

OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO PARA *PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI*



Castro, D. M. *, Grassi, M. C. B., Pereira, G.A.G

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, EVOLUÇÃO E BIOAGENTES – INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS / BRASIL

Suporte financeiro: FAPESP, Braskem

Palavras Chave: Eletroporação – *Propionibacterium* - Ácido propiônico

* Contato: dayanne@lge.ibi.unicamp.br

Introdução

A simples observação do nosso dia-a-dia nos faz perceber como a nossa sociedade é dependente do petróleo. São vários os bens de consumo dele derivados, como gasolina, plásticos e até produtos farmacêuticos. No entanto, este é um recurso não renovável e de um elevado potencial poluidor, sendo assim, encontrar fontes alternativas para este recurso se tornou essencial para um futuro sustentável.

Um intermediário químico de notável uso industrial obtido a partir de produtos petroquímicos é o ácido propiônico, cujas algumas aplicações são a produção de herbicidas, de aromas artificiais, de drogas e de conservantes de alimentos. As bactérias mais promissoras para a produção em escala industrial deste ácido são as actinobactérias *Propionibacterium acidipropionici*¹. A fim de tornar esta produção economicamente viável, é essencial o desenvolvimento de uma linhagem que produza ácido propiônico com alta produtividade e rendimento. Neste contexto, a padronização de técnicas de manipulação genética para esta bactéria é primordial, sendo o objetivo deste estudo a otimização da eletroporação de *P. acidipropionici*.

