

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

RAQUEL SALGADO BATISTA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO POR
ESCHERICHIA COLI VIA ENGENHARIA METABÓLICA E DE PROCESSOS**

**SÃO CARLOS - SP
2022**

RAQUEL SALGADO BATISTA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO POR
ESCHERICHIA COLI VIA ENGENHARIA METABÓLICA E DE PROCESSOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

SÃO CARLOS - SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Raquel Salgado Batista, realizada em 14/10/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (UFSCar)

Profa. Dra. Cintia Regina Sargo (CNPEM)

Profa. Dra. Thais Suzane Missi Esteves (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

*Dedico este trabalho para minha mãe, Marlene, pelo apoio incondicional em cada fase.
A senhora é meu maior exemplo!*

Meu amor e gratidão.

*There's always gonna be another mountain
I'm always gonna wanna make it move
Always gonna be an uphill battle
Sometimes I'm gonna have to lose
Ain't about how fast I get there
Ain't about what's waiting on the other side
It's the climb.*

Miley Cyrus

AGRADECIMENTOS

**“Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e tudo o que há em mim bendiga o seu santo nome. Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueças de nenhum de seus benefícios.”
(Salmos 103: 1,2)**

À Deus, por me dar forças quando eu achei que não conseguiria, por permitir que tudo acontecesse no tempo certo e por cuidar de mim em todos os momentos, eu dedico este trabalho e todos os frutos que poderão vir dele, algum dia. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas!

À minha família pelo carinho e apoio, especialmente à minha mãe, Marlene, que sempre apoiou minhas escolhas e contribuiu para que eu pudesse correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu orientador, professor Dr. Adilson José da Silva, por exercer sua função com maestria. pela compreensão, paciência, pela dedicação e suporte durante o mestrado. Pela ajuda e pela amizade. Que seu exemplo inspire outros a ser como você! Obrigada por tanto!

Aos meus amigos do LaFaC, em especial Gabriel e Davi que muito me ensinaram e contribuíram com este trabalho, e pela amizade! Contem sempre comigo!

Aos meus amigos da pós, em especial Breno e Gabi por todos os bons momentos compartilhados. Pelos cafés, pelas fofquinhas e por todo apoio nesse período.

Ao Marcelo Ivanofre, pelo incentivo, pelo carinho, pelo apoio e pela contribuição. Você é muito especial. Aos meus colegas de serviço, Arthur, Gabs, Lucas e Beibis, por acreditarem em mim mais do que eu mesma.

Aos colegas do Grupo de Cultivos e aos professores Kaka e Teresa pelas contribuições nas reuniões do grupo e apresentações dos trabalhos.

À minha amiga Ari por estar sempre presente, mesmo com a distância, e por nunca me deixar desanimar diante das adversidades.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, Dra. Aline Dumaresq, Dra. Cintia Regina Sargo, Dra. Thais Milessi, Dra. Teresa Cristina Zangirolami por toda contribuição para este trabalho.

Aos colegas do DEQ, no geral, pelo carinho e apoio nesse período, que a força esteja com vocês!

Ao PPGEQ pela compreensão com a prorrogação de prazos e tramites para possibilitar a finalização desse trabalho. À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro (Processos FAPESP 2016/10.636-8, 2019/07902-6 e CNPq 132651/2020-3).

RESUMO

O aproveitamento de subprodutos de bioprocessos é de grande interesse devido a necessidade de destinação final para os mesmos e a possibilidade de convertê-los em produtos de valor agregado. Dentre esses substratos, destacam-se os hidrolisados de material lignocelulósico e o glicerol obtido a partir da produção de biocombustíveis. Listado como uma importante plataforma química que pode ser obtida a partir da biomassa pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos, o ácido 3-hidroxi propiônico (3-HP) se torna uma opção de produto a ser obtido a partir dos coprodutos citados anteriormente. A produção do 3-HP por rotas biológicas apresenta algumas vantagens sobre as rotas químicas, e tem se tornado cada vez mais viável devido ao contínuo avanço na biotecnologia industrial. Com o objetivo de viabilizar esta produção, tem-se desenvolvido bioprocessos a partir de microrganismos recombinantes. Assim, a aplicação da engenharia genética na modificação de genes relacionados à via metabólica desses microrganismos permite a construção de linhagens capazes de obter o 3-HP a partir de substratos baratos (p.e. glicerol, glicose e xilose). Uma linhagem recombinante de *E. coli* desenvolvida no nosso grupo de pesquisa apresentou resultados promissores por meio da rota de produção a partir da β -alanina, mas a inserção da via de produção do 3-HP nessa linhagem resultou numa deficiência de cofatores, já que a última reação da via é dependente de NADPH. Diante disso, a regeneração desse cofator foi avaliada a partir da expressão de genes que codificam a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase NADP⁺ dependente, de modo que a demanda desse cofator pelas vias dependentes dele fosse suprida. A superexpressão do gene *gapN* de *Streptococcus equi zooepidemicus* que codifica uma gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) dependente de NADP⁺, aliada à regulação da transcrição do *gapA* endógeno e o uso do glicerol como fonte de carbono, resultou em uma produção 147% maior em relação à produção da linhagem controle. O uso da lactose como agente de indução do promotor lacUV5 também foi avaliado nesse estudo e aumentou cerca de 7% a concentração final de 3-HP em relação à produção obtida pela mesma linhagem utilizando IPTG 1mM como agente indutor. Além disso, condições com restrição de O₂ no processo mostraram que, para a via estudada, a produção do 3-HP é favorecida em processo aeróbio e restrições de oxigênio limitam a produção e acarretam o acúmulo de acetato pela célula. Em conjunto, as estratégias avaliadas até o momento levaram à obtenção da segunda maior produção de 3-HP pela via da β -alanina, reportada até o momento na literatura.

Palavras-chave: Ácido 3-hidroxi propiônico, β -alanina, glicerol, lactose, fábrica celular, GAPDH.

ABSTRACT

The integration of substrates from bioprocesses is of great interest due to the need of destination for them and the possibility of converting them into value-added products. Among these substrates, the hydrolysates from biorefineries and glycerol obtained from the production of biofuels stand out. Listed as an important chemical platform that can be obtained from biomass by the U.S. Department of Energy, 3-hydroxypropionic acid (3-HP) becomes a product option to be obtained from the co-products mentioned above. The production of 3-HP by biological routes presents some advantages over chemical routes and has become increasingly feasible due to the continuous advancement in industrial biotechnology. To make this production feasible, bioprocesses have been developed from recombinant microorganisms. Thus, the application of genetic engineering in the modification of genes related to the metabolic pathway of these microorganisms allows the construction of strains capable of obtaining 3-HP from cheap substrates (e.g., glycerol, glucose, and xylose). A recombinant *E. coli* strain developed in our research group showed promising results through the β -alanine production route, but the insertion of the 3-HP production pathway in this strain resulted in a deficiency of cofactors, since the last reaction of the pathway is NADPH dependent. Therefore, the regeneration of this cofactor was evaluated by the expression of genes encoding the NADP⁺ dependent enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, so that the demand for this cofactor by the NADPH dependent pathways could be met. Overexpression of the *gapN* gene from *Streptococcus equi zooepidemicus*, which encodes an NADP⁺ dependent GAPDH, coupled with regulation of endogenous *gapA* transcription and the use of glycerol as a carbon source, resulted in 147% higher production compared to the control strain. The use of lactose as an induction agent for the *lacUV5* promoter was also evaluated in this study and increased the final 3-HP concentration by about 7% compared to the production obtained by the same strain using 1mM IPTG as an induction agent. Furthermore, conditions with O₂ restriction in the process showed that, for the pathway studied, 3-HP production is favored under aerobic condition, and oxygen restriction limits production and leads to acetate accumulation by the cell. Taken together, the strategies evaluated led to the second highest production of 3-HP by the β -alanine pathway reported so far in the literature.

Keywords: 3-Hydroxypropionic acid, β -alanine, glycerol, lactose, cell factory, GAPDH.

Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO.....	15
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 Ácido 3-hidroxipropiônico.....	17
1.2 Produção de 3-HP usando <i>E. coli</i> recombinante.....	20
1.3 Metabolismo do glicerol em <i>E. coli</i>	23
1.4 Vias metabólicas para produção do 3-HP.....	25
1.5 Regulação da expressão gênica e o Operon Lac.....	28
1.6 Integração da regeneração de cofatores.....	31
1.7 Regulação da expressão de <i>gapA</i> endógeno usando CRISPRi.....	33
1.8 Produção de ácidos orgânicos por <i>rE. coli</i> : Toxicidade e aumento da tolerância.....	35
1.9 Parâmetros de processo e cultivo celular.....	40
1.9.1 Meios de cultivo.....	40
1.9.2 Modos de operação do Biorreator.....	41
1.9.3 Estratégias de cultivo.....	42
2 REVISÃO DOS RESULTADOS DO TRABALHO ANTERIOR.....	43
3 METODOLOGIA.....	45
3.1 Seleção dos genes <i>gap</i> heterólogos para regeneração de cofator NADPH.....	45
3.2 Linhagens bacterianas.....	46
3.3 Primers.....	47
3.4 Extração de DNA genômico e plasmidial.....	48
3.5 Plasmídeos.....	48
3.6 Clonagem por restrição e ligação.....	49
3.7 <i>Screening</i> de clones positivos.....	51

3.8	Otimização das linhagens produtoras	51
3.9	Construção do plasmídeo com o operon de aumento à resistência.....	52
3.10	Desenho do sgRNA	52
3.11	Construção do plasmídeo pCpBgA.....	53
3.12	Avaliação <i>in silico</i> de diferentes fontes de carbono e condições de aeração.....	53
3.13	Cultivos em shaker.....	53
3.13.1	Preparo do meio MR	54
3.13.2	Avaliação das fontes de carbono	55
3.13.3	Avaliação do efeito da concentração de indutor IPTG.....	55
3.13.4	Avaliação da indução por lactose	55
3.13.5	Avaliação do efeito da temperatura na produção de 3-HP	55
3.13.6	Avaliação da regulação da expressão do gapA endógeno.....	56
3.14	Cultivos em Biorreator.....	56
3.15	Procedimentos analíticos	56
3.16	Procedimento de cálculos	57
3.16.1	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular.....	57
3.16.2	Determinação dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$)	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Avaliação <i>in silico</i> de diferentes fontes de carbono e aeração.....	58
4.1.1	Variação da fonte de carbono e produção de 3-HP	58
4.1.2	Variação da disponibilidade de O ₂	60
4.2	Avaliação da variação da fonte de carbono <i>in vivo</i>	60
4.3	Avaliação da concentração do indutor IPTG	62
4.4	Avaliação da indução por lactose	63
4.5	Avaliação da temperatura na obtenção do produto.....	67
4.6	Otimização das linhagens produtoras	67

4.6.1	Inserção dos genes gap heterólogos na linhagem de produção	67
4.6.2	Inserção do plasmídeo pCrispathBrick com o sgRNA para regulação do gapA endógeno 69	
4.6.3	Construção do plasmídeo pEyJKbtyGpD.....	70
4.7	Avaliação das linhagens produtoras	71
4.7.1	Cultivo das linhagens PSO910, PSO920 e PSO930 com os genes gap heterólogos.....	71
4.7.2	Cultivo das linhagens PSO911, PSO921 e PSO931 com a regulação do gapA endógeno 74	
4.7.3	Cultivo da linhagem PSO932, contendo o operon yohJK	76
4.8	Avaliação das linhagens produtoras em cultivo em Biorreator	77
5	CONCLUSÕES	82
6	REFERÊNCIAS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de 3-HP por <i>E. coli</i> recombinante pelas principais vias de estudo.	22
Tabela 2 - Estratégias de sobrevivência para <i>E. coli</i> com desregulação no equilíbrio do pH intracelular.....	37
Tabela 3 - Modificações genéticas para a construção da linhagem PSO119	44
Tabela 4 - Seleção dos genes de trabalho	45
Tabela 5 - Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho para clonagem e propagação de plasmídeos e produção de 3-HP.	46
Tabela 6 - Primers utilizados nos procedimentos de clonagem.....	47
Tabela 7 - Plasmídeos usados na construção das linhagens produtoras.....	49
Tabela 8 - Etapas e condições da PCR para amplificação dos genes <i>gap</i> heterólogos.	49
Tabela 9 - Enzimas de restrição usadas para digestão dos <i>amplicons</i> e vetores para clonagem dos genes alvo.	50
Tabela 10 - Primers para identificação da sequência alvo da técnica de CRISPR de interferência.....	52
Tabela 11 - Composição do meio MR.....	54
Tabela 12 - Composição da solução traço de metais.....	54
Tabela 13 - Resultado da simulação de produção de 3-HP em aerobiose e anaerobiose	60
Tabela 14 - Velocidade específica máxima de crescimento para cada condição avaliada.....	61
Tabela 15 - Dados de rendimento de célula e produto para as condições avaliadas	62
Tabela 16 - Velocidade específica de crescimento obtida para as condições de indução com lactose.....	64
Tabela 17 - Dados de rendimento de célula e produto em relação ao substrato para os cultivos realizados com a lactose como indutor.	66
Tabela 18 - Velocidade específica máxima de crescimento obtida para as linhagens expressando os genes <i>gap</i> heterólogos.....	73
Tabela 19 - Dados de rendimento de célula e produto para as linhagens com expressão dos genes <i>gap</i> heterólogos.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - 3-HP como uma plataforma química.....	19
Figura 2 - Evolução ao longo dos anos do número de referências no Web of Science e no número de patentes concedidas a respeito da produção biotecnológica do 3-HP.....	20
Figura 3 - Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos.....	25
Figura 4 - Vias metabólicas reportadas em levedura e cálculo do rendimento máximo teórico usando glicerol e glicose como substrato.....	26
Figura 5 - Biossíntese de 3-HP a partir de CO ₂ utilizando cianobactérias.....	28
Figura 6 - Via metabólica para produção do 3-HP.....	32
Figura 7 – Sistema CRISPRi.....	34
Figura 8 – Mecanismo de CRISPRi.....	35
Figura 9 - Via metabólica endógena de <i>E. coli</i> , do TCA, com produção de ácidos orgânicos importantes.....	36
Figura 10 - Mecanismo de ação da célula sobre estresse ácido.....	38
Figura 11 - Representação esquemática da linhagem PSO119.....	44
Figura 12 - Simulação da produção de 3-HP utilizando o modelo <i>iML1515</i>	59
Figura 13 - Produção de 3-HP (A) e Crescimento celular (B) para a linhagem PSO119 em diferentes fontes de carbono.....	61
Figura 14 – Curva de produção de 3-HP (A) e crescimento celular (B) em 24h de cultivo após indução, pela linhagem PSO119 sob indução de diferentes concentrações de IPTG.....	62
Figura 15 – Produção de 3-HP com diferentes formas de indução (A) e Perfil de crescimento da linhagem PSO119 em meio de auto-indução e em indução com pulsos de lactose.....	64
Figura 16 - Perfis de consumo das fontes de carbono com uso da lactose como indutor. A) Adição de lactose na proporção 1:1 em relação ao glicerol, no início da fase exponencial de crescimento. B) Adição de lactose na proporção 2:1 em relação ao glicerol, no início da fase exponencial de crescimento. C) Adição de lactose:glicerol na proporção 1:1 como estratégia de auto-indução. D) Adição de lactose:glicerol na proporção 2:1 como estratégia de auto-indução.....	66
Figura 17 - Produção de 3-HP em diferentes temperaturas após a etapa de indução (A) e Perfil de crescimento da linhagem PSO119 nas condições de temperatura avaliadas.....	67
Figura 18 - Clonagem individual dos genes <i>gap</i> confirmada por PCR de colônia.....	68

Figura 19 - Confirmação dos fragmentos dos genes <i>gap</i> na linhagem produtora.	69
Figura 20 - Confirmação do plasmídeo CpBgA. A) PCR de colônia para identificação dos clones positivos. B) resultado da PCR dos plasmídeos extraídos e purificados.	69
Figura 21 - Identificação do clone positivo com a presença do operon <i>yohJK</i>	70
Figura 22 - Histórico de construção do plasmídeo pEyJKbtyGpD.	71
Figura 23 – Reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de <i>E. coli</i>	72
Figura 24 - A) produção de 3-HP pelas linhagens construídas após 24 h de indução. B) curva de crescimento das linhagens com genes <i>gap</i> heterólogos.	73
Figura 25 – Produção de 3-HP pelas linhagens PSO910 – sem a repressão do <i>gapA</i> endógeno; PSO910X – com o plasmídeo pCrispathBrick sem o sgRNA e PSO911 – com a presença do plasmídeo CpBgA. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.....	74
Figura 26 - A) produção de 3-HP pelas linhagens PSO920 – sem a repressão do <i>gapA</i> endógeno; PSO920X – com o plasmídeo pCrispathBrick sem o sgRNA e PSO921 – com a presença do plasmídeo CpBgA. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.....	75
Figura 27 - A) produção de 3-HP pelas linhagens PSO930 – sem a repressão do <i>gapA</i> endógeno; PSO930X – com o plasmídeo pCrispathBrick sem o sgRNA e PSO931 – com a presença do plasmídeo CpBgA. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.....	75
Figura 28 - A) produção de 3-HP pelas linhagens PSO930 – sem a repressão do <i>gapA</i> endógeno; PSO931 – com a presença do plasmídeo CpBgA e PSO932 – com a presença do plasmídeo CpBgA e do operon <i>yohJK</i> no plasmídeo da via. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.	77
Figura 29 - Cultivo em batelada para a linhagem PSO932 – A) Dados de crescimento celular e B) Perfil de consumo de substrato e produção de 3-HP e acetato.....	78
Figura 30 - Perfis de A) Crescimento celular e B) produção de 3-HP em Biorreator operando em batelada para as linhagens PSO931 e PSO932.....	79
Figura 31 - Perfis de consumo de substrato e produção de 3-HP e acetato no cultivo em Biorreator para as linhagens A) PSO931 e B) PSO932.	79
Figura 32 - Perfis dos parâmetros de controle dos cultivos em Biorreator	80

INTRODUÇÃO

Até o início do século XX, a indústria química era baseada, especialmente, na utilização do carvão e da biomassa nos processos para obtenção de produtos importantes como os combustíveis e ácidos orgânicos. Com a descoberta do petróleo, muitos desses processos foram substituídos e/ou otimizados pela síntese a partir desta fonte, e o petróleo tornou-se o principal recurso para a produção de plataformas químicas (WILLKE; VORLOP, 2004).

Em 1973, com a primeira crise do petróleo e a instabilidade política dos países que o exportavam ficou clara a necessidade de um processo de reorientação. Diante disso, o Brasil como principal produtor de cana-de-açúcar se via em uma situação de vantagem no processo para exploração do etanol como combustível, e assim iniciou-se o programa Pró-Álcool, que subsidiava a produção e venda de etanol combustível produzido a partir da cana-de-açúcar, intermediado pela PETROBRAS, sendo este o primeiro pico do uso de biocombustíveis no país, tornando-o pioneiro no desenvolvimento da produção e uso em larga escala de um combustível renovável com alta eficiência energética e com os menores custos de produção do mundo (GOLDEMBERG, 2008).

Em 2005, por meio da Lei 11.097 (de 13 de janeiro de 2005) que visava “incrementar, em bases econômicas, sociais e ambientais, a participação de biocombustíveis na matriz energética nacional”, o biodiesel foi incluído na matriz energética brasileira, com uso obrigatório da adição de 2% em volume de biodiesel ao diesel a partir de 2008, o que provocou um aumento de 69 milhões para 2,3 bilhões de litros de biodiesel produzidos, dos anos de 2006 a 2010. Em 2020, a proporção de adição obrigatória de biodiesel ao diesel passou a ser de 12% e a produção de biodiesel no Brasil atingiu o marco de 6,4 bilhões de litros (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; DE OLIVEIRA, 2012).

O crescimento da produção de biocombustíveis, apesar de trazer diversos benefícios ambientais, uma vez que são fontes energéticas renováveis, têm como consequência a geração de maiores quantidades de resíduos, que demandam atenção à sua destinação. Nos setores de açúcar e álcool, a biomassa celulósica é gerada em enorme quantidade, podendo ser vista como uma grande fonte de matéria-prima, uma vez que esta possui diferentes açúcares em sua composição que podem ser utilizados por microrganismos para conversão em outros produtos. Já em relação ao biodiesel, a coprodução do glicerol residual é um fato inerente ao processo, mas a alta razão oferta/demanda deste, dado o crescimento da indústria de biodiesel, transforma o que antes era um coproduto em um substrato com necessidade de desenvolvimento de estratégias de destinação final que gere valor agregado.

A integração desses substratos em bioprocessos se encaixa no conceito de biorrefinarias, que pode ser definido como uma unidade fabril na qual a biomassa é convertida em um produto final e os substratos do processo podem ser transformados – por meio de vias termoquímicas ou bioquímicas – em produtos químicos, energia (eletricidade ou calor) e biocombustíveis, de modo que tudo que resulte do processo produtivo apresente algum ganho para a indústria (AZAPAGIC, 2014). Entretanto, independente da rota de transformação da biomassa, para cada processo há uma série de questões tecnológicas que precisam ser superadas até se tornar uma realidade comercial.

No caso das vias bioquímicas, a engenharia genética vem ganhando espaço com pesquisas que visam aperfeiçoar rotas de processamento da biomassa e sua conversão por meio de microrganismos em uma série de plataformas químicas, seja pelo aumento da seletividade ou atividade de enzimas específicas, deleção de vias indesejáveis no processo metabólico, e construção de novos organismos que combinam propriedades metabólicas não existentes em organismos selvagens (WILLKE; VORLOP, 2004).

Plataformas químicas são produtos compostos de 2 a 6 carbonos que são usados como precursores na fabricação de diversos intermediários químicos tais como solventes, combustíveis, polímeros, produtos farmacêuticos, alimentos e perfumes. Existe certo interesse no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a obtenção desses compostos, com foco na produção microbiana, sendo que, para isso, alguns fatores chaves devem ser considerados, sendo eles i) a construção de microrganismos recombinantes para uma produção eficiente, ii) compatibilidade com as infraestruturas industriais, iii) otimização do processo de *downstream* e iv) acesso a recursos sustentáveis e com custo competitivo (JANG et al., 2012).

Com os avanços na biotecnologia industrial, exemplos de sucesso na obtenção de produtos químicos bioderivados comercializados em larga escala são relatados por (ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2012) como por exemplo, o 1,3-propanodiol, o ácido polilático (PLA) e o polihidroxialcanoato (PHA).

Diante da possibilidade potencial de mercado desses produtos, o Departamento de Energia dos Estados Unidos emitiu um relatório com uma lista nomeando importantes plataformas químicas que poderiam ser obtidas a partir da biomassa, e, dentre eles, 12 foram elencados como sendo os principais alvos de pesquisas e desenvolvimento dentro da biotecnologia industrial, sendo o ácido 3-hidroxipropiônico um destes (WERPY; PETERSEN, 2004).

Frente à perspectiva apresentada, a proposta deste trabalho teve como objetivo principal a atuação direta no processo de produção de 3-HP por via biotecnológica, utilizando linhagens recombinantes de *Escherichia coli* como fábrica celular, tendo objetivos específicos: i) avaliar a possibilidade da utilização do glicerol como fonte de carbono pela via da β -alanina; ii) avaliar a possibilidade de substituição do IPTG pela lactose como indutor do *operon* lacUV5 e os efeitos na concentração final de 3-HP; iii) integração da regeneração do cofator NADPH; iv) aumentar a resistência da linhagem produtora ao produto; vi) Avaliar condições de processo em biorreator.

Este trabalho é parte do Projeto temático 2016/10.636-8 da FAPESP “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macro escalas” sob coordenação do Prof. Dr. Roberto Giordano (DEQ/UFSCar)

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Ácido 3-hidroxiopropiônico

O ácido 3-hidroxiopropiônico (3-HP) é um composto não quiral, constituído por três carbonos, e um isômero estrutural do ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropiônico). A presença de

dois grupos funcionais em sua estrutura (hidroxila e carboxila) favorece a sua valorização industrial por meio da obtenção de um número significativo de derivados importantes, o que torna a produção desse ácido bastante atrativa (JERS *et al.*, 2019).

Apesar de existirem rotas para a síntese química do 3-HP, a produção deste não é implementada em larga escala devido à inviabilidade econômica, ambiental e a toxicidade dos reagentes ou intermediários envolvidos no processo (DELLA PINA; FALLETTA; ROSSI, 2011; KUMAR; ASHOK; PARK, 2013).

Uma forma bastante explorada de contornar esse problema e tornar viável essa produção tem sido o desenvolvimento de bioprocessos a partir de microrganismos recombinantes. A aplicação da engenharia genética na modificação de genes relacionados à via metabólica desses microrganismos permite a construção de linhagens capazes de obter o 3-HP a partir de substratos baratos, como o glicerol, a glicose e a xilose, que podem ser obtidos, inclusive, a partir de hidrolisados de biorrefinarias. Esta estratégia tem sido utilizada a fim de se estabelecer uma produção com baixo custo, alto rendimento e altas concentrações.

Existem organismos selvagens capazes de produzir 3-HP, porém a concentração obtida por essas linhagens é baixa quando este não é obtido como produto final. Já nos microrganismos em que ele é o produto final, estes não podem ser utilizados em grande escala porque, ou a concentração final é muito pequena, ou o substrato é muito caro (KUMAR; ASHOK; PARK, 2013).

Os compostos obtidos a partir do 3-HP (figura 1) possuem um mercado global bastante atraente como, por exemplo: o ácido acrílico (>1000M\$), utilizado na produção de polímeros para revestimentos, absorventes, têxteis, fabricação de papel, selantes adesivos e outros, assim como o 1,3-propanodiol (100 - 1000 M\$), utilizado como monômero definitivo para polímeros avançados como tereftalato de polítrimetileno, usado na preparação de fibras e resinas, o ácido malônico (<100 M\$), além do poli(3-hidroxipropanoato) que apresenta um potencial relevante no setor de polímeros dada à sua temperatura de transição vítrea e ponto de fusão acima de 170°C, além de apresentar alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, tornando-o recomendado para uso em materiais cirúrgicos e liberação controlada de fármacos (DELLA PINA; FALLETTA; ROSSI, 2011; JERS *et al.*, 2019).

