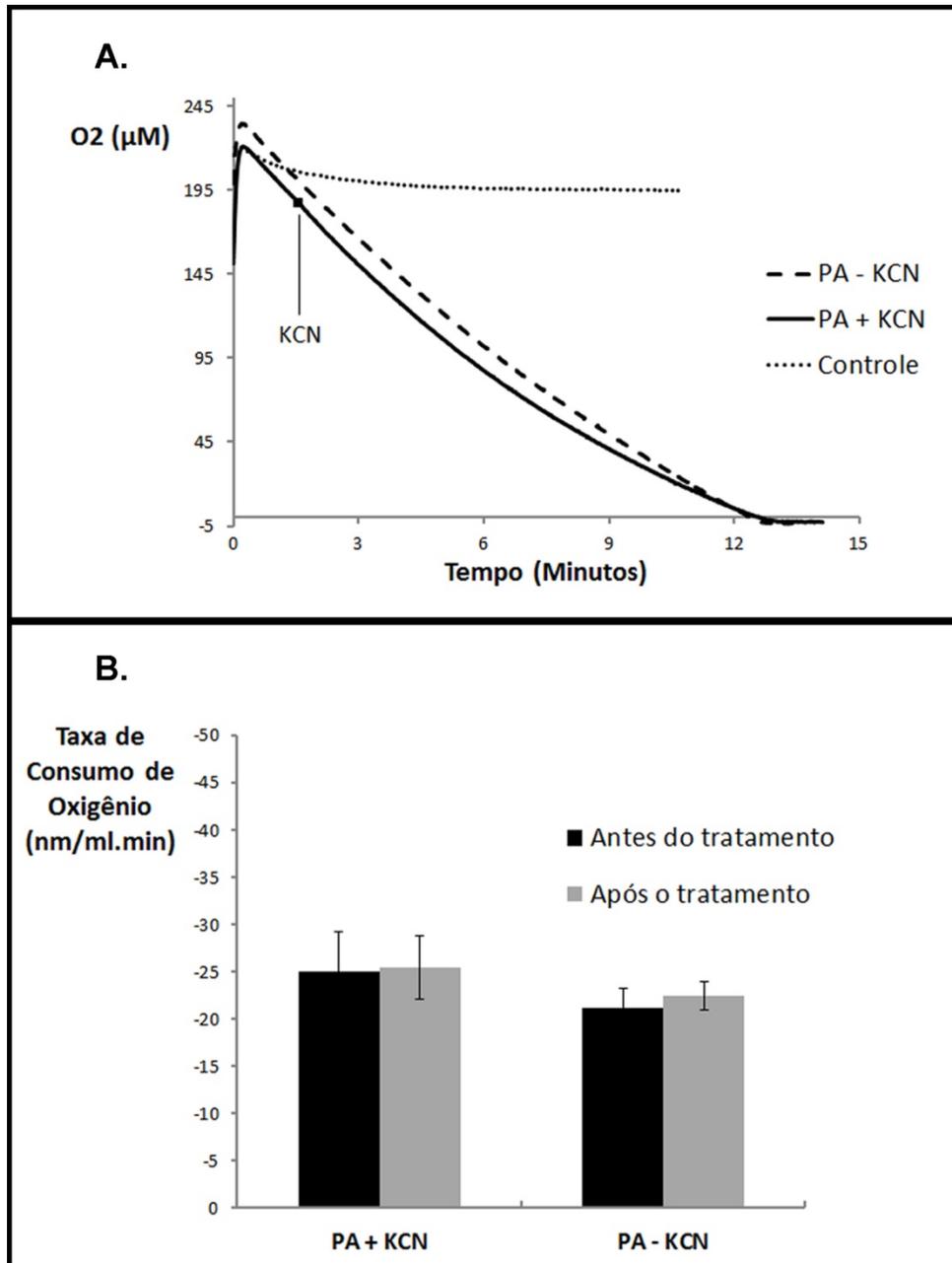


Figura 13: Respiração de *P. acidipropionici* na presença e ausência do inibidor KCN. **A.** Consumo de oxigênio de uma cultura sem adição de KCN (PA – KCN), de uma cultura com adição de KCN (PA + KCN) e apenas do meio de cultivo sem a bactéria (Controle). O ponto indicado na curva PA + KCN representa o momento em que foi adicionado 4 mM do inibidor KCN. **B.** Taxa de consumo de oxigênio nas culturas representadas em A. O valor antes do tratamento representa um intervalo de 20 segundos antes do momento da adição ou não de KCN. O valor após o tratamento representa um intervalo de 20 segundos após o momento da adição ou não de KCN.

Como um controle positivo para o inibidor, o experimento foi também realizado em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* JAY270/PE-2, tendo em vista que esse microrganismo apresenta uma citocromo c oxidase funcional e não apresenta a oxidase

alternativa do tipo bd. Como pode ser observado na Figura 14, a adição de KCN interrompeu a respiração da levedura, praticamente zerando a taxa de consumo de oxigênio.

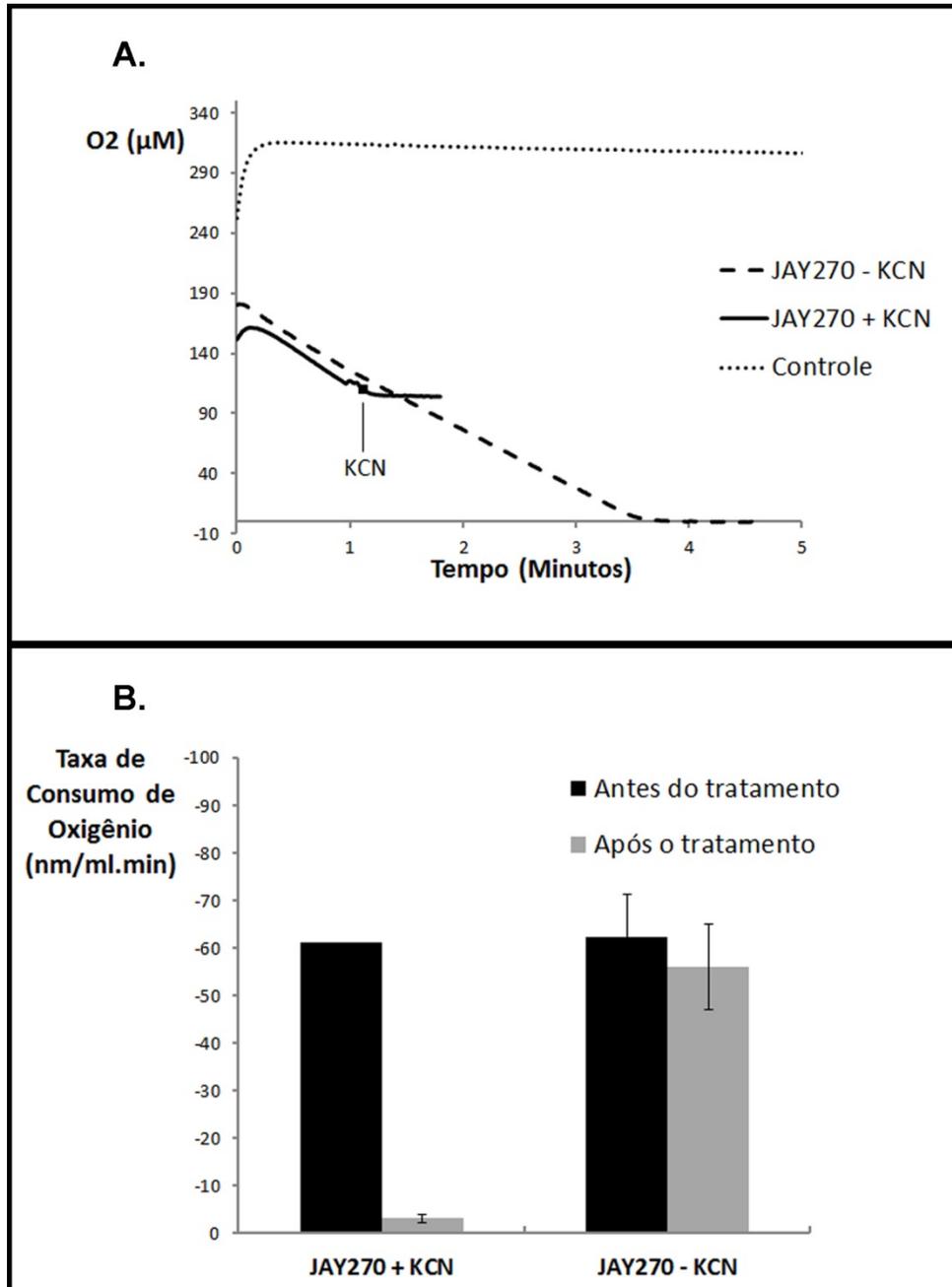


Figura 14: Respiração de *Saccharomyces cerevisiae* JAY270/PE-2 na presença e ausência do inibidor KCN. **A.** Consumo de oxigênio de uma cultura sem adição de KCN (JAY270 – KCN), de uma cultura com adição de KCN (JAY270 + KCN) e apenas do meio de cultivo YPD sem a levedura (Controle). O ponto indicado na curva JAY270 + KCN representa o momento em que foi adicionado 4 mM do inibidor KCN. **B.** Taxa de consumo de oxigênio nas culturas representadas em A. O valor antes do tratamento representa um intervalo de 20 segundos antes do momento da adição ou não de KCN. O valor após o tratamento representa um intervalo de 20 segundos após o momento da adição ou não de KCN.

Os dados aqui apontados reforçam a idéia de uma citocromo c oxidase não funcional em *P. acidipropionici*. Nesse cenário, a capacidade de regenerar NAD⁺ pela cadeia respiratória é reduzida, sendo a redução do oxigênio à água restrita à citocromo d ubiquinol oxidase (oxidase do tipo bd). Tendo em vista que a citocromo bd oxidase possui alta afinidade por oxigênio, o que viabiliza a respiração em baixas concentrações desse gás, e é normalmente inibida por elevadas concentrações de oxigênio (Borisov et al., 2011), *P. acidipropionici* não poderia suportar pressões atmosféricas desse gás utilizando apenas a oxidase do tipo bd. Com isso, a não atividade da citocromo c oxidase, responsável pela respiração em pressão atmosférica, pode ser uma das possíveis causas da microaerofilia dessa bactéria.

3.4. Crescimento aeróbico de *P. acidipropionici* em diferentes fontes de carbono

Uma vez analisada a cadeia respiratória, foi avaliada a capacidade de crescimento da bactéria em condições aeróbicas utilizando diferentes fontes de carbono. Foram testadas fontes com diferentes graus de redução e com diferentes números de carbono.

O crescimento de *P. acidipropionici* apresentou variações a depender da fonte de carbono utilizada e da atmosfera empregada (anaeróbica ou aeróbica). Utilizando glicose como fonte de carbono, o crescimento da bactéria foi reduzido com a presença de oxigênio, como reportado na Figura 15. Além de apresentar menor densidade óptica (decréscimo de 54,2% em comparação com as culturas anaeróbicas), as culturas aeróbicas também cresceram mais lentamente, resultando na redução da taxa de crescimento máxima (μ_{max}) de 0,10879/h para 0,07296/h (decréscimo de 32,9%). Os valores de máxima densidade óptica (OD₆₀₀ max) e de taxa de crescimento máxima (μ_{max}) para todas as culturas realizadas foram listados na Tabela 4.

As culturas com glicerol também apresentaram uma repressão no crescimento com a presença do oxigênio. Além de reduzir a densidade óptica (decréscimo de 50,2% em relação à cultura anaeróbica com glicerol), a aerobiose parece ter um impacto maior na taxa de crescimento, com uma redução de 45,5%.

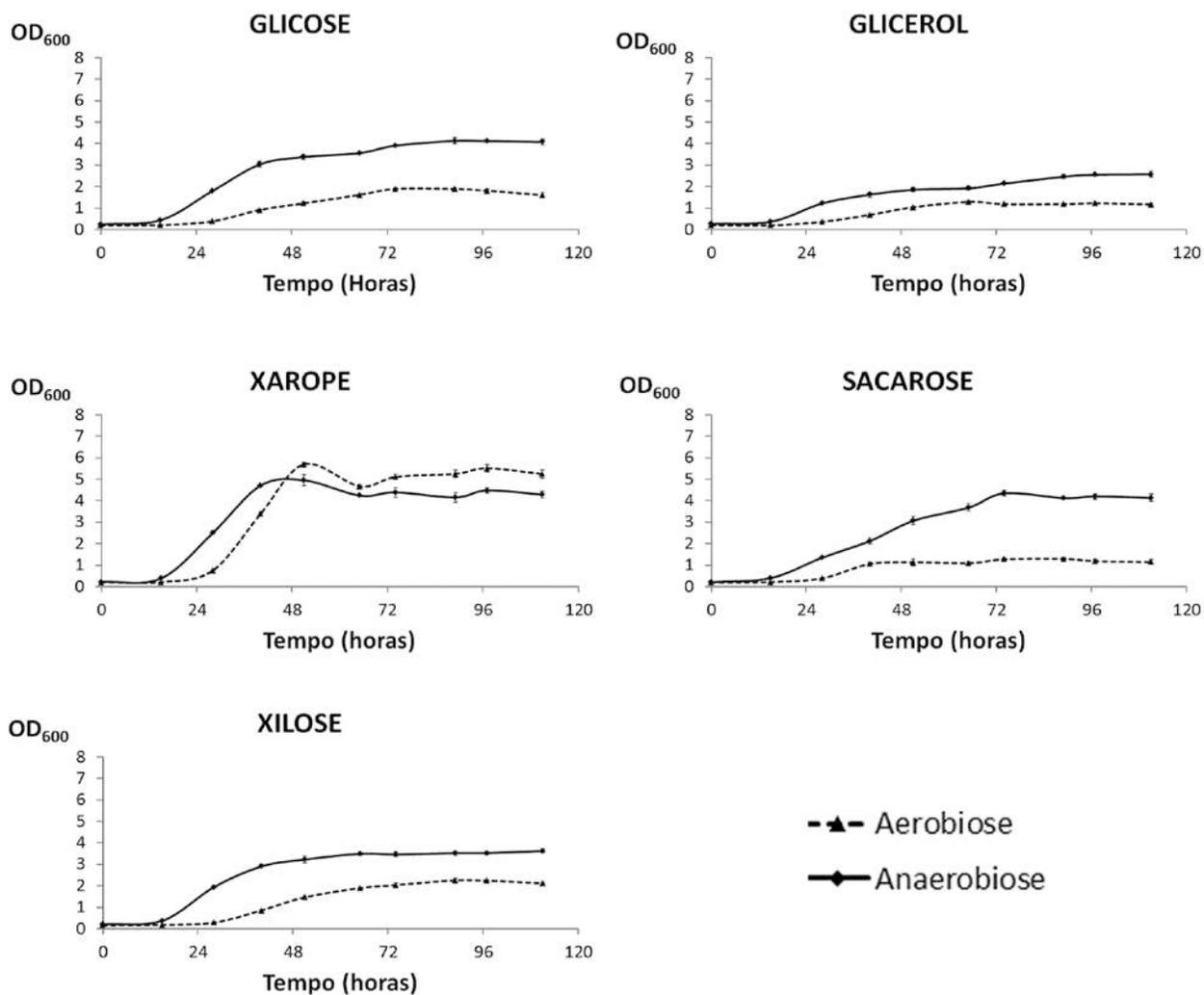


Figura 15: Crescimento de *P. acidipropionici* ATCC 4875 em condições aeróbicas e anaeróbicas com diferentes fontes de carbono (20 g/L).

