

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

PRODUÇÃO OTIMIZADA DE BIOCELULOSE
UTILIZAÇÃO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE MICRO-ORGANISMOS

CAROLINA VÉSPOLI DE MELO

Araraquara

2014

PRODUÇÃO OTIMIZADA DE BIOCELULOSE
UTILIZAÇÃO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE MICRO-ORGANISMOS

CAROLINA VÉSPOLI DE MELO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro
(Orientador)

Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli
(Co-Orientador)

Araraquara

2014

Dedico este trabalho aos meus pais, que representam
o amor e o apoio incondicionais

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por ser o meu combustível.

Aos Professores Dr. Sidney José Lima Ribeiro, pela oportunidade da pesquisa científica acadêmica e singular generosidade; Dr. Cleslei Fernando Zanelli e Dr. Sandro Roberto Valentini, por possibilitarem a realização deste trabalho de colaboração. À Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira e Dra. Eliane Trovatti, pelos ensinamentos adquiridos.

Aos amigos Gisele Corcino, Carolina Giordano, Talita Bonato, Mariana Cabral, Evelin Lima, Alfredo de Souza, Patrícia Bento, Thaís Marino, Bárbara Kiyotani, Letícia Sato e Mariana Naomi pelas minhas melhores memórias araraquarenses.

À FCFAR, Instituto de Química, FAPESP, CNPq e PADC-UNESP pelo apoio institucional e financeiro.

**"a gratidão é a memória do coração"
(Antístenes)**

SUMÁRIO

RESUMO	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Celulose.....	13
1.2. Micro-organismos produtores de biocelulose.....	15
1.3. Biossíntese.....	16
1.4. Genes relacionados à biossíntese de celulose bacteriana.....	18
1.5. Fonte de nutrientes do micro-organismo e a biossíntese de CB.....	20
1.6. Aplicações da celulose bacteriana.....	21
2. OBJETIVO GERAL	23
2.1. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Micro-organismos utilizados.....	24
3.2. Extração de DNA cromossômico bacteriano.....	24
3.3. Amplificação por PCR dos genes alvo relacionados à produção de celulose.....	25
3.3.1. Clonagem dos genes alvo.....	25
3.3.2. Transformação bacteriana.....	27
3.3.3. Extração do DNA plasmidial contendo os genes clonados.....	28
3.4. Clonagem dos genes em vetor de expressão.....	30
3.4.1. Amplificação dos genes.....	30
3.4.2. Digestão dos elementos utilizados na clonagem.....	32

3.4.3. Reação de ligação entre fragmento gênico e vetor	32
3.4.4. Análise dos clones recombinantes	33
3.4.4.1. Extração plasmidial do DNA recombinante	33
3.5. Transformação do DNA plasmidial recombinante para <i>G. hansenii</i>	34
3.6. Teste de estabilidade plasmidial	35
3.7. Produção de celulose bacteriana	36
3.7.1. Determinação do número de células para a produção de celulose	36
3.7.2. Comparação da produção de celulose bacteriana	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Clonagem dos genes <i>cmcaX</i> e <i>ccpAx</i> de <i>G. hansenii</i>	40
4.2. Clonagem dos genes <i>cmcaX</i> e <i>ccpAx</i> em vetor de expressão	44
4.3. Estudos da superexpressão de <i>cmcaX</i> e <i>ccpAx</i> em <i>G. hansenii</i>	47
5. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
DADOS FINAIS	66

RESUMO

A celulose bacteriana ou biocelulose é produzida na superfície das células como mecanismo de proteção e sobrevivência do micro-organismo produtor, que tem essa característica por possuir genes responsáveis por codificar enzimas como celulose sintase (CS) e seu ativador alostérico, bem como produtos relacionados à montagem, cristalização e exportação do polímero. Tais genes estão localizados no operon da CS e nas regiões adjacentes a ele. O presente trabalho consistiu em empregar técnicas de Biologia Molecular como possíveis ferramentas de otimização da produção de celulose bacteriana (CB) pelo micro-organismo *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 e ATCC23760. Para tanto, foram construídas moléculas de DNA recombinante a partir de vetor de clonagem de ampla gama de hospedeiros e de genes envolvidos na via de produção de celulose. Uma vez obtidos os clones, estes foram introduzidos nos referidos micro-organismos mediante o método de eletroporação. A estabilidade do plasmídeo carregado pela bactéria foi confirmada durante o processo de biossíntese desde que o meio de cultivo contivesse antibiótico e, além disso, a produção de biocelulose foi comparada entre as diferentes bactérias, modificadas e não modificadas, cultivadas em diferentes meios de cultura. Desta forma, pela análise da massa seca de biocelulose produzida, procurou-se entender melhor a contribuição desses genes na produção celular de celulose bacteriana e obter uma melhor eficiência na síntese do polímero em *G. hansenii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da celulose	13
Figura 2: Montagem das microfibrilas de celulose por <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	14
Figura 3: Hidrogel de celulose obtido em meio de cultura estático	16
Figura 4: Via bioquímica da síntese de celulose	17
Figura 5: Formação de celulose bacteriana por <i>G. hansenii</i>	17
Figura 6: Região clonada e sequenciada do operon da celulose de <i>G. hansenii</i> ATCC23769	18
Figura 7: Teste de estabilidade plasmidial	36
Figura 8: Checagem da extração do DNA genômico de <i>G. hansenii</i> ATCC23769	41
Figura 9: Checagem do produto de PCR.....	41
Figura 10: Digestão com <i>Bam</i> HI confirmando a presença do inserto nos clones analisados	42
Figura 11: Vetor pBBR122	44
Figura 12: Clonagem dos genes da região <i>upstream</i> em pBBR122.....	46
Figura 13: Produção comparativa entre as linhagens de <i>G. hansenii</i> ATCC23769 selvagem, modificada com os genes da região <i>upstream</i> e portando o vetor pBBR122 vazio, cultivadas em diferentes meios de cultura	51
Figura 14: Produção comparativa entre as linhagens de <i>G. hansenii</i> ATCC23760 selvagem, modificada com os genes da região <i>upstream</i> e portando o vetor pBBR122 vazio, cultivadas em diferentes meios de cultura.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR para a utilização em vetor de clonagem.....	26
Tabela 2: Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento	30
Tabela 3: Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a utilização em vetor de expressão	31
Tabela 4: Composição dos meios de cultura utilizados para a produção de celulose bacteriana.....	37
Tabela 5: Taxa de estabilidade plasmidial em <i>G. hansenii</i> ATCC23769 carreadora de pBBR122 vazio ou contendo os genes da região <i>upstream</i>	48
Tabela 6: Taxa de estabilidade plasmidial em <i>G. hansenii</i> ATCC23760 carreadora de pBBR122 vazio ou contendo os genes da região <i>upstream</i>	49
Tabela 7: Características dos pré-inóculos cultivados para comparação da produção de celulose bacteriana.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

v/v	relação volume/volume
rpm	rotações por minuto
x g	aceleração gravitacional
pH	potencial hidrogeniônico
U	unidade de atividade enzimática
nt	nucleotídeos
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
pb	pares de base
kb	kilobase
DNA	ácido desoxirribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
16S	subunidade ribossomal 16S
dNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
c-di-GMP	monofosfato cíclico de guanosina
Ces	celulose sintase
AxCeS	<i>Acetobacter xylinum cellulose synthase</i>
acs	<i>Acetobacter xylinum cellulose- synthesizing</i>
bcs	<i>bacterial cellulose synthase</i>

CMCax	enzima endo- β -1,4 glucanase de <i>Acetobacter xylinum</i>
CcpAx	<i>cellulose complementing protein of Acetobacter xylinum</i>
bglxA	gene da beta-glicosidase de <i>Acetobacter xylinum</i>
CB	celulose bacteriana
UDP	uridina difosfato
TC	complexo terminal
CmR	gene de resistência ao cloranfenicol
KanR	gene de resistência à canamicina
EC	<i>Enzyme Commission (Number)</i>
LEDs	<i>Light Emitting Diodes</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Tm	temperatura de <i>melting</i>
Blastn	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
L	<i>Ladder</i>
IS	Inserção de Sequência
ANOVA	análise de variância
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético

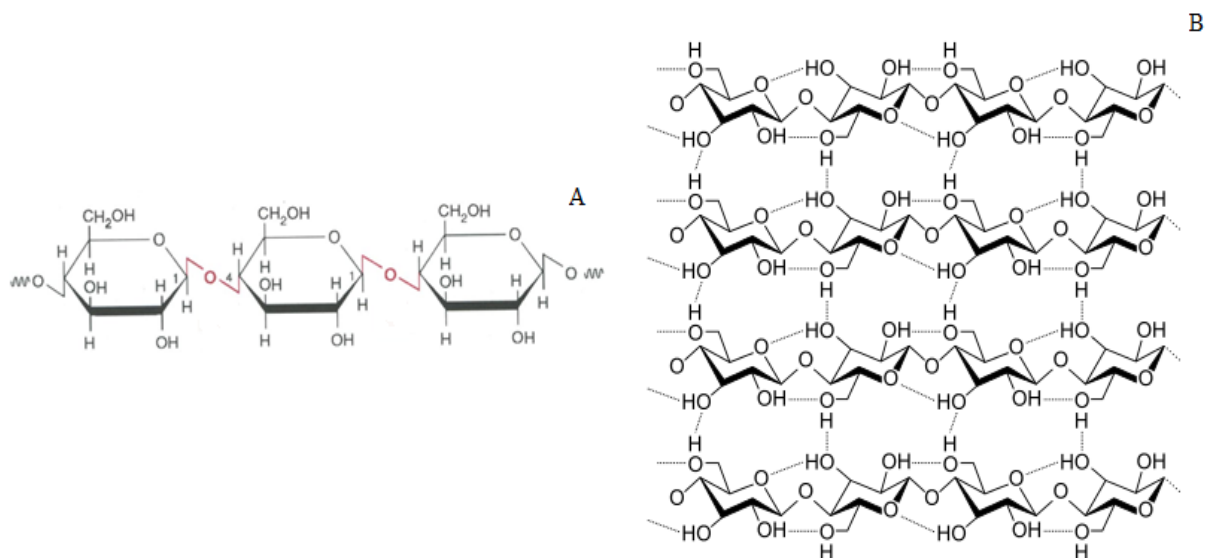
LB	Luria-Bertani
HS	Hestrin e Schramm
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo
IPTG	isopropil-tio- β -galactosídeo
EL	extrato de levedura
BSA	soroalbumina bovina
HiDi	<i>highly deionized</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Celulose

A celulose é um dos principais constituintes da parede celular das plantas, que ainda possuem outros biopolímeros como pectina, lignina e hemiceluloses (SILVA *et al.*, 2009). Por outro lado, a celulose também pode ser sintetizada por uma grande variedade de organismos vivos, como, por exemplo, algumas bactérias, algas marinhas, musgos e por animais como os tunicados. Até mesmo a mais antiga forma de vida na Terra, representada pelas cianobactérias, é hábil para sintetizar celulose (BROWN, 2004). Na literatura, esta celulose especificamente produzida por bactérias é conhecida como biocelulose ou celulose bacteriana (CB).

Figura 1: Estrutura química da celulose.

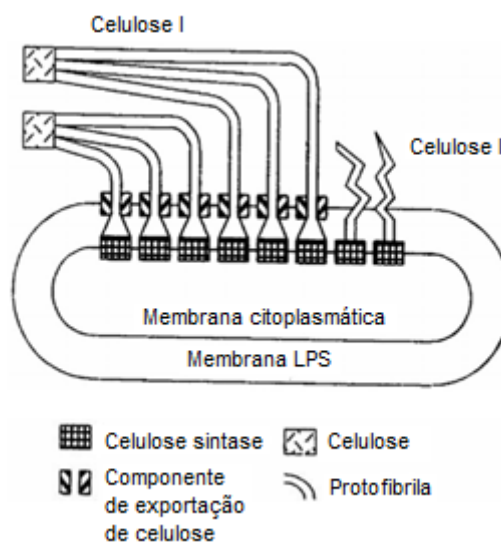


A) celulose, com destaque em vermelho para as ligações β -1,4 glicosídicas B) cadeias de celulose, com as ligações de hidrogênio representadas em linhas tracejadas. **Fonte:** <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos.html>>; <http://en.wikibooks.org/wiki/Principles_of_Biochemistry/The_Carbohydrates:_Monosaccharides,_Disaccharides_and_Polysaccharides>

O biopolímero em questão é um homopolissacarídeo extracelular composto por monômeros de *D*-glicose sob a forma de anéis piranosídicos conectados por ligações glicosídicas na conformação β -1,4 (Figura 1A). A geometria espacial desse arranjo covalente não-ramificado origina estruturas fibrilares estendidas, enquanto os grupos hidroxila disponíveis sobre as cadeias glicosídicas adjacientemente alinhadas fazem ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (Figura 1B). Dessa forma, formam-se agregados organizados em camadas e reforçados por forças de dispersão entre seus anéis heterocíclicos empilhados (BLACKWELL, 1982; FINCH, 1985).