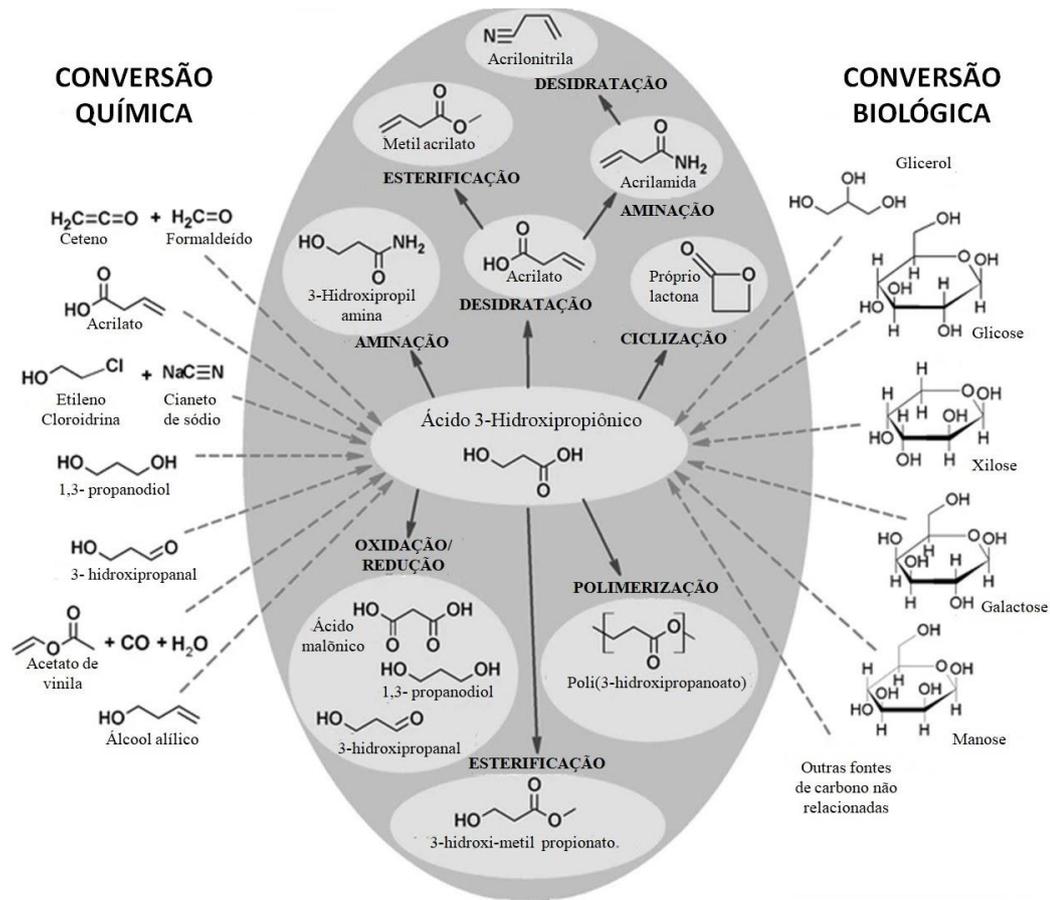


Figura 1 - 3-HP como uma plataforma química. Adaptado de Valdehuesa *et al.* (2013).

O tamanho do mercado global bem como a relevância industrial dos principais produtos que podem ser obtidos a partir do 3-HP serve como incentivo para grandes empresas como OPX Biotechnologies, Dow Chemical, Cargill, Novozymes, BASF, que têm investido no desenvolvimento de bioprocessos para a produção do 3-HP a partir de substratos renováveis como açúcares e glicerol (CHEN; NIELSEN, 2016). A Cargill, por exemplo, patenteou sete caminhos para a produção do 3-HP com um rendimento teórico de 100% a partir da glicose, porém aspectos termodinâmicos desfavoráveis ou problemas de separação do lactato e do 3-HP são levantados a partir dessas rotas (DELLA PINA; FALLETTA; ROSSI, 2011; KUMAR; ASHOK; PARK, 2013).

A produção biológica do 3-HP por microrganismos recombinantes teve início nos anos 2000 (KUMAR; ASHOK; PARK, 2013) e se intensificou, conforme mostrado por De Fouchécour e colaboradores (2018) (Figura 2), a partir da publicação de um relatório feito pelo Departamento de energia dos Estados Unidos, que identificava o 3-HP como uma das plataformas químicas entre outras onze, que poderiam ser obtidas a partir da biomassa e serem

convertidos em uma série de outros produtos com valor agregado (WERPY; PETERSEN, 2004).

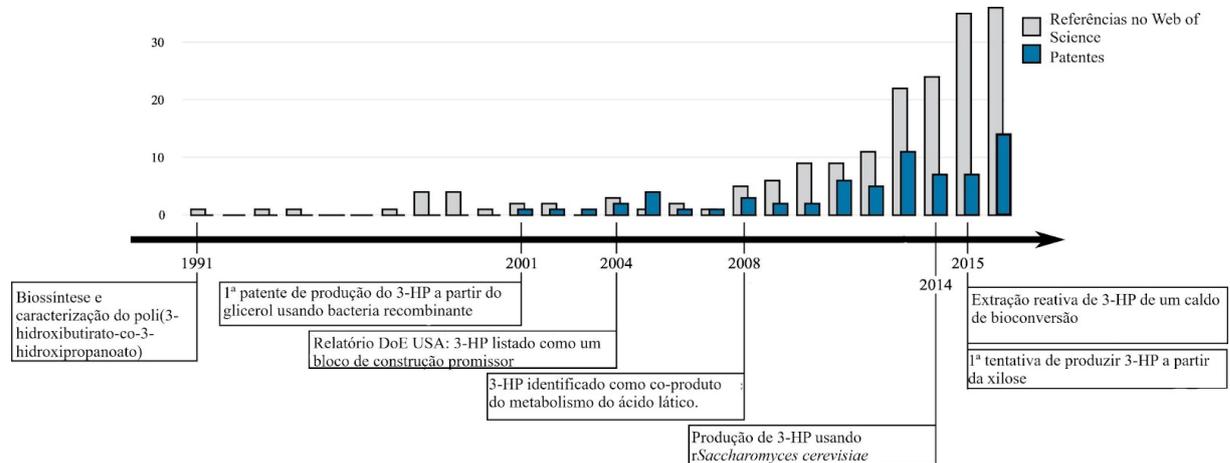


Figura 2 - Evolução ao longo dos anos do número de referências no Web of Science e no número de patentes concedidas a respeito da produção biotecnológica do 3-HP. Fonte: De Fouchécour et al. (2018).

Várias rotas biotecnológicas para a produção do 3-HP têm sido relatadas, sendo que, dentre elas, a que obteve até então maiores rendimentos e produtividade foi a via do glicerol dependente da coenzima B12 (RAJ *et al.*, 2008; RATHNASINGH *et al.*, 2009), porém este é um composto caro. Já a via do Malonil-CoA foi avaliada em diversos organismos como *E. coli* (RATHNASINGH *et al.*, 2012) ; (YANG *et al.*, 2016) *S. cerevisiae* (CHEN *et al.*, 2014; KILDEGAARD *et al.*, 2016), *Shizosaccharomyces pombe* (SUYAMA *et al.*, 2017) e *Pichia pastoris* (FINA *et al.*, 2021) e a via da β -alanina foi estudada em *S. cerevisiae* (BORODINA *et al.*, 2015), em *Issatechenkia orientalis* (OHTA *et al.*, 1991; BARNHART *et al.*, 2015) e em *E. coli* (SONG *et al.*, 2016; CHAVES, 2021), todos utilizando glicose como fonte de carbono, salvo Chaves (2021) que também avaliou o co-consumo de glicose e xilose por esta via.

1.2 Produção de 3-HP usando *E. coli* recombinante

A construção de fábricas celulares por meio da engenharia metabólica tem como objetivo o desenvolvimento de processos sustentáveis baseados em recursos renováveis visando os seguintes aspectos: i) melhorar a concentração final do produto de interesse, a produtividade e o rendimento e ii) melhorar o desempenho geral do organismo hospedeiro de forma a permitir um consumo mais inclusivo de uma variedade de substratos, a eliminação ou redução do

acúmulo de subprodutos e a introdução de novas rotas de produção para a obtenção de novos produtos (VALDEHUESA *et al.*, 2013).

E. coli foi descoberta em 1885 pelo pediatra e bacteriologista alemão Theodor Escherich. Trata-se de uma bactéria gram-negativa e anaeróbia facultativa extensamente estudada. Sendo introduzida em laboratório para estudos pouco tempo depois de sua descoberta, se tornou o procarioto mais bem estudado. Os inúmeros recursos para manipulação genética de *E. coli* desenvolvidos ao longo dos anos decorrentes do grande conhecimento acumulado sobre esse microrganismo, o rápido crescimento, as condições de cultivo fáceis e a plasticidade metabólica tornaram-no um organismo plataforma modelo (PONTRELLI *et al.*, 2018; TOUCHON *et al.*, 2009).

A aplicação da *E. coli* como organismo recombinante é apontada na literatura de forma numerosa na produção bem sucedida de uma ampla variedade de compostos, tais como: L-malato (ZHANG *et al.*, 2011), 5-aminovalerato (PARK *et al.*, 2013), ácido fumárico (SONG *et al.*, 2013), 1,4 butanodiol (SANFORD *et al.*, 2016), isopropeno (YANG *et al.*, 2016), entre muitos outros. *E. coli* também é apontada diversas vezes na literatura como organismo recombinante para produção de 3-HP, como mostrado na tabela 1, sendo as mais estudadas a via do glicerol e a via do Malonil CoA, e usando diferentes fontes de carbono, e até mesmo por meio de associação entre elas (DE FOUCHÉCOUR *et al.*, 2018).

Via Metabólica	Hospedeiro	Linhagem	Fonte de Carbono / Modo de cultivo	Concentração final [g. L ⁻¹]	Produtividade [g.L ⁻¹ .h ⁻¹]	Rendimento [mol. mol ⁻¹]	Referência
Glicerol	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	SH254	Glicerol / Reator Batelada	0,60	0,02	0,48	Raj <i>et al.</i> , 2008
Glicerol	<i>E. coli</i> BL21	KFCC 114220P	Glicerol / Reator Batelada alimentada	31,00	0,43	0,35	Raj <i>et al.</i> , 2009
Glicerol	<i>E. coli</i> BL21	SH-BGK1	Glicerol / Batelada alimentada	38,70	0,54	0,35	Rathnasingh <i>et al.</i> , 2009
Malonil-CoA	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	-	Glicose / Batelada em frascos agitados Glicose e Glicerol / Reator Batelada alimentada	0,20	0,01	-	Rathnasingh <i>et al.</i> , 2012
Glicerol	<i>E. coli</i> TOP10	JHS00947	Glicerol / Reator Batelada alimentada	14,30	0,26	0,15	Kwak <i>et al.</i> , 2013
Glicerol	<i>E. coli</i> BL21star (DE3)	-	Glicerol / Reator Batelada alimentada	57,30	1,59	0,88	Kim <i>et al.</i> , 2014
Glicerol	<i>E. coli</i> W	-	Glicerol / Reator Batelada alimentada	41,50	0,86	0,31	Sankaranarayanan <i>et al.</i> , 2014
Glicerol	<i>E. coli</i> W310	-	Glicerol / Reator Batelada alimentada	15,30	0,36	0,26	Sankaranarayanan <i>et al.</i> , 2014
Glicerol	<i>E. coli</i> W310	SPC006	Glicerol / Reator Batelada alimentada	42,10	1,31	0,22	Jung <i>et al.</i> , 2014
Glicerol	<i>E. coli</i> TOP10	JHS01300	Glicose e Xilose / Reator Batelada alimentada	29,40	0,54	-	Jung <i>et al.</i> , 2015
Glicerol	<i>E. coli</i> BL21	E.coli pdu:P:L:W	Glicerol / Batelada alimentada em frasco agitado	1,10	0,06	0,30	Sabet-Azad <i>et al.</i> , 2015
Malonil-CoA	<i>E. coli</i> BL21	BE-MDA	Glicose / Reator Batelada alimentada	10,80	0,28	0,11	Cheng <i>et al.</i> , 2016
β-alanina	<i>E. coli</i> W310	CWF4NAS	Glicose / Reator Batelada alimentada	31,10	0,64	0,42	Song <i>et al.</i>, 2016
Malonil-CoA	<i>E. coli</i>	Q2186	Glicose / Reator Batelada alimentada	40,60	0,58	0,19	Liu <i>et al.</i> , 2016
Glicerol	<i>E. coli</i>	SP4	Glicerol / Batelada alimentada	56,40	1,20	-	Sankaranarayanan <i>et al.</i> , 2017
Glicerol	<i>E. coli</i>	-	Glicerol / Batelada alimentada	76,20	1,89	0,46	Kim <i>et al.</i> , 2020
Malonil-CoA	<i>E. coli</i>	Q-3434	Glicose / Batelada alimentada	38,13	1,03	0,25	Wang <i>et al.</i> , 2022
β-alanina	<i>E. coli</i> K12	PSO119	Glicose e Xilose / Reator Batelada alimentada	29,1	0,62	0,44	Chaves <i>et al.</i>, 2022

Tabela 1 - Produção de 3-HP por *E. coli* recombinante pelas principais vias de estudo. Em destaque, de vermelho, são os trabalhos apresentados na literatura abordando o uso da via da β-alanina para produção do 3-HP em *E. coli* recombinante

1.3 Metabolismo do glicerol em *E. coli*

E. coli pode crescer em uma ampla faixa de compostos como fonte única de carbono e, cada uma destas é incluída no metabolismo central por uma série de enzimas que fazem a conversão destes em intermediários, sendo eles compostos fosforilados e ácidos carboxílicos, os quais servem como precursores para a biossíntese de outros compostos. Independente do mecanismo utilizado pela célula para o metabolismo, os fluxos através das vias centrais servem para o fornecimento de precursores e energia e estes são equilibrados com os fluxos desses componentes, junto com as fontes de oxigênio e outros íons inorgânicos para o crescimento (EL-MANSI; HOLMS, 1989).

A glicose é a fonte de carbono preferencial da *E. coli*, uma vez que é, simultaneamente fonte de carbono e de energia, e é facilmente metabolizada. Sua utilização é dependente do sistema de transporte por fosfotransferase (PTS) que é responsável pelo transporte de açúcares específicos, mas que, na ausência de substrato, estimula a produção de cAMP-CRP, responsável pela transcrição de muitos genes catabólicos, incluindo os envolvidos na utilização do glicerol. São três os principais reguladores necessários para um crescimento aeróbio equilibrado em glicerol: O cAMP-CRP que é o principal indutor do *regulon* catabólico do glicerol (que inclui *glpF*, *glpK* e *glpD*), o Cra (FruR) como regulador de alguns genes gliconeogênicos e ArcA como regulador de vários genes metabólicos centrais, incluindo o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e outros envolvidos na respiração (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2012).

O glicerol é um subproduto do processo de produção do biodiesel que pode ser convertido em diversos compostos químicos variados por meio de processos termoquímicos (DILLS *et al.*, [s.d.]; MEDEIROS *et al.*, 2011) ou biotecnológicos (DOBSON; GRAY; RUMBOLD, 2012). Por ser altamente redutível e assimilável por bactérias, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, atua como regulador do potencial redox e na reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (DILLS *et al.*, 1980).

O glicerol é um dos poucos compostos que entra nas células procarióticas por difusão. Esse processo requer um gradiente de concentração para induzir o transporte do substrato através da membrana. Proteínas do tipo poro-canal podem facilitar tal processo, uma vez que permitem a assimilação do glicerol e de outras pequenas moléculas (tais como polihidroxi-alcoois, ureia e glicina) sem gasto energético, mas excluem moléculas carregadas como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato. Em *E. coli* esse facilitador do glicerol (GlpF) ocorre em *operon* com GlpK (que codifica a glicerol quinase) (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Ao passar pela membrana plasmática, o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes (Figura 3). Uma das rotas consiste em duas etapas antes de ser inserido no metabolismo central: (i) formação do glicerol-3-fosfato a partir da fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase; e (ii) redução deste composto a dihidroxiacetona fosfato, um intermediário da glicólise, pela enzima glicerol fosfo-ubiquinona oxirredutase (FAD dependente) (GANCEDO, SERRANO, 1989).

Outra rota possível reportada por Gancedo, Gancedo e Sols (1968) e por Moat, Foster e Spector (2002) corresponde à formação de dihidroxiacetona através da oxidação do glicerol pela enzima glicerol desidrogenase. A reação prossegue com a dihidroxiacetona sendo fosforilada a dihidroxiacetona fosfato por ação da enzima dihidroxiacetona quinase (DhaK) (dependente de ATP), que alimenta a via glicolítica. Nesta etapa, a enzima dihidroxiacetona quinase usa o fosfoenolpiruvato como doador do grupo fosfato para fosforilação da dihidroxiacetona. Assim, na metabolização do glicerol pela *E. coli*, a conversão do fosfoenolpiruvato a piruvato é acoplada à fosforilação da dihidroxiacetona e realizada por uma única enzima - DhaK. Para outras fontes de carbono, a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato ocorre pela ação da enzima piruvato quinase, sendo esta a principal diferença entre o metabolismo do glicerol e de outras fontes de carbono. Adicionalmente, esta via ainda pode culminar na formação de succinato, gerando ATP, o que caracteriza vantagem bioenergética da utilização do glicerol (CINTOLESI *et al.*, 2012; SILVA; SOUZA; ANTERO, 2017).

Além destas rotas, o glicerol também pode sofrer desidratação pela enzima glicerol desidratase, em condições de anaerobiose, para produzir 3-hidroxi-propionaldeído, que posteriormente, é transformado em 1,3-propanodiol pela enzima 1,3-propanodiol oxi-redutase (NADH dependente) (RIVALDI; SARROUH; FIORILO, [s.d.]) (GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2006).

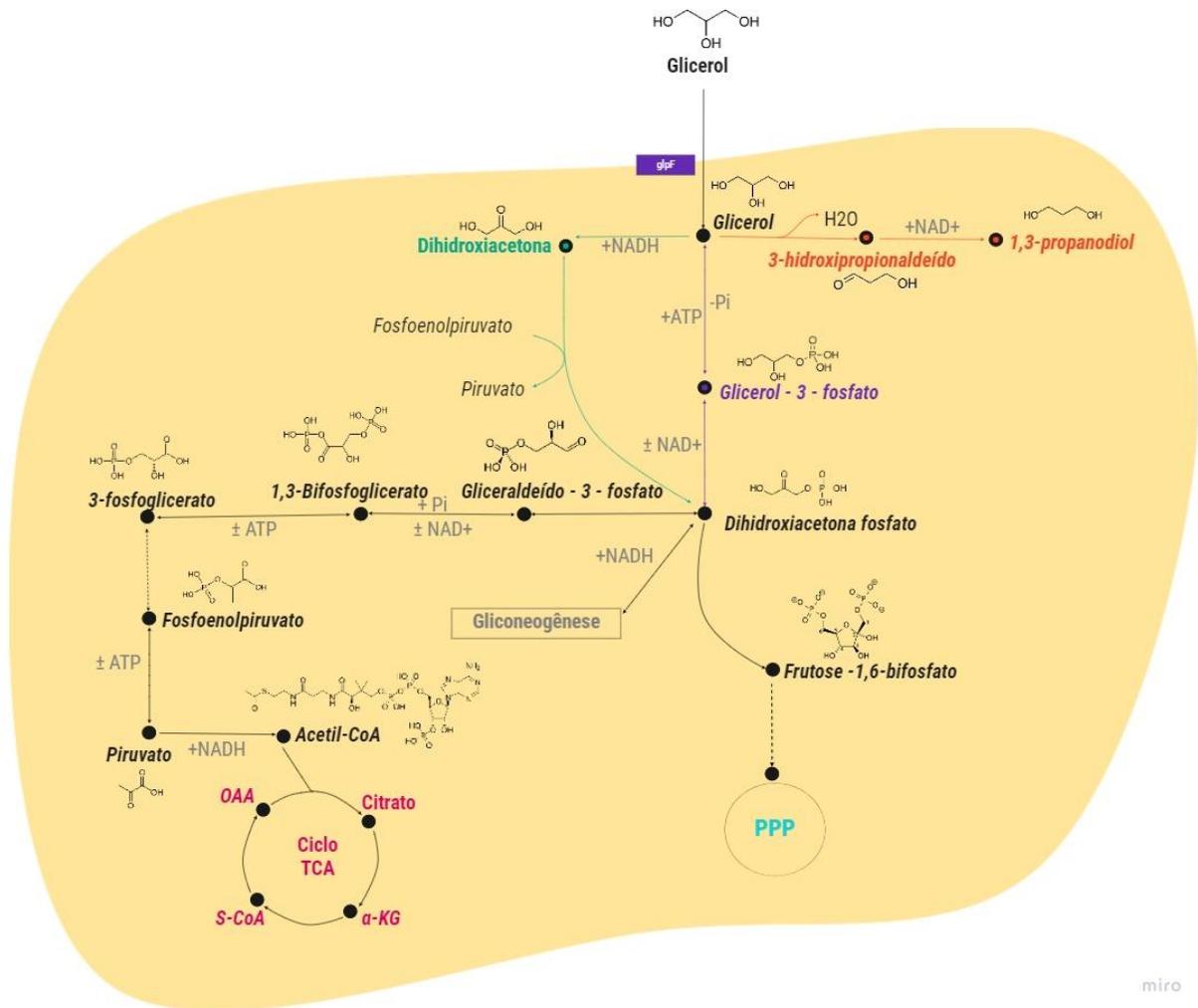


Figura 3 - Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos. A via metabólica de assimilação do glicerol destacada em roxo corresponde à reportada por Gancedo e Serrano (1989). A via metabólica de assimilação do glicerol destacada em verde corresponde à reportada por Gancedo, Gancedo e Sols (1968) e por Moat, Foster e Spector (2002), e é a mais destacada na literatura em processos aeróbios. A via de assimilação do glicerol destacada em laranja é a que ocorre em condição de anaerobiose, também extensamente estudada nos processos de utilização do glicerol como fonte de carbono para produção do 3-HP.

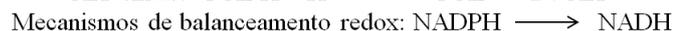
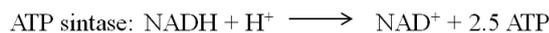
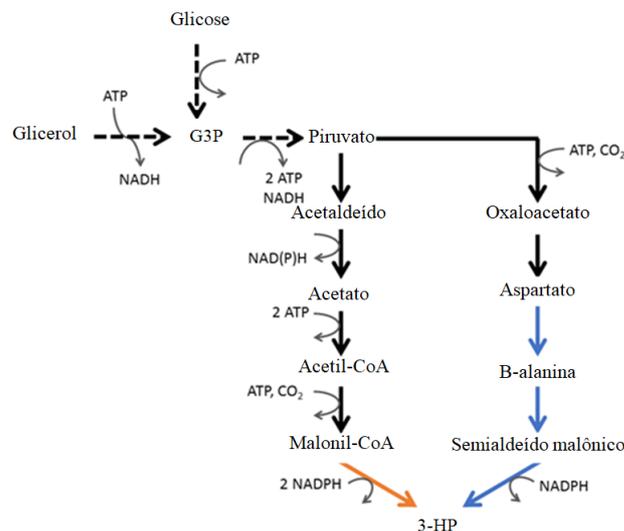
1.4 Vias metabólicas para produção do 3-HP

Uma estratégia importante para o desenvolvimento de um bioprocesso viável é a seleção de uma via metabólica que seja eficiente. Nesse contexto, diversas rotas vêm sendo estudadas para a produção do 3-HP a partir de glicerol, glicose e/ou xilose como substrato, sendo elas a oxidação de glicerol através de uma via dependente de CoA, oxidação de glicerol através de uma via independente de CoA, a via do Malonil-CoA, a via da β-alanina, rotas heterotróficas usando 1,3-propanodiol ou 3-hidroxi-propionitrila como fonte de carbono, e rotas autotróficas

usando bicarbonato de sódio ou dióxido de carbono como fonte de carbono (DE FOUCHÉCOUR *et al.*, 2018).

Independentemente da rota, esta será viável se for redox neutra, termodinamicamente favorável e produzir ATP para crescimento celular, manutenção e exportação de produtos. Além disso, a eficiência da via deve ser avaliada em relação às vias competitivas, à cinética e à estabilidade genética do hospedeiro recombinante (JIANG; MENG; XIAN, 2009; KUMAR; ASHOK; PARK, 2014).

Dentre as rotas metabólicas propostas na literatura para a produção do 3-HP, a via do glicerol é a que apresenta os maiores rendimentos, mas é uma via inviável em escala industrial do ponto de vista econômico, dada a necessidade de suplementação da coenzima B₁₂ (RAJ *et al.*, 2008; RATHNASINGH *et al.*, 2009). Fina e colaboradores (2021) avaliaram o rendimento máximo teórico do 3-HP em leveduras e constataram que dentre elas a via da β-alanina apresenta um rendimento teórico máximo superior, pois a via do Malonil CoA requer mais ATP. Porém, quando o glicerol é usado como substrato, ambas as vias apresentam rendimento teórico máximo iguais, pois há produção líquida de ATP nas duas, conforme mostrado na figura 4 (FINA *et al.*, 2021).



Via da β-alanina	0.5 Glicose	→	3-HP
Via do Malonil-CoA	0.5 Glicose + 2 ATP	→	3-HP
Via da β-alanina	Glicerol	→	3-HP + 2.5 ATP
Via do Malonil-CoA	Glicerol	→	3-HP + 0.5 ATP

Figura 4 - Vias metabólicas reportadas em levedura e cálculo do rendimento máximo teórico usando glicerol e glicose como substrato. Adaptado de FINA *et al.* (2021). As setas pretas indicam reações endógenas no

metabolismo da levedura estudada, a seta laranja indica a reação heteróloga na via do Malonil CoA e as setas azuis indicam as reações heterólogas que compõem a via da β -alanina. Utilizando a Glicose como fonte de carbono, para cada 0,5 mol de glicose tem-se a formação de 1 mol de 3-HP, sendo que, pela via do Malonil CoA há a necessidade de 2 mols de ATP para a conversão. Utilizando Glicerol como fonte de carbono, cada mol de glicerol resulta em 1 mol de 3-HP e há também a formação de ATP, sendo 2,5 mols na via da β -alanina e 0,5 mol na via do Malonil CoA.