Metodologia

Construção de um vetor de transformação

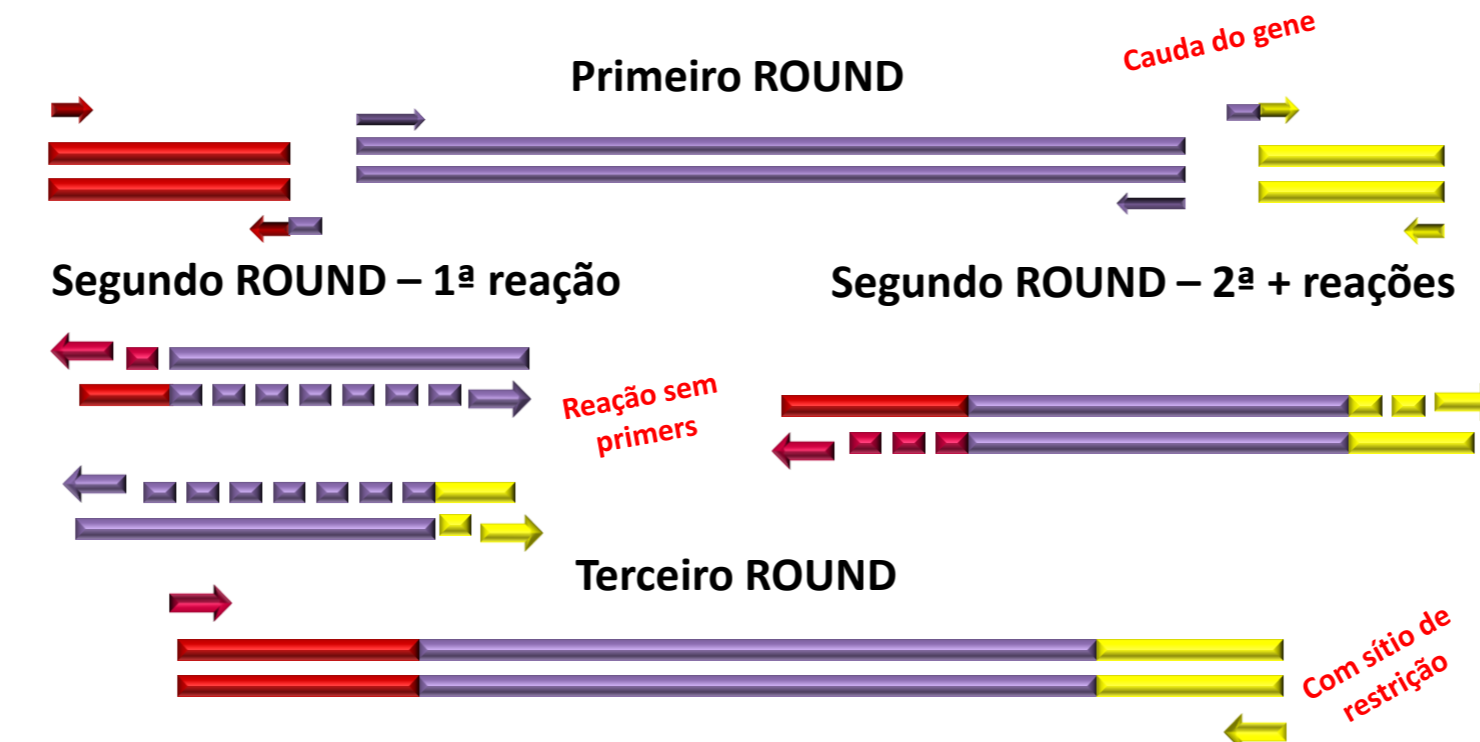


Figura 1: Double-joint PCR² (Adaptado de Yu et al. 2004).