A bactéria *Gluconacetobacter hansenii* produz duas formas cristalinas de celulose: celulose I, o polímero *ribbon-like*, e celulose II, um polímero amorfo termodinamicamente mais estável, cujas montagens fora da membrana citoplasmática são diferentes (YU e ATALLA, 1996), conforme ilustra a Figura 2:

Figura 2: Montagem das microfibrilas de celulose por *Gluconacetobacter xylinus*, adaptado.



Fonte: IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000.

A CB apresenta propriedades diferenciadas da celulose de origem vegetal. Possui maior pureza, grau de polimerização e índice de cristalinidade, além de maior resistência à tração e capacidade de retenção de água (superior a cem vezes por massa) (SHODA e SUGANO, 2005). Fibrilas de celulose bacteriana são cerca de cem vezes mais finas do que as de celulose vegetal, tornando-se um material altamente poroso, com poros de 0,1 a 10 μm (CZAJA *et al.*, 2006).

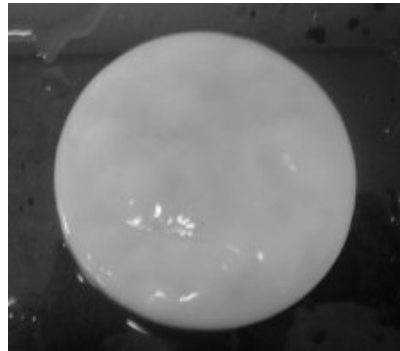
1.2. Micro-organismos produtores de biocelulose

Várias espécies de bactérias produzem celulose, como as do gênero *Gluconacetobacter* (anteriormente denominado *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Salmonella* (SHODA e SUGANO, 2005).

Um estudo utilizando sequenciamento gênico da subunidade 16S de rRNA demonstrou similaridade genética de 98,1 a 99,9% entre as cepas das espécies *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) e *Gluconacetobacter hansenii* (LISDIYANTI *et al.*, 2006), podendo, assim, serem consideradas como a mesma espécie.

Os produtores mais efetivos são *Gluconacetobacter pasteurianus* (22% do total da massa celular seca corresponde a celulose) e *G. hansenii* (20,21%). No entanto, *G. hansenii* é a fonte de celulose bacteriana mais comumente estudada devido à sua capacidade de produzir níveis relativamente altos de polímero a partir de uma ampla gama de fontes de carbono e nitrogênio (BIELECKI *et al.*, 2005). A produção de celulose por *G. hansenii*, um bastonete Gram-negativo e aeróbico, foi primeiramente relatada em 1886 (BROWN, 1886) e ocorre na forma de mantas (hidrogéis) (Figura 3) constituídos por fitas extracelulares entrelaçadas (PURI, 1984).

Figura 3: Hidrogel de celulose obtido em meio de cultura estático.



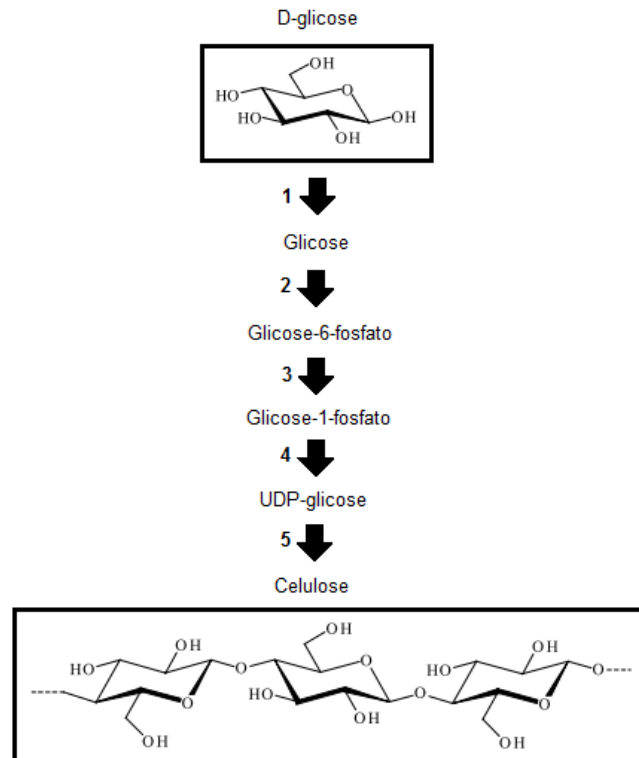
Fonte: KIM, CAI e CHEN, 2009.

1.3. Biossíntese

A formação de celulose inclui cinco etapas fundamentais mediadas por enzimas: a transformação de glicose a UDP-glicose via glicose-6-fosfato e glicose-1-fosfato, e a adição de UDP-glicose, pela celulose sintase (EC 2.4.1.29), considerada essencial no processo de síntese, ao final de uma cadeia polimérica em crescimento (Figura 4) (KLEMM *et al.*, 2001).

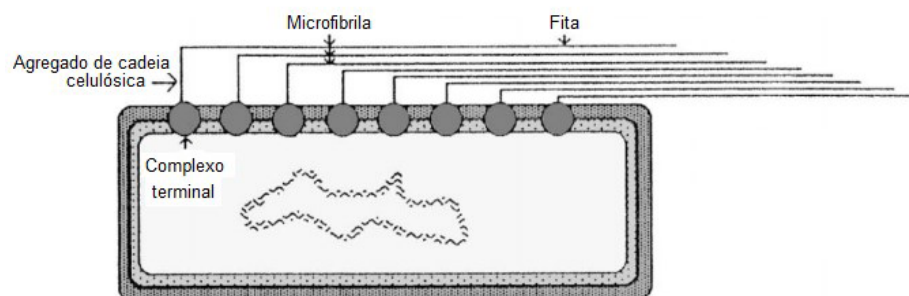
G. hansenii sintetiza celulose entre o meio extracelular e sua membrana citoplasmática. Na superfície da bactéria, há poros aos quais estão associados os complexos terminais (TC; complexos sintetizadores de celulose), dispostos linearmente. Na primeira etapa de formação de celulose, nestes complexos são originados agregados de cadeias celulósicas, presentes na célula como fibrilas elementares. Estas, por sua vez, são agregadas na segunda etapa para formar microfibrilas e, na terceira etapa, de modo a formar fitas (Figura 5). A matriz de fitas entrelaçadas constitui a membrana de celulose bacteriana, que protege a célula de efeitos letais da radiação ultravioleta, retém umidade prevenindo a dessecação e mantém a bactéria no ambiente aeróbico (KLEMM *et al.*, 2001).

Figura 4: Via bioquímica da síntese de celulose.



1 = glicose permease (EC 2.7.1.69), 2 = glicoquinase (EC 2.7.1.2), 3 = fosfoglicomutase (EC 5.4.2.2), 4 = UDP-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9), 5 = celulose sintase.

Figura 5: Formação de celulose bacteriana por *G. hansenii*, adaptado.



Fonte: BROWN, 1992.

1.4. Genes relacionados à biossíntese de celulose bacteriana

Em 1990, foi realizado o isolamento do operon codificador de quatro proteínas requeridas na biossíntese de CB em *G. hansenii*. Demonstrou-se, de diferentes maneiras, que os respectivos genes do operon da celulose sintase, denominados *bcsA*, *bcsB*, *bcsC* e *bcsD*, eram, em conjunto, necessários para a máxima produção de celulose (WONG *et al.*, 1990). Pesquisas conseguintes permitiram conhecer funcionalmente estes genes; ademais, novas regiões foram identificadas como relevantes na biossíntese de CB (Figura 6). Posteriormente, o DNA genômico total de *G. hansenii* ATCC23769 e ATCC53582 foi isolado e os genes relacionados à produção de celulose, sequenciados (KAWANO, TAJIMA, UEMORI, *et al.*, 2002).

Figura 6: Região clonada e sequenciada do operon da celulose de *G. hansenii* ATCC23769.



A localização dos genes *cmcax*, *ccpAx*, *acsAB*, *acsC*, *acsD* e *bglxA* estão demonstradas. (a) indica a região do operon da celulose sintase, adaptado. **Fonte:** KAWANO, TAJIMA, UEMORI, *et al.*, 2002.

A partir destes estudos, foram identificados dois genes relacionados à síntese de CB, posicionados na região *upstream* do operon:

- *cmcax*: codifica a enzima endo- β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4), responsável pela atividade de hidrólise da celulose, essencial para a produção de CB, ativando-a (TONOUCHI *et al.*, 1995; KOO *et al.*, 1998; KAWANO, TAJIMA, KONO, *et al.*, 2002). O papel real da

proteína CMCax permanece desconhecido, porém sugere-se que a mesma influencie na montagem das fibras de celulose (KAWANO *et al.*, 2005);

- *ccpAx*: é sugerido que seu produto, *celulose complementing protein*, esteja envolvido na cristalização e produção das microfibrilas de CB (NAKAI *et al.*, 2002).

Um terceiro gene, também relacionado, encontra-se na região *downstream* do operon:

- *bglxA*: codifica a enzima β -glicosidase (EC 3.2.1.21), que catalisa a reação de hidrólise de β -oligossacarídeos e a reação inversa de condensação (Kono *et al.*, 1999). A enzima não é essencial para a produção de CB, mas a interrupção deste gene causa um decréscimo desta (KAWANO, TAJIMA, UEMORI, *et al.*, 2002).

O próprio operon, ilustrado na Figura 6, por sua vez, é constituído pelos seguintes genes:

- *bcs* ou *acsAB*, *acsC* e *acsD*: subunidades do operon da celulose sintase em *G. hansenii* (ou denominação geral dos genes do operon de celulose bacteriana). O gene *bcsA* codifica a enzima celulose sintase, enquanto *bcsB* codifica a proteína de ligação a c-di-GMP, ativadora alostérica da celulose sintase (ROSS, MAYER E BENZIMAN, 1991); presume-se que a proteína codificada por *bcsC* seja requerida na exportação da celulose na membrana da célula (BROWN, 2004), devido ao fato de induzir a formação de poros nesta (KAWANO *et al.*, 2008). Já o gene *bcsD* codifica uma proteína que desempenha papel importante na cristalização da celulose (BROWN, 2004).

Micro-organismos que sofreram mutagênese com etilmetanosulfonato e, dessa forma, alterações nos genes *bcsA*, *B*, *C* e *D*, apresentaram diminuição ou interrupção da biossíntese de celulose, o que também ocorreu quando o promotor deste operon foi substituído por um promotor *lac* ou *tac* em *Escherichia coli*. Constatou-se, assim, que o operon *bcs* é limitante para a síntese de CB (WONG *et al.*, 1990). Por outro lado, o estudo de Standal *et al.* (1994) mostrou

que um mutante de *G. hansenii* não produtor de celulose foi complementado pela inserção do gene *cmcax* que estava anteriormente interrompido, o que resultou na produção de atividade celulolítica em *E. coli*, propriedade iminente deste gene, que, portanto, tornou-se funcional.

1.5. Fonte de nutrientes do micro-organismo e a biossíntese de CB

Estudos avaliando alterações nas condições de crescimento dos micro-organismos produtores indicaram aumento na síntese do polímero como consequência da modificação da composição do meio de cultura. Como exemplo, o emprego de frutose - considerada o açúcar de melhor rendimento para produção de celulose (TARR e HIBBERT, 1931; RAO, 1957) -, em uma concentração de 7%, gerou um rendimento de celulose produzida por *G. hansenii* de 7,38 g/L, enquanto a glicose na mesma concentração, resultou em 1,0 g/L (EMBUSCADO *et al.*, 1994). Melhor rendimento também foi observado estudando-se a acidificação de um meio de cultura basal contendo sacarose, no qual o pH 4,5 foi estabelecido, resultando em um rendimento de celulose produzida por *G. hansenii* de cerca de 11,0 g/L, sendo de 6 g/L em pH 5,5 e ausência de produção em pH 3,5 (EMBUSCADO *et al.*, 1994). O glicerol, como fonte única de carbono para *G. hansenii*, gerou rendimento de 14,7 g/mol C, 2,38 vezes maior em comparação com o da glicose (ZHONG *et al.*, 2013); já a adição de lactato a meios basais resultou em um aumento da produção de celulose por *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* de 4 a 5 vezes, e o aminoácido metionina demonstrou, sozinho, o mesmo rendimento de celulose do que 14 outros aminoácidos juntos, demonstrando ser importante na produção de celulose por este micro-organismo (MATSUOKA *et al.*, 1996).

1.6. Aplicações da celulose bacteriana

As características diferenciadas e controláveis que a CB pode apresentar fazem com que o campo de aplicação para este material seja muito abrangente, incluindo as indústrias têxtil, alimentar, farmacêutica, de papel, tratamento de resíduos, radiodifusão, mineração e refinaria (LEGGE, 1990; SHAH e BROWN, 2005; CZAJA *et al.*, 2006).