A via da β -alanina é uma via pouco explorada. Essa rota foi primeiramente patenteada pela Cargill em *E. coli* e pela Novozymes em *Saccharomyces cerevisiae*. Nela, a glicose é oxidada em piruvato que posteriormente é convertido em β -alanina. A β -alanina é convertida em semialdeído malônico (MSA), e nesta etapa é consumido piruvato e produzida L-alanina que pode ser convertida de volta em β -alanina pela ação da enzima 2,3 alanina aminomutase. O semialdeído malônico então é reduzido a 3-HP (DE FOUCHÉCOUR et al., 2018).

Com o objetivo de estabelecer uma rota para a produção do 3-HP na levedura *S. cerevisiae* utilizando a glicose como substrato, Borodina e colaboradores (2015) utilizaram um modelo em escala genômica de *S. cerevisiae* iTO977 e avaliaram a capacidade metabólica da via do malonil-CoA e da via da β -alanina, obtendo um rendimento teórico máximo superior para esta segunda. Implementando esta última via *in vivo*, por meio da expressão de enzimas críticas, os autores obtiveram uma concentração final de 3-HP de 13,7 g/L em biorreator de 1L operando em batelada alimentada.

Song e colaboradores (2016) desenvolveram uma rota alternativa para a via da β -alanina. Nela, o aspartato é produzido a partir do fumarato e não do oxaloacetato, utilizando uma linhagem de *E. coli* construída previamente capaz de produzir e acumular o ácido fumárico. Para a síntese do 3-HP, enzimas chave foram expressas e seis genes foram deletados para aumentar o fluxo na direção de produção do ácido fumárico, alcançando uma concentração de 3-HP de 31,1 g/L utilizando batelada alimentada como modo de operação.

Lan e colaboradores (2015) estudaram a produção fotossintética de 3-HP a partir do CO₂ atmosférico utilizando cianobactérias *Synechococcus elongatus*, tanto pela via do malonil-CoA como pela via da β -alanina. Em ambas, ATP e redutores NADPH gerados pela fotossíntese são utilizados para fixação do dióxido de carbono pelo ciclo de Calvin, no qual a fixação do dióxido de carbono resulta em duas moléculas de 3-fosfoglicerato, que é reduzido a gliceraldeído 3-fosfato. O fosfoenolpiruvato (PEP) é carboxilado a oxaloacetato, que é transaminado em aspartato. O aspartato é depois descarboxilado a β -alanina, utilizando aspartato descarboxilase. β -alanina é subsequentemente transaminada para semialdeído malônico e reduzida a 3HP (Figura 5). A concentração de 3-HP obtida pela via da β -alanina foi

menor em relação à obtida pela via do Malonil-CoA, sendo 0,186 g/L e 0,665 g/L, respectivamente (LAN et al., 2015).

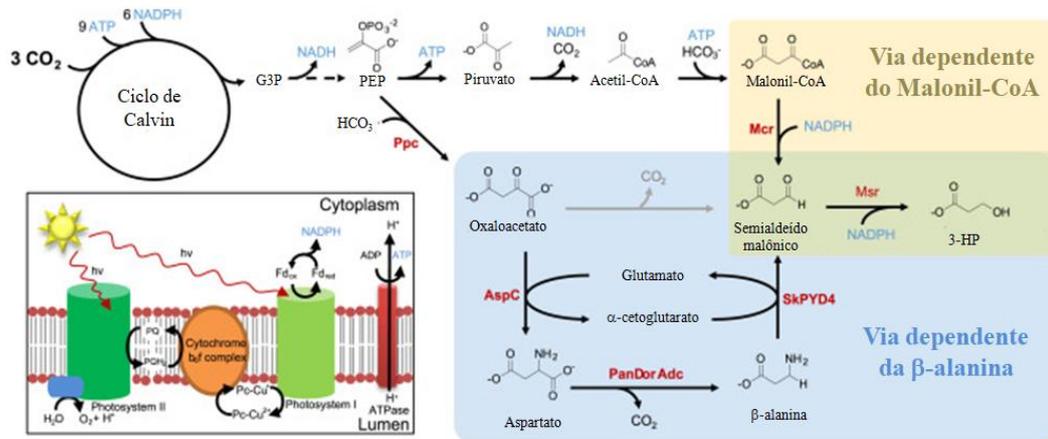


Figura 5 - Biossíntese de 3-HP a partir de CO₂ utilizando cianobactérias. Adaptado de Lan et al., (2015). G3P, gliceraldeído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; Ppc, fosfoenolpiruvato carboxilase; AspC, aspartato aminotransferase; PanD, PLP descarboxilase de aspartato independente; Adc, aspartato descarboxilase dependente de PLP; SkPYD4, β-alanine aminotransferase; Mcr, malonil-CoA redutase; Msr, semialdeído malônico reductase

Assim como a via do malonil-CoA, a via da β-alanina permite o uso de outros substratos que não sejam a glicose (DE FOUCHÉCOUR et al., 2018), o que permite explorar fontes de carbono diversas. Apesar disso, não há trabalhos na literatura que exploraram *in vivo* o uso de outras fontes de carbono além do CO₂ e da glicose por esta via.

1.5 Regulação da expressão gênica e o Operon Lac

As células possuem os genes constitutivos, ou seja, aqueles genes cujos produtos são obtidos constantemente. Em geral, esses genes codificam enzimas essenciais para o funcionamento da célula, como as enzimas da glicólise, por exemplo. No entanto, proteínas necessárias apenas em algum período específico são expressas somente quando cruciais, porque a síntese proteica demanda uma grande quantidade de energia. Portanto, a regulação da expressão gênica é influenciada por mecanismos de controle genético que regulam essas sínteses, e esses mecanismos são conhecidos como repressão e indução (TORTORA *et al.*, 2017).

A repressão é o mecanismo regulador que inibe a expressão gênica, diminuindo a síntese de enzimas. Normalmente, é uma resposta à grande quantidade de algum produto de uma via metabólica, o que acarreta a redução da expressão da via de produção daquele composto. A indução é o processo que ativa a transcrição de um gene ou um conjunto de genes, e esse processo se dá na presença de um indutor que ativa essa expressão (TORTORA *et al.*, 2017).

Um desafio na expressão heteróloga de vias multigênicas é adaptar o nível de expressão das enzimas selecionadas para que se atinja a eficiência catalítica ideal. Diante disso, Xu e colaboradores (2012) desenvolveram um conjunto de vetores compatíveis com os padrões *BioBrick*, chamados de vetores *ePathBrick* (pETM6, pCDM4, pACM4, pCOM4 e pRSM3), para permitir a montagem de um conjunto de genes em configurações nas quais é possível regular a expressão destes de diferentes formas por meio de sítios de restrição (*AvrII*, *XbaI*, *SpeI* e *NheI*) localizados em posições estratégicas. Os genes clonados podem ser organizados das seguintes formas: i) *Operon*, na qual existe um único promotor assim como um único terminador para todos os genes clonados sequencialmente e estes são transcritos e regulados em conjunto, ii) *Pseudo-operon*: nesta configuração cada gene clonado está sob o controle de um promotor independente, mas há um único terminador para toda a combinação, iii) *Monocistrônico*: é a configuração na qual cada gene clonado possui seu próprio promotor e terminador. Nessas configurações, o nível de expressão de cada gene é regulado de acordo com o posicionamento destes em relação à região promotora e terminadora.

O conjunto de plasmídeos desenvolvidos por Xu e colaboradores (2012) possui a expressão gênica controlada pelo promotor T7, e isso significa que é necessário que as cepas que os carreguem tenham um gene codificador da enzima RNA polimerase T7 (DE3) induzível para torná-los funcionais. Objetivando ampliar a aplicabilidade desta plataforma para qualquer cepa, independente da presença ou ausência do gene T7 RNAP, (DA SILVA et al., 2021) substituíram o promotor T7 pelo promotor lacUV5 - uma versão mutada do promotor lac de *E. coli* que é independente de ativadores. Assim, a expressão das enzimas heterólogas fica condicionada à indução do *operon* lacUV5 nesses vetores.

O uso de indutores é necessário em sistemas de expressão proteicas baseados no *operon* lac. Esse *operon* compreende os genes *lacZ*, *lacY* e *lacA*. *LacZ* codifica a β -galactosidase que degrada a lactose em glicose e galactose e produz a alolactose, o indutor natural do *operon* lac. *LacY* codifica a permease de lactose (lac permease), responsável pelo transporte de lactose do meio extracelular para o meio intracelular e *lacA* codifica uma transacetilase, cuja função é desconhecida. Além disso, o operon é regulado pelo produto do gene regulador (*lacI*) (TORTORA et al., 2017).

Normalmente, utiliza-se um indutor análogo à lactose, o isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Este apresenta boa efetividade na indução, não necessita de transportador e não é consumido durante o processo, o que possibilita sua recuperação e reutilização (SHOJAOSADATI et al., 2008). Porém, apesar destas características favoráveis, o

uso do IPTG para produções em larga escala não é desejável dado o seu alto custo e toxicidade (MENZELLA; CECCARELLI; GRAMAJO, 2003).

Uma alternativa ao uso do IPTG é a própria lactose, que pode promover a indução da expressão de enzimas heterólogas bem como crescimento celular, não apresenta toxicidade e tem baixo custo (SHOJAOSADATI et al., 2008) além de também ser utilizada como fonte de carbono.

O uso da lactose como indutor para expressão de proteínas recombinantes e fonte de carbono foi abordado por Studier (2005) por meio do princípio de auto-indução, no qual, a presença de compostos indutores no meio complexo ou definido desde o início do cultivo irá promover a expressão proteica assim que a fonte de carbono preferencial se esgotar, durante o crescimento (STUDIER, 2005).

Essa estratégia de auto-indução vem sendo aplicada visando a alta expressão de proteínas recombinantes. Por exemplo, Silva e colaboradores (2012) utilizaram o protocolo de auto-indução para avaliar a expressão de proteínas heterólogas em *rE. coli* e compararam a produção do antígeno vacinal rSpaA em condições nas quais a lactose e o IPTG foram utilizados como indutor, nas condições de pulso de lactose, pulso de IPTG e autoindução utilizando o meio ZYM-5052 proposto por Studier (2005). O melhor resultado foi para a condição de autoindução na qual a expressão da proteína de interesse foi 16% superior em relação às concentrações observadas com o uso do IPTG e ocorreu simultaneamente ao crescimento celular.

Li e colaboradores (2011) obtiveram um rendimento final de proteínas de massa molecular de 18 a 90 kDa 4 vezes maior, assim como maior concentração de biomassa final usando meio definido de auto-indução, em relação ao meio utilizando a indução com IPTG. Esse resultado superior foi obtido tanto em placas de microtitulação de 96 poços como em cultivos em biorreator de 15 L, com rendimentos médios de 500 mg/L de proteína alvo e densidade óptica > 20.

A abordagem de autoindução apresenta como principal e mais relevante vantagem abordada neste trabalho a substituição do IPTG pela lactose, uma vez que esta se apresenta como uma alternativa mais barata e natural, além de servir como fonte de carbono em cultivos realizados com *rE. coli*.

1.6 Integração da regeneração de cofatores

Um desafio para a inserção de vias metabólicas em microrganismos geneticamente modificados está relacionado à exigência de alguns compostos não proteicos adicionais, chamados cofatores. Cofatores são moléculas necessárias para o funcionamento de algumas enzimas, e podem auxiliar na catálise de uma reação formando uma ponte entre a enzima e seu substrato. Uma vez que não há a presença do cofator, a apoenzima não tem atividade catalítica (TORTORA *et al.*, 2017).

Quando uma via heteróloga dependente de cofator é inserida em uma célula, o equilíbrio interno de cofatores é perturbado, porque, neste caso, a célula vai precisar de mais cofator do que ela teria disponível no seu metabolismo natural e isso tem um impacto negativo sobre o funcionamento ideal daquele organismo. Com a inserção da via metabólica para produção do 3-HP surge a necessidade de aumentar a produção de NADPH na *E. coli*, porque esse cofator é necessário na última etapa da via de produção (Figura 6).

Os cofatores, em especial, os cofatores redox, atuam na transferência de energia dentro da célula. Essas moléculas servem como sinais para regulação da expressão gênica e do ciclo celular, além de estarem envolvidas em um grande número de reações bioquímicas (CHEN *et al.*, 2014).

Existem algumas estratégias para a regeneração de cofatores *in situ*, podendo ser baseadas em métodos químicos, eletroquímicos, fotoquímicos e em enzimas, sendo que a abordagem enzimática é preferida para processos industriais devido à alta seletividade e eficiência (LIU; WANG, 2007).

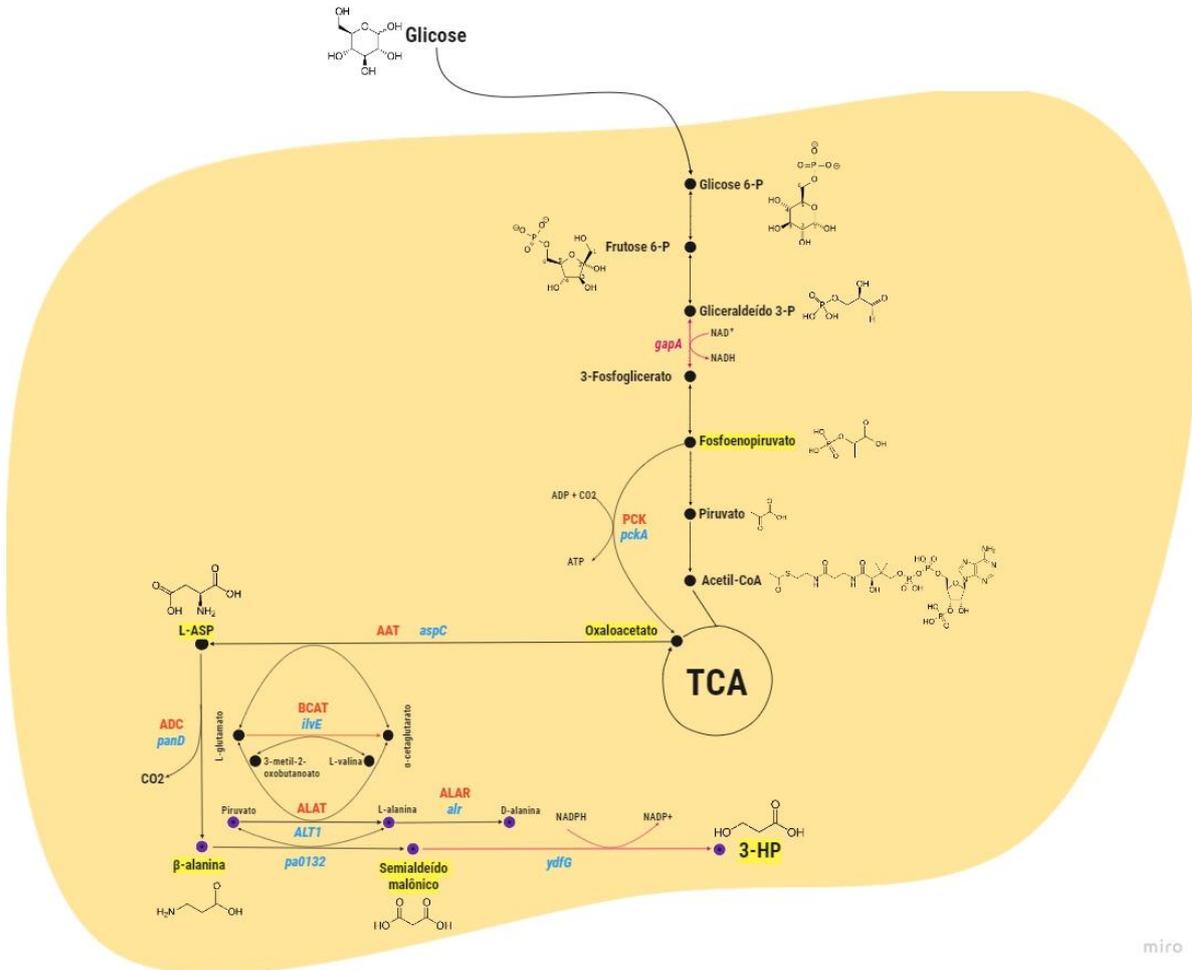


Figura 6 - Via metabólica para produção do 3-HP. Adaptado de Chaves (2021). Enzimas estão representadas em vermelho e seus respectivos genes em azul. Metabólitos chave da via da β-alanina estão destacados em amarelo. A reação catalisada pelo GAPDH NAD dependente e a última reação da via de produção, dependente do cofator NADPH, estão destacadas em rosa

A disponibilidade de NADPH em organismos geneticamente modificados para formação de diversos produtos é um obstáculo na produção eficiente destes e foi apontada por alguns autores. Chemler e colaboradores (2010), por exemplo, avaliaram a deleção de três genes para melhorar a disponibilidade de NADPH para produção de leucocianidina e catequina em *E. coli*.

Takeno e colaboradores (2016) utilizaram o gene *gapN* de *Streptococcus mutans* que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), NADP⁺ dependente, para substituir o *gapN* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica o GAPDH, NAD⁺ dependente, para esta espécie, para obter maiores concentrações de L-lisina. A estratégia resultou numa maior

produção de L-lisina pelo mutante, mas apresentou crescimento retardado. Esse efeito foi contornado expressando o GAPDH nativo de forma induzível por myo-inositol em uma fase inicial de crescimento, seguida por uma fase de produção utilizando somente o *gapN* heterólogo, quando os níveis do indutor do gene nativo caíram. Os autores obtiveram com essa estratégia um aumento de 1,5 vezes na produção de L-lisina.

Diversos outros autores avaliaram estratégias semelhantes na obtenção de compostos medicinais (SIEDLER; BRINGER; BOTT, 2011; ZHAO et al., 2011), blocos de construção para plástico biodegradável (KOCHARIN; SIEWERS; NIELSEN, 2013), aminoácidos (BECKER et al., 2007; PAPAGIANNI, 2012), entre outros.

De um modo geral, as principais fontes de NADPH são as reações de desidrogenase na via oxidativa das pentoses fosfato (PP), da via Entner-Doudoroff (ED) e no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) - na etapa de isocitrato desidrogenase. Porém, há outras importantes enzimas geradoras de NADPH que são intensa fonte de estudo como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, a glicose desidrogenase e as transidrogenases (SPAANS et al., 2015).

1.7 Regulação da expressão de *gapA* endógeno usando CRISPRi

O sistema de Repetições Palíndromas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR - *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) consiste em pequenas repetições de nucleotídeos do DNA bacteriano, cada uma adjacente a um protoespaçador que corresponde a uma região não endógena inserida no DNA bacteriano na forma de espaçadores, por bacteriófagos ou plasmídeos (figura 7). Esse sistema atua como um mecanismo de imunidade adaptativa, permitindo que o microrganismo reconheça e faça a clivagem de DNA invasor interrompendo seu ciclo (KOONIN; MAKAROVA, 2013). O arranjo dessas repetições consiste basicamente na presença dos CRISPR RNA (crRNA) – região onde ocorre o reconhecimento da sequência de DNA alvo; e o transativador de crRNA (tracrRNA) – importante para o ancoramento do RNA guia (sgRNA) na Cas9. Cas é a proteína associada ao sistema CRISPR capaz de clivar o DNA invasor (CRESS et al., 2015; WIEDENHEFET et al., 2012; JINEK et al., 2012). O sgRNA é formado pela união das duas sequências (crRNA e tracrRNA) que interagem entre si por complementaridade de bases (JINEK et al., 2012).

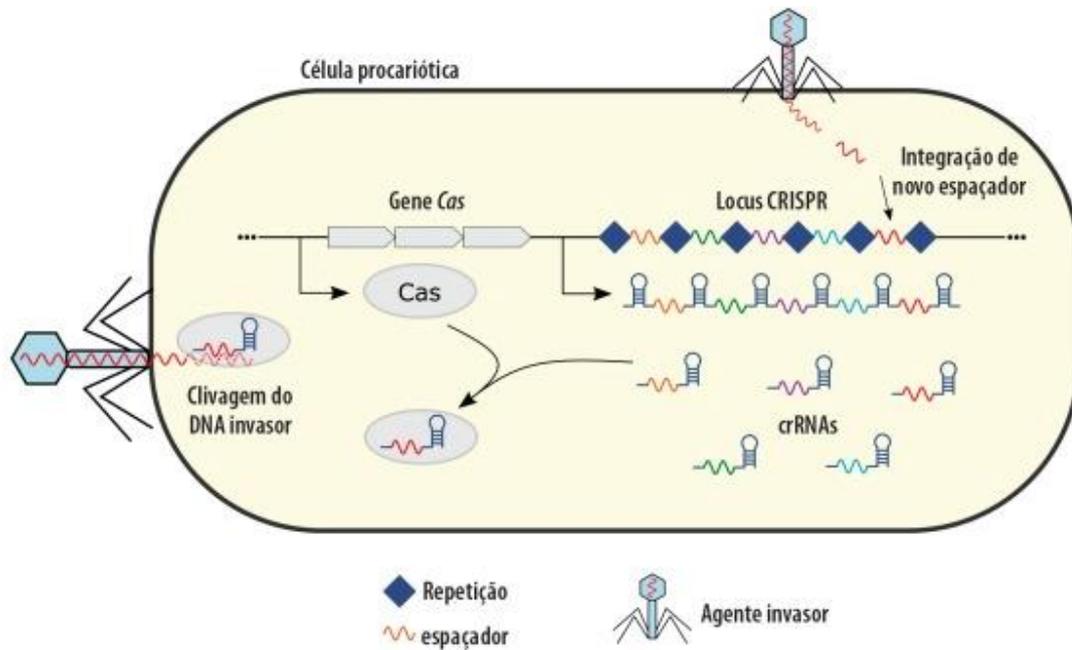


Figura 7 – Sistema CRISPRi - O sistema CRISPRi consiste em pequenas repetições de nucleotídeos do DNA bacteriano que ficam adjacente a um protoespaçador que corresponde a uma região endógena inserida no DNA por bacteriófagos, por exemplo. Esse sistema age como um mecanismo de imunidade no qual o microrganismo reconhece e faz a clivagem do DNA invasor. O arranjo dessas repetições consiste na presença do CRISPR RNA (crRNA) – região onde ocorre o reconhecimento de DNA alvo e o transativador de crRNA (tracrRNA) – importante para o ancoramento do RNA guia na cas9 (o sgRNA é formado pelo ancoramento de crRNA e tracrRNA). Cas9 é a proteína associada ao sistema CRISPR capaz de clivar o dna invasor.

Os mecanismos CRISPR/Cas em procariotos são divididos em duas classes, cada uma dividida em três tipos com base na natureza do complexo efetor e nos diferentes genes Cas. Tipos I, III e IV pertencem à Classe I e se caracterizam pelo emprego de múltiplas proteínas Cas no complexo efetor; já a Classe II agrupa os tipos II, V e VI, que se caracterizam pela presença de uma única proteína efetora (GAUSIUNAS et al., 2012).

O sistema dCas9, diferente do Cas9, utiliza uma proteína Cas9 cataliticamente desativada, dessa forma, a dCas9 não causa a quebra da fita dupla de DNA. A modulação da expressão gênica ocorre por meio de ativadores transcricionais à proteína dCas9 (para o aumento da expressão gênica – CRISPRa) ou por meio da inibição física da transcrição de um gene pela própria proteína dCas9 (redução da expressão gênica – CRISPRi).

A técnica de CRISPR de interferência (CRISPRi / CRISPR/dCas9) fornece uma abordagem de perturbação seletiva simplificada da expressão genética. Quando a proteína Cas9 cataliticamente inativa é coexpressa com o sgRNA, esse complexo liga-se a elementos do DNA complementares ao sgRNA causando um bloqueio estérico que interrompe a transcrição

daquela região pela RNA polimerase, resultando na repressão do gene alvo (figura 8) (LARSON et al., 2013).

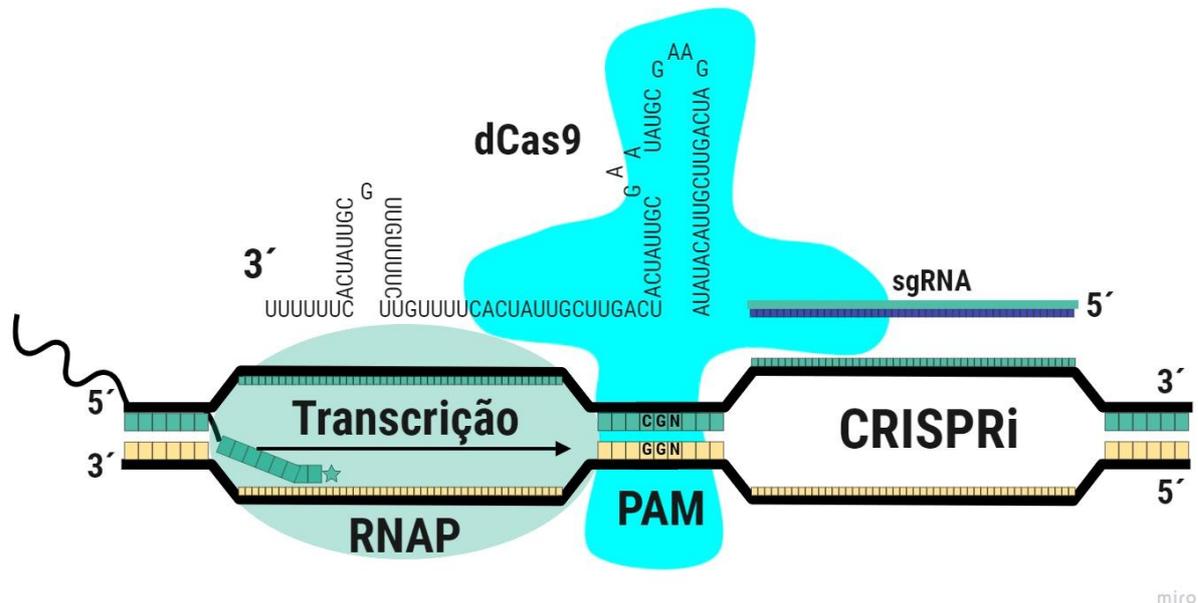


Figura 8 – Mecanismo de CRISPRi- Diferente do mecanismo CRISPR Cas9 em que ocorre a clivagem da fita dupla de DNA na região do alvo, no sistema CRISPR de interferência utiliza-se uma enzima Cas9 cataliticamente inativa, dessa forma a quebra da fita dupla não ocorre. Nesse sistema, a modulação da expressão genica ocorre por meio da inibição física da transcrição de um gene pela própria proteína dCas9. Quando a proteína dCas9 é coexpressa com o sgRNA esse complexo liga-se a elementos do DNA alvo, complementares ao sgRNA causando um bloqueio que interrompe a transcrição daquela região, resultando na repressão do gene alvo. Para que Cas9 funcione, ele também requer um motivo adjacente protospaço específico (PAM) que varia dependendo das espécies bacterianas do gene Cas9. A Cas9 mais usada, derivada de *Streptococcus pyogenes*, reconhece uma sequência PAM de NGG que é encontrada diretamente a jusante da sequência de alvo no DNA genômico, na cadeia não-alvo. A Cas9 irá procurá-lo antes de identificar o DNA alvo. Quando Cas9 identificar o PAM correto, ela então verificará se a região *upstream* corresponde ao sgRNA guia antes de fazer a edição.