O crescimento utilizando xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono foi a única condição em que o crescimento aeróbico superou o anaeróbico. As culturas aeróbicas apresentaram uma densidade óptica 15% superior às culturas anaeróbicas, embora a taxa de crescimento tenha sofrido uma leve redução de 12,7%. Contraditoriamente, o crescimento utilizando sacarose, a principal fonte de carbono presente no xarope de cana-de-açúcar (Walford, 1996), não apresentou o mesmo perfil. O crescimento com sacarose em aerobiose sofreu uma forte repressão, reduzindo a densidade óptica em 70,2%. Entretanto, a taxa de crescimento máxima não sofreu grandes variações (redução de 11,5%).

Essa diferença observada entre os crescimentos utilizando xarope de cana-de-açúcar e sacarose como fontes de carbono pode estar relacionada ao fato de o meio contendo xarope ser mais rico em nutrientes (Walford, 1996). Na Tabela 3, estão representados os principais componentes presentes no caldo de cana-de-açúcar, para efeito de visualização da complexidade de sua composição. É importante destacar que, pelo fato de o xarope ser mais concentrado do que o caldo de cana-de-açúcar, muitos compostos que não foram representados na tabela podem passar a ter uma concentração expressiva.

Tabela 3: Composição do caldo de cana de açúcar em Brix (Porcentagem de sólidos presentes). Tabela adaptada de Walford e colaboradores (1996).

		Porcentagem (Brix)
Açúcares	Sacarose	81-86
	Açúcares Redutores	3-6
	Oligossacarídeos	0,06-0,6
	Polissacarídeos	0,2-0,8
Minerais - Cátions	Potássio	0,77-1,31
	Sódio	0,01-0,04
	Cálcio	0,24-0,48
	Magnésio	0,1-0,39
	Ferro	0,006-0,04
	Alumínio	0,005-0,17
	Cobre	0,002-0,003
	Zinco	0,003-0,012
	Manganês	0,007
	Cobalto	0,0007
Minerais - Ânions	Silício	0,016-0,101
	Cloreto	0,16-0,27
	Fosfato	0,14-0,40
Outros	Sulfato	0,17-0,52
	Ácidos Orgânicos	0,1-1,3
	Aminoácidos	0,5-2,5
	Dextrano	0,1-0,6
	Amido	0,11-0,5
	Fosfolipídeos, Ácidos graxos	0,05-0,15
	Insolúveis	0,15-1

Uma hipótese é a de que o xarope contenha algum mineral que possa atuar como acceptor final de elétrons, utilizando uma redutase terminal de *P. acidipropionici*. É bastante conhecido que bactérias possuem uma gama de redutases terminais que podem utilizar

diversos minerais como aceptores de elétrons. Se isso for comprovado, a presença desse mineral poderia resultar numa regeneração mais eficiente de cofatores NAD^+ , viabilizando um maior crescimento e consumo de substrato nessas condições. Dentre os possíveis componentes do xarope que poderiam desempenhar esta função, se destacam o nitrato, o ferro e o cobre. Adicionalmente, é conhecido que o caldo de cana-de-açúcar apresenta altas concentrações de ácido trans-aconítico (Kanitkar, Aita, & Madsen, 2013), o qual potencialmente poderia ser incorporado no ciclo do ácido propiônico através de sua conversão à intermediários do ciclo de Krebs. Caso esse mecanismo seja possível, seria esperada uma forte alteração na fisiologia da bactéria com o cultivo em xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Com relação à xilose, o crescimento em aerobiose também foi reduzido. Ocorreu uma diminuição em 37,9% da densidade óptica e em 27,5% da taxa de crescimento máxima, seguindo o padrão apresentado no crescimento com glicose e com glicerol.

Dessa forma, fica evidente a influência da fonte de carbono no crescimento da bactéria em condições aeróbicas. Especificamente, o efeito apresentado pelo xarope de cana-de-açúcar poderia resultar em uma aplicação industrial muito interessante e merece investigações mais aprofundadas, conforme será discutido na próxima sessão dos resultados.

Tabela 4: Parâmetros de crescimento aferidos para as culturas de *P. acidipropionici* cultivadas em aerobiose e anaerobiose com diferentes fontes de carbono

Máxima Densidade Óptica (OD_{600} max)			
Fonte de Carbono	-O₂	+O₂	%
Glicose	4,133	1,893	-54,2%
Glicerol	2,577	1,283	-50,2%
Xarope de cana-de-açúcar	4,957	5,700	15,0%
Sacarose	4,347	1,293	-70,2%
Xilose	3,627	2,253	-37,9%

Taxa de Crescimento Máxima (μmax)			
Fonte de Carbono	-O₂	+O₂	%
Glicose	0,10879	0,07296	-32,9%
Glicerol	0,09331	0,05362	-45,5%
Xarope de cana-de-açúcar	0,14418	0,12589	-12,7%
Sacarose	0,09444	0,08354	-11,5%
Xilose	0,12691	0,09202	-27,5%

3.5. Análise do perfil de produtos da fermentação em cultivo aeróbico

Visando avaliar o metabolismo aeróbico de *P. acidipropionici* em diferentes fontes de carbono, foi realizado o cultivo da bactéria em biorreatores. Os cultivos foram realizados com o meio padrão contendo glicose, glicerol, xarope de cana-de-açúcar ou sacarose como fonte de carbono, e os produtos da fermentação foram analisados e quantificados.

Inicialmente, foi realizada uma comparação entre o perfil aeróbico e anaeróbico da bactéria utilizando glicose como fonte de carbono. A fermentação anaeróbica apresentou o perfil ilustrado na Figura 16, típico de uma cultura nessas condições.

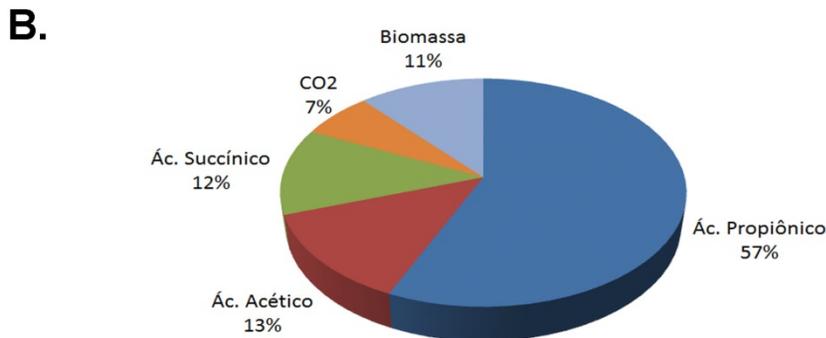
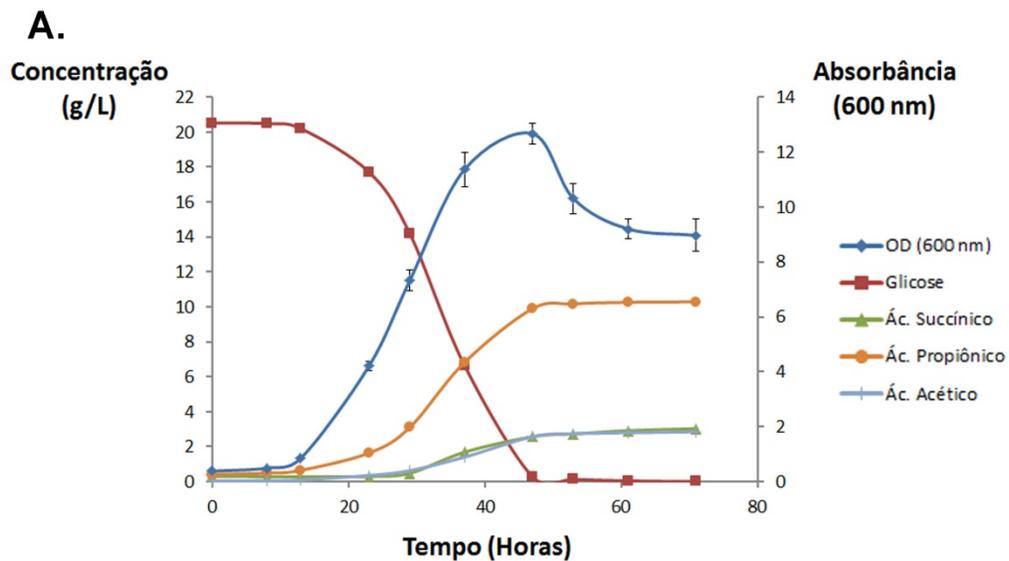


Figura 16: Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em anaerobiose utilizando glicose (20 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato, a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD_{600}). **B.** Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação.

Observa-se que o produto majoritário da fermentação foi o ácido propiônico, produzido em uma concentração de 9,352 g/L, o que corresponde a um rendimento em massa de 46,7% e a uma produtividade volumétrica de 0,169 g/l.h. O ácido acético também teve uma produção significativa de 2,613 g/L e um rendimento em massa de 13%, com uma produtividade volumétrica de 0,047 g/l.h. O ácido succínico, um intermediário no ciclo do ácido propiônico, foi encontrado na concentração de 2,42 g/L em um rendimento de 12,1%, com uma produtividade volumétrica de 0,044 g/l.h. Os valores de rendimento e concentração final, com os respectivos desvios, podem ser consultados na Tabela 5. O perfil anaeróbico observado é característico de *P. acidipropionici*, estando de acordo com o modelo esquematizado na Figura 17.

Tabela 5: Quantidade (g/L) e rendimento (massa/massa) dos produtos obtidos e a biomassa (g/L) aferida para cada fermentação realizada

	ÁCIDO PROPIÔNICO		ÁCIDO ACÉTICO	
	Produção (g/L)	Rendimento (m/m) %	Produção (g/L)	Rendimento (m/m)
Glicose - Anaerobiose	9,352 ± 0,346	46,7 ± 1,8	2,613 ± 0,048	13 ± 0,3
Glicose - Aerobiose	0,271 ± 0,051	2,3 ± 0,8	1,029 ± 0,028	8,8 ± 0,8
Glicerol - Aerobiose (FASE 0-I)	7,049 ± 0,407	29,1 ± 1,5	3,575 ± 0,144	14,8 ± 0,4
Glicerol - Aerobiose (FASE 0-II)	2,415 ± 0,983	10,0 ± 4,0	7,531 ± 0,661	31,1 ± 2,9
Xarope - Aerobiose (FASE 0-I)	5,747 ± 0,312	27,6 ± 2,0	5,228 ± 0,449	24,9 ± 1,3
Xarope - Aerobiose (FASE 0-II)	3,321 ± 0,192	16,3 ± 0,5	7,553 ± 0,806	37,0 ± 2,4
Sacarose - Aerobiose	0,799 ± 0,066	7,2 ± 0,7	1,986 ± 0,206	17,8 ± 1,1
	ÁCIDO SUCCÍNICO		ÁCIDO LÁCTICO	
	Produção (g/L)	Rendimento (m/m)	Produção (g/L)	Rendimento (m/m)
Glicose - Anaerobiose	2,422 ± 0,208	12,1 ± 1,0	-	-
Glicose - Aerobiose	-	-	7,303 ± 0,190	62,6 ± 5,7
Glicerol - Aerobiose (FASE 0-I)	1,914 ± 0,179	7,9 ± 0,7	-	-
Glicerol - Aerobiose (FASE 0-II)	2,229 ± 0,410	9,2 ± 1,7	-	-
Xarope - Aerobiose (FASE 0-I)	0,385 ± 0,235	1,9 ± 1,1	-	-
Xarope - Aerobiose (FASE 0-II)	0,515 ± 0,171	2,5 ± 0,8	-	-
Sacarose - Aerobiose	-	-	3,823 ± 0,197	34,3 ± 0,8
	ETANOL		BIOMASSA (g/L)	
	Produção (g/L)	Rendimento (m/m)		
Glicose - Anaerobiose	-	-	3,352 ± 1,936	
Glicose - Aerobiose	0,670 ± 0,016	5,7 ± 0,5	0,955 ± 0,139	
Glicerol - Aerobiose (FASE 0-I)	0,549 ± 0,063	2,3 ± 0,3	-	
Glicerol - Aerobiose (FASE 0-II)	0,804 ± 0,042	3,3 ± 0,2	3,869 ± 0,810	
Xarope - Aerobiose (FASE 0-I)	-	-	-	
Xarope - Aerobiose (FASE 0-II)	-	-	6,051 ± 0,079	
Sacarose - Aerobiose	0,495 ± 0,093	4,5 ± 1,0	0,863 ± 0,060	