No campo da Medicina, a CB vem sendo utilizada com grande sucesso como substituta temporária da pele e curativo no tratamento de feridas. De fato, a estrutura de rede tridimensional nanométrica formada pelas fibrilas de celulose faz com que o material seja permeável a gases e não a micropartículas, o que a torna uma importante barreira física contra qualquer infecção externa. Além disso, a CB pode atuar como agente para liberação controlada de antibióticos ou outras classes de medicamentos, satisfazendo, assim, os requisitos da moderna abordagem sobre materiais curativos (CZAJA *et al.*, 2006). As brasileiras Bionext e Fibrocel e a americana Xylos Corp são exemplos de empresas que lançaram produtos baseados nessa proposta (BARUD, 2010). Em outra abordagem, um grupo alemão criou o BASYC[®] (Bacterial Synthetised Cellulose), que consiste em um biomaterial tubular destinado a aplicações em microcirurgias de artérias e veias (KLEMM *et al.*, 2001).

A CB também tem sido um importante material para aplicações no setor cosmético, como é o caso das máscaras faciais. A NanoMasque[®] pode ser produzida partindo-se do hidrogel de CB pura, ou impregnada com substâncias ativas como extratos de plantas, extratos de algas, óleos essenciais, pantenol, etc.. Os aditivos ligam-se à matriz celulósica por meio de ligações de hidrogênio, sendo essas ligações suficientemente seletivas para aprisionar as substâncias na matriz, assim como manter sua difusão na pele durante a aplicação (CZAJA *et al.*, 2006).

No Laboratório de Materiais Fotônicos (LAMF) do Instituto de Química da UNESP, a CB vem sendo estudada há anos, o que resultou em produtividade científica elevada, envolvendo trabalhos publicados, dissertações, teses e patentes, relacionados a aplicações da CB que vão desde a opto-eletrônica como substratos para os chamados LEDs orgânicos até a preparação de materiais aplicáveis em restauração óssea.

Desta forma, são cientificamente importantes estudos que considerem a melhoria da produção bacteriana tanto em rendimento quanto em qualidade. Neste trabalho, a proposta de combinação entre a modificação das condições de cultivo do micro-organismo produtor com as técnicas de clonagem e expressão funcional de genes da via biossintética de CB foi utilizada como ferramenta para avaliar o aumento da eficiência de produção de celulose em *G. hansenii*.

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetiva estudar a produção de biocelulose, com o propósito de aumentar a quantidade de massa seca produzida pelo micro-organismo *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 e ATCC23760, por meio da superexpressão dos genes *cmcaX* e *ccpAx*, em diferentes meios de cultura.

2.1. Objetivos específicos

- clonagem dos genes da região *upstream* ao operon da celulose sintase, *cmcaX* e *ccpAx*;
- clonagem dos referidos genes em vetor de expressão pBBR122;
- avaliação da estabilidade do vetor de expressão ao longo do tempo de produção de celulose bacteriana;
- verificação da massa seca de celulose obtida pelas diferentes linhagens em diferentes meios de cultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Micro-organismos utilizados

As linhagens do micro-organismo *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 e ATCC23760 foram gentilmente doadas pela Fundação André Tosello, sendo que ambas foram mantidas em meio de Hestrin e Schramm (HS; glicose 2%, ágar 2%, extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, ácido cítrico 0,115%, fosfato de sódio dibásico anidro 0,27%, pH 5,0) (SCHRAMM e HESTRIN, 1954) pH 5,0, repicados semanalmente com auxílio de uma alça de platina previamente flambada, incubados por 48 h a 25 °C e em seguida, mantidos sob conservação a 4° C até o próximo repasse em placa.

3.2. Extração de DNA cromossômico bacteriano

O micro-organismo *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 foi inoculado em meio HS e incubado a 25 °C *overnight*. Deste material, foi obtido o *pellet*, que foi ressuscitado em vórtex com 500 µL de tampão TAS (Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M, NaCl 1 M), centrifugado a velocidade de 12.000 rpm por 1 min e ressuscitado no mesmo tampão para adição de 4 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 50 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10%. A lise foi realizada misturando o material por inversão e com incubação a 50 °C por 1 h. Posteriormente, a suspensão foi purificada com 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (PCI; 25:24:1, v/v), centrifugada por 3 min a 12.000 rpm, sendo que a fração superior aquosa foi recuperada. Este procedimento foi repetido duas vezes. O material foi mantido em gelo por 30 min e centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. O *pellet* resultante foi lavado com 500 µL de etanol 70%, seco e ressuscitado em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0).

O material resultante foi checado por meio de eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

3.3. Amplificação por PCR dos genes alvo relacionados à produção de celulose

3.3.1. Clonagem dos genes alvo

O DNA genômico isolado de *G. hansenii* foi utilizado como molde para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos genes da região *upstream* do operon da celulose sintase, utilizando oligonucleotídeos iniciadores especificamente desenhados a partir da sequência que está no GenBank sob número de acesso M96060.1. Para a amplificação dessa região gênica, foi utilizada a enzima Platinum[®] Pfx polimerase (Invitrogen), 2,5 U/µL, 3 µL do tampão da enzima (10 X), 1,5 µL de *enhancer* (10 X), 0,6 µL de MgSO₄ 50 mM, 0,6 µL de dNTP 10 mM e 0,4 µL de DNA genômico, completando a reação para um volume de 30 µL com água purificada. As condições da reação foram: *hot start* de 94 °C por 5 min, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 47 °C por 45 s, polimerização por 3 min, a 68 °C e extensão final também a 68 °C, durante 5 min. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). O produto de PCR resultante foi visualizado por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na clonagem descrita e suas principais características estão apresentadas na Tabela 1.

Após a amplificação dos genes da região *upstream* ao operon da celulose sintase a partir do DNA genômico da bactéria, o fragmento foi purificado aplicando-se 30 µL de produto

de PCR em gel de agarose 0,8% e extraindo-se a banda de interesse com auxílio do kit “Qiaquick Gel Extraction” (Qiagen). O fragmento com o tamanho de interesse (em número de

Tabela 1: Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR para a utilização em vetor de clonagem.

Sequência	Tipo	Tamanho*	Tm (°C)	Região de amplificação
5'-CGTTCCTTTATGTCGGTCATGGC-3'	<i>forward</i>	23	70,1	<i>cmcaX</i> e <i>ccpAx</i>
5'-CGGTCGCCTGAATATAGG-3'	<i>reverse</i>	18	60,7	

* = tamanho em número de nucleotídeos (nt).

pares de base, pb) observado no gel de agarose foi recortado com uma lâmina de bisturi previamente limpa e colocado em tubo de centrífuga de 1,5 mL, em que foram adicionados 3 volumes de tampão QG para cada volume de gel (100 mg ~100 µL). O tubo foi incubado a 50 °C em bloco de aquecimento até que o gel dissolvesse completamente (cerca de 10 min). Após a dissolução, foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3 M, pH 4,8 e o conteúdo foi homogeneizado; em seguida, foi adicionado um volume de isopropanol absoluto relativo ao volume de gel e a solução foi transferida para uma coluna de purificação acoplada a um tubo coletor e centrifugada por 1 min a máxima velocidade. O filtrado foi descartado e, para lavagem, foram adicionados 750 µL de tampão PE, contendo etanol, na coluna, sendo que o tubo foi centrifugado por 1 min a máxima velocidade novamente. O filtrado foi descartado e, após nova centrifugação, a coluna foi transferida para um tubo de centrífuga de 1,5 mL, em que foram adicionados 30 µL de tampão de eluição EB.

Para aumento da eficiência de ligação inserto-vetor, foi realizada uma reação de ciclagem para incorporação de adenosina nas extremidades 3' dos fragmentos gerados na PCR.

Para tanto, a reação foi realizada com 25 µL do fragmento purificado, 1,5 µL de dATP (10 mM), 5 µL de tampão 10 X (Tris-HCl 100 mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 200 mM e Tween[®] 20 0,1% (v/v)), 4 µL de MgCl₂ (25 mM) e 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (2,5 U/µL) e água purificada suficiente para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 72 °C por 30 min e purificada com o auxílio do kit “Qiaquick PCR Purification kit” (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante, que consiste, primeiramente, em adicionar 1 volume de tampão de ligação (100 mg ~100 µL) para cada volume de produto de reação e misturar o conteúdo por pipetagem. Em seguida, foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3 M, pH 4,8 à solução, que foi novamente misturada, transferida para uma coluna de purificação e centrifugada durante 1 min à velocidade de 13.000 rpm. O filtrado foi descartado e 700 µL de tampão de lavagem foram adicionados à coluna, que foi novamente centrifugada, e o filtrado, descartado. 1 min adicional de centrifugação foi procedido para remoção residual do tampão de lavagem e, por fim, 30 µL de tampão de eluição foram adicionados à coluna, que foi acoplada a um tubo de 1,5 mL e centrifugada.

Uma vez purificado e ciclado, o fragmento foi ligado ao vetor de clonagem pTZ57R/T (vetor de clonagem tipo TA), do kit “Instaclone™ PCR Cloning” (Fermentas) seguindo-se o protocolo do fabricante. Para tanto, em um tubo de 600 µL, foram adicionados 3 µL do vetor pTZ57R/T (55 ng/µL), 12 µL do inserto (19,48 ng/µL), 6 µL do tampão de ligação (5 X), 1 µL da enzima T4 DNA ligase (5 U/µL) e água suficiente para um volume final de 30 µL. A reação foi incubada em banho a 16 °C, *overnight*.

3.3.2. Transformação bacteriana

Esse procedimento foi realizado com *Escherichia coli* (DH10B) ultracompetente. O produto da reação de ligação dos genes da região *upstream* com o vetor pTZ57R/T foi incubado

por 30 min em banho de gelo com adição de uma solução composta por KCl 1 M, CaCl₂ 0,3 M, MgCl₂ 0,5 M e polietilenoglicol 10% e, posteriormente, por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram recuperadas com incubação em 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) por 50 min a 37 °C, sob agitação. O inóculo transformado foi plaqueado homoganeamente em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina, 40 µL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) 20 mg/µL e 40 µL de IPTG (isopropil-tio-β-galactosídeo; 100 mM), incubando-se as placas a 37 °C, *overnight*.

3.3.3. Extração do DNA plasmidial contendo os genes clonados

O DNA plasmidial formado pela ligação entre o vetor de clonagem e os genes relacionados à síntese de celulose foi extraído com o kit “Qiaprep Miniprep” (Qiagen). Para tanto, as células bacterianas de 3,0 mL de cultura em meio contendo ampicilina, incubadas *overnight*, foram decantadas em uma centrífuga de mesa (Eppendorf – 5415D) a 16.100 x g por 1 min. O *pellet* foi ressuspendido em 250 µL de tampão P1 contendo RNase; depois foram adicionados 250 µL de tampão de lise P2, o microtubo foi gentilmente invertido por 4 a 6 vezes e foram adicionados 350 µL de tampão de neutralização N3. Repetiu-se a homogeneização por inversão e o microtubo foi centrifugado a 16.100 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna Qiaprep acoplada sobre um tubo coletor e centrifugado por 1 min a 16.100 x g. O filtrado foi descartado, a coluna foi lavada com 750 µL de tampão de lavagem PE e submetida a nova centrifugação, repetindo-se a mesma por 1 min para remoção de resíduos do tampão de lavagem. A coluna foi transferida para um tubo de centrífuga; foram adicionados 30 µL do tampão de eluição EB; a coluna incubada à temperatura ambiente por 1 min e depois centrifugada por 1 min a 16.100 x g para eluição do DNA plasmidial.

Para verificar a presença do gene da região *upstream* ligado ao vetor pTZ57R/T, foi realizada a digestão com a enzima de restrição *Bam*HI (1 U/uL; Fast Digest, Fermentas). Em um tubo de 600 μ L foram adicionados 1 μ L de tampão da enzima (10 X), 0,5 μ L de enzima, DNA plasmidial (~1 μ g) e água purificada suficiente para 10 μ L. A reação foi incubada a 37 °C por 30 min e os resultados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL).

Para confirmar a identidade do fragmento clonado, foi realizado um sequenciamento de nucleotídeos de acordo com o método de Sanger. Para as reações de PCR foi utilizado o kit “Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems). Na reação, foram misturados 1 μ L de mix Big Dye[®], 3,5 μ L do tampão de sequenciamento (5 X), 1 μ L de oligonucleotídeos iniciadores (3,2 μ M) M13 *forward* ou *reverse* (Tabela 2), 4 μ L do DNA plasmidial (100 ng/ μ L) de pTZ57R/T contendo o fragmento e água purificada suficiente para 20 μ L. As condições de amplificação foram: *hot start* de 96 °C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 43 °C por 5 s, 60 °C por 4 min e extensão final de 60 °C por 5 min.