1.8 Produção de ácidos orgânicos por *rE. coli*: Toxicidade e aumento da tolerância

Semelhante a outros ácidos orgânicos, o 3-HP causa inibição do crescimento celular. A toxicidade dos ácidos orgânicos é um dos principais gargalos técnicos em bioprocessos baseados no uso de hospedeiros porque muitos desses ácidos exibem efeitos tóxicos na célula antes mesmo que suas concentrações atinjam níveis comercialmente importantes.

Apesar das limitações, o uso da *E. coli* como hospedeiro para produção de ácidos orgânicos apresenta vantagens não só do ponto de vista da facilidade de manipulação genética desse microrganismo, mas também sobre o seu desempenho na produção destes. Em seu metabolismo, *E. coli* apresenta naturalmente vias de produção de importantes ácidos orgânicos

de alto valor agregado: ácido láctico, ácido succínico e ácido glicólico (YANG et al., 2016) (figura 9), e tem sido utilizada com sucesso na produção em escala semi-industrial de dois destes (ácido láctico e ácido succínico) a partir de cepas geneticamente modificadas por evolução adaptativa e engenharia metabólica (AHN; JANG; LEE, 2016; FU et al., 2017; NIELSEN; TILLEGREEN; PETRANOVIC, 2022).

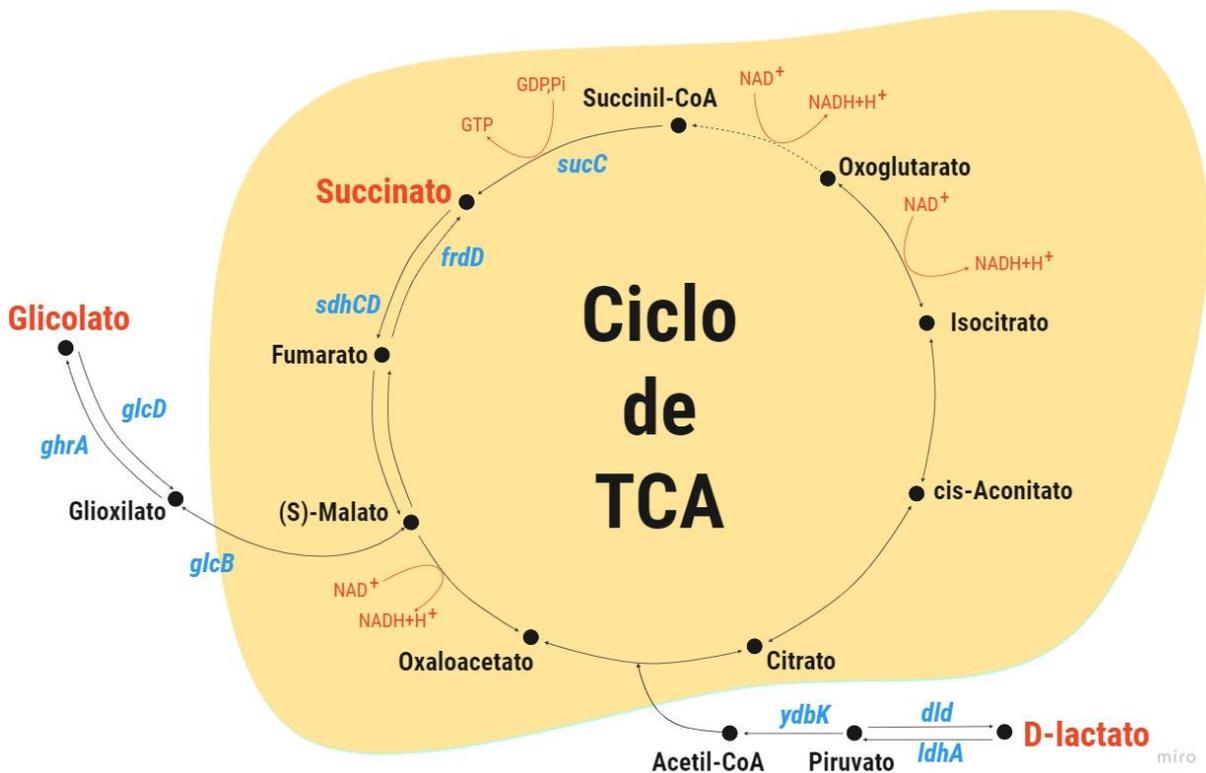


Figura 9 - Via metabólica endógena de *E. coli*, do TCA, com produção de ácidos orgânicos importantes. Ácido glicólico, com um mercado estimado em US\$ 159,6M em 2015, com projeção para US\$415M até 2024. Ácido D-láctico com mercado global avaliado em US\$525,47M em 2020 com projeção de crescimento a uma taxa anual composta de 18,1% de 2021 a 2028. Ácido Succínico com mercado global de US\$181,6M em 2019 com projeção pra chegar a US\$237,8M em 2022.

É natural que as condições do processo provoquem alterações que afetem o fluxo metabólico ou o crescimento da bactéria. O acúmulo gradual dos produtos ácidos no meio durante a fermentação pode causar alteração do pH causando sensibilidade ao microrganismo. Por este motivo, estudos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos para o desenvolvimento de estratégias com o objetivo de contornar os efeitos da toxicidade e aumentar a resistência à produtos ácidos, inclusive para *E. coli* como hospedeiro nesses processos, como apresentado na Tabela 2 por Yang e colaboradores (2021).

Estratégias	Substâncias/sistemas alvo	Fatores de ativação/modulação	Proteína e função essenciais	Mecanismo de resistência a ácido
Ajuste da composição dos lipídios da membrana	Ácidos graxos insaturados	A acidificação pode ser diretamente detectada pelos resíduos de histidina periplásmica CpxR-CpxA do sistema de dois componentes, e o CpxR se liga à região promotora do fabA/fabB para ativar a transcrição	FabA/FabB são genes essenciais na via de síntese de hidrocarbonetos insaturados, atuando como 3-hidroxiacyl-ACP desidratase/isomerase e 3-oxoacyl-ACP, respectivamente	A regulação da fabA/fabB aumenta a produção de ácidos graxos insaturados, e a composição da membrana celular muda diminuindo a fluidez da membrana, mantendo a homeostase
	Ácidos graxos ciclopropanos (CFA)	Um promotor proximal (estimulado pela regulação do RpoS no período de crescimento estável) e um promotor distal (em todo o ciclo de crescimento)	Cfa, ciclopropano-graxo-acril-fosfolipido-sintase	Não há uma resposta conclusiva sobre se o aumento do CFA melhorou ou diminuiu a mobilidade da membrana
Equilíbrio de ânions e prótons	Família de proteínas CLC	pH extremamente baixo e concentração de ânions	A. CLC - canais tipo Cl ⁻ B. Membrana transportadora reversa de íons cloreto/hidrogênio	A. Permite que os ânions passem rapidamente através da membrana celular B. Transportando H para fora e ânions para dentro, restaurando a carga dentro da célula a uma carga negativa normal +
Consumo de prótons	Sistema AR oxidativo, AR1 (sistema reprimido por glicose)	pH baixo, fator σ alternativo (RpoS) e proteína receptora cAMP (CRP)	RpoS	Protege as células da exposição transitória ao pH 2.5
	AR2 dependente de glutamato	pH baixo	Glutamato descarboxilase GadA e GadB e pode transformar glutamato em ácido glutamato-aminobutírico (GABA)	GadA e GadB utilizam ácido glutâmico para gerar GABA durante a descarboxilação para consumir próton H ⁺ , aumentando assim o valor do pH intracelular, e, em seguida, transportar o GABA para o exterior através do transportador GadC, protegendo células de exposição temporária à variação de pH entre pH 2-3.
	AR3 dependente de arginina	pH baixo	Arginina descarboxilase AdiA e proteína reversa AdiC	Troca arginina extracelular por produto de amina endógena descarboxilada mantendo o pH interno em torno de 4,5
	AR4 dependente de lisina	pH baixo	Lisina descarboxilase CadA e lisina CadB/resistência a cadaverina	Troca de lisina extracelular por lisina endógena descarboxilada

Tabela 2 - Estratégias de sobrevivência para *E. coli* com desregulação no equilíbrio do pH intracelular. Fonte: (YANG et al., 2021)

Ensaio de evolução adaptativa aliados à técnicas de engenharia genética e metabólica tem sido estudados no desenvolvimento de linhagens de *E. coli* para produção de ácidos orgânicos como ácido lático (DIEN; NICHOLS; BOTHAST, 2001), ácido succínico (VEMURI; EITEMAN; ALTMAN, 2002) e o 3-HP (NGUYEN-VO et al., 2019; NGUYEN-VO et al., 2020).

O principal fator que contribui para a alta toxicidade dos ácidos orgânicos às células é a sua capacidade de se difundir através da membrana celular quando estão na forma não-dissociada (figura 10). Ao entrar no citoplasma, ligeiramente alcalino, os ácidos se dissociam, alterando o pH interno pela liberação de prótons e ânions. Essa perturbação no pH citoplasmático inibe diferentes aspectos do metabolismo resultando na desnaturação de enzimas essenciais além de provocar um aumento na pressão de turgor resultante da tentativa de regulação do pH, causando perturbação na osmolaridade da célula e redução da viabilidade e no potencial de crescimento dela (WARNECKE; GILL, 2005).

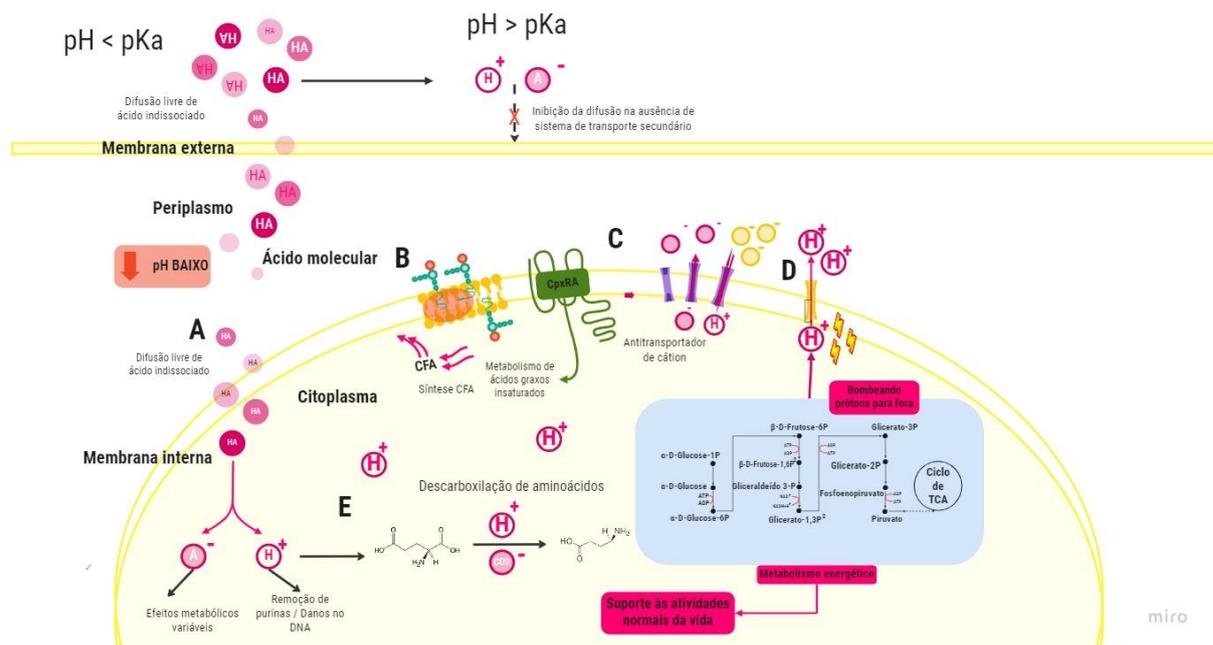


Figura 10 - Mecanismo de ação da célula sobre estresse ácido. A) moléculas de ácido orgânico não dissociados se difundem através da membrana celular para o citoplasma, que, inicialmente está em um pH perto da neutralidade. O transporte de moléculas dissociadas depende de um Sistema de transporte em pHs neutros ou básicos. Ao entrar no citoplasma o ácido se dissocia em ânions (-) e prótons (+). B) CpxRA aumenta a síntese de ácidos graxos insaturados o que provoca uma consequente diminuição da flacidez da membrana, causada pela variação na proporção dos ácidos graxos produzidos. C) Os efeitos no pH interno são mitigados pelo transporte de prótons para fora da membrana e E) pelo consumo de prótons por reações de descarboxilação. D) Mais fatores energéticos são fabricados para manter as atividades normais da célula.

Um estudo comparando os efeitos tóxicos no crescimento celular provocados pelo 3-HP e outros ácidos fracos semelhantes foi conduzido por CHUN e colaboradores, (2014) usando *E. coli* W como cepa avaliada. Nos resultados apresentados pelos autores, um efeito tóxico aproximadamente 4 vezes maior foi observado para o 3-HP em comparação com o ácido láctico, resultado atribuído à sua menor acidez e maior valor do pKa em relação ao seu isômero. Apesar de considerar o efeito dos ânions na redução da resistência da célula, na presença de ácidos fracos os autores atribuem a maior toxicidade ao aumento da concentração de prótons intracelular.

A redução do acúmulo intracelular de produto tem sido investigada para atuar como “válvula de segurança” quando a célula for exposta a situações de estresse ácido. Katsube; Ando; Yoneyama, (2019) desenvolveram uma aplicação relacionada para *E. coli* na produção de L-alanina que consiste na excreção do produto por meio de uma proteína exportadora de L-alanina (AlaE) que faz o transporte quando a estabilidade estrutural e funcional da célula é interrompida por um fluxo de aminoácidos externos. Esse estudo fortalece a hipótese de sistemas internos das células sensíveis a produtos específicos que fazem a regulação da permeabilidade e contribuem para estabilidade celular.

Nos estudos de (NGUYEN-VO et al., 2019), alterações no gene *yieP* ou sua exclusão completa influenciaram no aumento da tolerância de linhagens de *E. coli* em meio contendo 3-HP. Nesse estudo, linhagens de *E. coli* foram testadas utilizando glicose e glicerol como fontes de carbono avaliando os efeitos de alterações e deleção desse gene nas linhagens W, B, BL21, K-12 MG1655 e K-12 W3110. Com exceção da BL21, as demais linhagens adquiriram tolerância ao 3-HP com as modificações avaliadas.

Em um estudo posterior de (NGUYEN-VO et al., 2020) que visava investigar o mecanismo de tolerância ao 3-HP a partir da deleção do gene *yieP*, foi relatado que a deleção de *yieP* apresentou uma transcrição superior de dois *operons*, sendo eles *ykgEFG* e *yohJK* e outras menos significantes, sugerindo que o gene *yieP* regula negativamente a expressão de vários genes. Para avaliação da importância funcional desses *operons*, principalmente dos que apresentam função desconhecida, os autores realizaram experimentos de deleção. Os resultados desses experimentos demonstraram que a deleção dos genes *yohJK* torna as células sensíveis ao 3-HP e essa sensibilidade não é solucionada pela deleção do gene *yieP*, ao contrário dos genes *ydcA* e *adiY*, cujas deleções também causaram sensibilidade celular ao 3-HP, mas esse efeito foi contornado pela deleção do *yieP*. A análise desses resultados indica que a tolerância ao 3-HP resultante da deleção do *yieP* é, em grande parte, mediada pela expressão dos genes

yohJK, que também melhorou a tolerância ao 3-HP pela linhagem BL21, o que não havia sido observado apenas com a deleção do *yieP* no estudo anterior.

Apesar do mecanismo para o aumento da tolerância ao 3-HP pela expressão do *yohJK* ainda ser indefinido, essa expressão tem como efeito a redução da concentração de 3-HP intracelular, o qual pode ser útil no desenvolvimento de linhagens para obtenção de alto título de 3-HP por vias metabólicas (NGUYEN-VO et al., 2020).

1.9 Parâmetros de processo e cultivo celular

Uma das estratégias mais aplicadas para maximizar o fluxo de carbono do substrato em direção ao produto, em vias metabólicas, é a engenharia genética. No entanto, os parâmetros de processo também podem exercer um importante papel nos resultados desejados, o que torna esta estratégia desafiadora, uma vez que, em relação às técnicas de edição gênica, parâmetros operacionais ainda são pouco estudados no caso do 3-HP.

1.9.1 Meios de cultivo

Os meios de cultivo são formados pela combinação de substâncias fundamentais para o crescimento celular e a produtividade do microrganismo, cuja composição pode variar de acordo com as exigências nutricionais. Eles podem ser definidos ou complexos. Nos meios definidos, a composição de cada substância que o constitui é conhecida. Por outro lado, a composição do meio complexo possui ingredientes cuja composição exata não é conhecida, tais como extratos de carne, extrato de leveduras, entre outros. Estes constituintes servem como fonte de carbono, nitrogênio, sais minerais e outros componentes que podem ser necessários para satisfazer as necessidades nutricionais e energéticas da linhagem de trabalho.

A composição do meio de cultivo afeta vários processos metabólicos celulares, e isso ocorre porque a presença ou ausência de diferentes nutrientes pode ativar ou desativar processos metabólicos específicos. De acordo com Brown (2003), a velocidade específica de crescimento (μ) é favorecida em meios complexos nos quais encontram-se disponíveis fatores de crescimento como fontes de aminoácidos, peptídeos, nitrogênio e outros nutrientes orgânicos e inorgânicos necessários. Em contrapartida, os meios definidos permitem um maior controle sobre os efeitos de inibição por substratos e metabólitos tóxicos a partir do controle de fornecimento da fonte de C, permitindo atingir maiores concentrações celulares (C_x) em alguns casos.

Embora a importância do meio de cultivo para os processos metabólicos seja reconhecida, estudos específicos utilizando metabolômica para investigar os efeitos dos meios complexos e mínimos nos perfis metabólicos dos microrganismos ainda são pouco frequentes. Na contramão dessa realidade, Kim, J. e Kim, K. (2017) avaliaram os perfis metabólicos intracelulares de *E. coli* e *S. cerevisiae* em meios mínimos e complexos, verificando que os níveis de aminoácidos essenciais para síntese proteica e crescimento celular foram, significativamente mais elevados no meio complexos; em contrapartida, os níveis de açúcares, álcoois e ácidos graxos foram significativamente maiores nos organismos cultivados em meios mínimos, reforçando os resultados obtidos nos estudos de Brown (2003).

Um estudo sobre o impacto da composição do meio no crescimento microbiano, realizado por Couvreur e colaboradores, 2017 utilizando o microrganismo *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 mostrou que, o meio ideal pode proporcionar um aumento de até 70% na produção de 3-HP. Para isso eles estudaram coprodutos de beterraba e trigo para formular 28 meios de cultivo diferentes, variando as proporções de açúcar, extrato de levedura, Tween 80 e vitamina B12. A avaliação do desempenho dos meios foi realizada de acordo com a densidade óptica máxima obtida e a produção de 3-HP ao final do processo de bioconversão.

Além da composição geral do meio, a fonte de carbono utilizada também tem grande impacto na obtenção do produto de interesse uma vez que esta está diretamente relacionada à distribuição do fluxo de carbono nas vias metabólicas. Embora a escolha mais comum para a via da β -alanina seja a glicose, como fonte de carbono, o uso do glicerol apresenta como vantagem a redução da produção do acetato como subproduto. Apesar disso, ainda não foi reportado nenhuma pesquisa *in vivo*, na literatura, que utilize o glicerol como fonte de carbono por esta via.

Utilizando um Modelo Estendido do Metabolismo Central de Carbono pelo software COPASI para avaliar a produção de ácido acrílico por meio das vias do Glicerol, Malonil-CoA e β -alanina, utilizando glicose e glicerol como fontes de carbono, Oliveira e colaboradores (2021) observaram uma produção teórica de cerca de 1,2 vezes maior de 3-HP (intermediário na obtenção do ácido acrílico) utilizando glicerol como fonte de carbono, em relação à glicose, pela via da β -alanina.

1.9.2 Modos de operação do Biorreator

A maioria dos estudos realizados sobre a produção de 3-HP por vias metabólicas é conduzida em frascos agitados e reatores de pequeno volume (DE FOUCHÉCOUR et al., 2018)

Quando ensaiados em biorreator, o modo de operação pode ser alterado visando melhorar a produtividade no processo. Isso é possível porque a operação em biorreator permite um controle de parâmetros que não podem ser controlados em frasco agitado e que tem influência direta sobre os resultados como o pH, aeração e tipo de alimentação.

Embora cultivos realizados em biorreator permitam trabalhar com modo contínuo, descontínuo ou semi-contínuo, o modo em batelada alimentada (semi-contínuo) é o mais comum (conforme observado na Tabela 1 deste trabalho), pois permite o controle do fornecimento de substrato de acordo com o consumo dos componentes do meio, a formação de produto e o crescimento celular (LIU, 2017). No entanto, esse modo de operação também necessita de estratégias bem definidas de alimentação a fim de que se maximize a formação do produto, e isso pode requerer o uso de equipamentos e softwares para controle contínuo das condições do processo.

Cultivos em batelada alimentada permitem manter a concentração de substrato baixa, ajudando a evitar a ocorrência de inibição por substrato e fenômenos deletérios devido a altas concentrações de substrato ou acúmulo de intermediários tóxicos (HUANG et al., 2013).

1.9.3 Estratégias de cultivo

Além do modo de operação, outros parâmetros podem influenciar a concentração final do produto, entre eles, a temperatura, a disponibilidade de oxigênio dissolvido e a velocidade específica de crescimento celular. No entanto, esses aspectos têm sido objeto de menor atenção em comparação com as técnicas de engenharia metabólica para produção de 3-HP por microrganismos recombinantes.

Em um estudo realizado por Raj e colaboradores (2009), ao conduzir um experimento para produção de 3-HP em *E. coli*, diminuindo a relação de líquido-frasco de 0,4 para 0,2 para melhorar o nível de aeração, a concentração final de 3-HP foi aumentada em 2,2 vezes, demonstrando o efeito das condições de aeração nesse processo. Ko e colaboradores (2017) avaliaram diversas taxas de aeração em biorreator aplicando velocidade de agitação entre 200 e 600 rpm, observando um aumento na transferência de oxigênio, com o aumento da velocidade de agitação, melhorando o crescimento celular em 2,8 vezes além de melhorar o rendimento da produção de 3-HP de 0,18 para 0,38 mol de 3-HP/ mol de glicerol, a 600 rpm.

Embora haja um consenso da temperatura ótima de crescimento de *E. coli* ser 37°C, não necessariamente essa temperatura também é a melhor para produção. A redução da temperatura para 30°C, por exemplo, pode oferecer vantagens como a diminuição dos efeitos tóxicos dos

metabólitos celulares, da geração de calor pelo metabolismo e da demanda de oxigênio. No entanto, há também os efeitos negativos dessa redução como a diminuição da capacidade de consumo de nutrientes e da velocidade específica de crescimento (LEE, 1996).

2 REVISÃO DOS RESULTADOS DO TRABALHO ANTERIOR

O presente trabalho é uma continuação do trabalho realizado por Gabriel Chaves (CHAVES, 2021) durante o seu Mestrado, desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, no Programa de Pós-graduação em Engenharia Química - PPGEQ UFSCar, cujos principais objetivos eram i) construir uma via heteróloga para produção do 3-HP em *E. coli* e ii) otimizar a produção a partir de alvos metabólicos preditos na literatura e por modelagens *in silico*.

A rota de produção do 3-HP escolhida para estudo foi a via da β -alanina, por ser uma via pouco estudada e apresentar grande potencial de otimização. Porém, a etapa de conversão da β -alanina em semialdeído malônico não é uma via presente naturalmente no metabolismo da *E. coli* e, portanto, foi necessário inseri-la a partir da clonagem do gene *pa0132* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que codifica a enzima responsável por essa conversão. Além disso, os genes que codificam enzimas para conversão do L-Aspartato em β -alanina (*panD* de *Corynebacterium glutamicum*) e o gene *ydfG* de *E. coli* que codifica a reação de redução do semialdeído malônico em 3-HP, foram superexpressos para favorecer a produção do ácido de interesse. Esses genes foram combinados em um plasmídeo pEbtyGpD, chamado de “plasmídeo da via” para obter a primeira linhagem de produção, chamada de PS100, resultando numa concentração final de 3-HP de $0,338 \pm 0,044$ g/L.

Utilizando um modelo metabólico em escala genômica (iML1515) de *Escherichia coli* K-12 MG1655, modificado para inserção da via heteróloga de produção do 3-HP, foram executadas simulações para identificação de alvos não intuitivos que poderiam incrementar o fluxo de carbono na via de produção de 3-HP pela linhagem já construída. As reações alvo identificadas foram a superexpressão da reação da alanina racemase - codificada pelo gene *alr*, de *E. coli*, e da reação da L-alanina aminotransferase - codificada pelo gene *ALT1*, de *Saccharomyces cerevisiae*. Esses genes foram clonados no plasmídeo pRSM6, gerando o plasmídeo pRAR. Além disso, outra modificação implementada com base nas análises *in silico* foi a deleção da reação da L-Valina Transaminase (codificada pelo gene *ilvE*) de *E. coli*. Essas modificações resultaram na linhagem PSO107, que teve como produção final $0,743 \pm 0,016$ g/L de 3-HP em cultivos usando glicose como fonte de carbono e $1,147 \pm 0,015$ g/L de 3-HP em cultivos com a mistura de glicose: xilose (1:1 na base C-mol).

