

INTRODUÇÃO

Propionibacterias e a produção de ácido propiônico

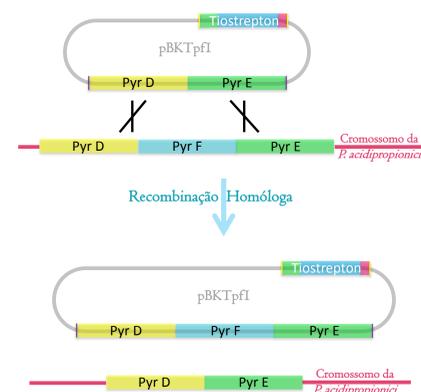
Atualmente, o ácido propiônico é produzido a partir do petróleo, mas dado o alto custo e os problemas ambientais relacionados a esta matéria prima, surge o interesse na produção de ácido propiônico a partir de processos microbiológicos usando matérias-primas renováveis e baratas. Neste contexto destacam-se as propionibacterias, bactérias gram-positivas e anaeróbias facultativas¹ amplamente estudadas para a produção de queijos, vitamina B₁₂ e ácido propiônico. Entretanto, os processos fermentativos para a produção de ácido propiônico não são viáveis comercialmente, uma vez que apresentam baixa produtividade e baixo rendimento. Deste modo, este trabalho visa o estudo de propionibactérias e o desenvolvimento de organismos capazes de produzir quantidades de ácido propiônico de uma forma economicamente competitiva. Para isso, o objetivo do estudo é a domesticação de espécies de *Propionibacterium* através do desenvolvimento de técnicas de manipulação genética e do estabelecimento de linhagens mutantes para o gene *pyrF*.

O gene *pyrF* como marcador de seleção

Para este estudo usou-se como marcador de seleção a deleção do gene *pyrF*, gene que codifica a enzima orotidine 5'-phosphate decarboxylase (OMP-dcase). Esta enzima realiza um passo essencial na via de pirimidina e converter o ácido 5'-fluoroorótico (5'-FOA) em um composto tóxico fazendo com que as células do tipo selvagem sejam mortas por 5'-FOA². A deleção do gene *pyrF* gera bactérias que são auxotróficas para uracil e resistentes a 5-FOA.

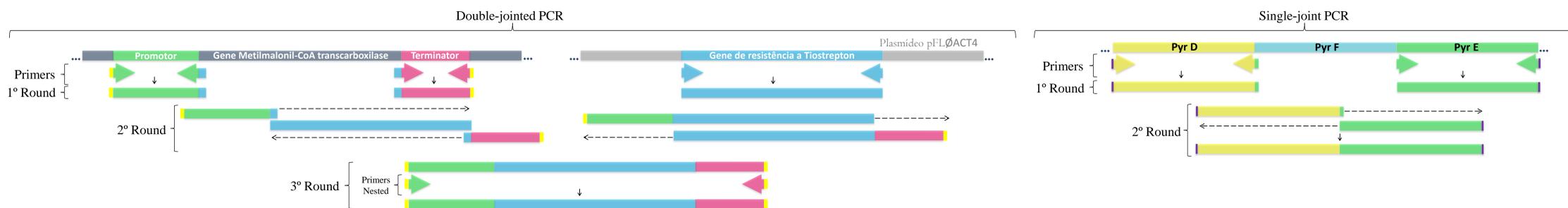
Ferramentas para a deleção

A deleção do gene *pyrF* foi feita usando duas ferramentas: os plasmídeos integrativos pBKTpf1 e pDH7, e o cassette simples fita contendo as regiões de homologia upstream e downstream do gene *pyrF*. A integração dos plasmídeos e do cassette é possível porque estes possuem uma região de homologia com o genoma da bactéria e, assim, por recombinação homóloga ocorre a perda do gene *pyrF*. O plasmídeo pDH7 apresenta, além da região de homologia, um fragmentos de DNA de fagos e não possui origem de replicação, fatores que ajudam na integração.

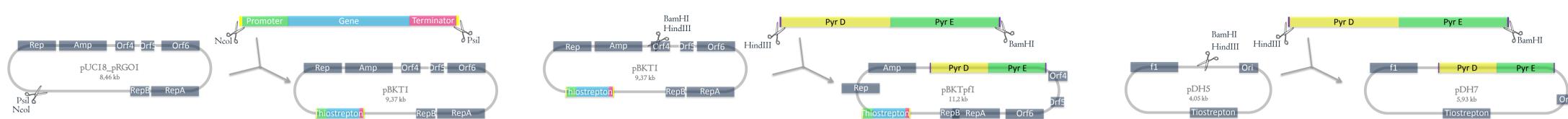


MATERIAIS E MÉTODOS

Ambas as ferramentas para a deleção do gene *pyrF* foram construídas com base nas técnicas Double-jointed PCR e Single-joint PCR³:



Após obtenção dos cassetes, estes foram digeridos e ligados aos plasmídeos:



Os plasmídeos construídos e o cassette de recombinação na forma de simples fita, foram eletroporados juntamente com células de *P. acidipropionici* (tempo~ 3 ms, pulso elétrico = 1.5kV, capacitância = 25Ω e resistência = ∞).

Para a obtenção de fragmentos simples fita, o cassette de recombinação foi amplificado por uma reação de PCR utilizando primers numa proporção de 5:50⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção dos cassetes

A formação do cassette de homologia foi feito através da técnica single-joint PCR³ e a confirmação das ampliações durante os rounds foi obtida através de corridas de eletroforese.