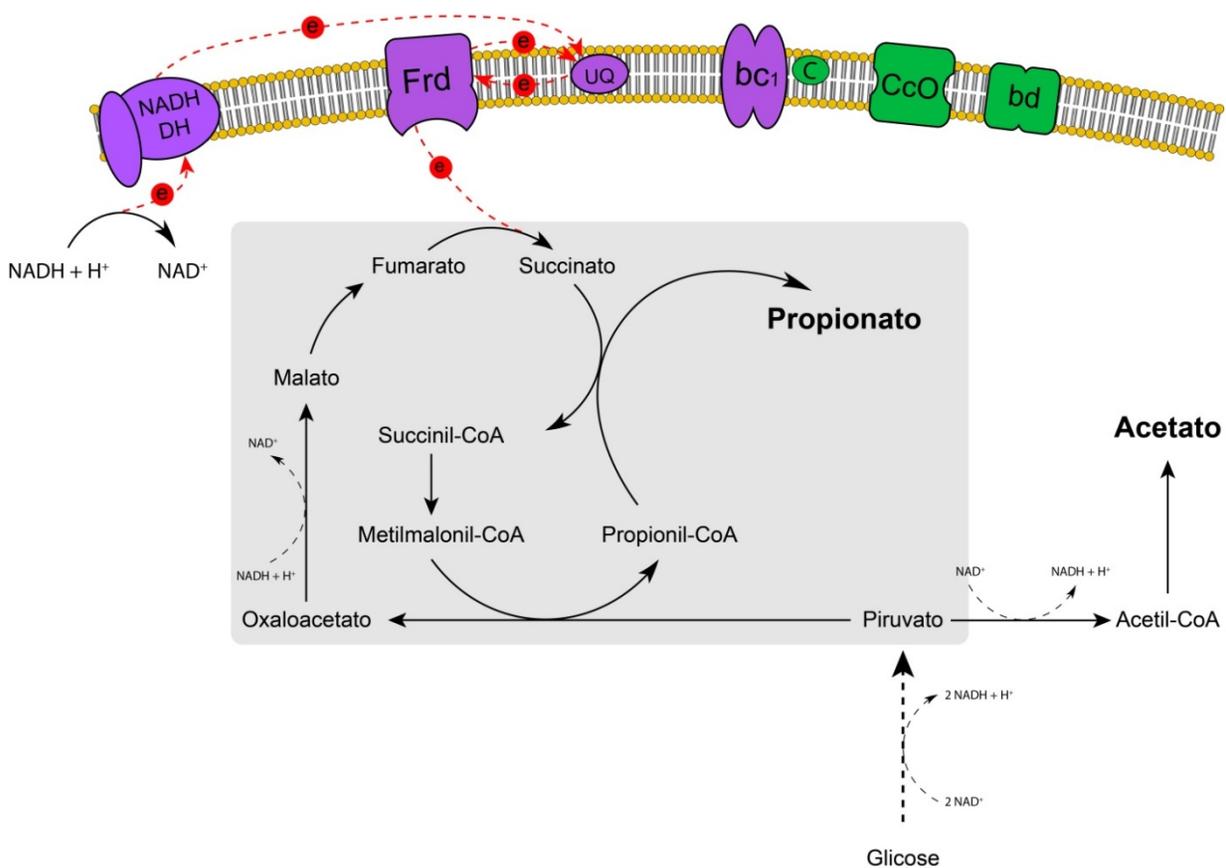


Figura 17: Esquema representando o metabolismo de carbono de *P. acidipropionici* em condições anaeróbicas. Estão representadas a glicólise, as vias fermentativas que geram os produtos anteriormente mencionados e a participação da cadeia transportadora de elétrons no metabolismo anaeróbico. **NADH DH:** NADH desidrogenase. **Frd:** Fumarato redutase. **UQ:** ubiquinona. **bc₁:** Citocromo c redutase. **C:** Citocromo c. **CcO:** Citocromo c oxidase. **bd:** Citocromo bd oxidase (citocromo d ubiquinol oxidase). As flechas em vermelho representam a passagem de elétrons (e) pela cadeia.

Com o consumo de um mol glicose, são gerados dois mols de cofatores reduzidos NADH, cuja reoxidação é essencial para dar continuidade ao metabolismo oxidativo da bactéria. Em anaerobiose, a estratégia de regeneração dos cofatores utilizada por *P. acidipropionici* é a própria produção do ácido propiônico, cada ciclo regenerando dois mols de cofatores NAD⁺ para cada mol de piruvato convertido. Como são gerados dois mols de piruvato para cada mol de glicose, a conversão de todo o piruvato em ácido propiônico é inviável devido a um déficit de NADH. Dessa forma, a produção do ácido acético, um processo oxidativo, é essencial para gerar mais cofatores NADH e fechar o balanço redox.

Conforme discutido anteriormente, destaca-se a participação da cadeia transportadora de elétrons no metabolismo anaeróbico da bactéria, com a fumarato reductase fornecendo elétrons para a redução do fumarato à succinato. Os elétrons

fornechos possivelmente são originados da reoxidação do NADH feita pela NADH desidrogenase, a qual também se encontra expressa a partir dos dados do transcriptoma.

Quando a fermentação com glicose foi realizada em condições aeróbicas, observou-se uma mudança significativa no perfil fermentativo da bactéria (Figura 18). Notavelmente, a bactéria apresentou um crescimento inferior ao observado em anaerobiose, o que era esperado tendo em vista os resultados obtidos nos testes de crescimento anteriormente realizados. A menor taxa de crescimento resultou em uma fermentação longa, não ocorrendo o consumo total da fonte de carbono.

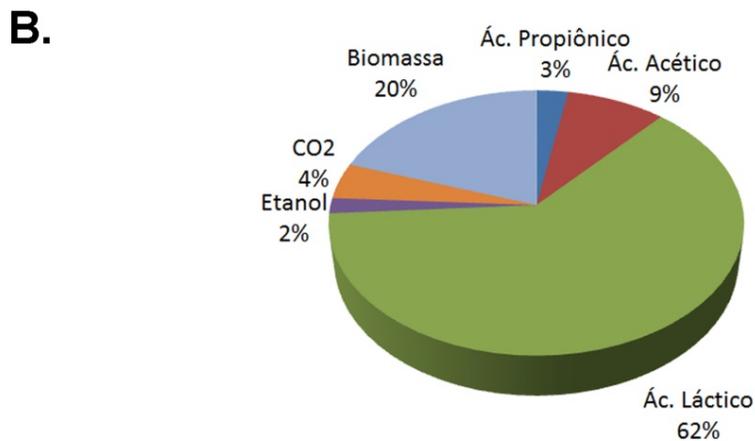
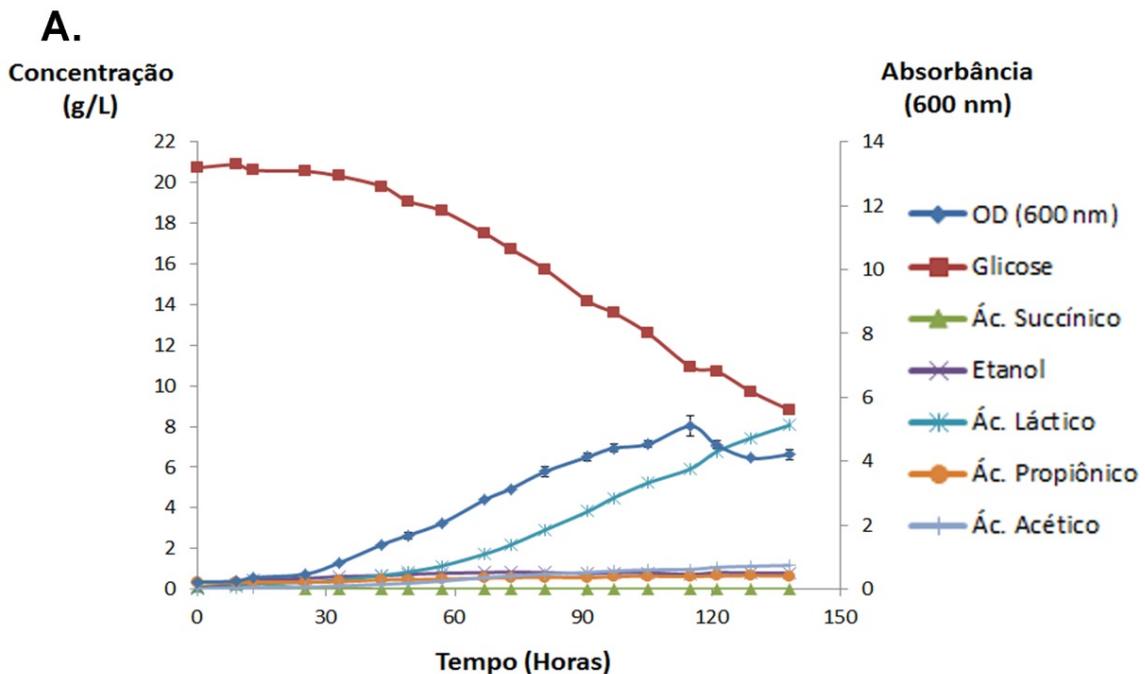


Figura 18: Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em aerobiose utilizando glicose (20 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato, a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD₆₀₀). **B.** Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação.

Adicionalmente, verificou-se uma alteração do perfil fermentativo de *P. acidipropionici*. O fluxo de carbono para o ácido propiônico foi reduzido de 57% na fermentação anaeróbica (Figura 16B) para 3% na fermentação aeróbica (Figura 18B), sendo produzido com uma concentração de 0,271 g/L, correspondendo a um rendimento de 2,3% (massa/massa). Esta diminuição na produção de ácido propiônico está de acordo com estudos anteriores que reportam uma repressão ou até inversão do ciclo do ácido propiônico em aerobiose (De Vries et al., 1972; K Ye et al., 1999). Com a baixa concentração de ácido propiônico, não foi detectado o acúmulo do intermediário ácido succínico (Tabela 5). Com relação ao ácido acético, a produção foi de 1,029 g/L, uma leve redução do fluxo de carbono para este produto (de 13% na fermentação anaeróbica para 9% na fermentação aeróbica).

Interessantemente, foi observada na fermentação aeróbica a produção de ácido láctico em altas concentrações, sendo 62% do fluxo de carbono direcionado para esse ácido. (Figura 18B). A concentração obtida foi de 7,303 g/L, correspondendo a um rendimento em massa de 62,6%. Na Figura 19, pode ser visualizada uma comparação entre os rendimentos dos produtos obtidos na fermentação com glicose em anaerobiose e aerobiose, ressaltando a alteração metabólica que ocorreu na bactéria.

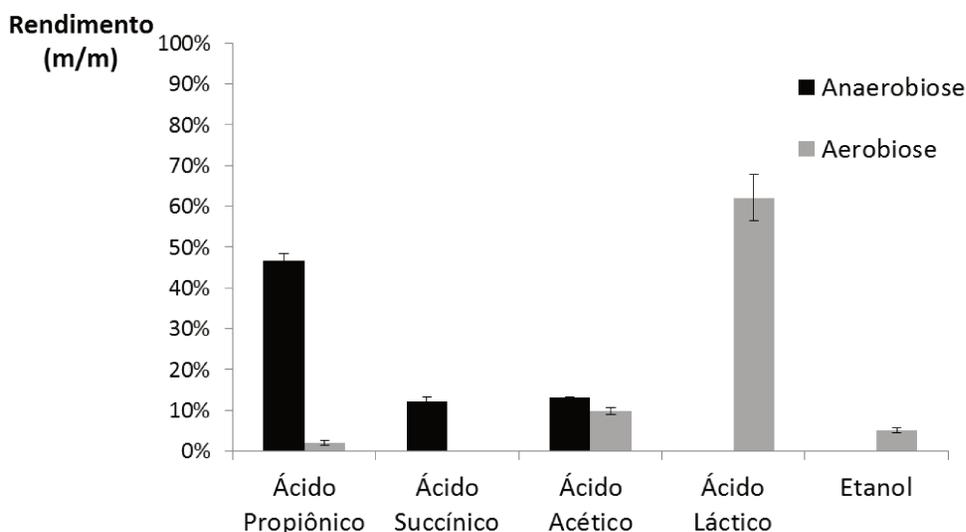


Figura 19: Rendimentos em massa observados nas fermentações com glicose (20 g/L), em condições anaeróbicas e aeróbicas.

Considerando o estudo feito por Ye *et al* (1999), que mostrou a inversão do ciclo do ácido propiônico em aerobiose, e os resultados obtidos nesse projeto a partir da fermentação aeróbica utilizando glicose como fonte de carbono, é possível que realmente

ocorra uma inversão do ciclo a depender da concentração de oxigênio no ambiente. Esse processo explicaria a grande redução no fluxo de carbono para o ácido propiônico nas fermentações aeróbicas com glicose. Um possível modelo para o metabolismo aeróbico de *P. acidipropionici* foi proposto, representado na Figura 20.