Para avaliar o efeito da superexpressão da reação de carboxilação do fosfoenolpiruvato a oxaloacetato e posterior conversão deste a L-aspartato, o gene *ppc* de *Corynebacterium glutamicum* foi agrupado ao plasmídeo pRAR da linhagem PSO107, resultando no plasmídeo pRARpCg e gerando a linhagem PSO119 (figura 11) que teve como produção final $0,792 \pm 0,017$ g/L de 3-HP em cultivos usando glicose como fonte de carbono e $1,294 \pm 0,009$ g/L de 3-HP em cultivos com a mistura de glicose:xilose (1:1 na base C-mol) (Chaves et al., 2022).

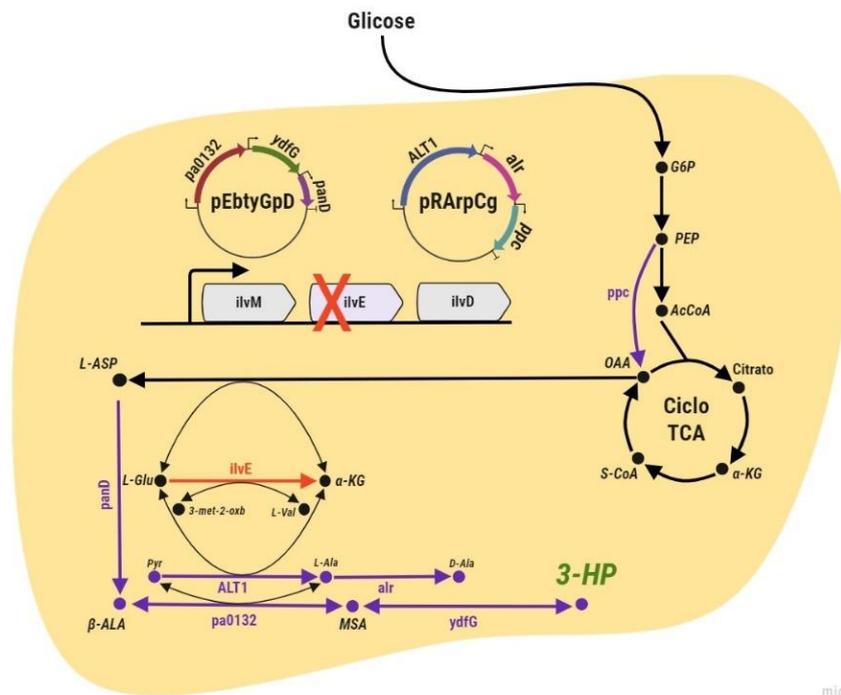


Figura 11 - Representação esquemática da linhagem PSO119. Adaptado de Chaves (2021). As setas em negrito representam as reações superexpressas no metabolismo celular, e a seta em vermelho representa a reação deletada.

G6P, Glicose 6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; AcCoA, Acetil Coenzima A; OAA, Oxaloacetato; α -KG, alfaetogluturato; S-Coa, succinil coenzima A; L-ASP, L-Aspartato; β -ALA, β -alanina; MAS, Semialdeído malônico; 3-HP, ácido 3-hidroxi propiônico; L-Glu, L-Glutamato; 3-met-2-oxb, 3-metil-2-oxobutanoato; L-Val, L-valina; Pyr, Piruvato; L-Ala, L-Alanina; D-Ala, D-Alanina.

A tabela 3 traz um resumo das modificações genéticas feitas para a construção da linhagem PSO119.

Gene	Microrganismo de origem	Objetivo da modificação	Local de clonagem
<i>pa0132</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Codifica a enzima responsável pela conversão da β -alanina em MSA	Plasmídeo da via (pEbyGpD)
<i>panD</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Codifica a enzima responsável pela conversão do L-aspartato em β -alanina	
<i>ydfG</i>	<i>Escherichia coli</i>	Codifica a enzima responsável pela redução do MSA a 3-HP	
<i>alr</i>	<i>Escherichia coli</i>	Modificações realizadas para incrementar o fluxo de carbono na via de produção	Plasmídeo pRARpCg
<i>ALT1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>ppc</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Deletado para incrementar o fluxo de carbono na via de produção	
<i>ilvE</i>	<i>Escherichia coli</i>		

Tabela 3 - Modificações genéticas para a construção da linhagem PSO119

A partir desta linhagem estruturam-se os objetivos deste trabalho, que envolve a otimização da fábrica celular obtida e a avaliação de parâmetros de processo a fim de se obter uma concentração final de 3-HP superior.

3 METODOLOGIA

As metodologias descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) do Departamento de Engenharia Química na Universidade Federal de São Carlos.

3.1 Seleção dos genes gap heterólogos para regeneração de cofator NADPH

Para seleção dos genes heterólogos que codificam a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), o principal fator observado para as enzimas escolhidas era a dependência do cofator NADP para que fosse obtido o cofator NADPH como produto da reação. Para isso, foi realizada uma busca na base de dados BRENDA (brenda-enzymes.org) por enzimas GAPDH NADP dependentes e seus respectivos microrganismos.

A escolha das enzimas e dos microrganismos hospedeiros foi baseada no valor de Km das enzimas e a disponibilidade do microrganismo hospedeiro. Com base nesses parâmetros, foram selecionados os seguintes microrganismos com as respectivas enzimas de interesse:

Microrganismo	Fornecedor	gene alvo	Atividade específica da enzima GAPDH [μmol/min/mg]	Km [mM]
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Prof ^a Dra. Danielle Pedrolli (UNESP)	<i>gapB</i>	-	0,1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Fundação André Tosello	<i>gapN</i>	0,01	-
<i>Streptococcus equi subs zooepidemicus</i>	Prof ^a Dra. Helena Santana (UNICAMP)	<i>gapN</i>	0,011	-
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655	LAFAC	<i>gapA</i>	-	0,89

Tabela 4 - Seleção dos genes de trabalho

3.2 Linhagens bacterianas

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi utilizada para a clonagem de genes, propagação e estocagem de plasmídeos, enquanto *E. coli* K-12 MG1655 (F- λ - ilvG- rfb-50 rph-1) foi utilizada como linhagem de produção.

As linhagens de trabalho são apresentadas na Tabela 5.

Linhagens selvagens	Objetivo	Origem
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Clonagem, propagação e estocagem de plasmídeos	LAFAC
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	Linhagem de produção	LAFAC
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Obtenção do gene <i>gapB</i>	UNESP
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	Obtenção do gene <i>gapN</i>	Fundação André Tosello
<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC 39920	Obtenção do gene <i>gapN</i>	LADABIO
PS003	<i>E. coli</i> K12 Δ ilvE	CHAVES, 2021
PSO119	Linhagem de partida	CHAVES et al., 2022
PSO910	PS003 + pRARpCggBBs + pEbtyGpD	Este trabalho
PSO920	PS003 + pRARpCggNBt + pEbtyGpD	Este trabalho
PSO930	PS003 + pRARpCggNSez + pEbtyGpD	Este trabalho
PSO911	PS003 + pRARpCggBBs + pEbtyGpD + CpBgA	Este trabalho
PSO921	PS003 + pRARpCggNBt + pEbtyGpD + CpBgA	Este trabalho
PSO931	PS003 + pRARpCggNSez + pEbtyGpD + CpBgA	Este trabalho
PSO932	PS003 + pRARpCggNSez + pEyJKbtyGpD + CpBgA	Este trabalho

Tabela 5 - Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho para clonagem e propagação de plasmídeos e produção de 3-HP.

3.3 Primers

Os primers utilizados para flanquear os genes alvo no DNA molde, apresentados na Tabela 6, foram desenhados usando o *software SnapGene®* v.4.2.11 e sintetizados pela empresa *Exxtend*. Para utilização, foram preparadas soluções estoque com concentração final de 100 pmol/μL e soluções de trabalho de 10 pmol/μL contendo a mistura dos primers *forward* e *reverse*.

Os primers dos genes *gap* heterólogos foram utilizados para amplificação dos respectivos genes a partir do DNA genômico das linhagens de estudo e para a realização de *screenings* de clones recombinantes.

Os primers do operon *yohJK* foram utilizados para superexpressão desses genes com o objetivo de avaliar o efeito dessa estratégia no aumento da resistência ao 3-HP.

Gene (Comprimento)	Primer	Enzima	Sequência 5' - 3'	T _m [°C]
<i>gapN</i> - <i>Bacillus thuringiensis</i> (1459 bp)	gapN_Bt_BglII_F	F (BglII)	CGC <u>CAGATCT</u> AATGACAACACTAGCAATACGTAC	53
	gapN_Bt_XhoI_R	R (XhoI)	CGG <u>CTCGAGT</u> TAAACTAAGTTTAATACAGTTACTTTTTACG	54
<i>gapB</i> - <i>Bacillus subtilis</i> (1038 bp)	gapB_Bs_NdeI_F	F (NdeI)	CGG <u>CATATGA</u> AGGTAAGTAGCGATCAAC	55
	gapB_Bs_XhoI_R	R (XhoI)	GCC <u>CTCGAGC</u> CATGACCTTATTTTATACAGCAG	54
<i>gapN</i> - <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (1436 bp)	gapN_Seiz_NdeI_F	F (NdeI)	CGG <u>CATATGGT</u> GAAATGGTGAGTGGAAGCTC	57
	gapN_Seiz_KpnI_R	R (KpnI)	GCAG <u>GTAACCC</u> CTTGCTTTTTTGTTATTGAATATC	54
<i>yohJK</i> (1091 bp)	yohJK_NdeI_F	F (NdeI)	CAG <u>CATATGAG</u> TAAGACACTGAACATTATCTG	55
	yohJK_XhoI_R	R (XhoI)	CCG <u>CTCGAGT</u> TAGCCACTTACTGCCAGAATAATCG	57

Tabela 6 - Primers utilizados nos procedimentos de clonagem. A sequência sublinhada é referente aos sítios de restrição das enzimas utilizadas

3.4 Extração de DNA genômico e plasmidial

Para extração do DNA genômico que serviria como molde para obtenção dos genes *gap*, as linhagens de *Bacillus* foram cultivadas *overnight* no meio Luria Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl) a 37°C e 225 rpm em *shaker* por 16 h, e a obtenção do DNA genômico foi feita utilizando o kit *Bacterial DNA preparation (Cellco)*. A etapa de eluição final do DNA foi feita utilizando água livre de nuclease.

A linhagem de *Streptococcus equi. subespécie zooepidemicus* ATCC 39920 foi cedida em placas de Peptona (35g/L), e a obtenção do molde do gene *gapN* foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o *mix* de primers adequados.

A linhagem de *E. coli* DH5 α carregando o plasmídeo pRSM6 foi cultivada *overnight* em meio LB a 37°C e 225 rpm em *shaker*. A obtenção dos vetores para a clonagem foi feita por extração dos plasmídeos dessa linhagem utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*.

3.5 Plasmídeos

O plasmídeo pRSM6, derivado do pRSM3 da série de plasmídeos *ePathBrick* (XU et al, 2017) e modificado por Silva e colaboradores (2021), foi utilizado para clonagem dos genes alvo. Os plasmídeos originais foram gentilmente doados pelo professor Mattheos A. G. Koffas do *Rensselaer Polytechnic Institute*, EUA.

Os plasmídeos pRArpCg e pEbtyGpD utilizados para construção da linhagem de produção carregando os genes da via da β -alanina foram obtidos de estoque no próprio laboratório resultante do trabalho desenvolvido anteriormente (CHAVES, 2021).

O plasmídeo pCrispathBrick utilizado para regulação da expressão do gene *gapA* endógeno, de *E. coli*, foi obtido da empresa Addgene (<https://www.addgene.org/65006/>).

A tabela 7 traz o resumo dos plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeos		Fonte
pRSM6 (Kan ^R)	pRSM3 PT7::lacUV5 e sítios de XbaI / XmaJI trocados	Chaves, 2021
pRArpCg (Kan ^R)	pRSM6 com genes <i>ALT1</i> , <i>alr</i> e <i>ppc</i>	Chaves <i>et al.</i> , 2022
pEbtyGpD (Amp ^R)	pETM9 com genes <i>pa0132</i> , <i>ydfG</i> e <i>panD</i>	Chaves, 2021
pCrispathBrick (Cm ^R)	pACYC184, <i>tracrRNA</i> , <i>cas9</i> (D10A, H840A)	Addgene
pRgBBs (Kan ^R)	pRSM6 com gene <i>gapB</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	Este trabalho
pRgNBt (Kan ^R)	pRSM6 com gene <i>gapN</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Este trabalho
pRgNSez (Kan ^R)	pRSM6 com gene <i>gapN</i> de <i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	Este trabalho
pRArpCggBBs (Kan ^R)	pRArpCg com gene <i>gapB</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	Este trabalho
pRArpCggNBt (Kan ^R)	pRArpCg com gene <i>gapN</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Este trabalho
pRArpCggNSez (Kan ^R)	pRArpCg com gene <i>gapN</i> de <i>Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus</i>	Este trabalho
pRyJK (Kan ^R)	pRSM6 com operon <i>yohJK</i> de <i>E. coli</i>	Este trabalho
pEyJKbtyGpD (Amp ^R)	pEbtyGpD com operon <i>yohJK</i>	Este trabalho
CpBgA (Cm ^R)	CrispathBrick <i>gapA_KO</i>	Este trabalho

Tabela 7 - Plasmídeos usados na construção das linhagens produtoras

3.6 Clonagem por restrição e ligação

A amplificação dos genes alvo, *gapB* (*Bacillus subtilis*), *gapN* (*Bacillus thuringiensis*) e *gapN* (*Streptococcus equi. subsp. zooepidemicus*), a partir do DNA genômico das linhagens, foi realizada por PCR utilizando os primers listados na Tabela 8.

A reação da PCR foi montada utilizando 25 µL de TAQ *HighFidelity Pool Master Mix* 2x (*Cellco*), 2.5 µL de *mix* de primers (10 pmol/µL de cada primer), 50 ng de DNA genômico, e água livre de nuclease para completar o volume de 50 µL. As reações foram conduzidas em Termociclador *ProFlex™ 3 x 32-well PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*). conforme descrito na tabela 8.

Número de ciclos	T	Tempo	Etapas da reação	Observações
1X	95°C	5 min	Desnaturação do DNA	
	95°C	15 s	Desnaturação	
35X	Ta °C	30 s	Anelamento	T de anelamento, Ta, é específica para o primer (Ta = Tm -5°C ou Tm -3°C)
	72°C	X	Extensão	O tempo de extensão é 1.5 min por kb de DNA
1X	72°C	5 min	Extensão	

Tabela 8 - Etapas e condições da PCR para amplificação dos genes *gapB* de *B. subtilis*, *gapN* de *Bacillus thuringiensis* e *gapN* de *Streptococcus equi. subsp. zooepidemicus*.

Os *amplicons* foram recuperados usando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)* segundo instruções do fabricante e quantificados em *Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)*.

Os *amplicons* e plasmídeos foram digeridos com as enzimas apropriadas dos *mixes FastDigest Green Buffer 10X (Thermo Scientific)* ou *Anza™ 10X Red Buffer 10X (Thermo Scientific)* de acordo com o mostrado na Tabela 9, usando 1000 ng de DNA, 1 µL de cada enzima, 3 µL do tampão adequado e água suficiente para completar 30 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 4 horas. Os produtos das reações de digestão foram corridos em gel de agarose (1% em TAE) a 25V por 60 min e as bandas correspondentes aos insertos (*amplicons*) e aos vetores (plasmídeos) foram purificadas com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)*. Cada amostra foi quantificada em *NanoDrop*.

As reações de ligação foram preparadas calculando-se a quantidade de inserto necessária para uma massa de 75 ng de vetor, a uma proporção de 3:1 (inserto:vetor), a partir do website da *New England Biolabs ®* (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>), adicionando-se à mistura 4 µL de *5X T4 DNA ligase buffer*, 1 µL de *T4 DNA ligase (Invitrogen)* e água livre de nuclease até o volume de 20 µL de reação. A mistura foi incubada *overnight* em temperatura ambiente.

Células competentes de *E. coli* DH5α em estoque foram utilizadas para a transformação. Um volume de 10 µL do produto de ligação foi adicionado a estas e logo em seguida, submetidas a choque térmico a 42°C por 45 segundos, adicionando-se em seguida 250 µL de meio SOC (20g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de NaCl) gelado, sendo, posteriormente, incubadas em *shaker* por 1h a 37°C e, em seguida, plaqueadas em LB e canamicina a 37°C por 18 h.

Amplicon	Enzima 1	Enzima 2	Mix
gapB_Bs	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	<i>FastDigest 10x Green Buffer</i>
gapN_Bt	<i>BglII</i>	<i>XhoI</i>	<i>Anza™ 10X Red Buffer 10X</i>
gapN_SeZ	<i>NdeI</i>	<i>KpnI</i>	<i>FastDigest 10x Green Buffer</i>
yohJK	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	<i>FastDigest 10x Green Buffer</i>

Tabela 9 - Enzimas de restrição usadas para digestão dos *amplicons* e vetores para clonagem dos genes alvo.

3.7 Screening de clones positivos

As colônias crescidas em placas, resultantes dos processos de transformação, foram submetidas à PCR de colônia para confirmar a presença dos genes nas construções.

Nessa etapa, as reações para a PCR foram preparadas com um volume total de 6 μL , sendo 3 μL de *GoTaq*® *G2 Green Master Mix* (*Promega*), 0,3 μL do *mix* de primers adequados para cada molde que se desejava confirmar e 2,7 μL da suspensão de células oriunda da ressuspensão da colônia em 10 μL de água. Os clones positivos foram incubados *overnight* em meio LB a 37°C e 225 rpm para preparação do estoque de células (720 μL do inóculo, 480 μL de glicerol 50 % v/v, armazenado a - 80 °C) e extração dos plasmídeos.

3.8 Otimização das linhagens produtoras

Os genes de interesse neste trabalho foram combinados no plasmídeo pRARpCg, já construído (CHAVES, 2021), na configuração pseudo-*operon* - nesta configuração, os alvos mais próximos ao terminador possuem maior nível de transcrição. Para a construção dessa configuração, os plasmídeos pRSM6 contendo os genes *gap* foram digeridos com as enzimas *XbaI* e *ApaI* (*Anza*™, *Thermo Scientific*) e o plasmídeo pRARpCg foi digerido com as enzimas *ApaI* e *BcuI* (*Anza*™, *Thermo Scientific*).

Células de *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta ilvE$ carregando pEbtyGpD (PSO103) (CHAVES, 2021) foram incubadas *overnight* em meio LB a 37°C e 225 rpm por 16 h, a fim de torná-las competentes. Três horas antes do procedimento, uma alíquota de 100 μL do inóculo foi transferida para 3 mL de meio fresco. A densidade óptica das amostras foi acompanhada em espectrofotômetro *Genesys 10-S UV-Vis* (*Thermo Scientific*) por cerca de 2 h até atingir um valor de absorbância próximo a 0,8. Um volume de 1 mL de amostra foi transferido para microtubos e centrifugado a 4000 rpm, a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 μL de uma solução gelada de CaCl_2 0,1 M. Para iniciar a transformação com os plasmídeos construídos, as células foram mantidas em banho de gelo por 5 minutos e em cada amostra foram adicionados 100 ng dos plasmídeos (pRARpCggBBs, pRARpCggNBt e pRARpCggNSez). A transformação por choque térmico, já detalhada anteriormente, foi aplicada às células, que, posteriormente ao período de incubação, foram plaqueadas em meio LB contendo os antibióticos ampicilina (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como marcadores de seleção dos plasmídeos contidos na linhagem, e incubadas a 37°C *overnight*.

Para cada construção obtida, 3 colônias foram selecionadas e inoculadas em LB com os antibióticos de seleção para serem estocadas em glicerol 50% v/v, a -80°C.

3.9 Construção do plasmídeo com o operon de aumento à resistência

A construção do plasmídeo carregando o operon *yohJK* responsável por fazer o transporte do 3-HP para fora da célula e aumentar a resistência ao produto, também se deu por clonagem de restrição e ligação, primeiramente do operon *yohJK* ao plasmídeo pRSM6, resultando no plasmídeo pRyJK, seguido pela digestão dos plasmídeos pRyJK com as enzimas *ApaI* e *BcuI* e o plasmídeo pEbyGpD com as enzimas *ApaI* e *XbaI*, resultando na inserção do operon no plasmídeo da via na configuração de pseudo-operon.

3.10 Desenho do sgRNA

Para o desenho do sgRNA foram seguidos 3 importantes passos: i) identificação das sequências PAM (NGG) na região a ser editada; ii) seleção de uma sequência de 30 nucleotídeos à jusante do PAM, mas sem incluí-lo, chamada sequência espaçadora; iii) adição do espaçador à extremidade 5' do RNA *scaffold* - (importante para a ancoragem do sgRNA à dCas9). Dessa forma, a sequência do sgRNA foi projetada sendo: 5'-AAAC-[sequência espaçadora de 30 bp]-[GTTTTAGAGCTATGTTTTGAATGGTCCCA]-3' e a sequência complementar: 5'-[GTTGGGACCATTCAAAAACAGCATAGCTCTAAAAC]-[30 bp complemento reverso da sequência espaçadora]-3' (CRESS et al., 2015).

Os primers desenhados contendo o sgRNA para o gene *gapA* endógeno de *E. coli*, são mostrados na tabela 10. Todos foram desenhados usando o *software SnapGene®* v.4.2.11 e sintetizados pela empresa *Exxtend*.

Primer	Sequência 5' - 3'
gapA_KO_F	AAACCAATCAACGACCTGTTAGACGCTGATTACAGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCA
gapA_KO_R	GTTTTGGGACCATTCAAAAACAGCATAGCTCTAAAAC <u>TGTAATCAGCGTCTAACAGGTCGTTGATTG</u>
check_gapA_KO_crispathbrick_F	CAATCAACGACCTGTTAGACG
check_crispathbrick_R	TCCTATGAGCTTCCGAGACAG

Tabela 10 - Primers para identificação da sequência alvo da técnica de CRISPR de interferência. Sequência espaçadora sublinhada. Os Primers gapA_KO Forward e Reverse são usados para identificar a sequência alvo no genoma da bactéria. Os primers check são utilizados na PCR de colônia para identificar clones positivos.

3.11 Construção do plasmídeo pCpBgA

Os primers foram fosforilados utilizando o kit Anza T4 PNK kit e anelados. O anelamento dos oligos foi feito misturando volumes iguais equimolares dos oligos F e R em um microtubo com uma solução de anelamento contendo Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM e EDTA 1mM (preparada no laboratório). A mistura foi incubada a 95°C por 5 min e então a mistura ficou resfriando overnight em banho seco à temperatura ambiente.

O plasmídeo pCrispathBrick foi digerido com a enzima *BsaI* e foi preparada uma reação de ligação contendo 2 µL da mistura de oligos, 20 ng de vetor, 1µL de ligase, 2 µL de Tampão e o volume de reação foi complementado com água biomol livre de nuclease até obtenção de um volume de 10 µL de solução. A reação de ligação foi mantida em temperatura ambiente overnight e então seguiu-se o processo de transformação e screening de clones positivos já detalhados nos itens anteriores.

3.12 Avaliação *in silico* de diferentes fontes de carbono e condições de aeração

Utilizando o modelo metabólico em escala genômica de *Escherichia coli* K-12 MG1655 iML1515 (MONK et al., 2017), modificado para incluir a via de produção do 3-HP além das modificações para otimização do fluxo de carbono para a via de produção (CHAVES, 2021), foi realizada uma simulação considerando as seguintes condições ambientais: crescimento em glicose com taxa de captação de -10mmol/gDW.h de glicose, crescimento em glicerol com taxa de captação do glicerol de -20mmol/gDW.h, crescimento em glicose e glicerol considerando a proporção 1:1 em Cmol (-10mmol/gDW.h e -20mmol/gDW.h, respectivamente) e crescimento em glicose e xilose com taxas de captação -10mmol/gDW.h e -12 mmol.gDW.h, respectivamente, todas sem limitação de oxigênio.

Além disso, foram realizadas simulações considerando uma condição ambiental de crescimento em glicerol com taxa de captação de -20mmol/gDW.h e condições de 100% aerobiose (taxa de captação de oxigênio 1000 mmol/gDW.h) e 100% anaerobiose (taxa de captação de oxigênio 0 mmol/gDW.h).

As simulações foram realizadas usando o método pFBA com reação de biomassa (R_BIOMASS_Ec_iML151515_core75p37M) utilizada como função objetivo.

3.13 Cultivos em shaker

As linhagens de produção foram inoculadas *overnight*, individualmente, em tubos Falcon contendo 5 mL de meio LB com antibióticos adequados a 37°C e 225 rpm. Alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada falcon e transferidas para frascos aletados de 250 mL com 50 mL

do meio de cultivo MR, cuja composição é apresentada na tabela 11. A densidade óptica das células foi acompanhada em comprimento de onda de 600 nm até que se atingisse um valor de absorvância entre 0,8 ~ 1,0, quando IPTG 1 mM foi adicionado para a indução do promotor *lacUV5*. Os cultivos foram conduzidos por 24 h e, periodicamente, alíquotas de 1 mL do meio de cultura foram retiradas para acompanhamento do crescimento das linhagens e análise quantitativa dos metabólitos. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.13.1 Preparo do meio MR

O meio de cultivo (MR) utilizado para avaliação da produção do 3-HP pelas linhagens recombinantes construídas foi adaptado de Song e colaboradores (2016). Sua composição é mostrada na tabela 11.

Componente	Concentração [g.L ⁻¹]
Glicerol	15,30
Extrato de levedura	3,00
NaHCO ₃	3,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,00
KH ₂ PO ₄	6,67
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,80
Ácido cítrico	0,80
Solução traço de Metais	5,00%

Tabela 11 - Composição do meio MR (Adaptado de Song *et al.*, 2016)

A composição da solução traço de Metais (TMS) é mostrada na tabela 12.