Após a amplificação, as amostras foram purificadas e, para tanto, aos microtubos contendo as reações de PCR foram adicionados 2 μ L de EDTA 125 mM, 2 μ L de acetato de sódio 3 M e 50 μ L de etanol 100%. Os microtubos foram misturados por inversão 4 vezes e incubados à temperatura ambiente por 15 min ao abrigo da luz. Em seguida, foi feita a centrifugação por 30 min, 3.000 \times g, a 4 °C, inversão dos recipientes imediatamente, de modo a descartar o sobrenadante, e, posteriormente, uma nova centrifugação, até atingir 185 \times g. Foram adicionados 70 μ L de etanol aos microtubos, centrifugando a 1.650 \times g por 15 min a 4 °C. Depois, o sobrenadante foi descartado, os tubos foram centrifugados novamente por 1 min a 185 \times g e secos no concentrador SpeedVac (Eppendorf) por 30 min, a 60 °C. As amostras foram ressuspendidas em 10 μ L de formamida HiDi, vortexadas vigorosamente, centrifugadas a 200 \times g por 2 min, incubadas a 95 °C por 5 min para desnaturação do DNA e, finalmente, transferidas

imediatamente para o gelo, no qual permaneceram por 2 min até sua aplicação. O sequenciamento automático foi realizado em sequenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Tabela 2: Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento.

Sequência	Tipo	Tamanho*	Tm (°C)	Região de amplificação
5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	<i>M13</i> <i>forward</i>	17	52 °C	<i>cmcaX</i> e <i>ccpAx</i>
5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	<i>M13</i> <i>reverse</i>	17	50 °C	

* = tamanho em número de nucleotídeos (nt).

A identidade dos produtos de PCR clonados e sequenciados foi confirmada utilizando a ferramenta Blastn (Basic Local Alignment Search Tool), comparando-se as sequências obtidas com as depositadas no GenBank (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

3.4. Clonagem dos genes em vetor de expressão

3.4.1. Amplificação dos genes

Posteriormente, o fragmento clonado contendo os dois genes foi amplificado com oligonucleotídeos contendo a enzima de restrição *NotI* na sequência *forward*, enquanto a sequência *reverse* foi desenhada sem sítio de restrição, de modo a gerar um fragmento com extremidade cega para a reação de ligação com o vetor (Tabela 3).

Com o DNA plasmidial como molde, a reação e as condições empregadas na PCR foram: 0,24 µL da enzima Platinum® *Pfx* polimerase (Invitrogen), 2,5 U/µL, 3 µL do tampão da enzima (10 X), 3,0 µL de *enhancer* (10 X), 0,6 µL de MgSO₄ 50 mM, 0,6 µL de dNTP 10 mM e 0,4 µL de DNA plasmidial, completando a reação para um volume de 30 µL com água purificada. As condições da reação foram: *hot start* de 94 °C por 5 min, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 49 °C por 45 s, polimerização por 3 min a 68 °C e extensão final também a 68 °C durante 5 min. O produto de PCR resultante foi visualizado por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A purificação do DNA foi realizada a partir da aplicação de 30 µL de produto de PCR em gel de agarose 0,8% e extração da banda de interesse com auxílio do kit “Qiaquick Gel Extraction” (Qiagen), conforme já descrito no item 3.3.1.

Tabela 3: Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a utilização em vetor de expressão.

Sequência	Tipo	Tamanho*	T _m (°C)	Região de amplificação
5'-ATAAGAATGCGGCCGCGACGTTCTTTATGTCGGTCATG-3'	<i>forward</i>	40	85,8	<i>cmca</i> e
5'-CGGTCGCCTGAATATAGG-3'	<i>reverse</i>	18	60,7	<i>ccpAx</i>

*= tamanho em número de nucleotídeos (nt). A região sublinhada corresponde ao sítio de reconhecimento da enzima de restrição *NotI* no oligonucleotídeo *forward*.

3.4.2. Digestão dos elementos utilizados na clonagem

Os genes clonados da região *upstream* bem como o vetor pBBR122 (MobiTec) foram submetidos à reação de digestão com endonucleases de restrição. Para isso, em um tubo de 600

μL , foram adicionados DNA plasmidial ($\sim 2 \mu\text{g}$), $0,6 \mu\text{L}$ de enzima de restrição *DraI* (20.000 U/mL, New England Biolabs), $0,6 \mu\text{L}$ de enzima de restrição *NotI* (10 U/ μL , New England Biolabs), $2 \mu\text{L}$ de tampão da enzima (10 X), $2 \mu\text{L}$ de solução de soroalbumina bovina (BSA; 10 mg/mL) e água purificada suficiente para completar o volume de $20 \mu\text{L}$. Em outro tubo, foram adicionados o inserto ($\sim 2 \mu\text{g}$), $0,6 \mu\text{L}$ de enzima de restrição *NotI*, $2 \mu\text{L}$ de tampão da enzima (10 X), $2 \mu\text{L}$ de BSA (10 mg/mL) e água purificada suficiente para completar o volume de $20 \mu\text{L}$. Ambas reações foram incubadas em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h. Posteriormente, o produto da digestão do vetor plasmidial foi purificado de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.1; o inserto digerido foi purificado pelo uso do kit “Qiaquick PCR Purification kit” (Qiagen), descrito no mesmo item.

3.4.3. Reação de ligação entre fragmento gênico e vetor

O fragmento dos genes clonados da região *upstream* ao operon foi ligado ao vetor pBBR122, em um tubo de $600 \mu\text{L}$, ao qual foram adicionados $2,0 \mu\text{L}$ de vetor digerido ($7,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$), $10 \mu\text{L}$ de inserto digerido ($8,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$), $2 \mu\text{L}$ de tampão de ligação (10 X), $1 \mu\text{L}$ de enzima T4 DNA ligase ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$) e água suficiente para um volume final de $20 \mu\text{L}$.

As reações foram incubadas em banho a $16 \text{ }^\circ\text{C}$ *overnight* e depois submetidas à transformação por choque térmico em *E. coli* (linhagem DH10B) ultracompetente, como já descrito, e foram inoculadas em meio LB sólido contendo canamicina ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$).

3.4.4. Análise dos clones recombinantes

3.4.4.1. Extração plasmidial do DNA recombinante

As células bacterianas de *E. coli* contendo o plasmídeo recombinado foram inoculadas em 50 mL de meio LB com o antibiótico canamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C durante 12 h sob agitação constante (~300 rpm). As células foram centrifugadas a 4.000 x g por 10 min a 4 °C. Em seguida, foram lavadas com 20 mL de tampão fosfato salino (PBS; 80% NaCl, 2% KCl, 14,4% Na₂PO₄ e 2,4% KH₂PO₄) gelado e centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente; depois, o *pellet* foi ressuscitado em 8,0 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) contendo 100 µg/mL de RNase A. Posteriormente, foram adicionados 4,0 mL de tampão de lise (dodecilsulfato de sódio 1% e NaOH 0,2 M) à suspensão, que foi misturada por inversão de 4 a 6 vezes e incubada a temperatura ambiente por 5 min. O produto resultante foi adicionado de 4,0 mL de acetato de potássio (3 M; pH 5,5), e misturado por inversão novamente. Seguiu-se com a centrifugação a 17.000 x g por 30 min a 4 °C; o sobrenadante foi removido para um novo recipiente, adicionado de igual volume de isopropanol e incubado a -20 °C durante 30 min. Este produto foi centrifugado a 6.000 x g por 30 min, o *pellet* lavado com 1,0 mL de etanol 75%, ressuscitado em 0,4 mL de TE e transferido para um tubo de 2,0 mL, ao qual foram adicionados 10 µL de RNase A (10 mg/mL). O tubo foi incubado durante 1 h a -20 °C, adicionado de 0,4 mL de PCI (25:24:1, v/v), agitado duas vezes por 20 s com intervalo de 1 min em gelo e centrifugado durante 5 min a 12.000 x g. A fase superior resultante foi transferida para um novo tubo, e o processo anterior foi repetido. Posteriormente, a fase superior foi transferida para outro tubo, seu volume foi medido e o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3 M para concentração final de 0,3 M. Foi adicionado três vezes o volume de amostra de etanol absoluto ao tubo, que foi incubado a -20 °C durante 30

min. O tubo foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 min alternadamente com duas lavagens do *pellet*, utilizando 1,0 mL de etanol (75%). A amostra foi seca *overnight* e o *pellet* ressuspensionado em seguida em 50 μ L de TE.

3.5. Transformação do DNA plasmidial recombinante para *G. hansenii*

Para verificar a eficácia do processo de clonagem, isto é, confirmar a ligação do inserto ao vetor pBBR122, foi realizado o método de diagnóstico de restrição por digestão plasmidial dos clones obtidos nas transformações utilizando as enzimas *EcoRV* (20.000 U/mL; New England Biolabs) e *NotI* (10 U/uL; New England Biolabs). Em um tubo de 600 μ L, foram adicionados 1 μ L de tampão da enzima (10 X), 1,0 μ L de BSA (10 mg/mL), 0,3 μ L de cada enzima, DNA plasmidial ($\sim 1 \mu$ g) e água purificada suficiente para 10 μ L. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 min e os resultados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). Após a confirmação da ligação, um clone positivo foi escolhido aleatoriamente para ser transformado em *G. hansenii* ATCC23769 e ATCC23760 eletrocompetentes. Para isso, foram adicionados 4 μ L de vetor em 40 μ L de micro-organismo, sendo que as células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (0,1 cm) e depois submetidas a um pulso elétrico de 1,5 kV, 200 Ω e 25 μ F. Após o pulso, foi adicionado 1 mL de meio HS na cubeta para remoção das células, que foram recuperadas em um tubo de 2,0 mL durante 3 h, sob agitação a 25 °C. As células foram plaqueadas em meio HS ágar contendo canamicina (50 μ g/mL) e incubadas durante 48 h a 25 °C. Este mesmo procedimento foi efetuado com os referidos micro-organismos e o vetor pBBR122 vazio, para controle negativo dos estudos posteriores.

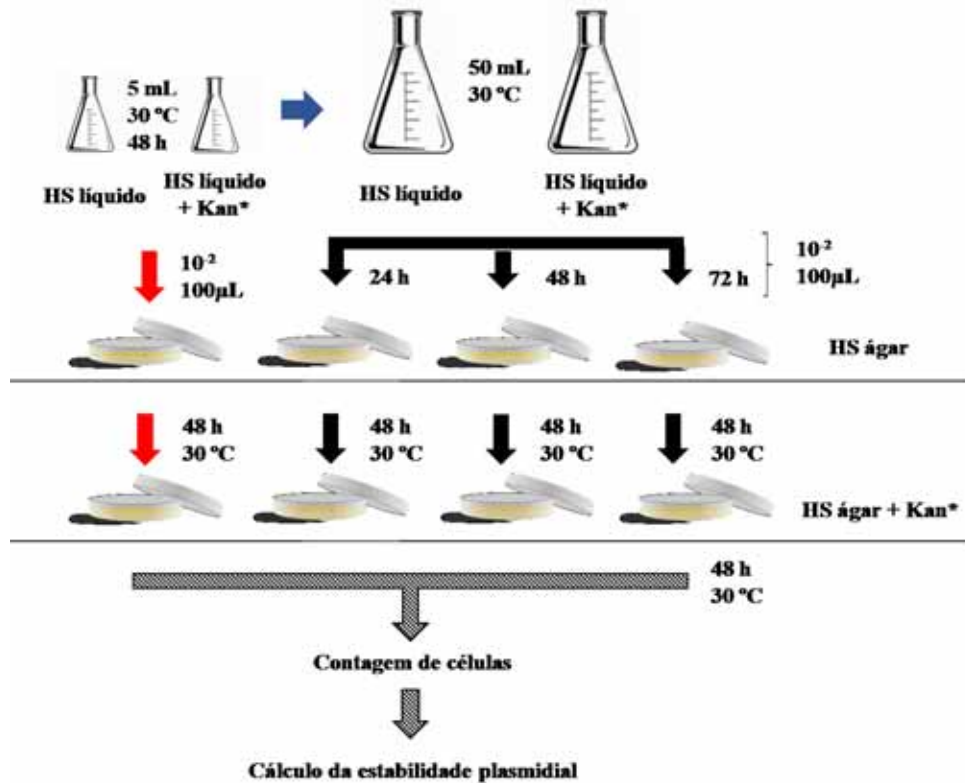
3.6. Teste de estabilidade plasmidial

A estabilidade plasmidial foi realizada com os clones de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 e ATCC23760 portando o vetor pBBR122 contendo os genes *cmcaX* e *ccpAx*, e com o vetor vazio, tendo como base os estudos de Gupta *et al.* (2001) e Gahan *et al.* (2007), com algumas modificações. A partir de uma alçada do micro-organismo, cultivado em meio HS ágar com canamicina (50 µg/mL) a 30 °C durante 48 h, foram preparados, para cada estudo, um pré-inóculo líquido de 5 mL deste mesmo meio de cultura, contendo e não contendo canamicina, tendo sido ambos incubados a 30 °C durante 48 h em condições estáticas. Em seguida, o volume dos inóculos foi completado para 50 mL, com meio HS adequado, sendo mantidos durante as mesmas condições descritas durante 72 h.

Partindo-se de uma alíquota de 20 µL de cada pré-inóculo, foram feitas, em triplicata, diluições 1:100 (v/v), com salina tampão fosfato (PBS; 1 X), das quais 100 µL foram plaqueados em meio HS ágar e submetidos à incubação a 30 °C por 48 h. Após este período, foi realizado o repique de 100 colônias de micro-organismos em meio HS ágar contendo canamicina (50 µg/mL) para verificação da taxa de manutenção plasmidial. Todas essas etapas foram realizadas da mesma maneira com as alíquotas dos inóculos de 50 mL após 24, 48 e 72 h de incubação.