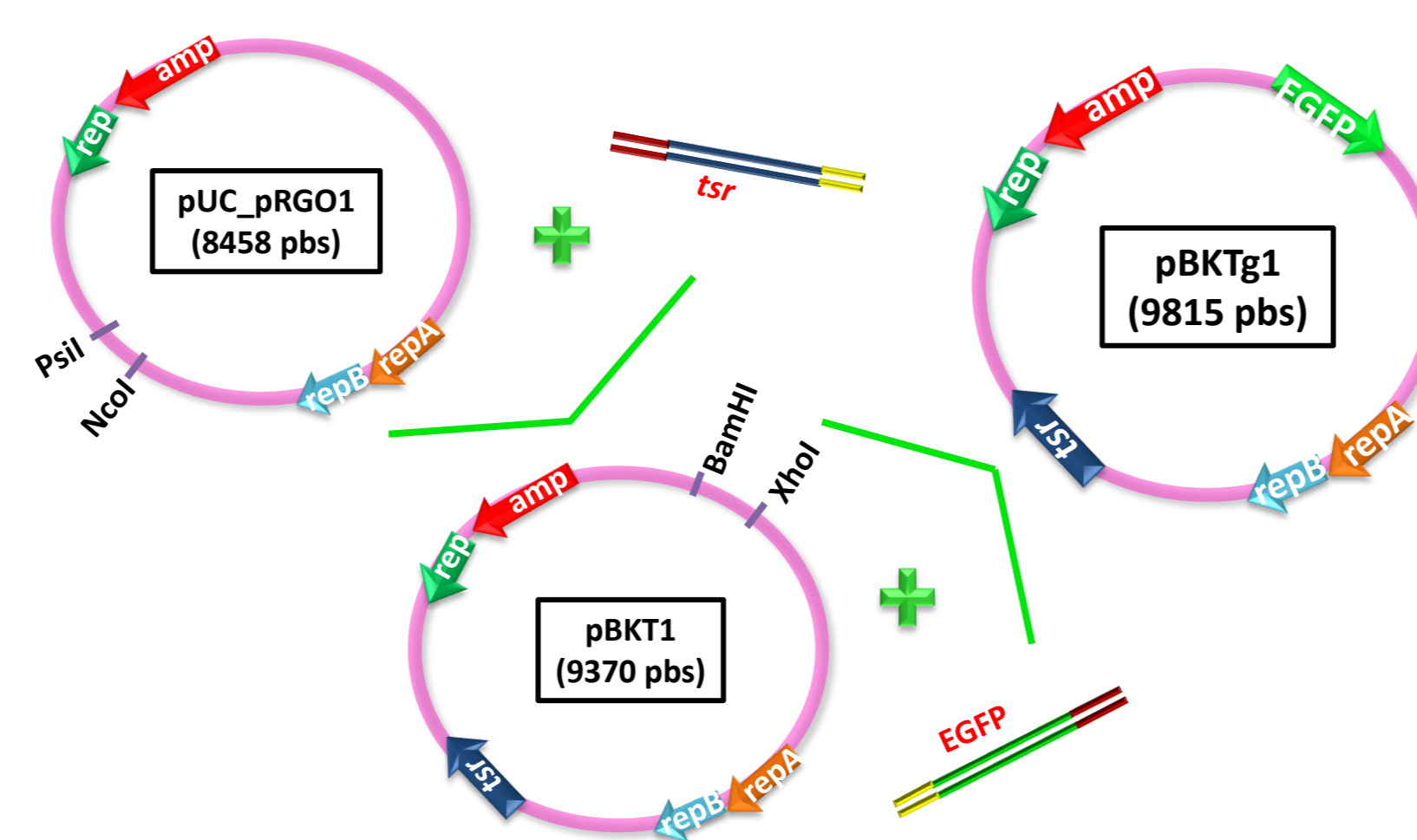


Figura 2: Clonagens para a construção dos vetores de transformação pBKTg1.

Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)³

Combinar fatores que podem influenciar a eficiência da eletroporação

Variável	-2,37841	-1	0	1	2,37841
Voltagem (kV)	0,32	0,80	1,15	1,50	1,98
"Time Constant" (ms)	0,82	2,20	3,20	4,20	5,58
Fase de Crescimento (OD ₆₀₀)	0,20	0,48	0,68	0,88	1,16
Temperatura de incubação (°C)	15,73	24,00	30,00	36,00	44,27
Quantidade de DNA (ng)	3,11	10,00	15,00	20,00	26,89

Tabela 1: Parâmetros utilizados para a otimização da eletroporação e seus respectivos valores.

O crescimento inicial de *P. acidipropionici* (medição da densidade ótica - OD₆₀₀).

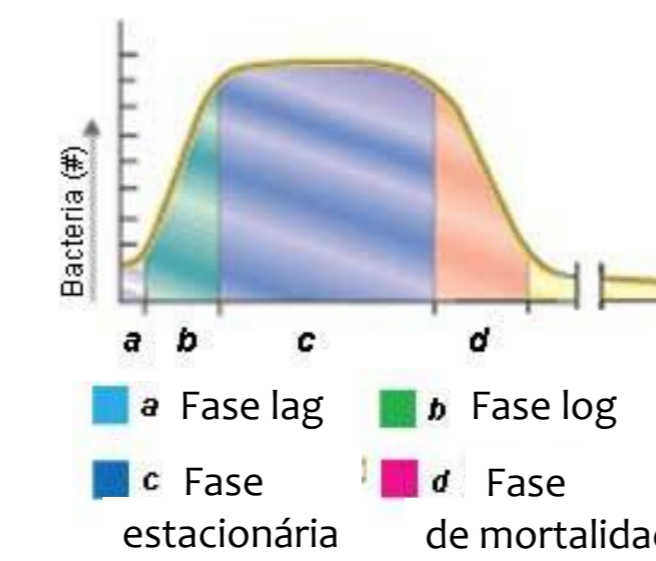


Figura 3: Curva genérica de crescimento bacteriano

Viabilidade celular de *P. acidipropionici* submetida a diferentes condições de eletroporação (L7012 LIVE/DEAD[®] BacLight[®] Bacterial Viability Kit - Invitrogen).