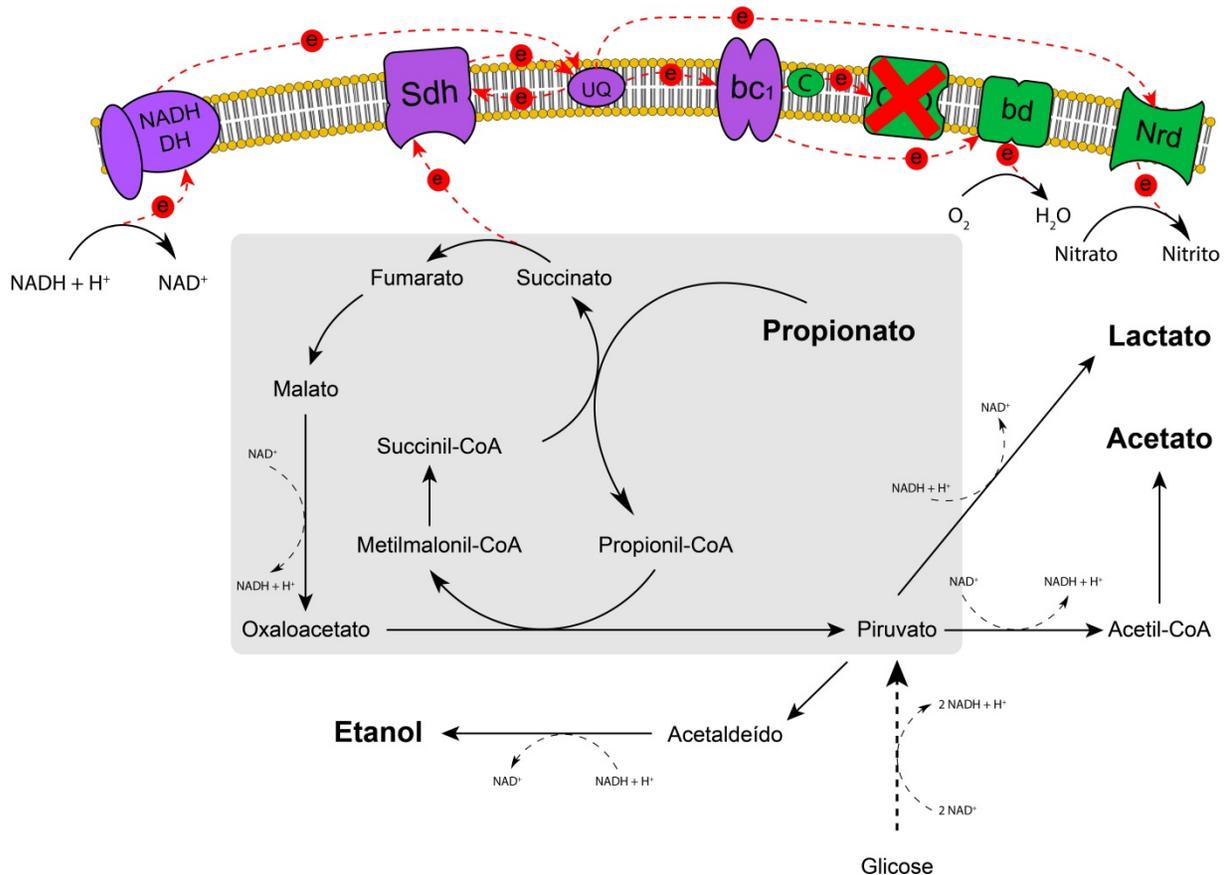
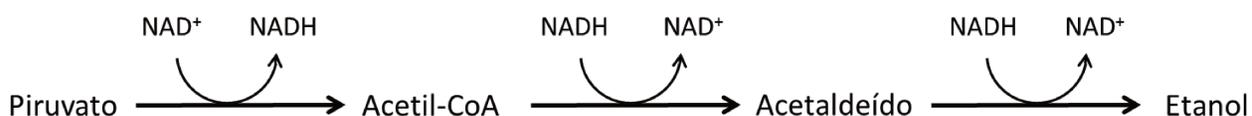


Figura 20: Esquema representando o metabolismo de carbono de *P. acidipropionici* em condições aeróbicas. Estão representadas a glicólise, as vias fermentativas que geram os produtos anteriormente mencionados, e a participação da cadeia transportadora de elétrons. **NADH DH:** NADH desidrogenase. **Sdh:** Succinato desidrogenase. **UQ:** ubiquinona. **bc₁:** Citocromo c redutase. **C:** Citocromo c. **CcO:** Citocromo c oxidase. **bd:** Citocromo bd oxidase (citocromo d ubiquinol oxidase). **Nrd:** Nitrato redutase. As flechas em vermelho representam a passagem de elétrons (e⁻) pela cadeia.

Com a inversão do ciclo do ácido propiônico, a regeneração dos cofatores NAD⁺ não pode ser realizada por essa via. Dessa forma, seria esperado em um metabolismo aeróbico que tal regeneração ocorresse através da cadeia transportadora de elétrons, reoxidando o NADH e utilizando os elétrons em três possíveis rotas. (1) Os elétrons fornecidos à cadeia respiratória seriam utilizados pela Citocromo c Oxidase para reduzir o oxigênio. No entanto, como mencionado anteriormente, tal enzima possui uma mutação de *frameshift* e possivelmente não apresenta atividade funcional (representada pelo X vermelho na Figura 20). (2) Os elétrons seriam utilizados para reduzir o oxigênio através

da citocromo bd oxidase, que apresenta alta afinidade por oxigênio e cria um gradiente eletroquímico sem o bombeamento direto de prótons (representado por *bd* na Figura 20). (3) Os elétrons seriam utilizados para reduzir minerais presentes no meio como, por exemplo, o nitrato através da nitrato redutase (representado por *Nrd* na Figura 20).

Entretanto, os dados obtidos na fermentação com glicose em condições aeróbicas sugerem um quadro de dificuldade na regeneração dos cofatores NAD^+ através da cadeia respiratória. Como pode ser observado na Figura 18B, grande parte do fluxo de carbono foi direcionado para o ácido láctico, uma rota que consome NADH e regenera o NAD^+ . A produção desse ácido é frequente em metabolismos anaeróbicos de diversos organismos, visto que funciona como uma estratégia eficiente e direta para regenerar NAD^+ na ausência de oxigênio. No entanto, a produção desse metabólito em aerobiose não é frequentemente observada, podendo refletir uma dificuldade na capacidade da cadeia respiratória de regenerar os cofatores NAD^+ através do oxigênio. Embora o mecanismo subjacente a essa dificuldade na cadeia respiratória ainda não esteja elucidado, a produção do ácido láctico neste cenário seria essencial para manter o balanço redox. Outro produto formado que esta de acordo com esta hipótese é o etanol. Embora encontrado em baixas concentrações (0,670 g/L, conforme a Tabela 5), a produção de etanol também envolve a regeneração de cofatores NAD^+ , através da reação:



Conforme os resultados até então obtidos, o cultivo de *P. acidipropionici* em aerobiose utilizando uma fonte de carbono com maior grau de redução deveria em tese aumentar a produção do ácido láctico. No entanto, a fermentação aeróbica com glicerol apresentou um perfil metabólico não esperado. Devido a uma alteração na cinética dos produtos que ocorreu ao longo da fermentação, a mesma foi dividida em duas fases, representadas na Figura 21.

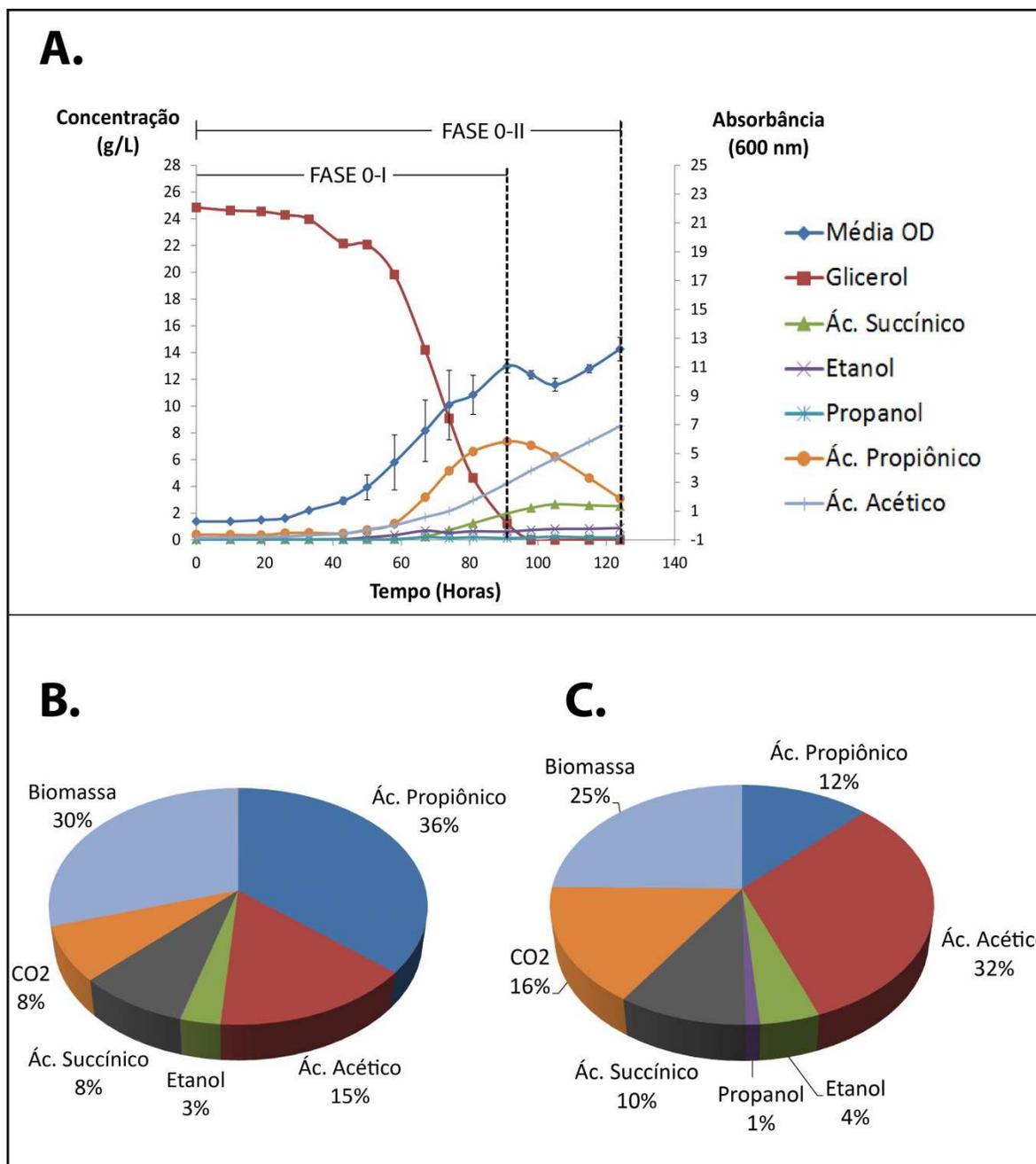


Figura 21: Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em aerobiose utilizando glicerol (20 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato, a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD_{600}). A cinética foi dividida em duas fases: FASE 0-I se caracteriza pelo consumo de glicerol e formação de ácido propiônico; FASE 0-II se caracteriza pelo consumo do ácido propiônico formado. **B.** Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação até o final da fase 0-I. **C.** Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação até o final da fase 0-II.

Essa fermentação aeróbica com glicerol traz diversas questões sobre o equilíbrio oxidoreduutivo. Na primeira fase, a produção de ácido propiônico é contraditória à inversão do ciclo anteriormente reportada e, claramente, a via está direcionando um fluxo

expressivo de carbono para o ácido propiônico. Embora a produção desse ácido possa regenerar cofatores NAD^+ , o fluxo de carbono para este produto foi menor do que o observado na fermentação anaeróbica com glicose. Como o glicerol possui um grau de redução superior ao da glicose, uma menor produção de ácido propiônico na fermentação com glicerol não poderia equilibrar o balanço redox. Dessa forma, existe um excesso de NADH que precisa ser reoxidado por outras rotas. Como não foi observada a produção do ácido láctico e a produção de etanol não é expressiva, uma possível explicação seria o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons para reduzir o oxigênio.

Na segunda fase da fermentação, o consumo do ácido propiônico anteriormente formado poderia ser explicado pela inversão do ciclo desse ácido, como reportado por Ye *et al.* (1999). Como o consumo de ácido propiônico e a formação de ácido acético são processos oxidativos, a viabilidade dessa segunda fase na fermentação exige uma estratégia eficiente de regeneração do NAD^+ . Novamente, o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons para reduzir o oxigênio poderia ser uma explicação plausível.

Dessa forma, diferentes taxas respiratórias entre as fermentações aeróbicas realizadas com glicose e glicerol poderiam justificar a diferença observada nos produtos. A influência da fonte de carbono na taxa respiratória já é um processo conhecido, sendo inclusive descrito para propionibactérias (Schwartz, 1973), mas o mecanismo envolvido com a inversão do ciclo do ácido propiônico ainda precisa ser investigado.

A fermentação aeróbica utilizando xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono também foi dividida em duas fases levando em consideração a cinética dos produtos (Figura 22). É notável o crescimento da bactéria nessa fermentação, corroborando os resultados dos testes de crescimento anteriormente realizados.

Inicialmente (fase 0-I), observa-se o consumo dos açúcares presentes (sacarose, glicose e frutose), e o acúmulo dos ácidos propiônico (rendimento em massa de 27,6%) e acético (rendimento em massa de 24,9%). Com o esgotamento das fontes de carbono presentes no xarope (fase 0-II), a bactéria consome o ácido propiônico formado e redireciona o fluxo de carbono para o ácido acético, resultando em um rendimento final de 16,3% (massa/massa) para o ácido propiônico e de 37% (massa/massa) para o ácido acético.