A quantidade de colônias que demonstrou crescimento após o repique no meio ágar contendo antibiótico foi contabilizada em relação às 100 colônias iniciais, provenientes daquele sem o antibiótico. Uma média das triplicatas de cada experimento foi calculada, gerando a taxa de estabilidade plasmidial (%). A Figura 7 representa as etapas deste experimento.

Figura 7: Teste de estabilidade plasmidial.



*Kan = meio de cultura contendo canamicina (50 µg/mL). As setas vermelhas indicam o procedimento realizado com os pré-inóculos de 5 mL; a seta azul, a ação de completar os volumes dos pré-inóculos para 50 mL, após 48 h de incubação dos mesmos a 30°C; as setas pretas, os repiques realizados após 24, 48 e 72 h após os volumes terem sido completados, e as setas hachuradas são representativas das etapas de contagem do número de células e cálculo da estabilidade plasmidial, etapas estas realizadas nas placas de repique de 100 colônias em HS ágar contendo antibiótico, após sua incubação de 48 h a 30 °C. As diluições realizadas com as alíquotas dos inóculos foram de 10^{-2} sendo plaqueados 100 µL da diluição.

3.7. Produção de celulose bacteriana

3.7.1. Determinação do número de células para a produção de celulose

Para a quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por volume (mL) dos diferentes meios de cultura e linhagens empregados neste estudo, foram realizados inóculos de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 e ATCC23760 selvagem e contendo o vetor pBBR122 ligado com os genes *cmcaX* e *ccpAx*. Uma alçada dos micro-organismos cultivados

previamente em meio HS ágar com ou sem canamicina (50 µg/mL) foi inoculada em 5 mL dos meios de cultura I, II, III e IV, cuja composição está descrita na Tabela 4.

Tabela 4: Composição dos meios de cultura utilizados para a produção de celulose bacteriana.

Meio I	Meio II	Meio III	Meio IV
Glicose 2%	Glicose 2%	Frutose 2%	Glicose 5%
EL 0,5%	EL 0,5%	EL 0,5%	EL 0,4%
Peptona 0,5%	Peptona 0,5%	Peptona 0,5%	MgSO ₄ 0,073%
Ácido cítrico 0,115%	Ácido cítrico 0,115%	Ácido cítrico 0,115%	KH ₂ PO ₄ 0,2%
Na ₂ HPO ₄ 0,27%	Na ₂ HPO ₄ 0,27%	Na ₂ HPO ₄ 0,27%	Etanol 2%
pH 5,0	pH 5,8	pH 5,0	pH 5,65

EL = extrato de levedura. Os destaques em negrito demonstram as principais diferenças entre os constituintes de cada meio.

Os inóculos foram incubados a 30 °C, durante 48 h. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000 com PBS (1 X), das quais foram coletados 100 µL para plaqueamento em meio HS ágar contendo ou não canamicina. Repetidas as condições de incubação, foram contabilizadas as colônias em cada diluição, prosseguido-se com o seguinte cálculo:

$$C \times D \times V = \text{UFC/mL, onde:}$$

C = quantidade de colônias em cada placa, D = correção da diluição empregada e V = correção, para 1 mL, do volume de diluição plaqueado.

Posteriormente, foi obtida a quantidade média de micro-organismos em cada caso.

Foram preparados novos inóculos nas mesmas condições anteriormente descritas, sendo que os valores de densidade óptica foram medidos em espectrofotômetro (DU[®] 800, Beckman Coulter) e empregados na equação de Lambert-Beer:

$$\text{Abs} = a.b.c$$

onde: a = absorvidade molar = 1 (específico para cada amostra, desconsiderado no cálculo);
 b = largura da cubeta = 1 cm e c = UFC/mL. Portanto:

$$\text{Abs} = c = \text{UFC/mL}$$

Considerando o número de micro-organismos constante para o início da produção de celulose, obteve-se, ao final:

$$\text{Volume (mL)} = 1/\text{Abs}$$

Uma vez conhecidos os valores dos volumes, foi possível calcular a quantidade de micro-organismos neles existente, baseando-se na concentração média de micro-organismos (UFC/mL) e, dessa forma, obter os valores dos inóculos contendo 10^5 UFC, necessárias para iniciar a produção de celulose.

3.7.2. Comparação da produção de celulose bacteriana

A comparação da produção de CB foi estudada entre as linhagens de *G. hansenii* ATCC2379 e ATCC23760 selvagens e transformadas com o vetor pBBR122 contendo os genes

envolvidos na biossíntese do polímero. Foram preparados, em triplicata, pré-inóculos a partir de micro-organismos cultivados em meio HS ágar contendo ou não canamicina, a 30 °C, durante 48 h, nos meios líquidos I, II, III ou IV. Os volumes dos pré-inóculos contendo a mesma quantidade de micro-organismos entre si, da ordem de grandeza 10^5 , foram completados para 50 mL de meio de cultura em frascos erlenmeyer de 250 mL e submetidos à incubação em estufa a 30 °C durante 96 h.

A celulose bacteriana formada foi filtrada com o auxílio de papéis de filtro tarados em funil de Büchner sob vácuo. Após a filtração, os papéis foram secos em estufa a 30 °C durante 24 h, e em seguida pesados para conhecimento da massa seca de celulose bacteriana produzida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido às suas peculiares propriedades estruturais, físico-químicas e mecânicas, a celulose bacteriana constitui um material biocompatível de notável emprego em um variado campo de aplicações, como na indústria médica e de alimentos, desempenhando papel de precursora de uma série de produtos. Por este motivo, no campo científico, há uma busca recorrente de otimização da produção deste material, no sentido de aproveitar, com melhores rendimentos, os nutrientes disponíveis para o micro-organismo produtor, como também explorar suas características gênicas, manipulando-as na tentativa de aumentar a biossíntese do polímero.

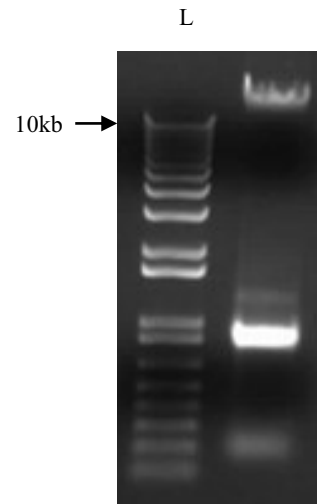
4.1. Clonagem dos genes *cmcax* e *ccpAx* de *G. hansenii*

O DNA genômico de *G. hansenii* ATCC23769 obtido na extração descrita anteriormente no item 3.2 está ilustrado na Figura 8. A banda superior a 10 kb indica a presença deste material devido à sua estrutura de grande tamanho.

A reação de PCR contendo como material de partida o DNA genômico de *G. hansenii* para amplificação da região *upstream* ao operon da celulose sintase resultou na obtenção de mais de um fragmento, de diferentes tamanhos, os quais podem ser observados na Figura 9A, sendo necessária a purificação apenas da banda de interesse de 2.120 pb, referente aos genes *cmcax* e *ccpAx*, cuja purificação está ilustrada na Figura 9B.

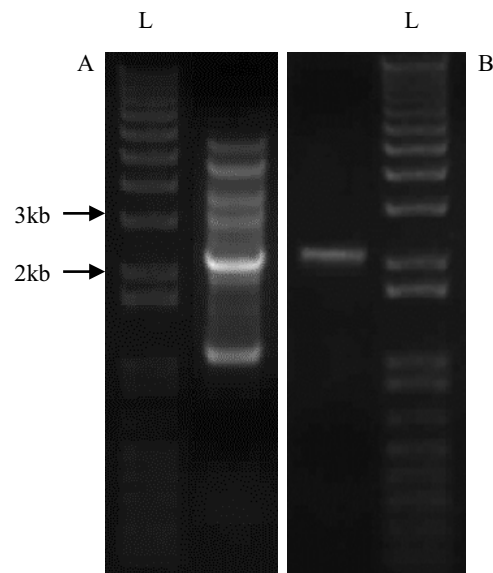
Posteriormente à ligação dos genes da região *upstream* ao vetor de clonagem e introdução do produto resultante em *E. coli*, foi verificada a eficácia do processo de clonagem. Para isso, foi realizado o diagnóstico de restrição de clones recombinantes obtidos na transformação bacteriana utilizando o vetor pTZ57R/T ligado aos genes *cmcax* e *ccpAx*.

Figura 8: Checagem da extração do DNA genômico de *G. hansenii* ATCC23769.



L = Ladder 1 kb, Life Technologies.

Figura 9: Checagem do produto de PCR.

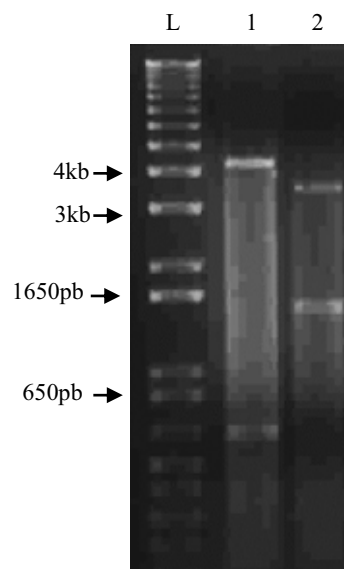


A) fragmento de DNA de interesse (genes *cmcax* e *ccpAx*) situado entre 2 e 3 kb, podendo ser visualizadas outras bandas B) banda resultante de extração em gel de agarose (L = Ladder 1 kb, Life Technologies).

A Figura 10 representa o resultado positivo da reação de digestão utilizando a endonuclease de restrição *Bam*HI, que clivou o inserto na posição 1.487 e o vetor, na posição

654. A presença do inserto foi confirmada por dois clones, sendo que após a digestão um deles gerou fragmentos de 624 pb e 4.382 pb (este correspondente ao vetor, de 2.886 pb, e à porção do inserto ligada a este, de 1.496 pb); enquanto o outro, por um fragmento de cerca de 1.650 pb e 3.356 pb (correspondente ao vetor, de 2.886 pb, mais a porção do inserto ligada a este, de 470 pb).

Figura 10: Digestão com *Bam*HI confirmando a presença do inserto nos clones analisados.



Os clones apresentam bandas de ~4,4 kb e 624 pb (indicado por 1) ou ~3,4 kb e 1.650 pb (indicado por 2) (L = Ladder 1kb, Life Technologies).

Uma vez identificados os clones contendo o inserto, foi realizado o sequenciamento dos genes clonados. Após análise das sequências obtidas e comparação com o banco de dados utilizando a ferramenta Blastn, verificou-se que o fragmento inserido no vetor plasmidial demonstrou alinhamento com os genes *cmcax* e *ccpAx* de *G. hansenii* ATCC23769, localizados na região *upstream* ao operon da celulose sintase, com mais de 98% de identidade e cobertura entre as sequências. Os resultados do sequenciamento significam, portanto, que a clonagem desses dois genes-chave para a biossíntese de celulose foi bem sucedida.

O gene *cmcax* codifica a enzima β -1,4-endoglucanase, com capacidade celulolítica, a qual possui evidenciada importância no processo de síntese de celulose bacteriana, uma vez que

em sua ausência, o micro-organismo fica impossibilitado de produzi-la. Koo *et al.* clonaram o referido gene, que foi carregado em um vetor introduzido em *E. coli* e, a partir da indução da expressão gênica, foi obtida a proteína CMCax, com a qual seu anticorpo foi produzido. A adição do anticorpo ao meio de cultura resultou em ausência de produção de celulose bacteriana por *G. hansenni* ATCC23769, pois provavelmente houve um sequestro da endoglucanase. Isso demonstra que a proteína exerce um papel essencial na produção de celulose, o que reforça, dessa forma, a importância do gene *cmcax* nesse processo.