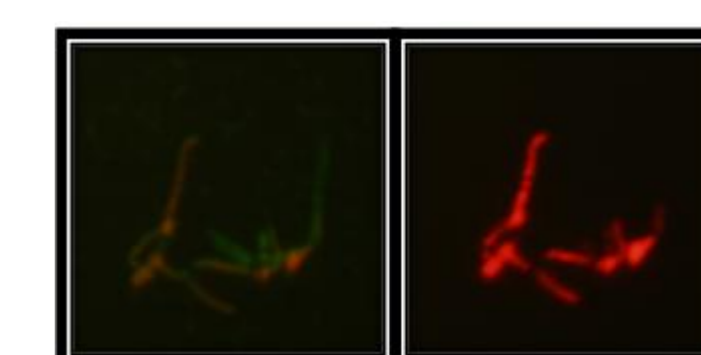
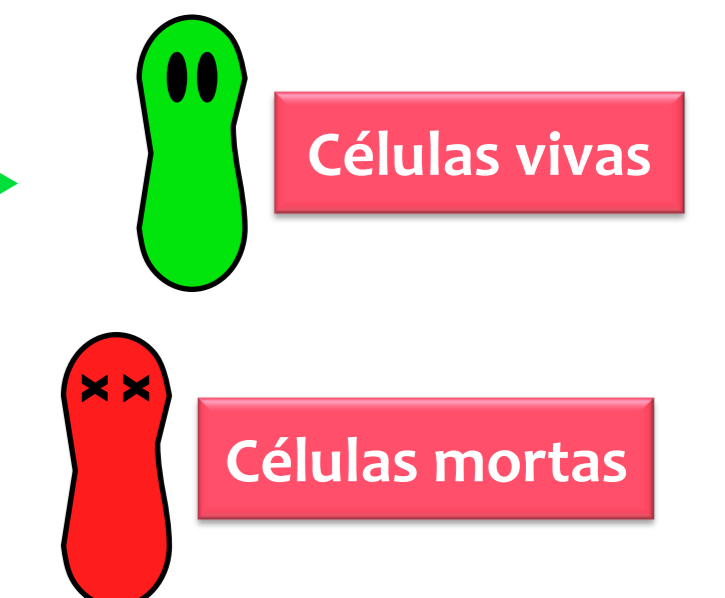


Figure 4: *P. acidipropionici* tratada com os corantes green-fluorescent SYTO[®] 9 e red-fluorescent propidium iodide

Transformação de *P. acidipropionici* por eletroporação (decaimento exponencial).



Resultados e Discussão

Construção de um Vetor de Transformação

Os produtos das reações de amplificação do double-joint PCR (fig. 5) e as análises de restrição dos plasmídeos pBKTg1 (fig. 6) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%.