Componente	Concentração [g.L ⁻¹]
FeSO ₄ . 7H ₂ O	10,00
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,00
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,20
MnSO ₄ . H ₂ O	0,38
CuSO . 5H ₂ O	1,00
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,14
Na ₂ B ₄ O ₇ . 10H ₂ O	0,02

Tabela 12 - Composição da solução traço de metais

Todos os componentes do meio foram autoclavados separadamente a 1bar e 121°C por 15 min, para evitar a ocorrência de reações indesejadas, com exceção do KH₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄ e ácido cítrico que foram misturados e, após completamente diluídos, fez-se a adição do TMS. O pH da mistura foi ajustado para 6,5 com a adição de NaOH 5 M. A solução de bicarbonato

de sódio foi esterilizada por filtração com filtros esterilizantes (poros de 0,22 μm). Os componentes do meio foram misturados após resfriados e armazenados para uso com um pH final entre 6,5 e 7,0 (CHAVES, 2021).

3.13.2 Avaliação das fontes de carbono

Para avaliação da produção do 3-HP utilizando diferentes fontes de carbono, o procedimento foi análogo ao descrito anteriormente para avaliação das linhagens produtoras. O meio utilizado também foi o mesmo (MR), com exceção da fonte de carbono, que, para este caso, foram avaliadas nas seguintes condições: glicerol (15,3 g/L) e glicerol e glicose na proporção 1:1 em base C-mol. Para este teste foi utilizada a linhagem PSO119.

3.13.3 Avaliação do efeito da concentração de indutor IPTG

Para avaliação do efeito da concentração de IPTG no crescimento celular e na produção do 3-HP, o mesmo meio já descrito anteriormente, utilizando glicerol como fonte de carbono foi utilizado para o cultivo da linhagem PSO119. Para a indução da expressão dos genes regulados sob a expressão do promotor LacUV5 foram avaliadas as seguintes concentrações de IPTG: 2 mM, 1,5 mM, 1,0 mM e 0,5 mM.

3.13.4 Avaliação da indução por lactose

Para verificar o efeito do uso da lactose como indutor dos genes regulados sob a expressão do promotor LacUV5 foram avaliadas as seguintes condições de indução para a linhagem PSO119: i) meio MR contendo lactose e glicerol como fontes de carbono nas proporções 2:1 e 1:1 em base C-mol (LAC10 e LAC20, respectivamente); ii) Meio MR utilizando glicerol como fonte de carbono e induzido com lactose nas proporções 1:1 e 1:2 em base C-mol (IND10 e IND20, respectivamente), em relação à concentração inicial de glicerol, com a indução realizada quando $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atingiu 0,8 ~1,0.

3.13.5 Avaliação do efeito da temperatura na produção de 3-HP

Para verificar o efeito da temperatura na obtenção do produto final de interesse foram avaliadas as seguintes condições de Temperatura: 25°C, 28°C, 31°C, 34°C e 37°C, em erlenmeyers aletados de 250 mL, com 50 mL de Meio MR tendo glicerol 15 g/L como fonte de carbono, sendo que, inicialmente as células da linhagem PSO119 eram inoculadas a 37°C (Temperatura ótima de crescimento) e 225 rpm até a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de indução (entre 0,8 ~1,0) e então o cultivo seguia na T de trabalho, por 24 h. Amostras foram coletadas a cada 6h para acompanhamento do crescimento celular por medida de DO.

3.13.6 Avaliação da regulação da expressão do *gapA* endógeno

Para verificar o efeito do plasmídeo CpBgA, as linhagens carregando o plasmídeo com os genes *gap* heterólogos foram cultivadas em erlenmeyers aletados de 250 mL, contendo 50 mL de meio MR com glicerol 15 g/L como fonte de carbono, a 37°C e 225 rpm por 24 h. As mesmas condições foram empregadas para avaliar as células com o sistema de CRISPRi para interferir na expressão do gene *gapA* nativo da *E. coli*.

3.14 Cultivos em Biorreator

As linhagens PSO931 e PSO932 (contendo o plasmídeo com o operon *yohJK*) armazenadas em criotubos foram cultivadas overnight em 5 mL de LB a 37°C e 225 rpm. Um mililitro dessa cultura foi transferido para Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio MR e mantido em shaker a 37°C e 225 rpm.

O cultivo em batelada foi realizado em biorreatores de 1,5 L (Minifors, Infors) com um volume de 950 mL de meio MR com glicerol como fonte de carbono, sendo inoculado com 50 mL de inóculo, obtendo uma DO_{600nm} inicial aproximada de 0,2, totalizando um cultivo com volume total de 1 L. A indução do cultivo foi feita quando a DO_{600nm} atingiu o início da fase exponencial (0,8 ~1,0) com IPTG 1mM. O pH foi controlado entre 6,5 e 7,0 usando 28% m/v de NH_4OH . O oxigênio dissolvido foi mantido a 20% da saturação através do controle do fluxo de ar e oxigênio ($2 L \cdot min^{-1}$) e a velocidade de agitação (300 – 1000 rpm).

O primeiro cultivo (feito em duplicata) foi realizado com o meio contendo 15 g/L de glicerol, como fonte de carbono. O segundo cultivo (feito em duplicata) foi realizado com o meio contendo uma concentração inicial de 45 g/L de glicerol, como fonte de carbono, e conduzido a 34°C após a indução.

3.15 Procedimentos analíticos

O crescimento celular foi analisado de acordo com a densidade óptica do meio de cultura no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}) utilizando espectrofotômetro Genesys 10-S UV-Vis (Thermo Scientific).

As medidas de massa seca foram determinadas no cultivo em biorreator realizado por Chaves et al., 2022 (dados em fase de publicação), obtendo-se uma correlação de $C_x = 0,465 \times DO_{600nm}$ ($R^2 = 0,99$).

A concentração de açúcares (glicose, lactose), glicerol, 3-HP e acetato nas amostras retiradas durante os cultivos foi determinada por HPLC (HPLC – Waters Co System; HPLC 510 bombas, injetor W717 com detector de índice de refração W410 e leitor UV PDA W996)

com a coluna Rezex™ ROA-Organic acid H+ (Phenomenex®) a 65 °C. A fase móvel consistia em solução de H₂SO₄ 5 mM a 0.6 mL/min. Todas as amostras foram centrifugadas por 5 min a 15,800 x g e filtradas usando filtro PTFE 0.2 µm antes da injeção.

3.16 Procedimento de cálculos

3.16.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular

A velocidade específica de crescimento celular é definida por meio do balanço de massa, considerando uma operação em batelada, pela equação:

$$\frac{d(C_x \cdot V)}{dt} = \mu \cdot C_x \cdot V \quad (1)$$

Em uma operação acontecendo em batelada, o Volume é constante, logo, essa variável é simplificada no cálculo. Durante a fase exponencial de crescimento $\mu = \mu_{max}$, desta forma, substituindo na equação e isolando os termos, teremos:

$$\int_{C_{x0}}^{C_x} \frac{dC_x}{C_x} = \int_0^t \mu_{max} dt \quad (2)$$

Resolvendo a integral:

$$\ln \frac{C_x}{C_{x0}} = \mu_{max} \cdot t \quad (3)$$

onde:

C_{x0} é a concentração de células no início da fase exponencial; e t é o tempo de cultivo da fase exponencial. A equação 3 é linear permitindo o cálculo de μ_{max} graficamente com auxílio de um software obtendo coeficiente da reta do gráfico t versus $\ln \frac{C_x}{C_{x0}}$, ou então, através de métodos numéricos, como o método dos mínimos quadrados.

3.16.2 Determinação dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$)

Para obter os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) são utilizados dados da fase exponencial dos cultivos em batelada conforme as equações:

$$Y_{X/S} = \frac{(C_x - C_{x0})}{(C_{S0} - C_S)} \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{C_P}{(C_{S0} - C_S)} \quad (5)$$

A partir dos dados de consumo da fonte de carbono e da produção de biomassa e 3-HP os cálculos de $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ são feitos graficamente com auxílio de um software obtendo coeficiente da reta do gráfico $(C_x - C_{x0})$ versus $(C_{S0} - C_S)$ e C_P versus $(C_{S0} - C_S)$, respectivamente, ou então, através de métodos numéricos, como o método dos mínimos quadrados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação *in silico* de diferentes fontes de carbono e aeração

4.1.1 Variação da fonte de carbono e produção de 3-HP

Com a possibilidade do uso de variadas fontes de carbono pela via da β -alanina, além da ausência de trabalhos que abordam essa estratégia, uma simulação considerando a alimentação de glicerol como fonte de carbono foi realizada a fim de se verificar se esta seria uma boa opção para estudo, comparando com os resultados simulados para as fontes já testadas por Chaves, 2021 (glicose, glicose:xilose 1:1), além da mistura de glicose e glicerol. Os resultados dos principais produtos obtidos para cada fonte de carbono considerada são mostrados na figura 12.

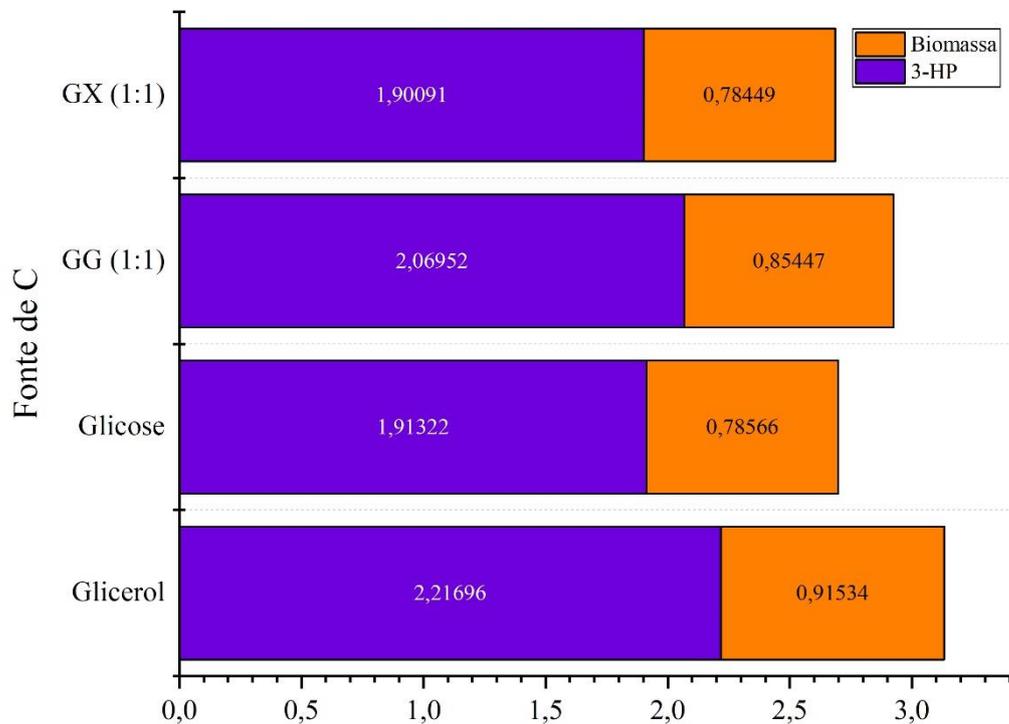


Figura 12 - Simulação da produção de 3-HP utilizando o modelo *iML1515* modificado por CHAVES (2021), tendo como função objetivo a reação de biomassa ($R_BIOMASS_Ec_iML151515_core75p37M$) a partir de diferentes fontes de carbono e associação entre elas. Os valores apresentados são obtidos em mmol/gDW.h. e gDW.. GX: Glicose e xilose; GG: Glicose e Glicerol.

De acordo com os resultados obtidos via simulação, o fluxo de carbono na via de produção do 3-HP considerando a condição ambiental de crescimento em glicerol seria de 2,2169 mmol/gDW.h, enquanto, na condição de crescimento em glicose o fluxo de carbono nessa via seria de 1,9132 mmol/gDW.h, indicando que, teoricamente, o uso do glicerol resultaria em maior produção de 3-HP.

Apesar de, na simulação, o fluxo de carbono na via do 3-HP com a glicose como única fonte de carbono em relação à mistura glicose:xilose ter sido um pouco maior, os resultados *in vivo* obtidos por Chaves, (2021) mostraram um resultado diferente (apresentados no Tópico 1 deste trabalho). Nas condições de mistura de glicose:xilose além da produção do 3-HP ter sido maior, foi observada pelos autores uma reassimilação do acetato, o que reduziu também, drasticamente a obtenção desse subproduto.

Para validar os resultados obtidos na simulação sobre uma ligeira vantagem do glicerol como fonte de carbono para produção de 3-HP pela via da β -alanina, foram realizados experimentos de cultivo, conforme descrito mais adiante (item 4.2).

4.1.2 Variação da disponibilidade de O_2

Avaliando os efeitos da disponibilidade de oxigênio, foram considerados os seguintes fluxos de assimilação para este: Aerobiose – sem restrição de oxigênio, e anaerobiose – com restrição total de oxigênio. Os resultados obtidos indicam que o processo com limitação total de oxigênio não só teve uma queda na produção do 3-HP como também na produção de biomassa, como mostrados na tabela 13.

O₂ [mmol/gDW.h]	3-HP [mmol/gDW.h]	Biomassa [gDW]
1000	2,21696	0,9154
0	0,1616	0,0696

Tabela 13 - Resultado da simulação de produção de 3-HP em aerobiose e anaerobiose

Nas simulações considerando anaerobiose, foi observada grande produção de Formato, Acetato e Etanol, enquanto a produção de 3-HP foi quase nula. Novas simulações foram realizadas com a deleção das vias do acetato e etanol, no entanto, o fluxo de carbono com a deleção dessas vias não foi utilizado para a produção do 3-HP, tendo sido apenas redirecionado para a formação de outro subproduto: Ácido lático (D-lactato).

4.2 Avaliação da variação da fonte de carbono *in vivo*

Para avaliar a produção *in vivo* com as variações das fontes de carbono simuladas, foi realizado cultivo com a linhagem PSO119. Os resultados de crescimento celular e produção de 3-HP em 24 h de cultivo após a indução são apresentados na figura 13.

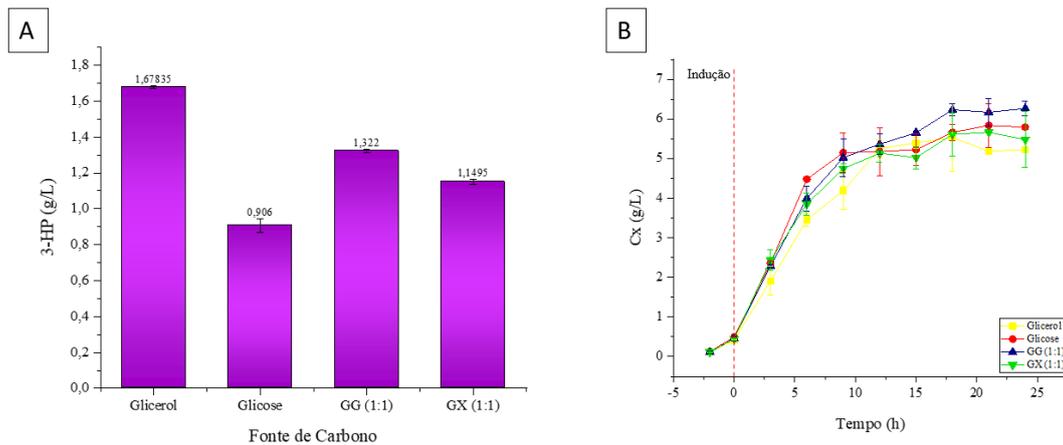


Figura 13 - Produção de 3-HP (A) e Crescimento celular (B) para a linhagem PSO119 em diferentes fontes de carbono.

GG (Glicerol:Glicose na proporção 1:1 em base Cmol) e GX (Glicerol:Xilose na proporção 1:1 em base Cmol). As barras indicam o desvio padrão para cada tratamento.

Embora não tenha sido possível verificar a curva característica de um crescimento diáuxico observada nos meios contendo a mistura de glicose e xilose reportada por Chaves (2021) devido à periodicidade dos pontos coletados, sabe-se que esse comportamento é característico na presença de glicose e outra fonte de carbono.

O crescimento celular para todas as condições foi próximo, assim como a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}), mostrado na tabela 14.

Fonte C	μ_{max} [min^{-1}]	Desvio padrão
Glicerol	0,3505	0,00212
Glicose	0,3648	0,00311
GG (1:1)	0,3609	0,01626
GX (1:1)	0,35815	0,00601

Tabela 14 - Velocidade específica máxima de crescimento para cada condição avaliada.

Em relação à produção de 3-HP nas condições avaliadas, observou-se, conforme o simulado, que a produção foi maior para a condição em que glicerol foi utilizado como fonte de carbono: cerca de 29,7% maior para a melhor condição reportada por Chaves e colaboradores (2022), para a linhagem PSO119, em cultivo com a mistura Glicose:Xilose 1:1 com produção de $1,294 \pm 0,009$ g/L de 3-HP. Além disso, o uso do glicerol também apresentou melhores rendimentos de célula e produto em relação às demais fontes de carbono. Dados de conversão de substrato a células e a produto são mostrados na tabela 15.

Fonte C	Y _{X/S}	Desvio padrão	Y _{P/S}	Desvio padrão
Glicerol	0,3801	0,0122	0,1326	0,0041
Glicose	0,3255	0,0023	0,0246	0,0024
GG (1:1)	0,3918	0,0054	0,0891	0,0011
GX (1:1)	0,3536	0,0291	0,0806	0,0004

Tabela 15 - Dados de rendimento de célula e produto para as condições avaliadas

Comparando com os dados obtidos via simulação, a produção de 3-HP usando glicerol como fonte de carbono pela via da β -alanina de fato se mostrou uma melhor opção diante das fontes mais comumente utilizadas por essa via. Esse resultado, não intuitivo, abre uma nova perspectiva para ampliar os estudos de produção de 3-HP por esta rota metabólica.

4.3 Avaliação da concentração do indutor IPTG

Sabe-se que a concentração de indutor é um dos fatores que pode afetar a expressão gênica, e esta variável é comumente avaliada no estudo de linhagens recombinantes. Aqui foi avaliada a variação da concentração de IPTG de 0,5 a 2,0 mM para verificar o efeito da concentração de indutor no crescimento celular e produção de 3-HP.

Para avaliação dessa condição, quando a absorbância atingiu entre 0,8 ~1,0, pulsos de IPTG foram adicionados nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mM. O cultivo foi conduzido por 24 h e os resultados de crescimento e produção são mostrados na figura 14.

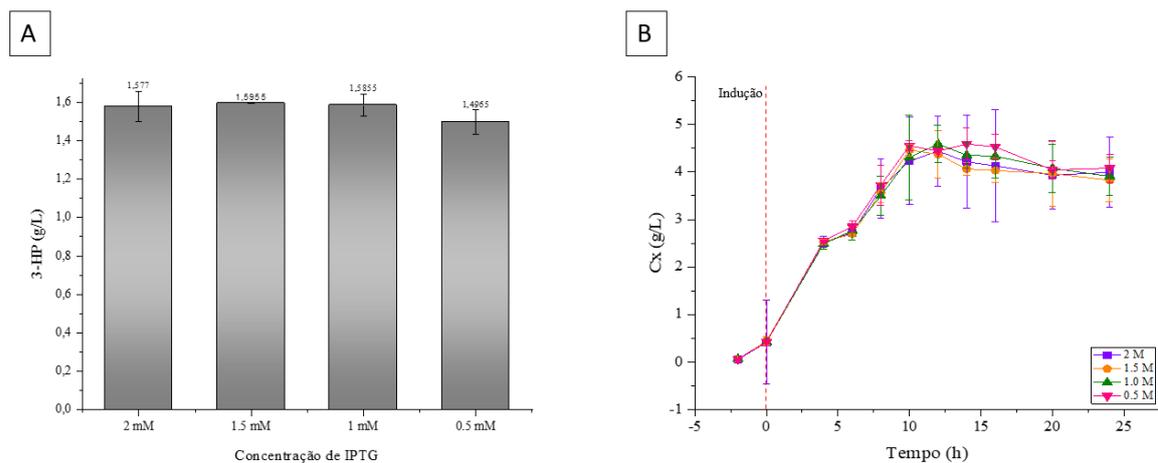


Figura 14 – Curva de produção de 3-HP (A) e crescimento celular (B) em 24h de cultivo após indução, pela linhagem PSO119 sob indução de diferentes concentrações de IPTG.

As concentrações de IPTG estudadas não apresentaram nenhum efeito, negativo ou positivo, em relação à concentração de 1 mM, mais comumente utilizada, no crescimento das células nem na produção do 3-HP nas condições estudadas.

No entanto, diferentes resultados foram obtidos por (LARENTIS et al., 2014), que, também avaliaram a variação da concentração do IPTG em cultivos com *E. coli* para expressão de uma proteína recombinante, obtendo maior densidade celular e melhor produção da proteína de interesse com uma concentração de 0,1 mM do indutor.

Os resultados positivos obtidos por Larentis e colaboradores podem estar associados a outros parâmetros avaliados em conjunto com a variação da concentração de indutor, como por exemplo, o tempo e a temperatura de indução. Os autores fizeram avaliação da temperatura ideal de pré-indução além de conduzirem testes de superfície de resposta que os permitiram determinar a melhor concentração de IPTG, aliada à taxa de crescimento específico da célula e temperaturas de cultivo pré e pós-indução, o que contribui para o bom resultado atingido no objetivo estudado.

Dessa forma, a concentração de IPTG utilizada talvez pode exercer algum efeito sobre o crescimento celular e a produção do produto de interesse, mas esses efeitos devem ser melhor observados quando combinados a outros parâmetros do processo.

4.4 Avaliação da indução por lactose

Para avaliação do uso da lactose como agente indutor do promotor LacUV5 foram realizados cultivos nas condições de auto-indução utilizando meio MR com glicerol e lactose nas proporções 1:1 e 1:2 (em base C-mol). Também foi avaliada a indução com adição de pulsos de lactose no início da fase exponencial (DO entre 0,8 ~1,0) de modo que as proporções de glicerol e lactose finais, no meio induzido, também fossem nas condições de 1:1 e 1:2. Os resultados de crescimento celular e produção de 3-HP são apresentados na figura 15.

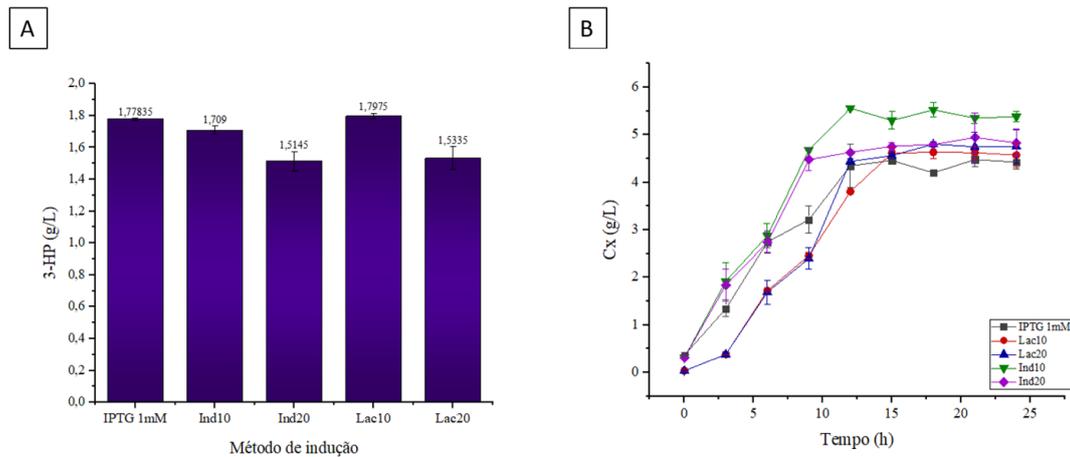


Figura 15 – Produção de 3-HP com diferentes formas de indução (A) e Perfil de crescimento da linhagem PSO119 em meio de auto-indução e em indução com pulsos de lactose. IPTG 1 mM – Indução com adição de IPTG no início da fase exponencial. Lac10 e Lac20 – autoindução com meio contendo Glicerol e lactose nas proporções 1:1 (LAC10) e 1:2 (LAC20); Ind10 e Ind20 - Crescimento em meio contendo glicerol como fonte de carbono induzido pela adição de lactose no início da fase exponencial (DO entre 0,8 ~1,0) na proporção 1:1(IND10) e 1:2(IND20).

As curvas de crescimento celular indicam níveis de produção de biomassa diferentes para todos os métodos empregados, o que reflete, diretamente na velocidade específica máxima de crescimento, obtida para as condições avaliadas e mostradas na tabela 16.

Indução	μ_{max} [min^{-1}]	Desvio padrão
Lac10	0,3102	0,0055
Lac20	0,3062	0,0115
Ind10	0,3684	0,0031
Ind20	0,3620	0,0088

Tabela 16 - Velocidade específica de crescimento obtida para as condições de indução com lactose

No cultivo em que foi utilizado o meio MR com adição de lactose junto ao glicerol como fonte de carbono o crescimento foi o menos expressivo na proporção 1:1 e o mais expressivo na condição 1:2 (glicerol:lactose). Em contrapartida, no cultivo utilizando o mesmo meio MR, mas com adição da lactose no início da fase exponencial, as concentrações em biomassa foram superiores.

Em relação à produção do 3-HP, as maiores concentrações foram obtidas para o caso em que lactose foi adicionada ao meio no início da fase exponencial, na proporção de 1:1 em relação à concentração de glicerol no meio, e na condição em que lactose estava presente no

meio junto ao glicerol na proporção 1:1. Para estes casos as concentrações de 3-HP obtidas foram de 1,902 g/L e 1,7975 g/L, respectivamente, sendo que, nesta última, a produção foi equivalente ao obtido com a indução feita utilizando o IPTG 1,0 mM.

Analisando os perfis de consumo das fontes de carbono para cada condição (figura 18) é possível perceber um comportamento de assimilação da lactose mais rápido, em relação a assimilação do glicerol. Em certo momento do cultivo (5~10h) a concentração de glicerol chega a ficar quase estável enquanto a lactose é consumida. Vale lembrar que, a lactose serve também como fonte de carbono para produção e crescimento, além de ser indutor do *operon Lac*. Para o caso em que lactose é adicionada na proporção 1:1 em relação ao glicerol, o consumo de glicerol pela célula só é retomado quando a concentração de lactose tem uma queda significativa, quase perto do esgotamento. Por outro lado, no caso em que a lactose foi adicionada no início da fase exponencial em uma proporção de 2:1 em relação à concentração de glicerol, este quase não foi consumido, enquanto a lactose foi esgotada pela célula ao longo das 24 h de cultivo que se seguiram.