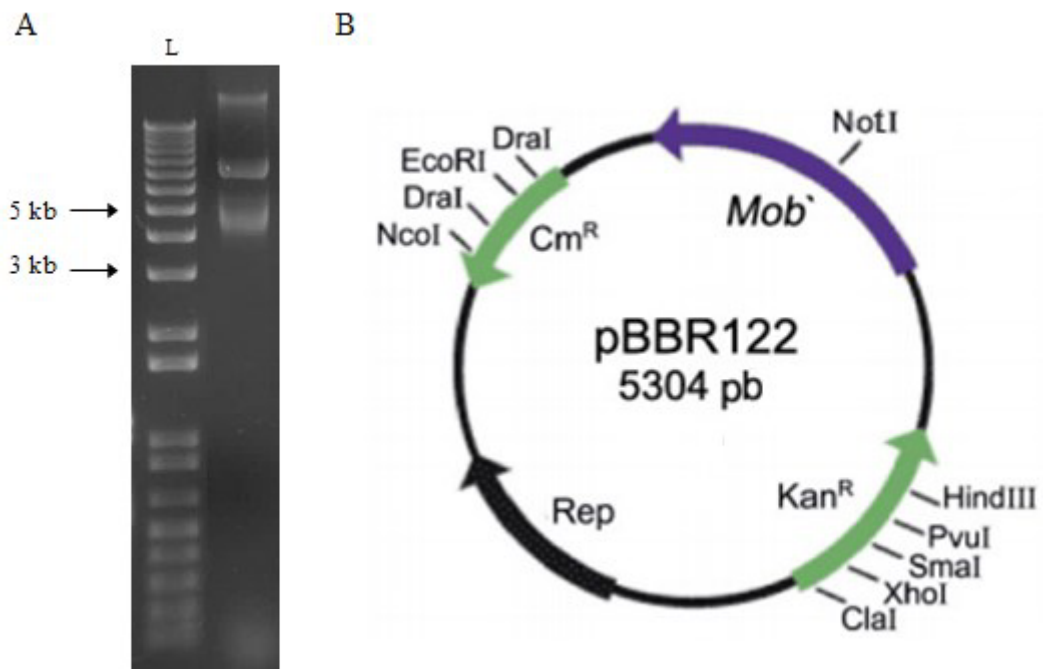
Mutações espontâneas em bactérias acetoácidas, como *G. hansenni*, são associadas com o comprometimento de propriedades morfológicas e fisiológicas, incluindo a produção de celulose. Neste contexto, foram descobertos, a 0,5 kb anteriores ao gene codificador da celulose sintase, dois elementos de inserção de sequência (IS) em mutantes de *G. hansenni* ATCC23769 não produtores de CB. Esses elementos são conhecidos por inativação dos genes onde são inseridos, logo, sua presença nessa região prejudicou a função de genes da região *upstream* e, por consequência, a síntese de celulose pela bactéria (COUCHERON, 1991). Posteriormente, um estudo que sequenciou a região em que ocorreu tal inserção revelou na mesma a existência da região codificadora relativa à proteína CMCax (STANDAL *et al.*, 1994).

O gene *ccpAx* é conhecido por estar envolvido na produção de celulose por espécies do gênero *Gluconacetobacter*, embora suas funções específicas permaneçam desconhecidas. Porém, um estudo sugere que a proteína CcpAx exerça papel como constituinte do complexo terminal (TC) em *G. hansenii*, uma vez que, com o uso de diferentes técnicas, observou-se que a localização de AxCeSD (considerado membro do complexo da celulose sintase, TC, e também como subunidade codificada pelo operon *Ces*) e CcpAx é similar, sendo que esta está situada longitudinalmente com um dos lados na membrana celular; além disso, ambos interagem entre si. Estas informações levam a crer que, uma vez considerada a relação entre CcpAx e o complexo terminal, envolvido na exportação de celulose na membrana da célula bacteriana, o

gene *ccpAx* possui função relevante neste processo, podendo estimular a formação das fibras de celulose.

4.2. Clonagem dos genes *cmcax* e *ccpAx* em vetor de expressão

Figura 11: Vetor pBBR122.



A) As bandas visualizadas em gel de agarose, correspondentes ao vetor pBBR122, extraído de células de *E. coli*, representam suas diferentes conformações (L = Ladder 1 kb, Life Technologies). B) Mapa do vetor pBBR122. As enzimas utilizadas para sua linearização foram *NotI*, cujo sítio de restrição está situado na posição 323 e *DraI*, nas posições 4.361 e 4.700. Cm^R = gene de resistência ao cloranfenicol; Kan^R = gene de resistência à canamicina; Rep = gene envolvido na replicação do vetor; Mob' = mutação *frame shift*.

Finalizada a etapa inicial de obtenção dos genes da região *upstream* ao operon da celulose, os experimentos foram prosseguidos com o objetivo de clonar os mesmos genes em um vetor que proporcionasse a sua expressão em linhagens de *G. hansenii*. Para isto, foi escolhido o vetor de expressão pBBR122 (Figura 11B), pela sua facilidade de mudança de hospedeiro, outro além de *E. coli*; capacidade de replicar-se com facilidade sob condições

padrão de cultivo e pressão seletiva adequada; além de possuir tamanho pequeno (5.304 pb), tornando-o acessível para a manipulação experimental.

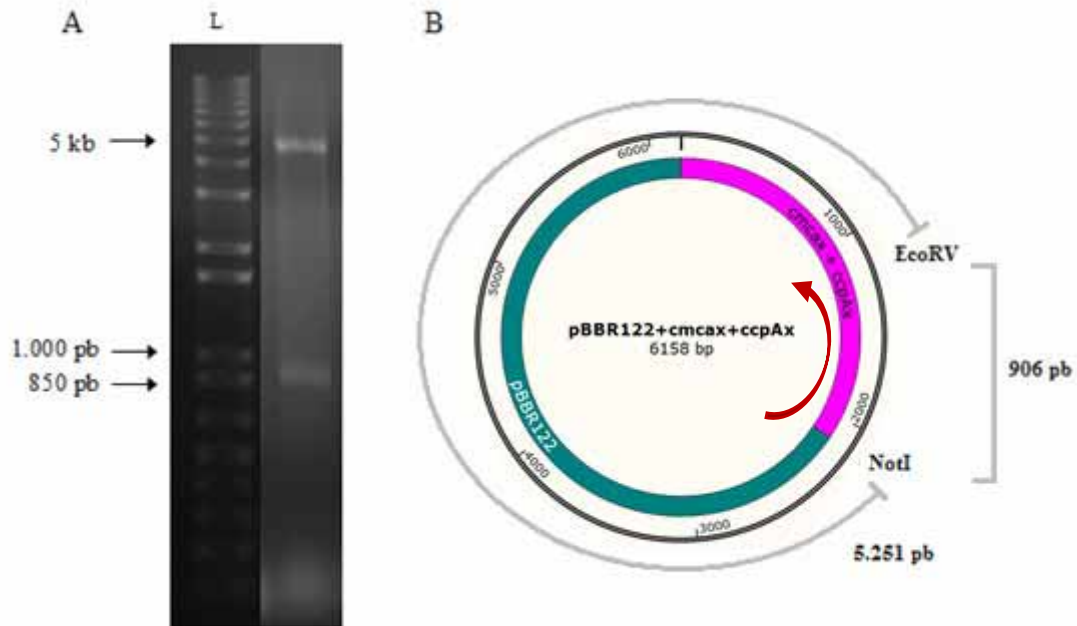
Em função de sua característica peculiar em gerar baixo número de cópias, o referido vetor foi extraído das células de *E. coli* utilizando um inóculo de 200 mL de células para proporcionar maior recuperação plasmidial. O material resultante desta técnica pode ser observado na Figura 11A.

Para a formação do DNA recombinante por reação de ligação, o vetor pBBR122 foi linearizado com a enzima *NotI*, cujo sítio de reconhecimento está localizado logo após a região promotora de *mob'* (MOSTAFA, HELLER e GEIS, 2002) e, *DraI*, deletando, desta forma, o gene responsável pela proteína que torna a célula resistente a cloranfenicol (Figura 11B). O inserto correspondente aos genes da região *upstream* foi digerido de forma a tornar coesiva a sua extremidade 5' pela reação com *NotI*. No diagnóstico de restrição, as enzimas empregadas foram *EcoRV* e *NotI*, que produziram uma clivagem no inserto e outra no inserto e vetor, produzindo, por sua vez, um fragmento de 906 pb e outro de 5.251 pb (Figura 12A), confirmando, assim, a inserção dos genes de interesse de forma direcional à região promotora (Figura 12B).

O vetor pBBR122, conhecido pela sua propriedade de compatibilidade com uma considerável quantidade de hospedeiros, especialmente de bactérias Gram-negativas, foi relatado como pivô de transformações bem sucedidas, isto é, com altas recuperações do plasmídeo, acima e 10^5 UFC/ μ g pBBR122; foram utilizadas várias espécies do gênero *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (HAYASHI *et al.*, 2000).

No presente trabalho, a clonagem de *cmcax* e *ccpAx* em pBBR122 foi construída de modo que os genes foram submetidos ao comando do promotor *mob'*. Este promotor também foi empregado em um estudo que clonou os genes *lacZ* e *lacY* de *E. coli* em *Gluconobacter oxydans* e *Acetobacter liquefaciens* (MOSTAFA, HELLER e GEIS, 2002), o que permitiu, com

Figura 12: Clonagem dos genes da região *upstream* em pBBR122.



A) Digestão de pBBR122 com as enzimas de restrição *EcoRV* e *NotI*, confirmando a presença do inserto nos clones analisados, apresentando bandas de 906 pb e 5.251 pb (L = Ladder 1kb, Life Technologies). B) pBBR122 ligado aos genes *cmcax* e *ccpAx*; estão indicados o sítios de restrição das enzimas *EcoRV* e *NotI* utilizadas no diagnóstico de restrição para confirmação da obtenção do clone desejado; a seta vermelha indica a direcionalidade em relação ao promotor *mob'* com a qual foram inseridos os genes *cmcax* e *ccpAx* no vetor pBBR122.

sucesso, que ambos genes fossem funcionalmente expressos nessas bactérias acetoácidas, classe à qual pertence também o micro-organismo *G. hansenii*. em um estudo que clonou os genes *lacZ* e *lacY* de *E. coli* em *Gluconobacter oxydans* e *Acetobacter liquefaciens* (MOSTAFA, HELLER e GEIS, 2002), o que permitiu, com sucesso, que ambos genes fossem funcionalmente expressos nessas bactérias acetoácidas, classe à qual pertence também o micro-organismo *G. hansenii*.

De conhecimento das peculiaridades acima citadas, o vetor pBBR122 demonstra ter um uso acessível e com características desejáveis para o emprego na clonagem dos genes de interesse.

4.3. Estudos da superexpressão de *cmcax* e *ccpAx* em *G. hansenii*

O clone recombinante de pBBR122 com os genes *cmcax* e *ccpAx*, assim como o vetor vazio, foram introduzidos, separadamente, em *G. hansenii* ATCC23769 e ATCC23760 pela técnica de eletroporação. As linhagens recombinantes foram submetidas ao estudo de estabilidade plasmidial a fim de verificar como se comportaria a taxa de retenção do plasmídeo pela bactéria ao longo do tempo de produção de celulose, na presença e na ausência da seleção exercida pelo antibiótico (GUPTA *et al.*, 2001; GAHAN *et al.*, 2007). Além de ser capaz de replicar em uma quantidade satisfatória de micro-organismos, é desejável também que vetores plasmidiais exógenos possam manter-se retidos pelo hospedeiro ao longo de suas gerações. Uma aplicação interessante dessa característica foi estudada com uma vacina de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, portando o gene do fragmento C da toxina tetânica, sob controle do promotor de citomegalovírus, ligado ao vetor pBBR122. Em meio de cultura livre de antibiótico, a percentagem de bactérias que portavam o vetor após 100 gerações foi de 42%; no ensaio *in vivo*, o vetor mostrou-se estável. O estudo sugere ainda uma relação entre alto número de cópias e instabilidade do vetor, o que justificou os resultados satisfatórios com pBBR122. Na ausência da seleção do antibiótico, um alto número de cópias pode estabelecer na bactéria uma carga metabólica tão grande para reter o plasmídeo enquanto ocorre a replicação, que ocorre rápida perda plasmidial (GAHAN *et al.*, 2007). Como pBBR122 gera 10 cópias/célula, a estabilidade resultante deste baixo número de cópias acaba tornando-se outra vantagem de sua utilização.

Os resultados do teste de estabilidade plasmidial estão organizados na Tabela 5. Os resultados registrados mostram que a ausência do antibiótico no meio de cultura leva a uma perda plasmidial ao longo das gerações, visto que não é necessário utilizar energia para a

expressão do gene e produção da proteína responsável pela resistência à canamicina, o que é verificado pela baixa taxa percentual de crescimento das células reinoculadas em meio contendo o antibiótico. O oposto ocorre na presença de canamicina, em que a média da estabilidade do vetor portando os genes observada foi de 83,08% e, enquanto vazio, de 75,75%. Este fato denota a importância da adição dessa substância ao meio para a manutenção do DNA recombinante contendo os genes responsáveis pela produção aumentada das proteínas envolvidas na síntese de celulose pelo micro-organismo. Mostra também, que mesmo após 72 h de crescimento celular, na presença de antibiótico, a estabilidade do vetor no inóculo é alta, proporcionando a manutenção da expressão das cópias de *cmcax* e *ccpAx* além da expressão constitutiva dos mesmos genes levando assim a uma superexpressão desse conjunto de genes.

Tabela 5: Taxa de estabilidade plasmidial em *G. hansenii* ATCC23769 carreadora de pBBR122 vazio ou contendo os genes da região *upstream*.

Tipo de célula / presença ou ausência de antibiótico no meio de cultura	pBBR122 + <i>cmcax</i> e <i>ccpAx</i> sem ATB*	pBBR122 + <i>cmcax</i> e <i>ccpAx</i> com ATB*	pBBR122 vazio sem ATB*	pBBR122 vazio com ATB*
Inóculo 24 h	79,33% ±11,02	89,33% ±4,93	26,33% ±5,13	87% ±4,36
Inóculo 48 h	56,33% ±2,89	72,33% ±2,31	34% ±3,61	79,66% ±1,53
Inóculo 72 h	17,33% ±2,08	86,67% ±9,61	31,33% ±9,02	81,33% ±1,53

Os valores estão descritos como a média do número de colônias recuperadas, em triplicata ± desvio-padrão. *ATB = antibiótico.