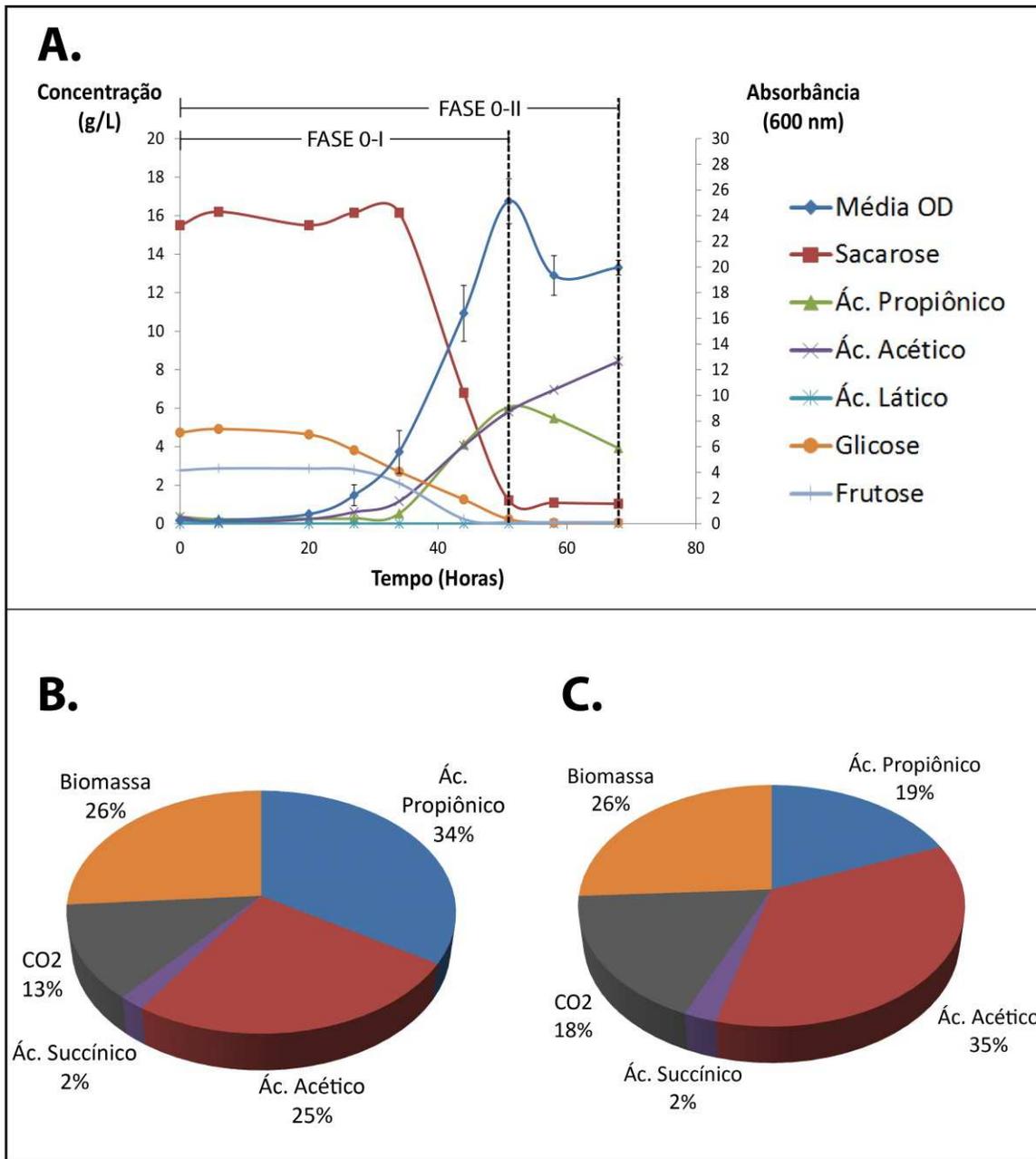


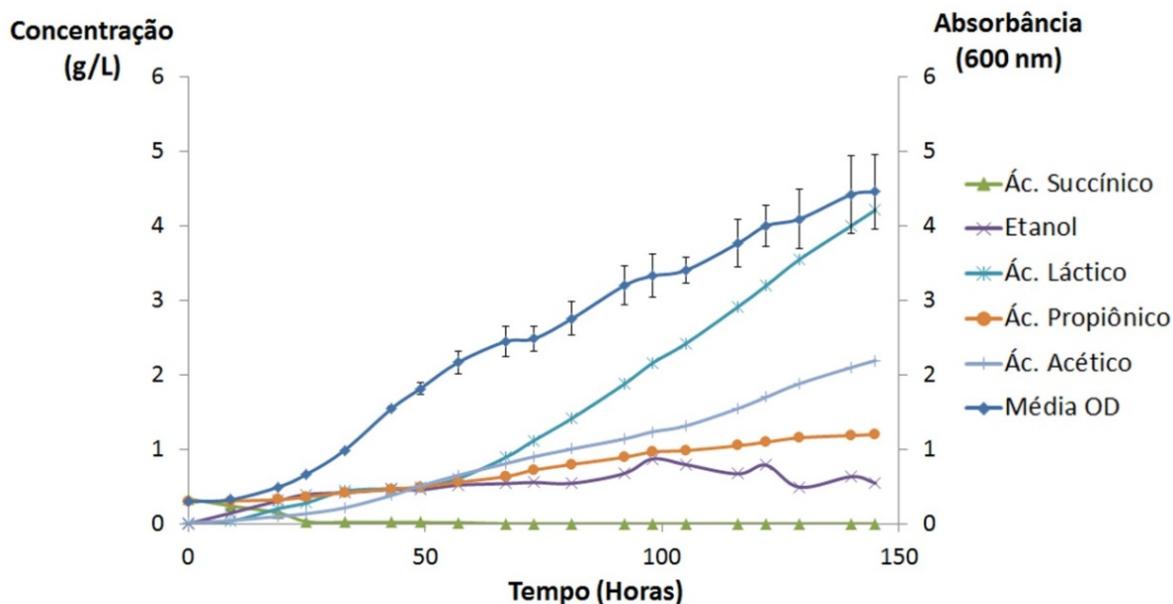
Figura 22: Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em aerobiose utilizando xarope de cana-de-açúcar (20 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando o consumo de substrato, a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD_{600}). A cinética foi dividida em duas fases: FASE 0-I se caracteriza pelo consumo dos açúcares e formação de ácido propiônico; FASE 0-II se caracteriza pelo consumo do ácido propiônico formado. **B.** Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação até o final da fase 0-I. **C.** Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação até o final da fase 0-II.

Evidentemente, o perfil apresentado pelo cultivo aeróbico utilizando xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono se assemelha ao perfil apresentado pela fermentação aeróbica utilizando glicerol como fonte de carbono. Dessa forma, em ambas

as situações *P. acidipropionici* possivelmente apresenta uma rota eficiente de regeneração de NAD^+ , não necessitando da produção de ácido láctico para este objetivo.

Entretanto, ao cultivar *P. acidipropionici* em aerobiose com a fonte de carbono mais abundante do xarope de cana-de-açúcar (sacarose), o perfil observado foi significativamente diferente (Figura 23). O processo fermentativo foi longo devido ao lento crescimento da bactéria, não atingindo a fase estacionária até o momento da interrupção da fermentação.

A.



B.

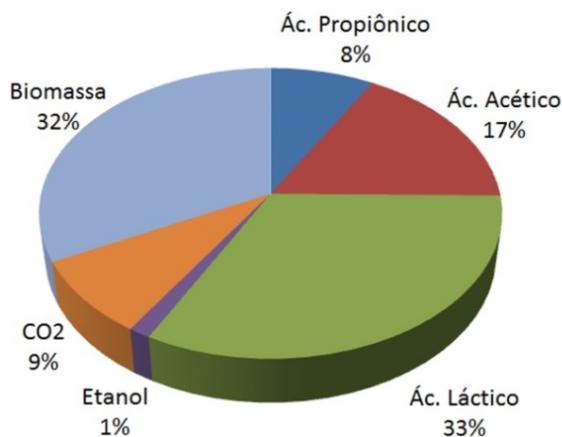


Figura 23: Perfil fermentativo de *P. acidipropionici* em aerobiose utilizando sacarose (20 g/L) como fonte de carbono. **A.** Cinética da fermentação, representando a formação dos produtos e o crescimento da bactéria (OD_{600}). Não foi representado o consumo de sacarose devido ao fato deste ter sido muito baixo. **B.** Distribuição molar do carbono entre os produtos da fermentação.

Observa-se que o produto majoritário da fermentação foi o ácido láctico, de forma similar ao perfil apresentado pela fermentação aeróbica com glicose. Esse ácido foi produzido com um rendimento em massa de 34,3%, sendo também encontrado o ácido acético (rendimento em massa de 17,8%), uma pequena quantidade de ácido propiônico (rendimento em massa de 0,07%) e etanol.

A diferença observada entre os cultivos aeróbicos com xarope de cana-de-açúcar e sacarose é interessante. Enquanto na fermentação com xarope observa-se um alto crescimento e consumo de sacarose, na fermentação com sacarose o crescimento foi baixo e a sacarose não foi totalmente consumida. Adicionalmente, os produtos da fermentação também foram distintos: enquanto a primeira produz principalmente ácido propiônico e acético, a segunda produz principalmente o ácido láctico. Um melhor crescimento e maior fluxo de carbono para o ácido propiônico e acético pode ser consequência de uma melhor respiração, regenerando os cofatores NAD^+ . Na fermentação com sacarose, a produção de ácido láctico reforça um quadro de deficiência na respiração, com alta necessidade de regenerar o NAD^+ por outras rotas.

Essa diferença na respiração entre as fermentações com xarope e sacarose poderia ser explicada levando em consideração a complexidade da composição química do xarope de cana-de-açúcar, o qual pode conter minerais que poderiam atuar como aceptores finais de elétrons. É conhecido que bactérias apresentam uma gama de redutases capazes de utilizar diversos compostos como aceptores de elétrons (Thöny-Meyer, 1997). Com isso, *P. acidipropionici* poderia utilizar algum componente do xarope como acceptor de elétrons, regenerando eficientemente o NAD^+ , e viabilizando um maior fluxo de carbono para o ácido propiônico e ácido acético e um maior crescimento.

3.6. Perspectivas futuras na elucidação da reversão do ciclo do ácido propiônico

Para aprofundar o estudo do metabolismo aeróbico de *P. acidipropionici*, é essencial elucidar os mecanismos subjacentes à reversão do ciclo do ácido propiônico. Neste contexto, entender e caracterizar cada passo do ciclo é um quesito essencial, tanto a nível de regulação gênica quanto a nível de cinética enzimática.

Dentro deste objetivo, o presente projeto iniciou os primeiros estudos de expressão heteróloga de uma das enzimas do ciclo do ácido propiônico, envolvida na conversão de

propionil-CoA à propionato e, simultaneamente, de succinato à succinil-CoA. Tal enzima possui grande relevância por ser a última enzima do ciclo, envolvida diretamente com a produção do ácido propiônico e com o acúmulo de ácido succínico. A propionil-CoA:succinato CoA transferase ou *coAT* (PACID_06950) de *P. acidipropionici* é codificada por 1512 nucleotídeos, apresentando maior similaridade com outras espécies do gênero *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Acidovorax* e *Micrococcus*.

Preliminarmente ao início dos procedimentos para a expressão heteróloga, foi realizada uma análise bioinformática da proteína a ser expressa. A análise pelo *ProtParam* (Gasteiger et al., 2003) revelou uma proteína contendo 503 aminoácidos e um ponto isoelétrico de 5,45, estimada em um peso molecular de aproximadamente 55 KDaltons. A busca por domínios acusou a presença do domínio característico das CoA transferases e também da acetil-CoA hidrolase (enzima que catalisa a mesma reação utilizando água como um dos substratos), conforme pode ser verificado na Figura 24.

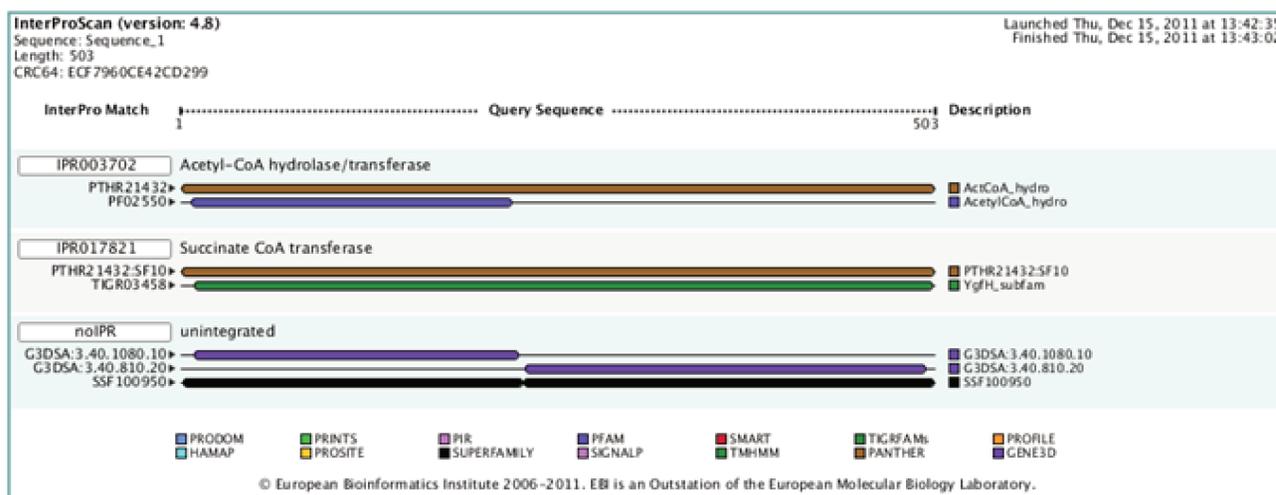


Figura 24: Busca por domínios na sequência de aminoácidos da CoA Transferase de *P. acidipropionici*. Ferramenta *InterProScan*.