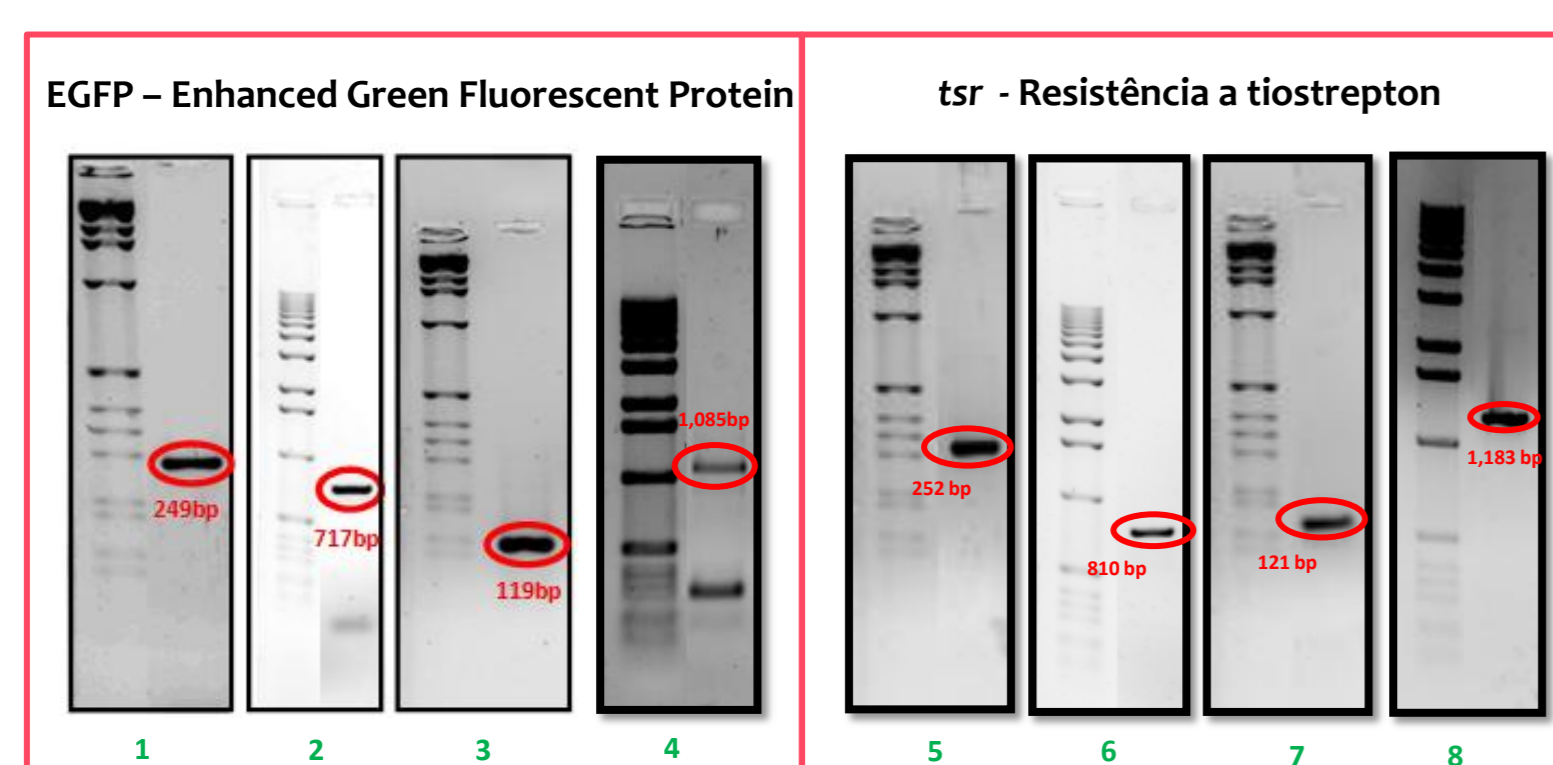


Figura 5: 1º e 3º round do double-joint PCR. Marcador de peso molecular (1 kb); EGFP - 1: Promotor metil-malonil-coA (MMCp) para EGFP, 2: gene EGFP, 3: terminador metil-malonil-coA (MMCT) para EGFP, 4: cassete promotor-EGFP-terminador; tsr - 5: MMCp para tsr, 6: gene tsr, 7: MMCT para tsr, 8: cassete promotor-tsr-terminador.