Tabela 6: Taxa de estabilidade plasmidial em *G. hansanii* ATCC23760 carreadora de pBBR122 vazio ou contendo os genes da região *upstream*.

Tipo de célula / presença ou ausência de antibiótico no meio de cultura	pBBR122 + <i>cmcax</i> e <i>ccpAx</i> sem ATB*	pBBR122 + <i>cmcax</i> e <i>ccpAx</i> com ATB*	pBBR122 vazio sem ATB*	pBBR122 vazio com ATB*
Inóculo 24 h	100	100	13,33 ± 4,62%	99,67 ± 0,58%
Inóculo 48 h	100	100	12,67 ± 2,08%	92 ± 1,00%
Inóculo 72 h	94,33 ± 8,14%	100	94,67 ± 3,21	85,33 ± 2,31

Os valores estão descritos como a média do número de colônias recuperadas, em triplicata ± desvio-padrão. *ATB = antibiótico.

Os resultados acima demonstram que a estabilidade plasmidial de *G. hansanii* ATCC23760 é, em geral, alta, nos primeiros quatro dias de incubação dos inóculos para produção de CB. As exceções ocorreram com os micro-organismos portadores do vetor vazio, cujos pré-inóculos cresceram na ausência de antibiótico; seus valores de estabilidade plasmidial nos períodos de 24 e 48 h foram de 13,33 e 12,67%, respectivamente. Portanto, diferentemente do observado com o micro-organismo ATCC23769, em termos gerais, a ausência de antibiótico não implica em perda plasmidial acentuada por *G. hansanii* ATCC23760, caracterizando-o como mais estável.

É importante ressaltar a importância dos altos valores de estabilidade plasmidial obtidos nestes estudos. A manutenção do crescimento dos micro-organismos portadores de *cmcax* e *ccpAx* clonados, ao longo das gerações, garante a observação dos efeitos que a superexpressão desencadeia na produção de celulose nesta linhagem, bem como possibilita a avaliação da produção pela bactéria portadora do vetor vazio. A instabilidade plasmidial verificada ao longo da multiplicação celular inviabiliza qualquer estudo dessa natureza em micro-organismos transformados.

Os resultados dos cálculos das concentrações médias de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), representados pela equação (A) do item 3.4.1, relativas às duas cepas ATCC selvagem, contendo o vetor pBBR122 com os genes *cmcaX* e *ccpAx* e vazio, estão representados na Tabela 7.

Tabela 7: Características dos pré-inóculos cultivados para comparação da produção de celulose bacteriana.

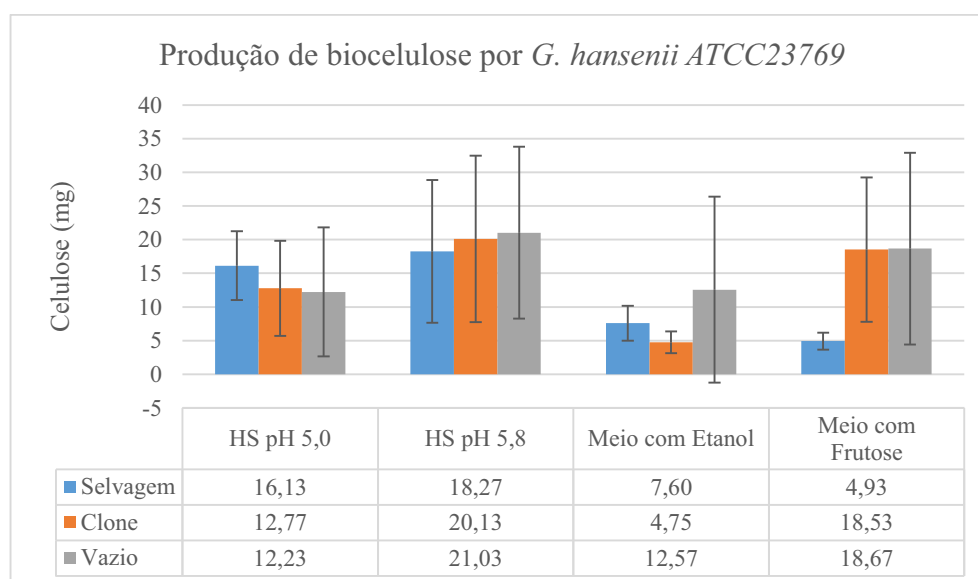
Meio de cultura	Micro-organismo*	UFC/mL
Meio HS pH 5,0	ATCC23760 S	$9,3 \times 10^7$
	ATCC23760 +	$4,30 \times 10^5$
	ATCC23760 V	$1,14 \times 10^8$
	ATCC23769 S	$6,78 \times 10^7$
	ATCC23769 +	$8,66 \times 10^4$
	ATCC23769 V	$5,35 \times 10^7$
Meio HS pH 5,8	ATCC23760 S	$8,40 \times 10^7$
	ATCC23760 +	$9,97 \times 10^6$
	ATCC23760 V	$2,68 \times 10^8$
	ATCC23769 S	$1,23 \times 10^8$
	ATCC23769 +	$1,13 \times 10^6$
	ATCC23769 V	$4,69 \times 10^7$
Meio contendo etanol	ATCC23760 S	$1,35 \times 10^6$
	ATCC23760 +	$1,00 \times 10^5$
	ATCC23760 V	$3,58 \times 10^6$
	ATCC23769 S	$7,67 \times 10^4$
	ATCC23769 +	$2,66 \times 10^4$
	ATCC23769 V	$1,00 \times 10^5$
Meio contendo frutose	ATCC23760 S	$3,39 \times 10^7$
	ATCC23760 +	$2,70 \times 10^5$
	ATCC23760 V	$5,25 \times 10^7$
	ATCC23769 S	$3,80 \times 10^6$
	ATCC23769 +	$5,53 \times 10^5$
	ATCC23769 V	$9,75 \times 10^6$

*S = selvagem; + = portando o vetor pBBR122 com os genes *cmcaX* e *ccpAx*; V = vetor pBBR122 vazio.

Estes valores foram importantes para a normalização do número de células de partida para os inóculos de avaliação da produção de CB, evitando vieses relacionados a inóculos com diferenças, em ordem de grandeza de 10, e que levassem a questionamentos quanto ao aumento ou não da produção.

Assim, a produção de celulose por *G. hansenii* ATCC23769 e ATCC23760 selvagem, modificados e portando o vetor vazio foi calculada e posteriormente comparada considerando-se os diferentes meios de cultura empregados, sendo que os valores obtidos experimentalmente estão ilustrados nas Figuras 13 e 14:

Figura 13: Produção comparativa entre as linhagens de *G. hansenii* ATCC23769 selvagem, modificada com os genes da região *upstream* e portando o vetor pBBR122 vazio, cultivadas em diferentes meios de cultura.



O gráfico acima ilustra o fato de os clones terem produzido 1,10 vezes mais CB do que a linhagem selvagem no meio HS pH 5,8 e 3,76 vezes no meio contendo frutose, o que, nestes casos, pode ter ocorrido devido à superexpressão dos genes *cmcaX* e *ccpA_x*, de acordo com o objetivo deste trabalho.

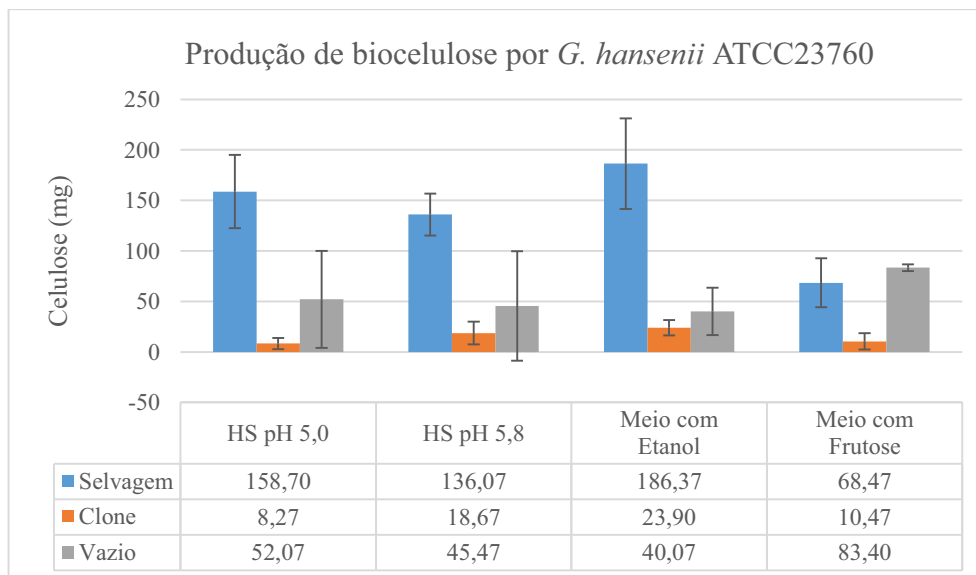
A frutose é um açúcar considerado uma das mais favoráveis fontes de carbono para a produção de celulose, segundo Tarr e Hibbert, (1931) e Kaushal e Walker, (1947 e 1951), apresentando o maior rendimento do processo, um resultado conectado com o fato conhecido de que a bactéria forma uma pequena quantidade de ácido a partir deste açúcar. A geração de bioprodutos desvia a energia que poderia ser aproveitada no sentido de produção do material de interesse, no caso, a CB; dessa forma, a minimização da formação destes compostos, como ocorre com o emprego da frutose, resulta em maiores rendimentos da biossíntese, o que possivelmente contribua para o melhor desempenho da produção de CB pela linhagem modificada em meio com frutose, conforme representado no gráfico.

Por outro lado, exceto com o meio HS pH 5,0, também é observado um aumento da produção de celulose na linhagem transformada com o vetor vazio, em relação à clonada. O vetor vazio possui, em teoria, potencial biossintético de celulose igual ao da linhagem selvagem, uma vez que possui apenas os genes dessa natureza relativos ao processo, o que não corrobora com os resultados obtidos. Isto implica na necessidade de investigação posterior dos motivos que levam esse tipo de micro-organismo em produzir mais celulose do que as linhagens selvagem e clonada.

Utilizando a ferramenta estatística de análise de variância (ANOVA), observou-se que os valores de p de todos os experimentos realizados com *G. hansenii* ATCC23769 em diferentes meios de cultura foram superiores a 0,05, o que significa que não houve diferença significativa entre os grupos de micro-organismo selvagem, clonado e portando o vetor vazio.

O gráfico abaixo denota que a superexpressão dos genes da região *upstream* não resultou em aumento da produção de celulose bacteriana do micro-organismo modificado em relação ao selvagem.

Figura 14: Produção comparativa entre as linhagens de *G. hansenii* ATCC23760 selvagem, modificada com os genes da região *upstream* e portando o vetor pBBR122 vazio, cultivadas em diferentes meios de cultura.



Por outro lado, observa-se que a produção de CB foi maior quando *G. hansenii* ATCC23760 selvagem e clonado foram cultivados em meio contendo etanol, em comparação com o cultivo nos demais meios de cultura. Se consideradas as linhagens selvagens, o aumento na síntese neste meio é 1,17 vezes superior em relação ao meio HS pH 5,0, 1,37 vezes ao HS pH 5,8 e 2,72 vezes ao meio contendo frutose; já entre as bactérias transformadas com pBBR122 contendo os genes *cmcaX* e *ccpAx*, os valores são 2,89, 1,28 e 2,28 vezes superiores, respectivamente. A adição de etanol ao meio de cultura atua como fonte de ATP no estágio de fermentação da via das hexoses monofosfato (HMP), estimulando as reações metabólicas no sentido do produto final, a celulose. Além disso, esse álcool implica na diminuição da geração de glicerol, o subproduto majoritário da via. A menor formação de subproduto implica em maior geração de CB, uma vez que a disponibilidade de energia para produzi-la torna-se superior (LI *et al.*, 2012). Adicionalmente, a quantidade de açúcar disponível para a síntese de celulose no

meio contendo etanol é 2,5 vezes superior aos meios HS e contendo frutose. Estas razões podem ter motivado a maior produção de celulose pelas duas linhagens de micro-organismo.

Com o emprego da ferramenta estatística ANOVA, foi observado que os valores obtidos nos experimentos com *G. hansenii* ATCC23760 possuem valor de p inferior a 0,05 e, portanto, houve diferença significativa entre os grupos. Assim, posteriormente, foi aplicado o Teste de Tukey para avaliar entre quais deles havia diferença significativa comparando-se as médias de produção de CB. Concluiu-se que diferenças significativas ocorreram entre as linhagens selvagem e clonada, bem como selvagem e portando o vetor vazio, nos meios de cultura HS pH 5,0, 5,8 e no meio contendo etanol; já no meio contendo frutose, esse resultado foi observado entre as linhagens clonada e selvagem, bem como clonada e portando o vetor vazio.