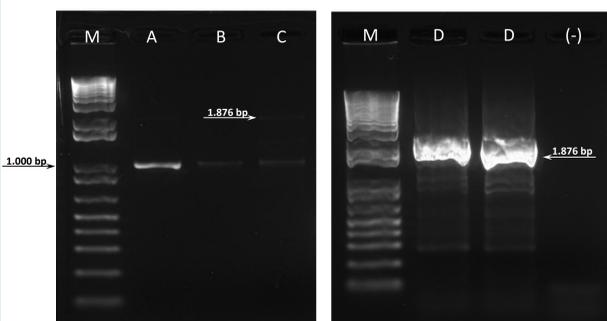
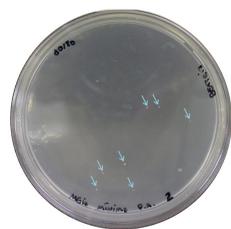


Figura 1. Primeiro, segundo e terceiro round da construção do cassette contendo as regiões de homologia upstream e downstream do gene *pyrF*. (M) Marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen). (A) Fragmento amplificado de 882 bp referente ao gene *pyrD*. (B) Fragmento amplificado de 994 bp referente ao gene *pyrE*. (C) Fragmento amplificado com 1876 bp obtido pelo segundo round. (D) Fragmento amplificado de 1876 bp obtido pelo terceiro round.

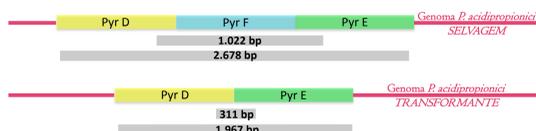
Determinação da composição do meio mínimo

Para a seleção dos transformantes em 5-FOA, faz-se necessário o crescimento das bactérias em meio mínimo. Assim, realizou-se um teste de variação de meio mínimo com o objetivo de encontrar o meio mais adequado para o crescimento. As variáveis escolhidas foram: diferentes fontes de nitrogênio, presença de fonte de fósforo, presença de vitaminas (tiamina, biotina e ácido pantotênico) e quantidade dos compostos. O crescimento da bactéria foi obtido após 8 dias no meio com maior disponibilidade de nitrogênio e em presença de vitaminas e sachês de anaerobiose.

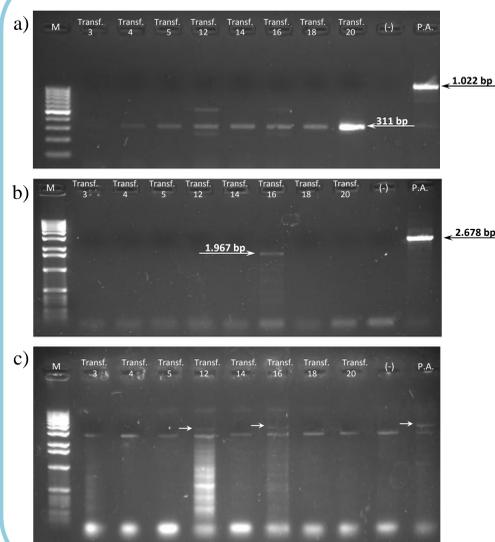


Transformação de Propionibacteria

O projeto acabou se focando na transformação de *P. acidipropionici* (P.A.) com o cassette de homologia simples-fita e com o plasmídeo pDH7. A confirmação dos possíveis recombinantes foi feita por reação de PCR, de modo que caso tenha ocorrido a recombinação, e a consequente deleção do gene *pyrF*, os fragmentos amplificados serão de menor tamanho:



RESULTADOS E DISCUSSÃO



A transformação com o plasmídeo pDH7, e o plaqueamento em meio mínimo com 5-FOA, gerou possíveis transformantes que foram verificados a partir de um PCR de colônia. Oito colônias foram selecionadas para ter seu DNA genômico extraído e a partir deste amplificou-se diferentes partes da região que contem os genes *pyr* com o intuito de confirmar a presença de reais transformante.

Além dessa reação de PCR, realizou-se a amplificação de uma região do plasmídeo pDH7. A ausência de bandas na corrida de eletroforese desta reação indicou que o plasmídeo foi perdido, o que condiz com o fato deste ser um plasmídeo suicida.

Por fim, foi realizada a amplificação do gene Metilmalonil-CoA carboxitransferase para confirmar a presença do genoma da P.A. nas colônias transformadas.

Figura 2. Confirmação dos transformantes. a) Amplificação da região adjacentes ao gene *pyrF*, no genoma da P.A. b) Amplificação da região referente aos genes *pyrD*, *pyrF* e *pyrE*, no genoma da P.A. c) Amplificação do gene Metilmalonil-CoA Carboxitransferase. (M) Marcador molecular 1kb (Invitrogen).

CONCLUSÃO

Esse projeto é essencial para a domesticação do gênero *Propionibacterium* e é a base para o desenvolvimento do estudo funcional dos genes relacionados com a via de produção de ácido propiônico. Até este momento resultados significativos foram obtidos com a construção do plasmídeo pDH7, do cassette de recombinação simples fita, da transformação com pDH7 e a definição do meio mínimo para a seleção de colônias transformantes.

A presença das bandas de 1967 bp e 311 bp e a ausência das bandas de 2678bp e 1022bp, indicam que o transformante 16 se trata de um real transformante. Além disso, o transformante 16 apresentou uma banda referente a amplificação do gene Metilmalonil-CoA Carboxitransferase.

BIBLIOGRAFIA

- Lewis PV, Yang ST (1992) Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 437-442.
- Boeke, J. D., LaCrute, F., and Fink, G. R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197, 345-346.
- Yu, J.H., Z. Hamari, K. H. Han, J.A. Seo, Y. Reyes Dominguez et al. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41: 973-981.
- Gyllenstein, U. B. & H. A. Erlich (1988) Generation of single stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA DQ locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7652-7658