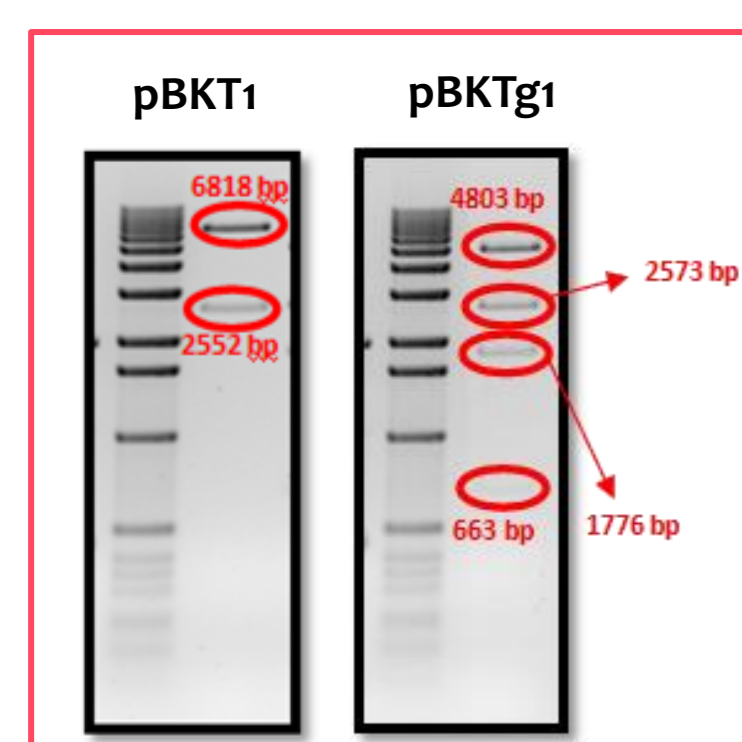


Figura 6: Vetores pBKT1, pBKTg1 confirmados por análise de restrição com as enzimas NheI e SacI respectivamente (Marcador de peso molecular - 1kb).

Curva de Crescimento

As curvas de crescimento iniciais de *P. acidipropionici* nas temperaturas selecionadas foram estabelecidas (gráfico 1).

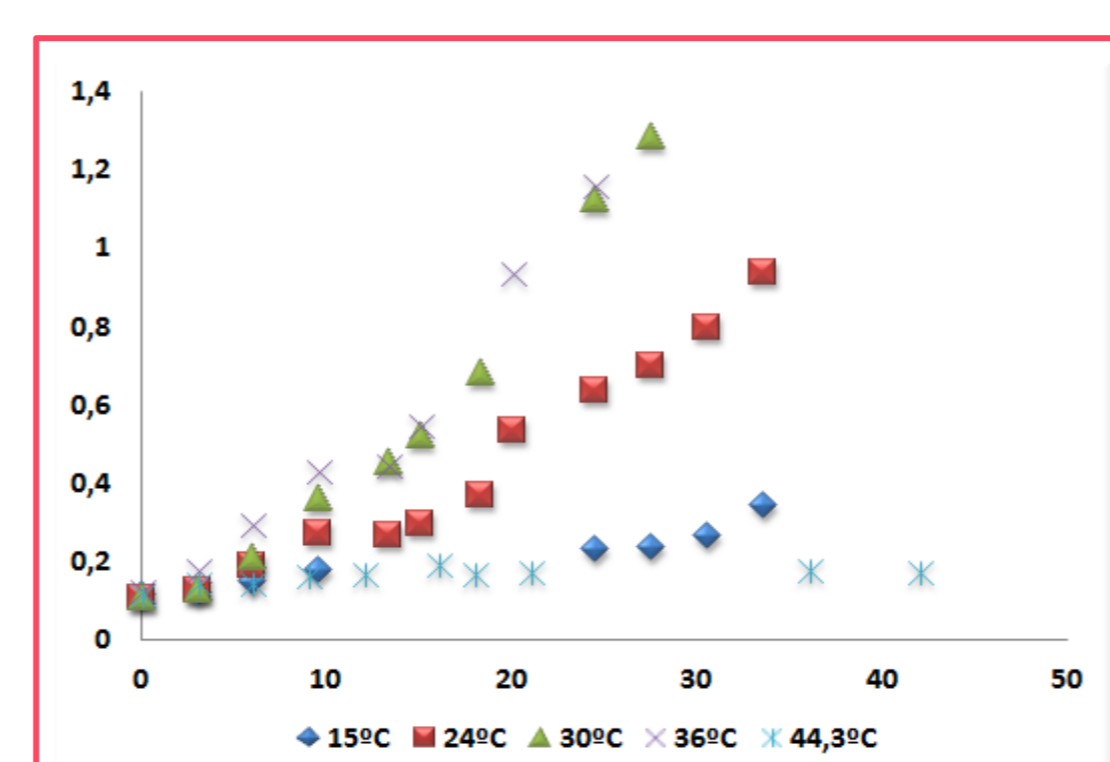


Gráfico 1: Curva de crescimento inicial de *P. acidipropionici*.