Os ensaios resultaram na expressão de uma proteína com cerca de 70 KDa, correspondendo aos 55KDa da *coAT* adicionados aos 13KDa da cauda SUMO (Figura 25). No entanto, não foi obtida a expressão na fase solúvel em nenhuma das temperaturas e concentrações de IPTG testadas. A expressão foi também testada em outra cepa de expressão, a *E. coli* Origami. Como tal cepa não apresenta a capacidade de codificar os tRNAs raros necessários, ela foi inicialmente transformada com o plasmídeo pRARE2 extraído da cepa Rosetta 2. Uma vez transformada (confirmação feita pela resistência ao

antibiótico Cloranfenicol), foi gerada uma nova cepa, aqui denominada Rosettagami 2. No entanto, a expressão a partir de tal cepa também não resultou na expressão da proteína na fase solúvel (Figura 25 C e D).

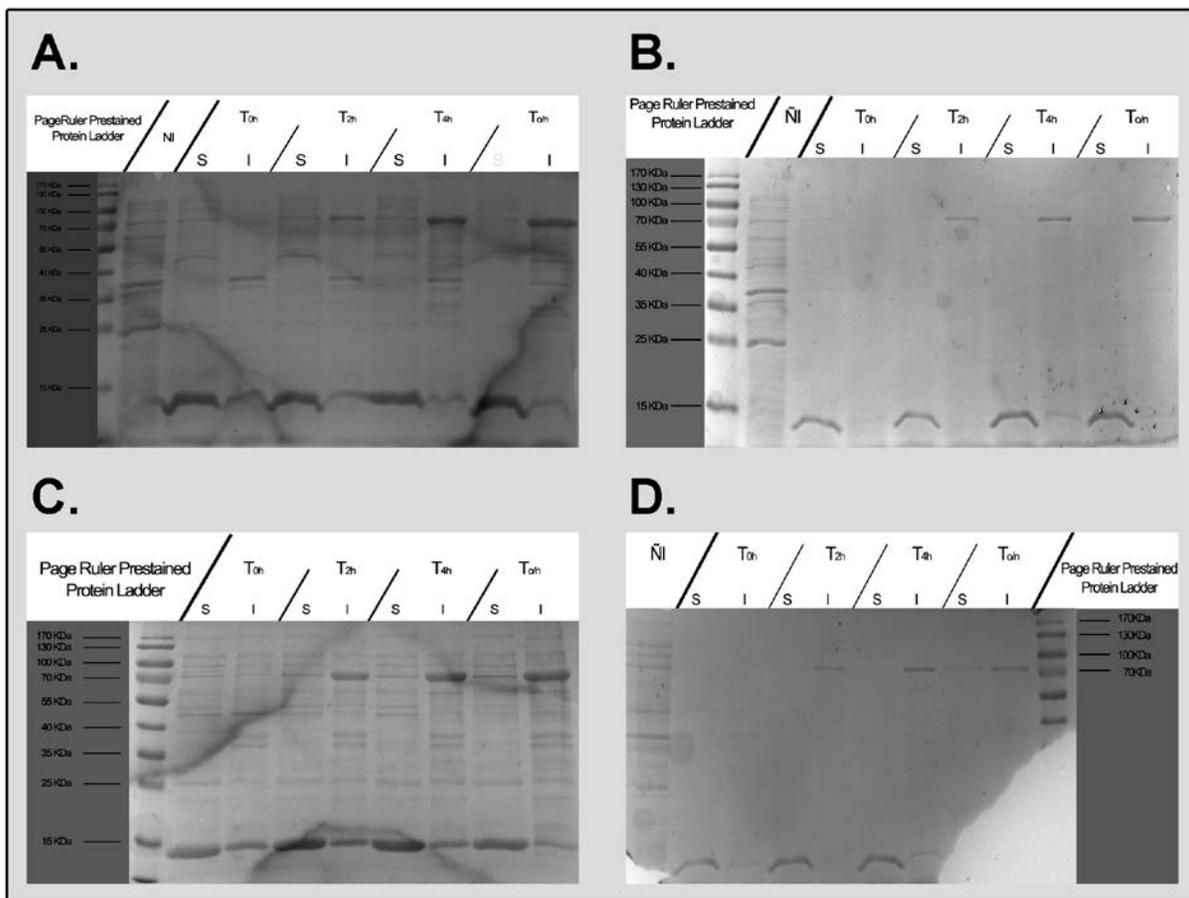


Figura 25: Ensaio de expressão realizados a partir do vetor pETSUMO contendo o gene *coAT*. A expressão foi testada em *E. coli* na cepa Rosetta 2, nas temperaturas de 18°C (A) e 37°C (B). A cepa construída Rosettagami 2 também foi utilizada, nas temperaturas de 18°C (C) e 37°C (D). NI: amostras não induzidas, como controle negativo. S e I: fases solúvel e insolúvel. T: tempo de indução de 0 horas, 2 horas, 4 horas e overnight.

A expressão a partir de outras cepas de *E. coli* ou em outros vetores de expressão ainda precisa ser avaliada. No entanto, por *P. acidipropionici* ser um organismo de alto conteúdo GC, o reflexo disso na diferença entre o *codon usage* dessa bactéria e o de *E. coli* pode dificultar uma expressão heteróloga. A síntese de um gene sintético com os códons otimizados poderia ser uma estratégia interessante para contornar este problema. A otimização dessa expressão para a fase solúvel, e posterior caracterização enzimática da CoA transferase, poderia iniciar estudos para melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos com o ciclo do ácido propiônico, fornecendo indícios para compreender as bases subjacentes a inversão do mesmo.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando os dados obtidos neste trabalho, fica evidente que *P. acidipropionici* possui todos os componentes típicos de uma cadeia transportadora de elétrons, sendo geneticamente equipada para um metabolismo aeróbico. Entretanto, foi confirmado através de um teste funcional que a citocromo c oxidase não apresenta função, o que inviabilizaria a respiração em pressões atmosféricas de oxigênio.

A ausência de uma citocromo c oxidase funcional e a presença de uma oxidase alternativa, a citocromo bd oxidase (citocromo d ubiquinol oxidase), deve ter impactos significativos na fisiologia da bactéria. Considerando que a citocromo bd oxidase está relacionada com a respiração em baixas pressões de oxigênio, devido a sua alta afinidade por este composto, essa combinação de oxidases terminais na cadeia respiratória deve ter fortes relações com a microaerofilia de *P. acidipropionici*. Com a continuidade dos estudos e o estabelecimento de ferramentas de manipulação genética para essa bactéria, será possível a transformação com a subunidade I funcional da citocromo c oxidase, o que deverá trazer resultados interessantes e potencialmente uma elucidação acerca da susceptibilidade ao oxigênio apresentada por essa bactéria.

Outro ponto interessante levantado a partir desse trabalho são as alterações metabólicas que ocorrem em *P. acidipropionici* na presença de oxigênio. Acreditava-se que a aerobiose provocava a reversão do ciclo do ácido propiônico, reduzindo drasticamente sua produção. Entretanto, esse trabalho mostrou que a reversão poderia ocorrer, porém apenas em condições mais específicas, de forma que não é a aerobiose o mecanismo responsável pela inversão. A reversão do ciclo ficou aparente no segundo estágio das fermentações aeróbicas com glicerol e xarope de cana-de-açúcar, em que se observa o consumo do ácido propiônico e acúmulo de ácido acético. No entanto, as baixas concentrações de ácido propiônico observadas nas fermentações aeróbicas com glicose e sacarose também poderiam ser uma consequência da inversão do ciclo. O mecanismo de reversão deste ciclo ainda precisa ser desvendado, com estudos mais aprofundados que envolvem a caracterização de cada etapa do ciclo a nível genético e enzimático.

Ademais, o estudo do metabolismo aeróbico da bactéria revelou uma propriedade interessante no xarope de cana-de-açúcar. O contraste observado no consumo de açúcar,

produtos fermentativos e no crescimento entre as culturas aeróbicas realizadas com xarope e sacarose é muito evidente. Metabolicamente, o cultivo aeróbico na presença do xarope de cana-de-açúcar se assemelha a um metabolismo anaeróbico da bactéria. Esse efeito de “simular uma anaerobiose” possivelmente poderia ocorrer pela presença de minerais que atuariam como aceptores finais de elétrons, sendo que a identificação desse componente específico poderia ter aplicações industriais relevantes para a fermentação propiônica. Uma vez que os custos de se manter uma dorna de fermentação industrial em anaerobiose são elevados, a possibilidade de simular um metabolismo anaeróbico na bactéria, mesmo com a presença do oxigênio, pode ser um grande avanço na produção economicamente viável de ácido propiônico. A realização de fermentações aeróbicas em meio de cultura contendo glicose ou sacarose como fonte de carbono, mas suplementado individualmente com diferentes minerais encontrados no xarope de cana-de-açúcar, deve ser o próximo passo para a identificação deste composto de interesse.

Em suma, todos os dados gerados nesse trabalho sugerem que esse microrganismo apresenta uma elevada flexibilidade metabólica, direcionando o fluxo de carbono para diferentes produtos fermentativos de acordo com a necessidade de manutenção do balanço redox. Com isso, a bactéria pode, através de variações nas condições de cultivo, produzir o ácido propiônico, ácido acético ou o ácido láctico como produtos majoritários da fermentação. Todos esses compostos são de interesse econômico, reforçando ainda mais o potencial desse microrganismo como plataforma industrial e a necessidade de explorar o versátil metabolismo dessa bactéria.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Linhagens de bactérias utilizadas e condições de cultivo

A bactéria utilizada para o desenvolvimento do projeto foi a *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875TM, a mesma linhagem que teve seu genoma sequenciado por Parizzi e colaboradores (2012), adquirida do centro de coleção de organismos “*Global Bioresource Center (ATCC)*”.

O cultivo de *P. acidipropionici* foi realizado em meio de cultura (meio padrão) contendo 2% da fonte de carbono de interesse, 1% de extrato de levedura, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,2% de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1% da solução salina 1 e 0,1% da solução salina 2. A solução salina 1 é composta por 10 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, enquanto a solução salina 2 é composta por 10 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. O cultivo em meio sólido foi feito através da adição de 1,5% de ágar ao meio descrito. O pH dos meios utilizados foram corrigidos para 6,8 através da adição de NaOH 6M, anteriormente a autoclavagem. O cultivo em meio líquido anaeróbico foi realizado em tubos falcon de 50 mL com o volume máximo de cultura, mantidos a 30°C sem agitação (cultura estacionária). O cultivo em meio sólido foi conseguido através da utilização de jarras de anaerobiose conjuntamente com o gerador de anaerobiose *Anaerobac* (Alfalab), mantidos também a 30°C.

Com relação a fonte de carbono, o presente projeto trabalhou com glicose (Sigma-Aldrich), glicerol (Synth), sacarose (Synth), xilose (Sigma-Aldrich) e xarope de cana-de-açúcar. O xarope de cana-de-açúcar foi obtido da Usina Costa Pinto (Piracicaba, SP). O xarope foi coletado após o terceiro efeito de evaporação na linha de produção de açúcar. O xarope foi autoclavado (121°C, 1 bar por 20 minutos) e estocado a 4°C para posterior utilização. O xarope foi caracterizado e quantificado quanto ao seu teor de sacarose, glicose e frutose por HPLC.

Para os experimentos de clonagem e expressão da CoA transferase, foi utilizada a bactéria *Escherichia coli*, cultivada em meio Luria Bertani (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989), a 37°C sob agitação de 250 rpm. A clonagem foi realizada através da cepa *Escherichia coli* DH10B, enquanto a expressão heteróloga foi testada nas cepas Rosetta 2 e Origami.

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

Os experimentos de análise global dos genes da bactéria em condições anaeróbicas são de autoria da Doutora Maria Carolina de Barros Grassi. As bibliotecas geradas por este experimento foram utilizadas neste projeto para investigar a expressão dos genes relacionados com a cadeia respiratória da bactéria.

As bibliotecas foram obtidas através do cultivo de *P. acidipropionici* em biorreator de bancada com volume de 2,5 L (Labfors, da Infors HT), utilizando o meio padrão descrito na seção 1 de Materiais e Métodos, adicionado exclusivamente de 60 g/L de uma das três fontes de carbono avaliadas: glicose, glicerol ou xarope de cana-de-açúcar. O cultivo foi realizado em anaerobiose, a 35°C, com pH fixado em 7,0 e agitação de 100 rpm.

Foram retiradas quatro amostras de cada fermentação: uma na fase de latência (Lag), no início da fase de crescimento exponencial (E-Log), no final da fase de crescimento exponencial (L-Log) e na fase estacionária (St). A amostra coletada em cada um destes pontos foi estabilizada com 2 volumes do reagente *RNAprotect Bacteria* (Qiagen). Esta mistura foi vortexada por 5 segundos e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 5000 x g, o sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -80 °C. A extração de RNA foi realizada através do kit *RNAeasy Minikit* (QIAGEN), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

O sequenciamento do RNA foi realizado pela Illumina, Inc (San Diego, California), utilizando o serviço “*Fast Track Genetic Analysis Services*”. A partir dos *reads* obtidos, foi realizado o alinhamento dos mesmos contra os genes de *P. acidipropionici* depositados no NCBI, utilizando o programa *BOWTIE* (Langmead, Trapnell, Pop, & Salzberg, 2009). Foram considerados somente os *reads* que alinharam com um único gene, permitindo no máximo dois *mismatch*. O número de *reads* alinhados contra cada gene foi então utilizado para o cálculo do RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*), um método de quantificação da expressão que leva em consideração a normalização a partir do tamanho do gene e do total de número de *reads* gerados na biblioteca (Mortazavi, Williams, McCue, Schaeffer, & Wold, 2008). A comparação entre as bibliotecas geradas, assim como a análise estatística desta comparação foi feita através do programa *DESeq* (Anders & Huber, 2010).