Em todos os casos, a lactose foi consumida até completo esgotamento. Uma vez esgotada, mesmo com a presença de glicerol no meio como fonte de carbono, que poderia possibilitar uma fase estacionária mais longa, a produção do 3-HP deixaria de ser eficiente a partir desse esgotamento por falta do indutor.

Assim como a produção, os rendimentos de célula e produto foram maiores para os casos em que a proporção entre as fontes de carbono foram iguais (Tabela 17). Do ponto de vista econômico, a possibilidade de substituir o IPTG por lactose é um bom resultado, pois significa redução do custo de reagentes do meio sem impactar negativamente a produção. Além disso, a lactose se mostrou um bom substituto ao IPTG, uma vez que maiores concentrações de produto foram obtidas e o custo-benefício do processo, além das vantagens ambientais da lactose são superiores à do IPTG. Outro resultado importante é que, para todos os casos, a concentração de acetato (subproduto) foi próxima a zero, indicando que o perfil de baixa produção de acetato observado para o uso do glicerol como fonte de carbono não foi afetado pela presença da lactose.

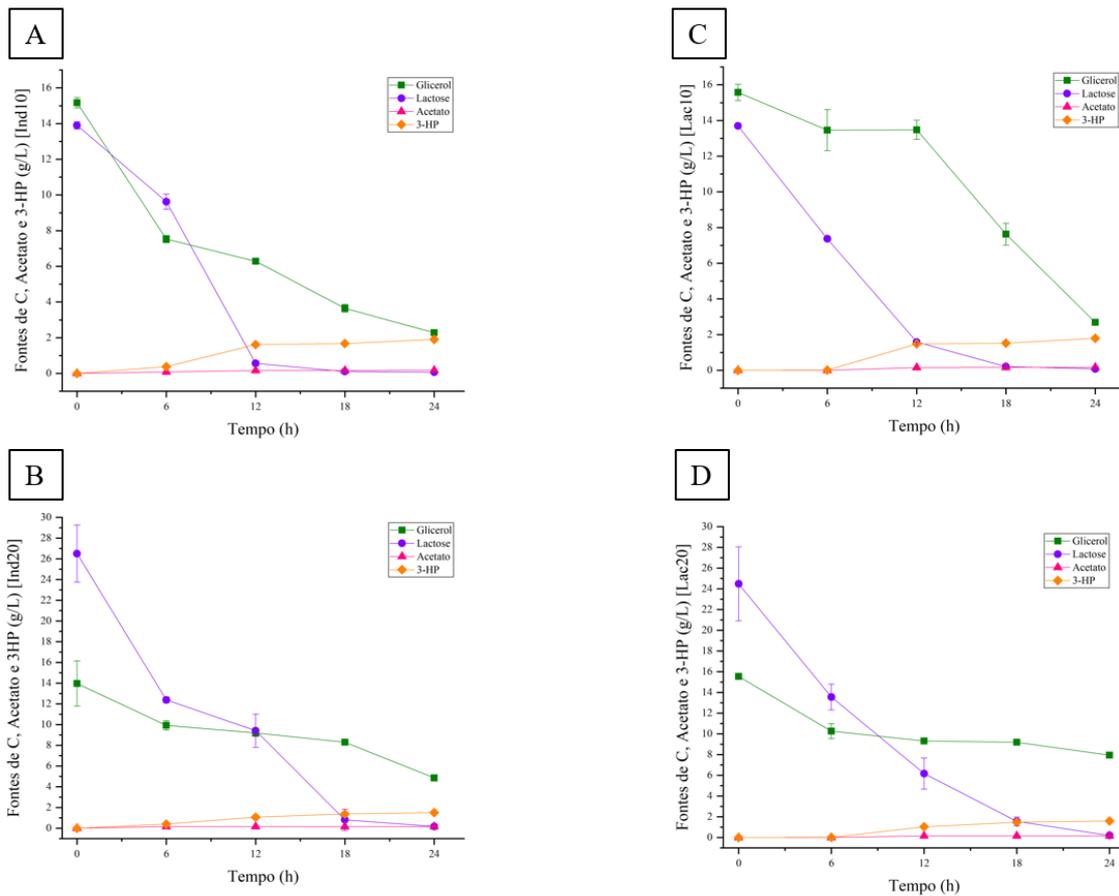


Figura 16 - Perfis de consumo das fontes de carbono com uso da lactose como indutor. A) Adição de lactose na proporção 1:1 em relação ao glicerol, no início da fase exponencial de crescimento. B) Adição de lactose na proporção 2:1 em relação ao glicerol, no início da fase exponencial de crescimento. C) Adição de lactose:glicerol na proporção 1:1 como estratégia de auto-indução. D) Adição de lactose:glicerol na proporção 2:1 como estratégia de auto-indução.

Fonte C	$Y_{X/S}$	Desvio padrão	$Y_{P/S}$	Desvio padrão
Lac10	0,1713	0,0085	0,0678	0,0011
Lac20	0,1491	0,0209	0,0505	0,0046
Ind10	0,1897	0,0057	0,0712	0,0047
Ind20	0,1277	0,0012	0,0427	0,0008

Tabela 17 - Dados de rendimento de célula e produto em relação ao substrato para os cultivos realizados com a lactose como indutor.

4.5 Avaliação da temperatura na obtenção do produto.

Avaliando o efeito da redução da temperatura do processo, para produção de 3-HP, cultivos foram conduzidos com a redução da temperatura após a indução das células. Os resultados são mostrados na figura 17.

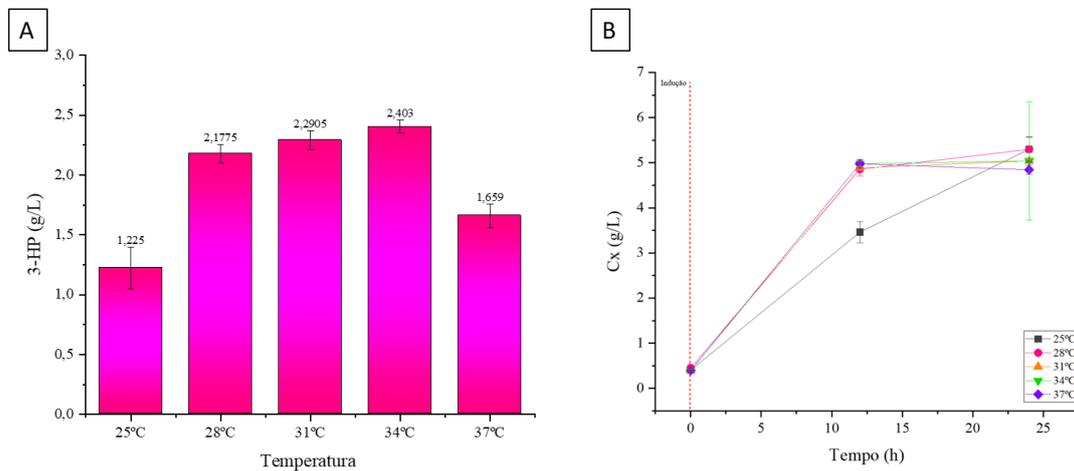


Figura 17 - Produção de 3-HP em diferentes temperaturas após a etapa de indução (A) e Perfil de crescimento da linhagem PSO119 nas condições de temperatura avaliadas.

De acordo com os resultados de produção obtidos, a redução da temperatura de fato colaborou com o aumento da produção do 3-HP, sendo que a melhoria foi observada com a redução a partir de 28°C, sendo o melhor resultado obtido com 34°C. Comparando-se a condição utilizada anteriormente de 37 °C com o resultado obtido a 34°C, observou-se um incremento de aproximadamente 45% na produção de 3-HP. Esse aumento expressivo da produção com a redução da temperatura de cultivo representa um ganho significativo na concentração final de produto obtida e também uma melhoria energética para o processo, tornando-o ainda mais atrativo do ponto de vista econômico.

4.6 Otimização das linhagens produtoras

4.6.1 Inserção dos genes *gap* heterólogos na linhagem de produção

A inserção dos genes *gap* no plasmídeo pRSM6 foi realizada a partir da ligação de *amplicons* e vetores digeridos, e, posteriormente, transformados em linhagens de *E. coli* DH5 α . Para facilitar a identificação de clones positivos no processo de *screening*, simulações da PCR foram conduzidas no SnapGene® para cada gene, com seu respectivo par de primers para

identificar o tamanho dos fragmentos esperados para cada gene. Os resultados das reações de PCR são apresentados na figura 18.

Após sua clonagem, o fragmento contendo o promotor lacUV5, a sequência RBS e os genes *gap* foi colocado no início do cluster genético do pRarpCg, criando os plasmídeos pRarpCggBBs, pRarpCggNBt e pRarpCggNSez (gBBs, *gapB* de *Bacillus subtilis*, gNBt – *gapN* de *Bacillus thuringiensis*, e gNSez, *gapN* de *Streptococcus equi zooepidemicus*). Os plasmídeos obtidos foram transformados em células de *E. coli* de modo a avaliar se a expressão desses genes supriria a necessidade do cofator NADPH na última reação da via de produção, aumentando a concentração de 3-HP pela linhagem produtora. A presença dos fragmentos clonados nas linhagens foi confirmada por PCR de colônia utilizando os *primers* específicos para cada fragmento. A confirmação é mostrada na figura 19. Os plasmídeos transformados em *E. coli* K-15 MG1655 resultaram nas linhagens PSO910, PSO920 e PSO930, respectivamente, todas carregando, além desses plasmídeos, o plasmídeo da via.

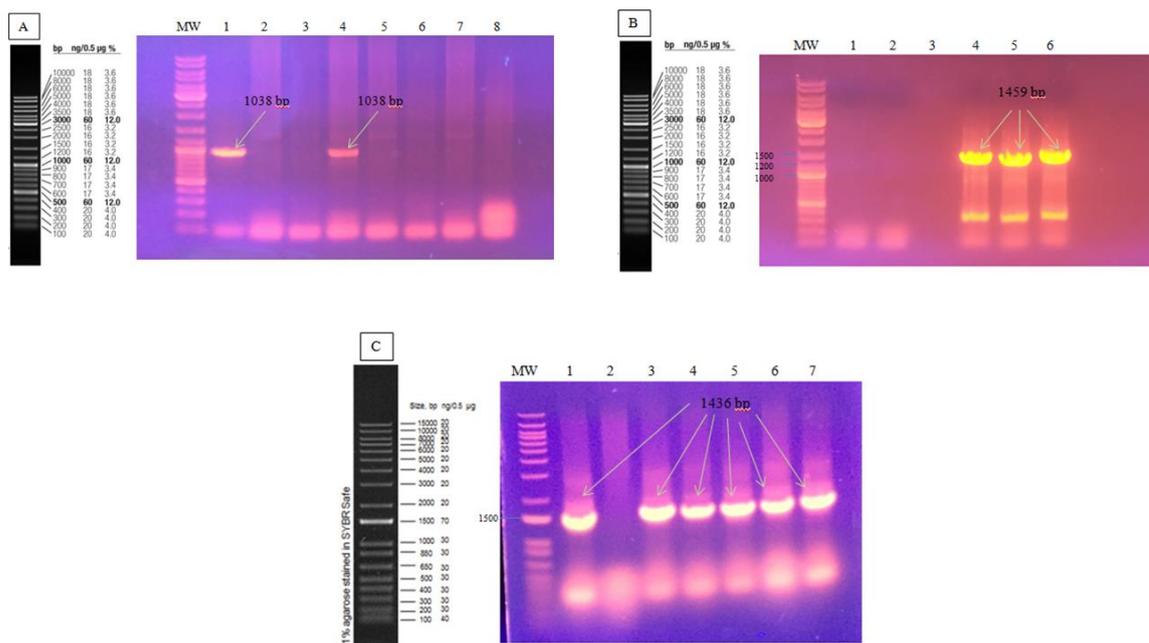


Figura 18 - Clonagem individual dos genes *gap* confirmada por PCR de colônia. A) Amplificação do fragmento de *gapB* de *Bacillus subtilis* – lanes 1 e 4 (1038 bp); B) Amplificação do fragmento de *gapN* de *Bacillus thuringiensis* – lanes 4, 5 e 6 (1459 bp); C) Amplificação do fragmento *gapN* de *Streptococcus equi subs. zooepidemicus* – lanes 1, 3, 4, 5, 6 e 7 (1436 bp). Todos os genes foram individualmente clonados no plasmídeo pRSM6.

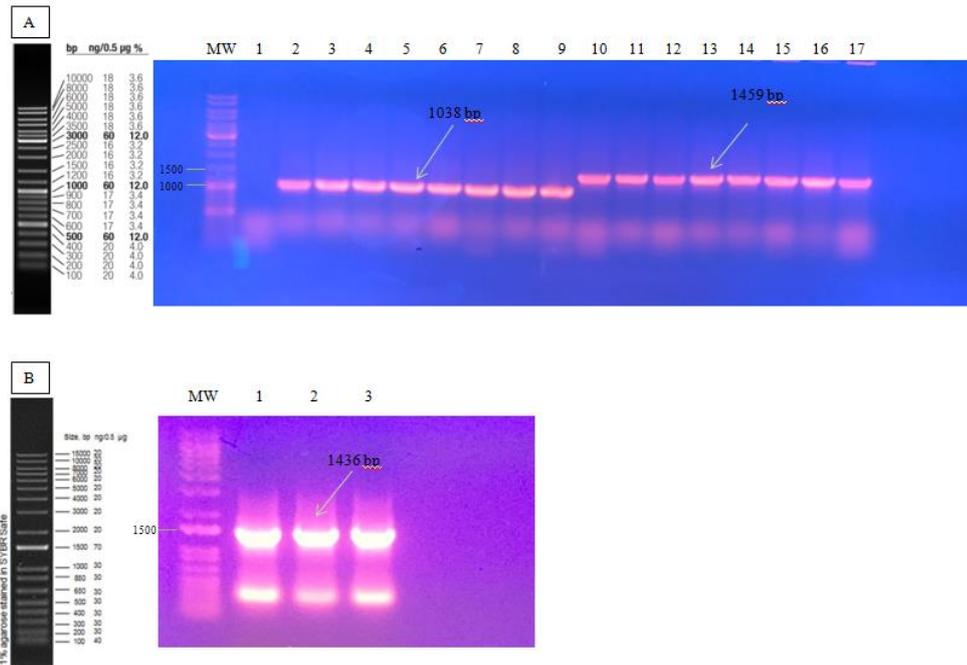


Figura 19 - Confirmação dos fragmentos dos genes *gap* na linhagem produtora. A) fragmento de *gapB* de *Bacillus subtilis* (1038 bp) na linhagem PSO910 - lanes 2 a 9, e fragmento de *gapN* de *Bacillus thuringiensis* na linhagem PSO920 - lanes 10 a 17, B) fragmento *gapN* de *Streptococcus equi* zoepidemicus na linhagem PSO930 (1436 bp) - lanes 1 a 3.

4.6.2 Inserção do plasmídeo *pCrispathBrick* com o *sgRNA* para regulação do *gapA* endógeno

PCR das linhagens obtidas com a transformação do plasmídeo CpBgA foram realizadas, utilizando o par de primers *check* já mostrados no item 3.10.1 para identificar clones positivos. Como a região de interesse corresponde à sequência do *sgRNA* (~90 bp), o produto da PCR foi corrido em gel de agarose 2% para possibilitar identificar a região amplificada. O resultado é mostrado na figura 20.

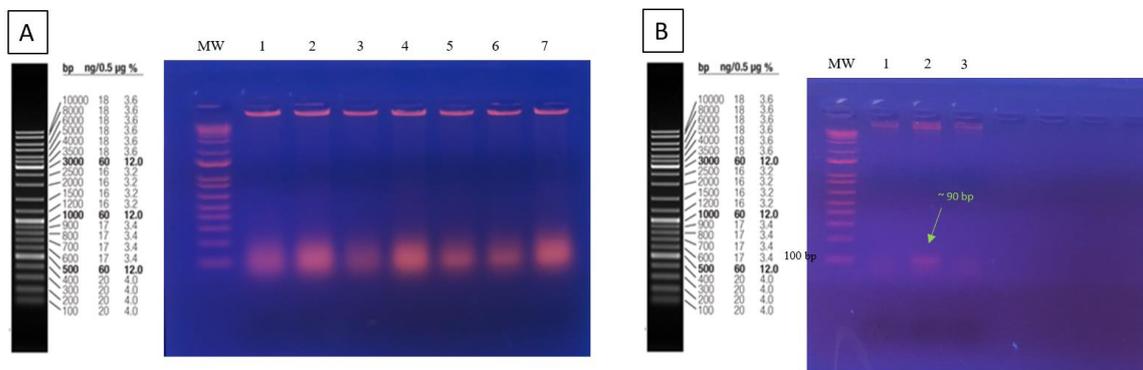


Figura 20 - Confirmação do plasmídeo CpBgA. A) PCR de colônia para identificação dos clones positivos. Foram escolhidas as colônias 2, 4 e 7 para inoculação, por terem apresentado bandas mais fortes na região de interesse. As colônias foram inoculadas, o plasmídeo foi extraído e a figura B) mostra o resultado da PCR dos plasmídeos

extraídos e purificados. Como é uma região muito pequena e de difícil identificação, apenas a colônia 4 (cuja produto PCR do plasmídeo é mostrado no lane 2 da figura B) foi mantida para estoque.

Uma vez feita a confirmação da sequência do sgRNA no plasmídeo, ele foi transformado nas linhagens construídas anteriormente (PSO910, PSO920 e PSO930), gerando as linhagens PSO911, PSO921 e PSO931.

4.6.3 Construção do plasmídeo *pEyJKbtyGpD*

A inserção do operon *yohJK* foi feita no plasmídeo da via (*pEbtyGpD*). Para isso, primeiro, identificou-se entre os clones positivos construídos com o plasmídeo *pRyJK*, qual de fato possuía o operon, conforme mostrado na figura 21.

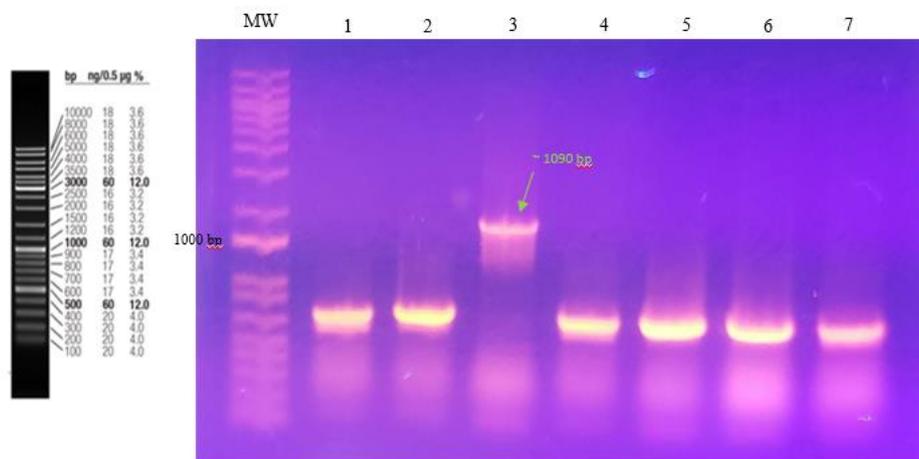


Figura 21 - Identificação do clone positivo com a presença do operon *yohJK* (1091 bp), na lane 3.

O plasmídeo *pRyJK* foi digerido com as enzimas *BcuI* e *ApaI* e o plasmídeo da via com as enzimas *ApaI* e *XbaI*. O histórico de construção do plasmídeo *pEyJKbtyGpD* é mostrado na figura 22.

Chemler e colaboradores (2010) utilizaram um modelo com base estequiométrica para identificar combinações de nocautes de genes de modo a aumentar a disponibilidade de NADPH em *E. coli* para produção de leucocianidina e catequina, que possuem um precursor em comum cuja via de produção utiliza duas enzimas dependentes de NADPH. A melhor combinação encontrada foi a deleção dos genes *pgi*, *ppc* e *pldA* que resultou em um aumento de 4 e 2 vezes, respectivamente, na obtenção dos produtos desejados.

Wang e colaboradores (2013) utilizaram o gene *gapB* de *Bacillus subtilis* co-expresso com o gene *nadK* de *E. coli* em substituição ao *gapA* nativo para aumentar a disponibilidade de NADPH para a biossíntese do licopeno, oxidação de ciclohexanona com ciclohexanona monooxigenase (CHMO) e um sistema anaeróbio utilizando 2-haloacrilato redutase (CAA43). Para todos os sistemas avaliados a síntese dos compostos dependentes de NADPH foi aumentada. No caso da co-expressão da NAD quinase (*nadK*) com o *gapB* na reação catalisada por CAA43 os autores obtiveram um rendimento duas vezes maior do produto.

A estratégia abordada neste trabalho para o aumento da disponibilidade de NADPH foi a expressão de genes *gap* (responsáveis pela codificação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH) de diferentes bactérias cuja GAPDH seja dependente de NADP⁺. O objetivo desta abordagem é aumentar a disponibilidade de NADPH na via glicolítica. A GAPDH nativa de *E. coli* é fosforilante, dependente de NAD⁺ e produz 1,3-difosfoglicerato junto com NADH conforme reação mostrada na figura 23. No sistema avaliado, a geração de NADPH em substituição à geração de NADH balancearia a necessidade desse cofator na célula para suportar processos de biossíntese dependentes de NADPH, especialmente, devido a adição de uma via heteróloga dependente deste na via de produção do 3-HP.

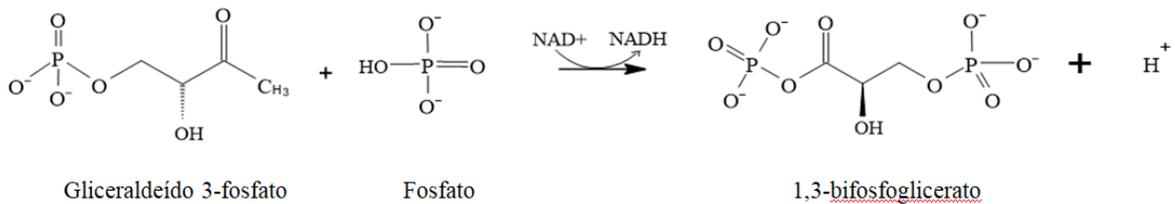


Figura 23 – Reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *E. coli*.

As novas linhagens obtidas com a inserção dos genes *gap* foram avaliadas em cultivos em frasco agitado para avaliar o efeito da presença dos novos genes na produção do 3-HP. A figura 24 apresenta a curva de crescimento das linhagens obtidas e a concentração final do produto de interesse para os cultivos após 24 h de indução.

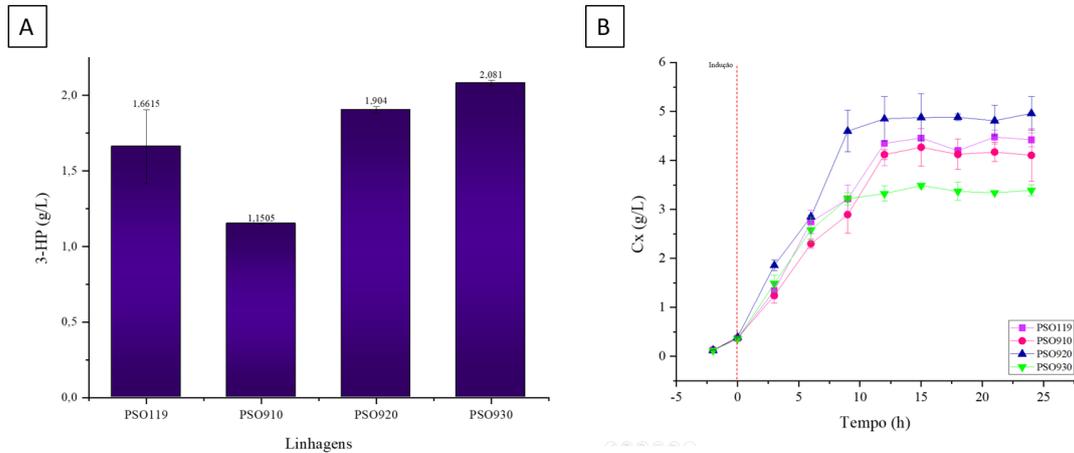


Figura 24 - A) produção de 3-HP pelas linhagens construídas após 24 h de indução. B) curva de crescimento das linhagens com genes *gap* heterólogos. PSO119 apenas com a presença do *gapA* endógeno, PSO910 – *gapB* de *Bacillus subtilis*, PSO920 – *gapN* de *Bacillus thuringiensis* e PSO930 – *gapN* de *Streptococcus equi subs. zooepidemicus*.

Em comparação com a PSO119, as linhagens PSO910 e PSO930 apresentaram uma concentração de biomassa ligeiramente inferior, e a linhagem PSO920 apresentou crescimento superior à linhagem de controle. A velocidade específica máxima de crescimento é apresentada na tabela 18.

Linhagem	μ_{max} [min^{-1}]	Desvio padrão
PSO910	0,3198	0,0173
PSO920	0,3144	0,0198
PSO930	0,3287	0,0078

Tabela 18 - Velocidade específica máxima de crescimento obtida para as linhagens expressando os genes *gap* heterólogos.

Em relação à produção do 3-HP por estas, as maiores concentrações de 3-HP obtidas foram para as linhagens PSO930 e PSO920, respectivamente. Em relação à linhagem de controle, o uso do *gapB* de *Bacillus subtilis* não apresentou vantagem na obtenção do produto de interesse.

Na configuração estudada, as linhagens aqui avaliadas têm a enzima GAPDH sendo codificada tanto no genoma, quanto no plasmídeo, uma vez que nessa estratégia em estudo não foi feita a deleção nem regulação da expressão do gene nativo de *E. coli* que codifica essa enzima. Portanto, os efeitos observados indicam que a expressão concomitante das duas GAPDH (nativa e heteróloga) levou a um balanço redox mais favorável para a produção do 3-HP em duas das três condições avaliadas. Os resultados mostram que a expressão do *gapN* de

Streptococcus equi zooepidemicus foi a mais benéfica resultando numa concentração final de 3-HP de $2,081 \pm 0,018$ g/L, sendo esta a maior produção de 3-HP obtida por este trabalho, até aqui, seguida pela expressão do *gapN* de *Bacillus thuringiensis*, que resultou numa concentração final de 3-HP de $1,904 \pm 0,023$ g/L. Já para a linhagem carregando o gene *gapB* de *Bacillus subtilis* (PSO910), o resultado de produção não seguiu a tendência observada e foi menor para esta linhagem do que para a linhagem de controle, resultando numa produção de $1,1505 \pm 0,001$ g/L de 3-HP.