Como mostrado, a bactéria cresce bem às temperaturas de 30°C e a 36°C, mais devagar à 15,7°C e à 24°C e ela não cresce à 44,3°C.

Viabilidade Celular

Uma curva padrão relacionando viabilidade celular e a razão entre as fluorescências verde:vermelho (células vivas:mortas) foi estabelecida (gráfico 2).

A equação desta curva foi utilizada para determinar a viabilidade celular das amostras submetidas às diferentes condições de eletroporação (gráfico 3).

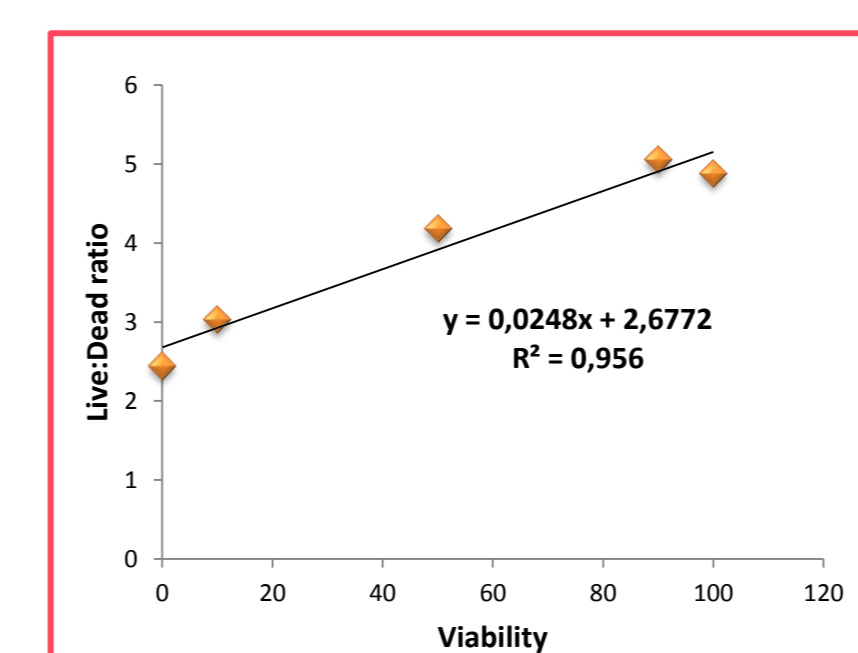


Gráfico 2: Curva padrão de viabilidade celular.