5.3. Análise e teste funcional da citocromo c oxidase

O alinhamento da sequência de peptídeos da subunidade I da citocromo c oxidase de *P. acidipropionici* foi realizado contra a mesma subunidade das bactérias filogeneticamente próximas *Propionibacterium acnes* (TIA2EST2_03470) e *Microlunatus phosphovorius* (MLP_42030). O alinhamento foi realizado através do programa *ClustalW*, utilizando a interface do *Geneious Pro* v 4.8.4.

A modelagem da estrutura da subunidade I da citocromo c oxidase, a qual contém a mutação de *frameshift*, foi feita através do programa I-TASSER (Roy et al., 2010), que se utiliza de algoritmos de predição de estrutura a partir da sequência de aminoácidos conjuntamente com o alinhamento das estruturas preditas com o banco de dados do PDB (*Protein Data Bank*) para gerar modelos prováveis de estrutura e função. Foi feita uma modelagem para a proteína contendo o *frameshift* (denominada de *coxA_FS*) e também uma modelagem da proteína corrigida sem a mutação (denominada de *coxA_Ct*).

O programa I-TASSER gera um índice que reflete a qualidade e confiabilidade dos modelos preditos pelo programa, denominado *C-Score*. Tal índice varia numa escala de -5 (modelo sem qualidade) até 2 (modelo perfeito). Ao modelo *coxA_Ct* foi atribuído um *C-Score* de 0,61, enquanto o modelo *coxA_FS* recebeu um *C-Score* de -1,34. O menor valor de *C-Score* para o modelo *coxA_FS* é esperado, visto que este índice leva em consideração o alinhamento contra outras estruturas semelhantes no PDB, e apenas a região antes da mutação de *frameshift* apresentaria um alinhamento satisfatório. A análise e alinhamento das estruturas preditas, assim como as imagens geradas, foram realizadas através do programa *PyMol* (Schrödinger LLC, 2010).

Para o teste funcional da citocromo c oxidase, foi realizada a aferição em triplicata do consumo de oxigênio através de um oxígrafo (Hansetech Instruments), utilizando culturas de *P. acidipropionici* crescidas até o final da fase exponencial (OD_{600} próxima a 3) utilizando 2% de glicose como fonte de carbono. As aferições foram todas padronizadas para a mesma quantidade de células a partir do valor de densidade óptica (OD_{600}).

A inibição foi realizada através da adição de cianeto de potássio (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 4 mM, adicionado em um momento próximo a taxa de consumo máxima de oxigênio observada. Como controle positivo, o teste foi realizado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2/JAY270.

5.4. Teste de crescimento aeróbico em diferentes fontes de carbono

A avaliação da capacidade de crescimento de *P. acidipropionici* em aerobiose foi testada no meio de crescimento padrão contendo 2% de uma das cinco fontes de carbono testadas: glicose, glicerol, xarope de cana-de-açúcar, sacarose e xilose. Para efeito de comparação, todas as curvas de crescimento foram também feitas em condições anaeróbicas. Todas as curvas de crescimento foram realizadas em triplicata.

O crescimento aeróbico foi realizado em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de cultura, mantidos a 30°C sob agitação de 200 rpm. Tais culturas efetivamente representam uma condição microaeróbica, uma vez que a concentração do oxigênio dissolvido em meio líquido é inferior a atmosférica. O crescimento anaeróbico foi realizado em tubos falcon de 50 mL contendo 50 mL de cultura, mantidos a 30°C sem agitação (cultura estacionária).

A avaliação do crescimento foi realizada através da aferição da densidade óptica em 600 nm (OD_{600}) utilizando o espectrofotômetro *Ultrospec 2000 UV/VIS* (Pharmacia Biotech). A taxa de crescimento máxima (μ_{max}) foi aproximada para a máxima taxa de crescimento calculada a partir de cada intervalo entre os pontos aferidos da curva, através da fórmula:

$$\mu = \frac{2,303 (\log OD_2 - \log OD_1)}{t_2 - t_1}$$

sendo μ a taxa de crescimento, OD_2 e OD_1 os valores de densidade óptica aferidos para dois pontos consecutivos, e $t_2 - t_1$ o intervalo de tempo, em horas, entre estas aferições.

5.5. Cultivo de *P. acidipropionici* em biorreatores

Para a análise do impacto da aerobiose no metabolismo da bactéria, foram realizadas fermentações em biorreator de bancada (Labfors 2,5 L, da Infors HT) e foi feita a análise dos produtos e substratos da fermentação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Foram realizadas fermentações em triplicata em aerobiose com as

fontes de carbono glicose, glicerol, xarope de cana-de-açúcar e sacarose. Para efeito de comparação, foi também realizada uma fermentação anaeróbica com glicose.

Todas as fermentações foram realizadas com o meio padrão descrito na seção 1 dos Materiais e Métodos, suplementados com 2% da fonte de carbono de interesse, e também adicionados de 100 ppm de anti-espumante *Antifoam 204* (Sigma-Aldrich). As fermentações foram conduzidas a 30°C, com agitação de 150 rpm e pH fixado em 6,5 através da adição automatizada de NaOH 6M. Para as fermentações aeróbicas, foi mantido um fluxo constante de 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) de Ar Sintético (White Martins), composto por 20% de oxigênio e 80% de nitrogênio. Para a fermentação anaeróbica, antes do início da fermentação os biorreatores foram borbulhados com fluxo de 4,5 vvm de nitrogênio gasoso durante 20 minutos e a cultura foi prosseguida sem fluxo de gases. O nível de oxigenação das fermentações foi monitorado em tempo real através do sensor *InPro6820* (Mettler Toledo).

Para iniciar uma fermentação em biorreator, a ativação de uma cultura permanente de *P. acidipropionici* ATCC 4875 foi feita em um tubo falcon de 15 mL, adicionando o 1 mL da cultura permanente à 14 mL de meio padrão contendo glicose (2%) como fonte de carbono. A cultura foi incubada em estufa a 30°C. Após 48 horas, foram separadas duas amostras de 5 mL deste tubo falcon de 15 mL, sendo estas utilizadas para inóculo em tubos falcon de 50 mL contendo 45 mL do meio padrão com glicose (2%) como fonte de carbono. As culturas de 50 mL foram também mantidas na estufa 30°C por 48 horas, sendo posteriormente centrifugadas a 6000 X g por 6 minutos e ressuspensas em 100 mL de meio padrão sem fonte de carbono. Esta cultura em 100 mL foi utilizada para inóculo em um biorreator.

Para o preparo do biorreator, foi confeccionado, em 900 mL, o meio de cultura com as concentrações necessárias para o volume final de 1000 mL. 800 mL deste meio foi adicionado no biorreator, o qual foi esterilizado em autoclave a 121°C, 1 bar, por 20 minutos. Os 100 mL restantes foram transferidos para uma garrafa de 250 mL e igualmente autoclavados, sendo posteriormente utilizados para a ressuspensão das culturas de falcon a serem inoculadas no biorreator. A fonte de carbono foi dissolvida em 100 mL de água destilada e também autoclavada em uma garrafa de 250 mL.

Uma vez iniciada a fermentação no biorreator, duas amostras de 1,5 mL eram coletadas em intervalos aproximados de 8 horas. Uma amostra foi utilizada para avaliar o

crescimento por densidade óptica (OD₆₀₀), enquanto a outra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e mantida a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

5.6. Confirmação da identidade das bactérias fermentadas por sequenciamento

Tendo em vista as grandes variações observadas no perfil fermentativo com as diferentes condições testadas, a identidade da bactéria utilizada para fermentação nos biorreatores foi conferida como sendo *Propionibacterium acidipropionici* após cada cultura.

Para este objetivo, foram retiradas amostras de 2 mL de cada biorreator ao longo de três pontos da fermentação (inicial, fase exponencial de crescimento e fase estacionária), as quais foram utilizadas para extração do DNA genômico de *P. acidipropionici*.

Inicialmente, as amostras foram centrifugadas para precipitação das células, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuscitado em 400 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1mM EDTA) pH 8,0. Para a quebra da parede celular, foram adicionados 50 µL de lisozima 10 mg/mL (Sigma-Aldrich) e a ressuspensão foi mantida *overnight* a temperatura ambiente com agitação de 100 rpm.

Posteriormente, foram acrescentados 70 µL de uma solução de SDS 10% e 5 µL de Proteinase K 10 mg/mL (Sigma-Aldrich). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 65°C durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl (0,8 g/L de CTAB e 0,4 g/L de NaCl). Esta suspensão foi agitada e incubada novamente a 65°C por 10 minutos adicionais. Foram adicionados 750 µL 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 por 15 minutos e o sobrenadante (cerca de 600 µL) foi transferido para outro tubo. Para precipitação do DNA genômico, foram adicionados 500 µL de isopropanol a -20°C e a amostra foi mantida a -20°C durante 30 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000 X g durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% a temperatura de -20°C. O DNA extraído foi seco a temperatura ambiente e ressuscitado em 50 µL de água deionizada (MilliQ) esterilizada. A concentração e

pureza do DNA foram determinadas a partir da análise em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) a 260 e 280 nm, respectivamente.

A partir do DNA extraído, foi realizado o sequenciamento de uma região codificante para o RNA ribossomal, subunidade 16S. O sequenciamento do rRNA 16S, por apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras altamente polimórficas entre diferentes bactérias, permite a identificação da bactéria trabalhada até o nível de gênero e, muitas vezes, ao nível de espécie (James, 2010). Para este objetivo, foram desenhados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Olinucleotídeos utilizados para sequenciamento de uma região polimórfica codificante para o RNA ribossomal, subunidade 16S, nas fermentações realizadas

NOME DO OLIGO	SENTIDO DE AMPLIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA
27F	Direto	5' AGA GTT TGA TCG TGG CTC AG 3'
1401R	Reverso	5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3'

A amplificação com estes oligonucleotídeos foi realizada utilizando a reação descrita na Tabela 7, resultando em um fragmento amplificado de 1381 pares de bases. As reações foram feitas com a polimerase *GoTaq* (Promega). O produto da reação de PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1%, e o fragmento alvo foi excisado com ajuda de um bisturi e purificado através do kit “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*” (Promega). O produto purificado foi utilizado para o sequenciamento.

A reação utilizada para o sequenciamento está representada na Tabela 8. A amplificação foi realizada no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems). O sequenciador utilizado foi o *3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems), baseado na tecnologia Sanger. As reações foram feitas utilizando o kit “*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” (Applied Biosystems), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Tabela 7: Reação de PCR utilizada para a amplificação de uma região do RNA ribossomal, subunidade 16S

REAÇÃO DE PCR			
Reagentes		Quantidade	
DNA Molde (Diluição 20 ng/ μ L)		1 μ L	
27F (5 pm/ μ L)		0,6 μ L	
1401R (5 pm/ μ L)		0,6 μ L	
dNTP (10 mM)		0,2 μ L	
MgCl ₂ (50 mM)		0,6 μ L	
GoTaq 5X Flexi Buffer		2 μ L	
DMSO 20% (Sigma-Aldrich)		3 μ L	
GoTaq Flexi DNA Polymerase		0,2 μ L	
Água Deionizada (MilliQ)		1,8 μ L	
TOTAL:		10 μL	
CICLAGEM DE TEMPERATURAS			
Etapa	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	94°C	2 min	1
Desnaturação	94°C	50 seg	
Anelamento	58°C	15 seg	30
Extensão	72°C	1 min	
Extensão Final	72°C	5 min	1

Tabela 8: Reação utilizada para sequenciamento do fragmento amplificado do RNA ribossomal 16S

REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO			
Reagentes		Quantidade	
DNA purificado		50 ng	
Oligonucleotídeo (10 pm/ μ L)		1,6 μ L	
Big Dye		1 μ L	
Buffer Big Dye 10X		1 μ L	
Água Deionizada (MilliQ)		Completar para 10 μ L	
CICLAGEM DE TEMPERATURAS			
Etapa	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	2 min	1
Desnaturação	95°C	20 seg	
Anelamento	58°C	15 seg	35
Extensão	60°C	2 min	

5.7. Quantificação dos substratos e produtos da fermentação por HPLC

A quantificação dos substratos (glicose, frutose, sacarose e glicerol) e dos produtos (ácido propiônico, ácido acético, ácido succínico, ácido láctico, etanol e propanol) das

fermentações em biorreatores foi realizada através da técnica da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), utilizando o cromatógrafo *Allience HT* (Waters) acoplado a um detector de índice de refração IR 2414 (Waters). As corridas foram realizadas utilizando a coluna HPX-87H (Biorad), mantida a 35°C, utilizando ácido sulfúrico 2 mM como fase móvel em um fluxo de 0,6 mL/min. Foram feitas curvas de calibração para cada substrato e produto de interesse, visando uma análise quantitativa dos mesmos.

5.8. Cálculo dos parâmetros de desempenho fermentativo

Com a análise quantitativa dos substratos e produtos da fermentação, o desempenho dos processos foi avaliado através dos seguintes parâmetros:

- **Rendimento:** Massa de produto formado por unidade de massa consumida, expresso em porcentagem (Doran, 1995).

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

No qual,

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

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

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

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

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

- **Produtividade Volumétrica:** massa de produto formado por unidade de volume, por unidade de tempo

$$\text{Produtividade Volumétrica (g/L.h)} = \frac{\text{MF produto} - \text{MI produto}}{\text{V.t}}$$

No qual,

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

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

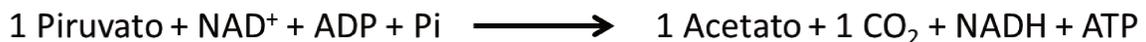
V: Volume final da fermentação, expresso em Litros.

t: tempo de cultura, expresso em horas.