O fornecimento de nutrientes em geral, é, sem dúvida, muito importante no tocante à maior ou menor geração de produtos do metabolismo do micro-organismo produtor de CB. Considera-se, por exemplo, que a síntese de membranas de celulose por *Gluconacetobacter hansenii* seja possível somente a partir de poliálcoois, hexoses - como é o caso da glicose e frutose, utilizadas como fonte de carbono nos meios de cultura deste trabalho -, seus anidridos e compostos que presumivelmente produzem hexoses (TARR e HIBBERT, 1931).

Em relação à fonte de nitrogênio, tem-se que, com exceção da uréia, fontes orgânicas de nitrogênio resultam em melhores rendimentos na produção de CB em relação às fontes inorgânicas, como fosfato e sulfato de amônio. Além disso, a peptona foi a fonte orgânica estudada de melhor desempenho, seguida por triptona e extrato de levedura, no trabalho de Embuscado *et al.* (1994). Vale ressaltar que a peptona e o extrato de levedura são constituintes dos meios de cultura utilizados neste trabalho.

Embora seja capaz de regular sua concentração hidrogeniônica interna, a manutenção da energia para o controle do pH é necessária quando há exposição a pHs além da faixa ótima

do micro-organismo. Além disso, o pH do ambiente também influencia na estrutura e permeabilidade celular, o que pode influenciar as atividades bioquímicas da bactéria (SINCLAIR, 1987). O pH ótimo para crescimento de espécies do gênero *Gluconacetobacter* é entre 5.4 e 6.3 (KRIEG, 1984). Já em relação à produção de celulose, entre os pHs estudados por Embuscado (1994), o melhor rendimento foi verificado em pH 4,5, seguido por 5,5. Nos experimentos realizados no presente trabalho, este resultado não foi verificado, pois foi observada maior produção de celulose em meios de maior pH, pelas ATCC23760 selvagem e clonada, cultivadas em meio contendo etanol, cujo pH é o segundo maior dentre os quatro meios de cultura estudados. Resultado semelhante ocorreu com os micro-organismos ATCC23769 selvagem, clonado e portando o vetor vazio, em que as maiores produções foram verificadas em pH 5,8, o mais básico dentre os meios.

A relevância que o produto codificado pelo gene *cmcax* representa é conhecida em termos de melhoramento do rendimento da produção de celulose. Tem-se na literatura que a adição de 1,5 mg/L de CMCax endógena ao meio de cultura aumentou a produção de celulose 1,2 vezes; o aumento de rendimento da produção também foi verificado quando houve uma superprodução desta proteína. Além da melhor performance de produção de celulose, CMCax também interfere na formação de sua estrutura. Demonstrou-se, por microscopia eletrônica de transmissão, que quando foi verificada superprodução de CMCax, as fitas de celulose secretadas apresentaram-se dispersas, o que sugere influência de CMCax na montagem dessas (KAWANO, TAJIMA, KONO, *et al.*, 2002). A superexpressão do gene *ccpAx*, cujo produto está relacionado com a estrutura de poros exportadores e com a montagem da celulose na superfície da célula produtora, sugere um papel de coação com o gene a ele adjacente na tentativa de otimizar a produção de celulose. Dessa forma, pode-se atribuir o aumento de produção dos micro-organismos modificados em relação à linhagem selvagem, no caso do cultivo em ambos meios HS e contendo etanol, à superexpressão dos genes *cmcax* e *ccpAx*.

Com base nos diferentes fatores acima descritos, foi possível verificar que, no micro-organismo contendo o DNA recombinante, a superexpressão dos genes da região *upstream* ao operon da celulose sintase pode ter contribuído para o aumento de produção de CB em relação ao micro-organismo selvagem, em dois dos experimentos realizados com *G. hansenii* ATCC23769. Esta bactéria apresenta, em geral, menor desempenho na produção de CB quando comparada com a ATCC23760 pois, em média, a linhagem selvagem produziu 11,73 mg de celulose, ao passo que a ATCC23760, 137,40 mg. Assim, esses resultados mostram-se positivos, pois neste caso, a superexpressão contribuiu para o aumento relativo da produção de CB, comparadas as bactérias de melhor e menor performance entre si, tendo como referência as linhagens selvagens.

5. CONCLUSÃO

- Os genes *cmcaX* e *ccpAx* foram clonados com sucesso, o que foi verificado por meio de seu sequenciamento, que apresentou identidade e cobertura de 98% em relação ao DNA genômico de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769;
- Os genes alvo foram clonados em pBBR122, o que possibilitou avaliar os efeitos de sua superexpressão no micro-organismo de estudo, cultivado em diferentes meios;
- A estabilidade do vetor de expressão vazio e com os genes clonados mostrou-se, em geral, superior diante da presença de antibiótico no meio de cultura, o que ressalta a importância dessa substância para a permanência do DNA recombinante portador dos genes superexpressos. Além disso, a linhagem ATCC23760 mostrou-se com estabilidade plasmidial superior em relação à ATCC23769;
- Ao contrário de todos os ensaios realizados com a bactéria *G. hansenii* ATCC23760, em HS pH 5,8 e meio contendo frutose, ATCC23769 clonada apresentou melhor rendimento na produção de celulose em relação à sua linhagem selvagem, estando, portanto, em conformidade com o objetivo principal deste trabalho, sendo um indicador positivo da superexpressão e, conseqüentemente, da clonagem realizada, além de evidenciar a importância que estes genes exercem na biossíntese de CB. Isto é importante ao passo em que ATCC23769 apresenta naturalmente menor performance produtora, logo, aumentos de produção por este micro-organismo são, de maneira relativa, mais relevantes do que se fossem constatados em ATCC23760.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

BARUD, H. S. **Novos materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. (Doutorado). Química Geral e Inorgânica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BIELECKI, S. *et al.* **Bacterial Cellulose, polysaccharides and polyamides in the food industry**: 31-85 p. 2005.

BLACKWELL, J. The Macromolecular Organization of Cellulose and Chitin. In: BROWN, R. M., JR. (Ed.). **Cellulose and Other Natural Polymer Systems**: Springer US, 1982. cap. 20, p.403-428. ISBN 978-1-4684-1118-8.

BROWN, A. J. XLIII - On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, n. 0, p. 432-439, 1886. ISSN 0368-1645.

BROWN, R. M. Emerging technologies and future-prospects for industrialization of microbially derived cellulose. 9th International Biotechnology Symp and Exposition: Harnessing Biotechnology for the 21st-Century, 1992, Crystal City, Va. 1992 Aug 19-21. p.76-79.

_____. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 487-495, Feb 1 2004. ISSN 0887-624X.

GALLO, L.A. Celulose. **Carboidratos**. Disponível em:
<<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos.html>>. Acesso em 10/05/2013.

COUCHERON, D. H. An *Acetobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 18, p. 5723-5731, Sep 1991. ISSN 0021-9193.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, Jan 2006. ISSN 0142-9612.

EMBUSCADO, M. E.; MARKS, J. S.; BEMILLER, J. N. Bacterial cellulose. 1. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Food Hydrocolloids**, v. 8, n. 5, p. 407-418, Oct 1994. ISSN 0268-005X.

FINCH, C. A. Cellulose chemistry and its applications. Edited by T. P. Nevell and S. H. Zeronian, Ellis Horwood, Chichester, 1985. pp. 552. ISBN 0-85312-463-9. **British Polymer Journal**, v. 17, n. 3, p. 321-321, 1985. ISSN 1934-256X.

GAHAN, M. E. *et al.* Impact of plasmid stability on oral DNA delivery by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Vaccine**, v. 25, n. 8, p. 1476-1483, Feb 9 2007. ISSN 0264-410X.

GUPTA, J. C.; PANDEY, G.; MUKHERJEE, K. J. Two-stage cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to enhance plasmid stability under non-selective conditions: experimental study and modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 1, p. 89-99, Jan 2 2001. ISSN 0141-0229.

HAYASHI, M. *et al.* Efficient transformation of *Mesorhizobium huakuii* subsp *rengei* and *Rhizobium* species. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 550-553, Jun 2000. ISSN 1389-1723.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261-270, Jan 2000. ISSN 0022-2461.

KAWANO, S. *et al.* Effects of endogenous endo-beta-1,4-glucanase on cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* ATCC23769. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 275-281, Sep 2002. ISSN 1389-1723.

_____. Regulation of endoglucanase gene (*cmcaX*) expression in *Acetobacter xylinum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 1, p. 88-94, Jul 2008. ISSN 1389-1723.

_____. Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: comparison of cellulose synthetic ability between strains. **DNA Research**, v. 9, n. 5, p. 149-156, Oct 31 2002. ISSN 1340-2838.

_____. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the cellulose biosynthesis related protein CMCax from *Acetobacter xylinum*. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, p. 252-254, Feb 2005. ISSN 1744-3091.

KIM, J.; CAI, Z.; CHEN, Y. Biocompatible Bacterial Cellulose Composites for Biomedical Application. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 011006-011006, 2009. ISSN 1949-2944.

KLEMM, D. *et al.* Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, Nov 2001. ISSN 0079-6700.

KONO, H. *et al.* Structural analyses of new tri and tetrasaccharides produced from disaccharides by transglycosylation of purified *Trichoderma viride* beta-glucosidase. **Glycoconjugate Journal**, v. 16, n. 8, p. 415-423, Aug 1999. ISSN 0282-0080.

KOO, H. M. *et al.* Evidence that a beta-1,4-endoglucanase secreted by *Acetobacter xylinum* plays an essential role for the formation of cellulose fiber. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2257-2259, Nov 1998. ISSN 0916-8451; 1347-6947.

KRIEG, N. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: 1984.

LEGGÉ, R. L. Microbial cellulose as a speciality chemical. **Biotechnology Advances**, v. 8, n. 2, p. 303-319, 1990. ISSN 0734-9750.

LI, Y. *et al.* Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1479-1487, Dec 2012. ISSN 0175-7598.

LISDIYANTI, P. *et al.* Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp nov and *Gluconacetobacter nataicola* sp nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2101-2111, Sep 2006. ISSN 1466-5026.

MATSUOKA, M. *et al.* A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp *sucrofermentans*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 4, p. 575-579, Apr 1996. ISSN 0916-8451; 1347-6947.

MOSTAFA, H. E.; HELLER, K. J.; GEIS, A. Cloning of *Escherichia coli lacZ* and *lacY* genes and their expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2619-2623, May 2002. ISSN 0099-2240.

NAKAI, T. *et al.* ORF2 gene involves in the construction of high-order structure of bacterial cellulose. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, n. 2, p. 458-462, Jul 12 2002. ISSN 0006-291X.

PURI, V. P. Effect of cristallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 10, p. 1219-1222, 1984 1984. ISSN 0006-3592.

RAO, M. R. R. Acetic acid bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 11, p. 317-338, 1957 1957. ISSN 0066-4227.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35-58, Mar 1991. ISSN 0146-0749.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of General Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 123-&, 1954 1954. ISSN 0022-1287.

SHAH, J.; BROWN, R. M. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 352-355, Jan 2005. ISSN 0175-7598.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1-8, Jan-Feb 2005. ISSN 1226-8372.

SILVA, R. *et al.* Applications of lignocellulosic fibers in polymer chemistry and in composites.

Quimica Nova, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009 2009. ISSN 0100-4042.

SINCLAIR, C. **Basic Biotechnology**. London: Academic Press, 1987.

STANDAL, R. *et al.* A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the *bcs* operon. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 11, p. 3443-3443, Jun 1994. ISSN 0021-9193.

SUNAGAWA, N. *et al.* Cellulose complementing factor (Ccp) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 607-612, Jun 2013. ISSN 1389-1723.

TARR, H. L. A.; HIBBERT, H. Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXV. Polysaccharide synthesis by the action of *Acetobacter xylinus* on carbohydrates and related compounds. **Canadian Journal of Research**, v. 4, n. 4, p. 372-388, 1931/04/01 1931. ISSN 1923-4287.

The Carbohydrates: Monosaccharides, Disaccharides and Polysaccharides. **Principles of biochemistry**. Disponível em: <http://en.wikibooks.org/wiki/Principles_of_Biochemistry/

The_Carbohydrates:_Monosaccharides,_Disaccharides_and_Polysaccharides>. Acesso em 21/04/2013.

TONOUCHI, N. *et al.* Addition of a small amount of an endoglucanase enhances cellulose production by *Acetobacter xylinum* **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 5, p. 805-808, May 1995. ISSN 0916-8451; 1347-6947.

WONG, H. C. *et al.* Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 8130-8134, Oct 1990. ISSN 0027-8424.

YU, X. C.; ATALLA, R. H. Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, n. 2, p. 145-146, Aug 1996. ISSN 0141-8130.

ZHONG, C. *et al.* Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6189-6199, Jul 2013. ISSN 0175-7598.

DADOS FINAIS

Araraquara, 14 de janeiro de 2015.

De acordo,

Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Carolina Véspoli de Melo