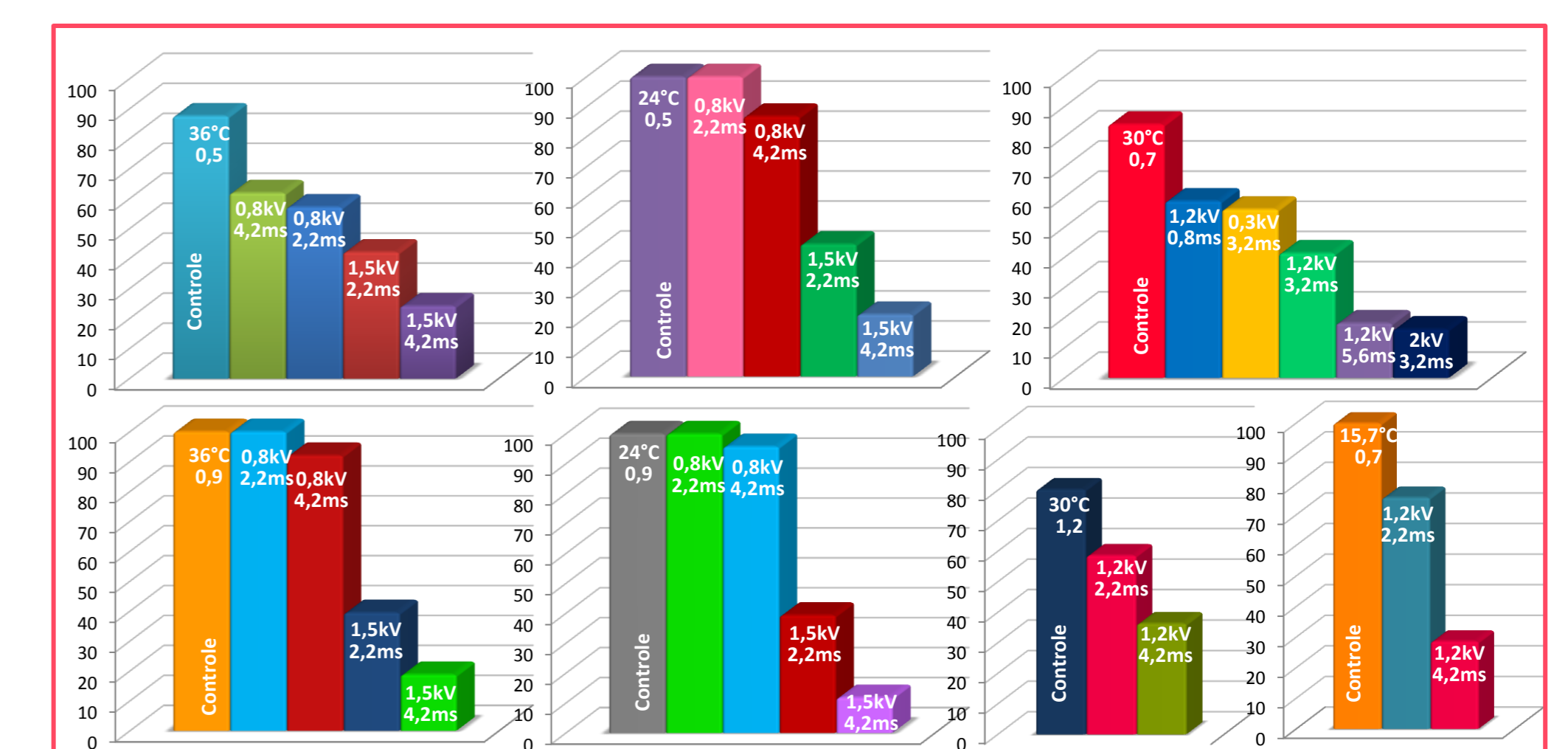


Gráfico 3: Viabilidade celular de *P. acidipropionici* submetidas a diferentes condições de eletroporação.

A viabilidade se mostrou inversamente proporcional a a tensão aplicada e a "time constant". Espera-se que condições que associem uma alta viabilidade e um potencial de membrana limiar (0,2-0,5V), que permite a formação de poros, devem ser as ótimas para eletroporação.

Transformação de *Propionibacterium acidipropionici*

Os testes de transformação estão sendo realizados e ao final deste projeto esperamos alcançar uma eficiência de 10⁴ transformantes/μg DNA. Para *E. coli* DH5, por exemplo, alcança-se uma eficiência de 1-3 x 10⁹ transformantes/μg DNA (pBR322)⁴.

Conclusão

A construção de um vetor de transformação está completa e um teste preliminar de viabilidade celular foi realizado, que servirá de base para a comparação com os resultados da transformação. Assim, o próximo passo será a otimização da transformação de *P. acidipropionici* através da variação de parâmetros que devem afetar a eficiência da eletroporação.

Referências

- Colomban, A.; Roger, L.; Boyaval, P. 1993. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration and cell recycling. *Biotechnology and Bioengineering* (42): 1091-1098.
- Yu et al. 2004. Double-joint PCR a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 973-981.
- Rodrigues, Maria Isabel; Iemma, Antonio Francisco. Planejamento de experimentos e otimização de processos. - 2ª. Ed. - Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.
- Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

Suporte Financeiro