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

Para representar o fluxo de carbono nas fermentações, foi realizada uma distribuição dos mols de carbono do substrato entre os produtos fermentativos observados. Para este objetivo, a massa produzida de cada produto ([concentração final x volume final] – [concentração inicial x volume inicial]) foi dividida pela massa molecular do mesmo, resultando no número de mols produzido para cada composto.

O número de mols de CO₂ produzido foi estimado considerando a estequiometria na produção de ácido acético, de forma que o número de mols de CO₂ produzido equivale ao número de mols do ácido acético formado, de acordo com a seguinte reação:



O restante do número de mols consumido do substrato que não pode ser atribuído a nenhum produto foi representado como fluxo para a biomassa das culturas.

5.9. Clonagem e expressão heteróloga da CoA transferase de *P. acidipropionici*

Antes de iniciar os experimentos de expressão heteróloga com a propionil-CoA:succinato CoA transferase de *P. acidipropionici*, foi realizada uma análise bioinformática desta enzima. A ferramenta *ProtParam* (Gasteiger et al., 2003) foi utilizada

para estimar características físicas da proteína, tais como o ponto isoelétrico e o peso molecular. A busca por domínios foi feita através da ferramenta *InterProScan* (Zdobnov & Apweiler, 2001). Para a análise da frequência de utilização dos códons na sequência da CoA transferase, em comparação com a frequência de utilização dos códons pela bactéria *host Escherichia coli* (diferença no *codon usage*), foi utilizado o programa *GCUA* (Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M, 2004).

Os códons utilizados por *P. acidipropionici* no gene *coAT* apresentaram diferenças quando comparados com o *codon usage* da bactéria a ser utilizada como *host, Escherichia coli*. As diferenças se concentraram principalmente em dois códons raros para *E. coli*: CGG e AGG, ambos codificantes para o aminoácido arginina. Dessa forma, foi escolhida para a expressão heteróloga a cepa de *E. coli* Rosetta 2, a qual contém o plasmídeo pRARE2, codificando para 7 tRNAs raros em *E. coli*, entre eles, os associados aos códons CGG e AGG.

Após a análise preliminar da sequência da CoA transferase, foram iniciadas as etapas de clonagem e expressão heteróloga. Inicialmente, a sequência da CoA transferase foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 9, a partir do DNA genômico de *P. acidipropionici* extraído através do mesmo procedimento descrito no item 6 dos Materiais e Métodos.

Tabela 9: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da sequência da CoA Transferase

NOME DO OLIGO	SENTIDO DA AMPLIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA	CAUDA DE RESTRIÇÃO
COAT_DIRETO	Direto	5' <u>GGATCC</u> ATGTCAGATCGGATTGCCAA 3'	BamHI
COAT_REVERSO	Reverso	5' <u>AAGCTT</u> T CAGGCCTTCATGGAGCC 3'	HindIII

A amplificação da CoA transferase foi realizada através da reação descrita na Tabela 10. Com a amplificação da CoA transferas utilizando os oligonucleotídeos da Tabela 9, foi obtido um fragmento correspondente ao tamanho total do gene (1512 pb) adicionado das caudas de restrição para as enzimas BamHI e HindIII (bases sublinhadas nos oligonucleotídeos da Tabela 9). A escolha destas enzimas foi feita de forma a permitir a subclonagem direcionada no vetor de expressão. O fragmento amplificado foi purificado com o kit “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*” (Promega), e ligado no vetor pGEM T-Easy (Promega), seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante, para formar o plasmídeo pGEM+CoAT.

O plasmídeo pGEM+CoAT foi transformado em *E. coli* DH10B competente, através da metodologia da eletroporação (Sambrook et al., 1989). Após o crescimento das células transformadas em meio seletivo (Ampicilina e X-gal), os transformantes foram inoculados em meio Luria Bertani e foi realizada a extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook et al., 1989). A clonagem do fragmento foi confirmada por PCR, análise de restrição com as enzimas BamHI e HindIII, e também através de sequenciamento.

Tabela 10: Reação de PCR utilizada para a amplificação do gene codante para a CoA transferase

REAÇÃO DE PCR			
Reagentes	Quantidade		
DNA Genômico (Diluição 20 ng/μl)	5 μl		
COAT_DIRETO (5 pm/μL)	3 μl		
COAT_REVERSO (5 pm/μL)	3 μl		
dNTP (10 mM)	1 μl		
MgCl ₂ (50 mM)	3 μl		
Pfu Buffer 10X	5 μl		
DMSO 20% (Sigma-Aldrich)	15 μl		
Pfu DNA Polymerase	1 μl		
Água Deionizada (MilliQ)	14 μl		
TOTAL:	50 μl		
CICLAGEM DE TEMPERATURAS			
Etapa	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	94°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	50 seg	
Anelamento	63°C	40 seg	35
Extensão	72°C	3 min	
Extensão Final	72°C	5 min	1

Em seguida, o plasmídeo pGEM+CoAT foi digerido com as enzimas BamHI e HindIII, sendo a mesma digestão também realizada para o vetor de expressão pETSUMO e pET28A. A ligação do fragmento *coAT* liberado com os vetores linearizados foi feita utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Promega), seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante. Os novos plasmídeos, pETSUMO+CoAT e pET28A+CoAT foram transformados nas cepas de expressão *E. coli* Rosetta 2 e *E. coli* Origami.

Após todas as etapas de clonagem (vetor pGEM T-Easy) e subclonagem (vetor pETSUMO e vetor pET28A), confirmação por sequenciamento, e transformação das cepas de expressão (*E. coli* Rosetta 2 e *E. coli* Origami), foram iniciados os ensaios de expressão em diversas condições.

Os ensaios de expressão foram realizados para as duas cepas de expressão, transformadas com um dos dois plasmídeos construídos, pETSUMO+CoAT ou pET28A+CoAT. Os ensaios foram realizados seguindo os procedimentos descritos no manual do pETSUMO (Promega), variando alguns parâmetros da expressão:

- OD₆₀₀ de indução: 0,4, 0,5 ou 0,6
- Temperatura de indução: 18°C, 30°C ou 37°C
- Concentração de IPTG: 0,1mM, 1mM ou 10 mM

Ao longo do ensaio de expressão, foram retiradas 4 amostras: uma logo após a adição do IPTG (T_{oh}), uma 2 horas após a adição do IPTG (T_{2h}), uma 4 horas após a adição do IPTG (T_{4h}) e outra após a indução por período *overnight* (T_{o/n}). Cada uma das amostras foi separada em fase solúvel e insolúvel, através de etapas consecutivas de congelamento e descongelamento seguidas de um tratamento com lisozima, como sugerido no protocolo do pETSUMO (Promega).

A mesma quantidade de cada amostra resultante (padronizado a partir da OD₆₀₀ das amostras coletadas) foi aplicada em um gel de poliacrilamida, para verificar a presença da banda alvo através de um SDS-PAGE, seguindo o método Laemmli (Sambrook et al., 1989)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10), R106. doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Belevich, I., & Verkhovsky, M. I. (2008). Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. *Antioxidants & redox signaling*, 10(1), 1–29. doi:10.1089/ars.2007.1705
- Blanc, P., & Goma, G. (1987). Kinetics of inhibition in propionic acid fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2, 175–179.
- Blanca, J. A. G., Jon, B., Ma, J., & Gennis, R. B. (1994). The Superfamily of Heme-Copper Respiratory Oxidases. *Journal of bacteriology*, 176(18).
- Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., & Verkhovsky, M. I. (2011). The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 1398–1413. doi:10.1016/j.bbabi.2011.06.016
- Boyaval, P., & Corre, C. (1995). Production of propionic acid. *Lait*, 75, 453–461.
- Cheong, D., Lee, H., & So, J. (2008). Optimization of electrotransformation conditions for *Propionibacterium acnes*. *Journal of Microbiological Methods*, 72, 38–41.
- De Vries, W., Wijck-Kapteijn, W. M., & Stouthamer, a H. (1972). Influence of oxygen on growth, cytochrome synthesis and fermentation pattern in propionic acid bacteria. *Journal of general microbiology*, 71(3), 515–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4647470>
- Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press Limited.
- Falk-krzesinski, H. J., & Wolfe, A. J. (1998). Genetic Analysis of the nuo Locus , Which Encodes the Proton-Translocating NADH Dehydrogenase in Escherichia coli Genetic Analysis of the nuo Locus , Which Encodes the Proton-Translocating NADH Dehydrogenase in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 180(5), 1174.
- Field, C. B., Campbell, J. E., & Lobell, D. B. (2008). Biomass energy: the scale of the potential resource. *Trends in ecology & evolution*, 23(2), 65–72. doi:10.1016/j.tree.2007.12.001
- Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M, H. P. (2004). Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol.*, 55(6), 869–881.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, *31*, 3748–3788.
- James, G. (2010). PCR for Clinical Microbiology. (M. Schuller, T. P. Sloots, G. S. James, C. L. Halliday, & I. W. J. Carter, Eds.), 209–214. doi:10.1007/978-90-481-9039-3
- Kanitkar, A., Aita, G., & Madsen, L. (2013). The recovery of polymerization grade aconitic acid from sugarcane molasses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Kerscher, S., Dröse, S., Zickermann, V., & Brandt, U. (2007). The Three Families of Respiratory NADH Dehydrogenases. *Bioenergetics*, *45*(May), 185–222. doi:10.1007/400
- Kumar, S., & Babu, B. V. (2006). A brief review on propionic acid: a renewal energy source. *Proceedings of National Conference on Environmental Conservation*, 459–464.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, *10*(3), R25. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Langsrud, T., & Reinbold, G. W. (1973). Flavor development and microbiology of Swiss cheese. A review III. *Journal of Milk and Food Technology*, *36*, 593–609.
- Lehninger, A., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Principles of Biochemistry* (pp. 668, 670–71, 676). New York: Worth Publishers.
- Liu, Y., Zhang, Y.-G., Zhang, R.-B., Zhang, F., & Zhu, J. (2011). Glycerol/Glucose Co-Fermentation: One More Proficient Process to Produce Propionic Acid by *Propionibacterium acidipropionici*. *Current microbiology*, *62*(1), 152–8. doi:10.1007/s00284-010-9683-5
- Mantere-Alhonen, S. (1995). Propionibacteria used as probiotics - A review. *Le Lait*, *75*(4-5), 447–452. doi:10.1051/lait:19954-534
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, (5), 621–628.
- Murooka, Y., Piao, Y., Kiatpapan, P., & Yamashita, M. (2005). Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of *Propionibacterium freudenreichii*: An overview. *Lait*, *85*, 9–22.
- OPEC Outlook. (2012). *World Oil Outlook*.
- Parizzi, L. P., Grassi, M. C. B., Llerena, L. a, Carazzolle, M. F., Queiroz, V. L., Lunardi, I., Zeidler, A. F., et al. (2012). The genome sequence of *Propionibacterium*

- acidipropionici provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC genomics*, 13, 562. doi:10.1186/1471-2164-13-562
- Playne, M. J. (1985). Propionic and butyric acid. *Comprehensive biotechnology*, 3, 731–755.
- Quesada-Chanto, A., Silveira, M. M., Schmid-Meyer, A. C., Schoroeder, A. G., Costa, J. P. C. L. da, López, J., Carvalho-Jonas, M. F., et al. (1998). Effect of the oxygen supply on pattern of growth and corrinoid and organic acid production of *Propionibacterium shermanii*. *Applied Microbiology Biotechnol*, 49, 732–736.
- Rincones, J., Zeidler, A. F., Grassi, M. C. B., Carazzolle, M. F., & Pereira, G. A. G. (2009). The Golden Bridge for Nature: The New Biology Applied to Bioplastics. *Polymer Reviews*, 49(2), 85–106.
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5(4), 725–38. doi:10.1038/nprot.2010.5
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Lab Press, EUA.
- Schrödinger LLC. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4.
- Schwartz, A. (1973). Anaerobiosis and oxygen consumption of some strains of *Propionibacterium* and a modified method for comparing the oxygen sensitivity of various anaerobes. *Z Allg Mikrobiol*, 13, 681–691.
- Suwannakham, S., & Yang, S.-T. (2005). Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 91(3), 325–37. doi:10.1002/bit.20473
- Thierry, A., Maillard, M., Richoux, R., Kerjean, J., & Lortal, S. (2005). *Propionibacterium ferudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *Lait*, 85, 57–74.
- Thöny-Meyer, L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(3), 337–76. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232615&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vorobjeva, L. I. (1959). Influence of aeration on propionic acid fermentation. *Mikrobioloija*, 28, 224–229.
- Vorobjeva, Lena I. (1999). *Propionibacteria*. Springer.

- Walford, S. (1996). Composition of Cane Juice. *Proc S Afr Sug Technol Ass*, (70), 265–266.
- Ye, K, Shijo, M., Miyano, K., & Shimizu, K. (1999). Metabolic pathway of *Propionibacterium* growing with oxygen: enzymes, ¹³C NMR analysis, and its application for vitamin B12 production with periodic fermentation. *Biotechnology progress*, 15(2), 201–7. doi:10.1021/bp990012s
- Ye, Kaiming, Shijo, M., Jin, S., & Shimizu, K. (1996). Efficient production of vitamin B12 from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(5), 484–491. doi:10.1016/S0922-338X(97)86988-7
- Yongsmith, B., Sonomoto, K., Tanaka, A., & Fukui, S. (1982). Production of vitamin B12 by immobilized cells of a propionic acid bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*1, 16, 70–74.
- Zdobnov, E., & Apweiler, R. (2001). InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17(9), 847–848.
- Zhang, A., & Yang, S.-T. (2009). Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochemistry*, 44(12), 1346–1351. doi:10.1016/j.procbio.2009.07.013
- Zhu, Y., Li, J., Tan, M., Liu, L., Jiang, L., Sun, J., Lee, P., et al. (2010). Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresource technology*, 101(22), 8902–6. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.070