4.7.2 Cultivo das linhagens PSO911, PSO921 e PSO931 com a regulação do *gapA* endógeno

Com o objetivo de analisar a produção do 3-HP sem que haja competição do GAPDH heterólogo NADP⁺ dependente e o GAPDH nativo NAD⁺ dependente, cultivos comparando as linhagens com o plasmídeo pCrispathBrick vazio (sem o sgRNA para a repressão da transcrição do *gapA* endógeno) e com o plasmídeo CpBgA (com o sgRNA) foram conduzidos para cada nova linhagem obtida. Os resultados são mostrados nas figuras 25 a 27.

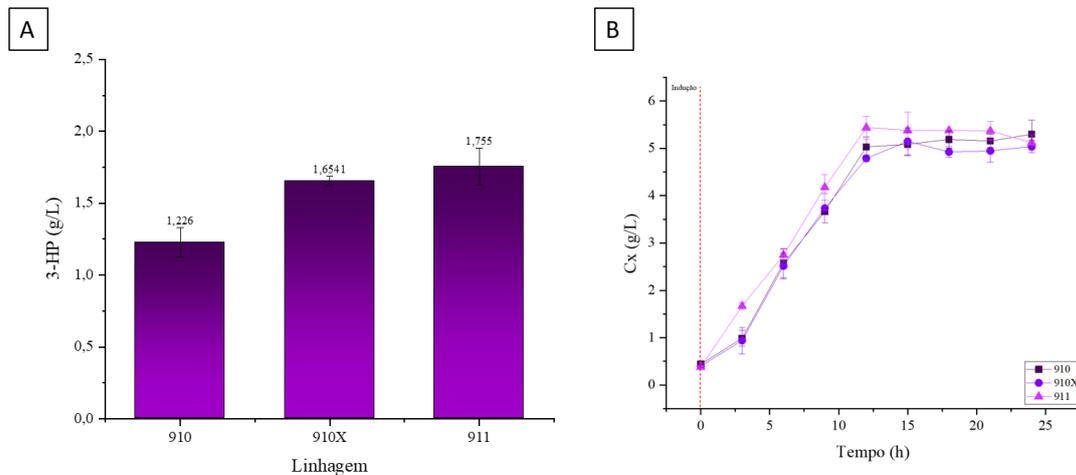


Figura 25 – Produção de 3-HP pelas linhagens PSO910 – sem a repressão do *gapA* endógeno; PSO910X – com o plasmídeo pCrispathBrick sem o sgRNA e PSO911 – com a presença do plasmídeo CpBgA. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.

Embora a produção de 3-HP pela linhagem PSO910 com a competição entre o GAPDH heterólogo e o GAPDH nativo não tenha sido satisfatória, a repressão do *gapA* endógeno favoreceu a produção de 3-HP pela linhagem PSO911, aumentando a produção em cerca de 43%.

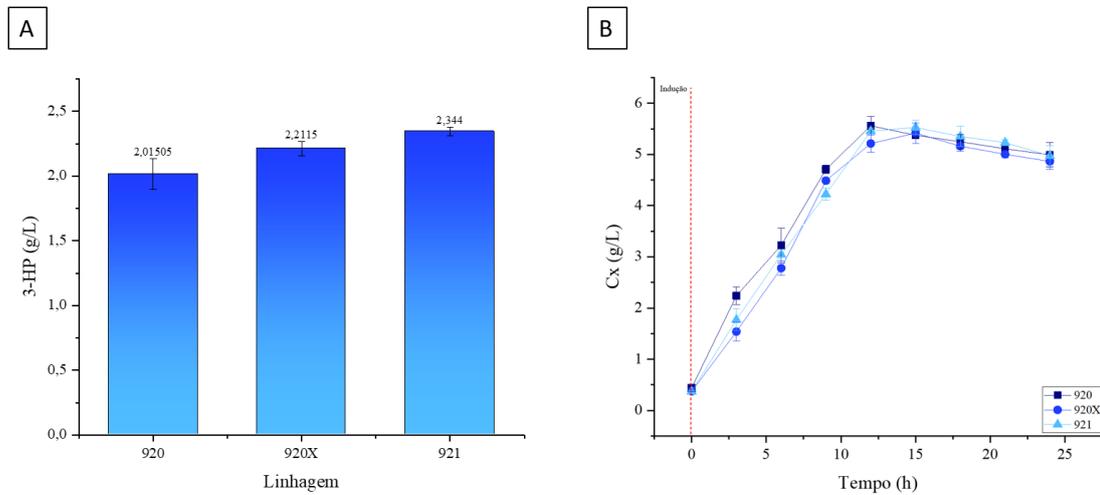


Figura 26 - A) produção de 3-HP pelas linhagens PSO920 – sem a repressão do *gapA* endógeno; PSO920X – com o plasmídeo pCrispathBrick sem o sgRNA e PSO921 – com a presença do plasmídeo CpBgA. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.

Como observado para a primeira linhagem, a repressão do gene endógeno também favoreceu a produção de 3-HP para a linhagem PSO921, mas não tão significativamente quanto para a PSO911. A produção com a presença do plasmídeo CpBgA foi aumentada em cerca de 16%.

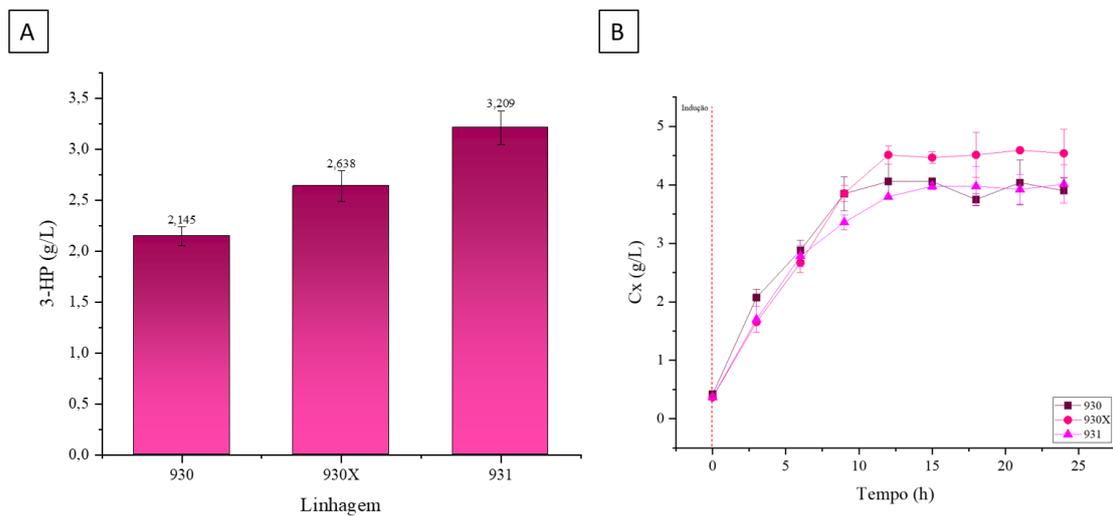


Figura 27 - A) produção de 3-HP pelas linhagens PSO930 – sem a repressão do *gapA* endógeno; PSO930X – com o plasmídeo pCrispathBrick sem o sgRNA e PSO931 – com a presença do plasmídeo CpBgA. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.

Surpreendentemente, para a linhagem PSO931 a repressão do gene endógeno apresentou o melhor resultado dentre as linhagens construídas, resultando num aumento de

cerca de 50% da produção do 3-HP, atingindo uma produção de, aproximadamente, 3,2 g/L de 3-HP. Esse resultado chegou muito próximo ao obtido por Song e colaboradores (2016) nos cultivos em frasco agitado – 3,31 g/L - portanto, configura-se como o segundo maior resultado de produção de 3-HP obtido pela via da β -alanina até então conhecido em frascos agitados.

Para complementar a análise dos resultados, os dados de rendimento para as novas linhagens são apresentados na tabela 19. Observa-se um maior direcionamento do substrato para a formação de 3-HP e menor direcionamento para a formação de biomassa para as linhagens PSO930 e PSO931 em comparação com as demais, indicando que as alterações na expressão de GAPDH nestas linhagens foram favoráveis à formação do produto de interesse.

Linhagem	Y_{X/S}	Y_{P/S}	Desvio padrão (Y_{P/S})
PSO910	0,2842	0,0781	0,0069
PSO920	0,2823	0,1333	0,0081
PSO930	0,2445	0,1925	0,0025
PSO911	0,2731	0,1315	0,0006
PSO921	0,2910	0,1419	0,0028
PSO931	0,2329	0,1683	0,0089

Tabela 19 - Dados de rendimento de célula e produto para as linhagens com expressão dos genes *gap* heterólogos.

4.7.3 Cultivo da linhagem PSO932, contendo o operon *yohJK*

Uma vez que a linhagem modificada com o gene de *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* apresentou os melhores resultados em todas as condições avaliadas, optou-se por seguir apenas com essa linhagem nas avaliações finais. Um cultivo em frasco com a linhagem contendo as modificações foi conduzido para verificar se o efeito da presença do operon *yohJK* já conseguiria ser observado em baixas concentrações de 3-HP. O resultado é mostrado na figura 28.

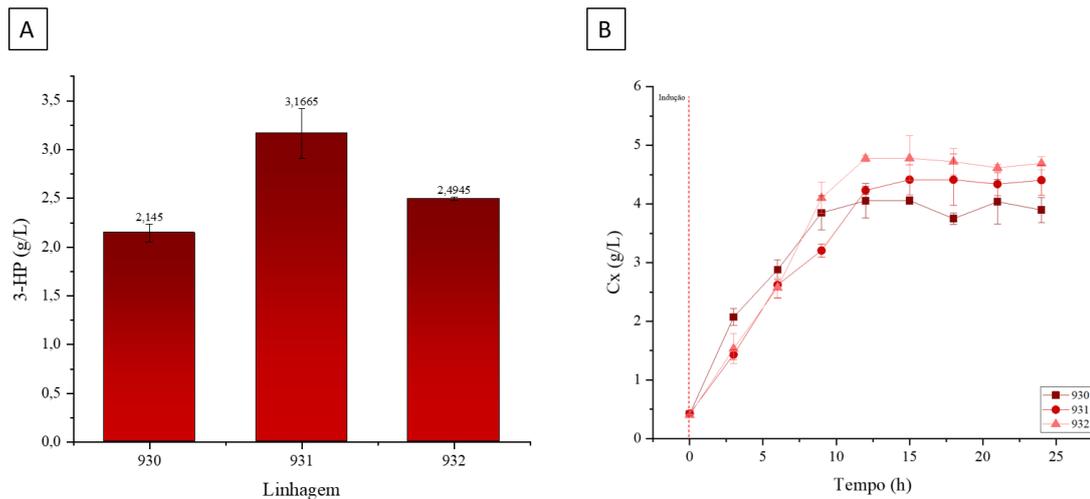


Figura 28 - A) produção de 3-HP pelas linhagens PSO930 – sem a repressão do *gapA* endógeno; PSO931 – com a presença do plasmídeo CpBgA e PSO932 – com a presença do plasmídeo CpBgA e do operon *yohJK* no plasmídeo da via. B) curva de crescimento das linhagens avaliadas.

Embora a produção de 3-HP da linhagem contendo o operon tenha sido melhor do que a linhagem PSO930 – apenas com o *gap* heterólogo – não foi observado nenhum outro efeito, senão a redução da produção em relação à linhagem que não possui o operon. Segundo Nguyen-Vo et al., (2020), concentrações acima de 300 mM de 3-HP (equivalente a 27 g/L) passam a inibir severamente o crescimento de células de *E. coli*. Dessa forma, possivelmente o efeito de aumento da tolerância ao 3-HP promovido pela superexpressão do operon *yohJK* não pôde ser observado nos experimentos realizados pois a concentração de 3-HP encontrava-se em patamares inferiores às concentrações inibitórias deste ácido orgânico para células de *E. coli*.

Para uma melhor avaliação das linhagens produtoras construídas, bem como do efeito da superexpressão do operon *yohJK*, foram realizados experimentos em biorreatores na sequência do trabalho.

4.8 Avaliação das linhagens produtoras em cultivo em Biorreator

Cultivos em biorreator foram conduzidos em duplicata, primeiramente com a linhagem PSO932 e os resultados são mostrados na figura 29.

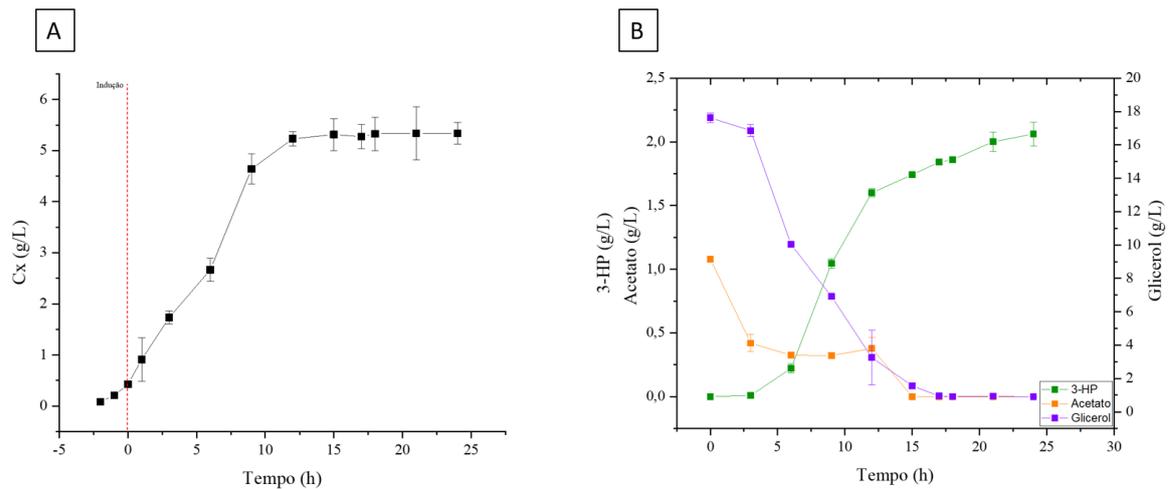


Figura 29 - Cultivo em batelada para a linhagem PSO932 – A) Dados de crescimento celular e B) Perfil de consumo de substrato e produção de 3-HP e acetato.

Neste cultivo a concentração inicial de glicerol no meio foi de 15 g/L, a mesma concentração utilizada em shaker, se mostrando baixa para avaliar o efeito da superexpressão do operon *yohJK*. No entanto, os resultados obtidos corroboram com aqueles obtidos em frasco agitado para esta linhagem, indicando que a ampliação de escala para o biorreator de 1,0 L não afetou o desempenho da linhagem construída. Um outro ponto importante a ser observado nesse cultivo é que, mesmo havendo uma pequena produção de acetato, houve uma retroalimentação deste durante o cultivo, de forma que sua presença (indesejada) não foi detectada ao final do experimento.

Um segundo cultivo em batelada foi realizado, desta vez para as linhagens PSO931 e PSO932, seguindo o procedimento do cultivo anterior, mas com uma concentração inicial de glicerol de 45 g/L e, na melhor temperatura observada em shaker. Para isso, o cultivo iniciou-se a 37°C e, após a indução das células com IPTG 1mM, a temperatura foi ajustada para 34°C. Os resultados dos cultivos são apresentados nas imagens 30, 31 e 32.

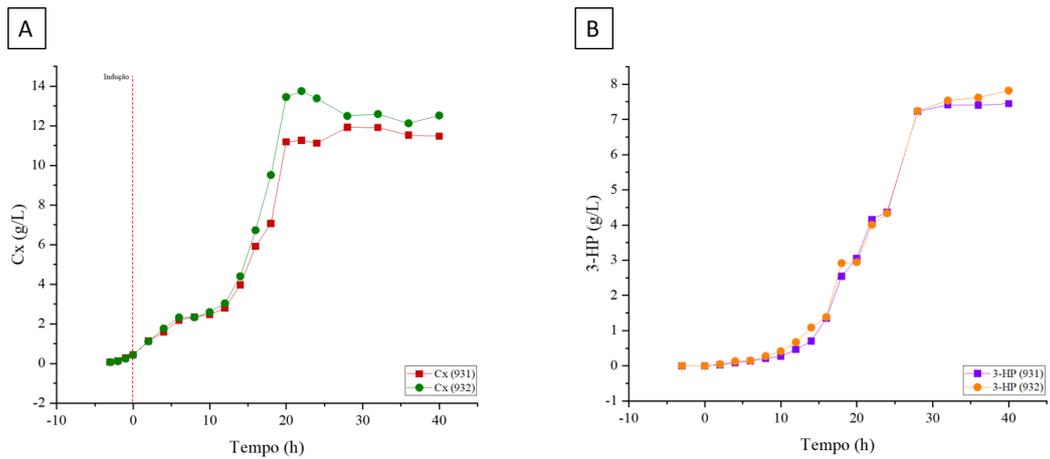


Figura 30 - Perfis de A) Crescimento celular e B) produção de 3-HP em Biorreator operando em batelada para as linhagens PSO931 e PSO932. O tempo de 0 h indica o momento da indução.

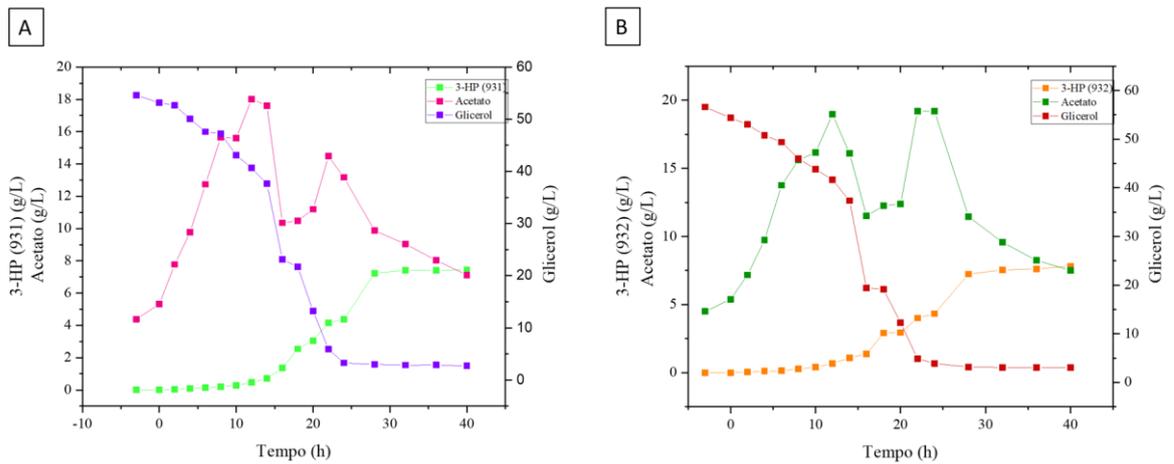


Figura 31 - Perfis de consumo de substrato e produção de 3-HP e acetato no cultivo em Biorreator para as linhagens A) PSO931 e B) PSO932. O tempo de 0 h indica o momento da indução.

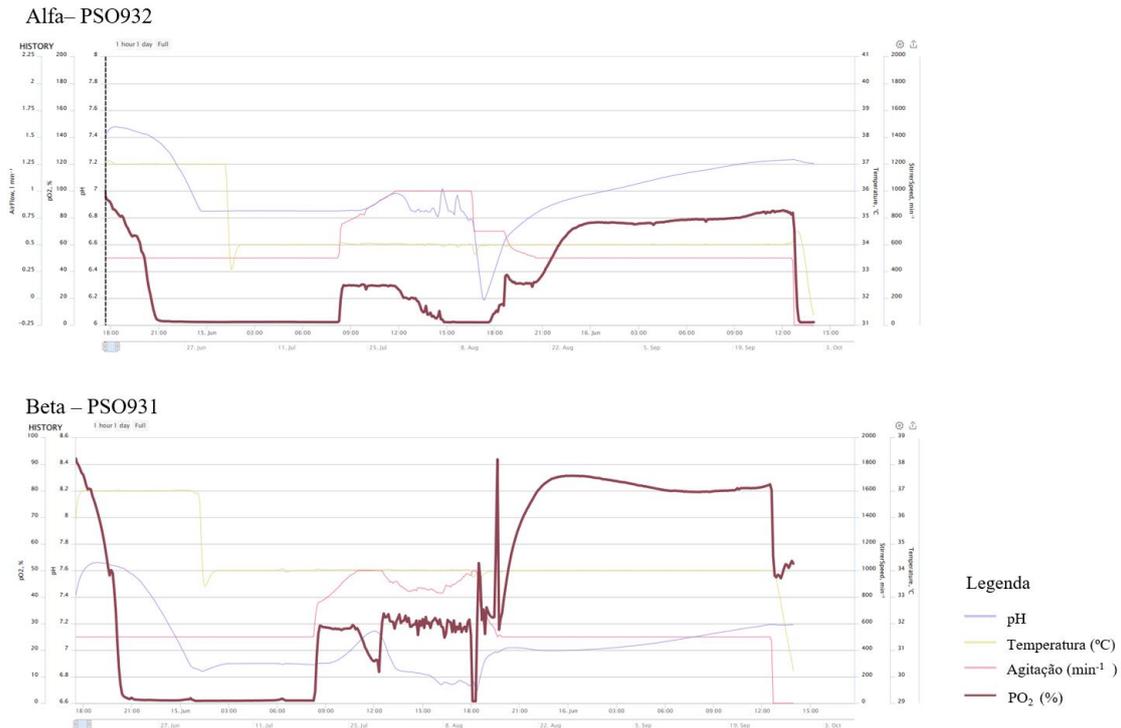


Figura 32 - Perfis dos parâmetros de controle dos cultivos em Biorreator

Durante uma parte do cultivo realizado o controle do pO_2 permaneceu desligado por uma falha experimental (entre as 21h da noite e 6h da manhã) o que provocou uma queda no pO_2 durante a madrugada. Além disso, o fluxo de ar também teve uma queda, nesse período, no reator Alpha (PSO932), provocado pelo entupimento parcial do aspensor. Nesse período (5 a 15 h de cultivo após a indução, aproximadamente), pode ser observado nos gráficos da figura que o crescimento celular foi reduzido e houve um acúmulo de acetato no meio de quase 20 g/L. Essa condição de limitação de oxigênio nesse período do cultivo, apesar de não desejada serviu para confirmar algumas informações obtidas na etapa de simulação com restrição de oxigênio. As simulações mostraram que um processo anaeróbico não é a condição ideal nesse processo, e essa etapa de restrição do fornecimento de oxigênio comprova que a situação de aerobiose é desejada para produção do 3-HP, uma vez que, praticamente não houve produção de 3-HP nesse período de restrição de oxigênio.

Após restabelecida a aeração do meio, o crescimento celular foi retomado, as células começaram a produzir 3-HP e o acetato que havia sido acumulado no meio foi parcialmente consumido. Uma vez esgotado o glicerol no meio o cultivo foi encerrado.

A produção de 3-HP nesse processo foi bastante prejudicada, devido a ocorrência de limitação de O_2 no início do processo. Quando retomadas as condições de aeração e a célula

começou a produzir, de fato, o 3-HP, a concentração de glicerol no meio já havia caído em cerca de 50% (próximo a 20 g/L). Apesar disso, a produção de 3-HP pelas células ainda alcançou uma concentração de 7,449 e 7,819 g/L para as linhagens PSO931 e PSO932, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos ficam evidentes as seguintes conclusões:

- O uso do glicerol como fonte de carbono pela via da β -alanina se mostrou superior em relação à glicose e à mistura glicose e xilose, confirmando os resultados obtidos via simulação. Até onde se sabe, este é o único trabalho que aborda o estudo do glicerol como fonte de carbono por esta via;
- As concentrações de 3-HP obtidas apontam a utilização bem-sucedida da lactose como agente indutor nas condições avaliadas, especialmente o seu uso na proporção 1:1 em conjunto com o glicerol no meio MR, com adição desta no início da fase exponencial;
- As concentrações de IPTG numa faixa de 2 a 0,5 mM avaliadas de forma isolada, sem análise conjunta com outros parâmetros de processo não apresentaram nenhum efeito, positivo ou negativo, sobre a produção do 3-HP nas condições de estudo;
- O uso dos genes *gap* heterólogos de *Streptococcus equi. subespécie zooepidemicus* e *Bacillus thuringiensis* se mostraram eficientes na estratégia que usa a combinação do gene nativo que codifica o GAPDH NAD⁺ dependente.
- Com a regulação da transcrição do *gapA* endógeno pela técnica de CRISPRi, o uso do gene *gap* de *Streptococcus equi zooepidemicus* se mostrou uma ótima alternativa, resultando na produção do 3-HP em uma concentração obtida semelhante à maior descrita na literatura, pela via da β -alanina, em frasco agitado. Até onde se sabe, não há relatos na literatura sobre o uso desse gene de *S. zooepidemicus* com a finalidade estudada neste trabalho.
- A produção do 3-HP por este trabalho saiu de uma produção inicial de 1,294 g/L de 3-HP pela linhagem de partida (PSO119) e alcançou uma produção de 3,209 g/L pela linhagem PSO931, o que representa um aumento de cerca de 147% na concentração do produto de interesse.
- Apesar de os cultivos em biorreator não terem ocorrido como planejado e as concentrações finais do produto obtidas não representarem de fato a capacidade de produção do 3-HP pelas linhagens construídas, em biorreator, os resultados obtidos foram importantes para verificar a necessidade da presença do oxigênio na produção do 3-HP pela rota considerada.
- Para continuidade do trabalho, novas abordagens de cultivo devem ser adotadas em relação às linhagens PSO931 e PSO932 a fim de se verificar as limitações dessas linhagens e o desempenho dela em um cultivo com glicerol bruto. A partir dos resultados obtidos, novas melhorias genéticas e no processo devem ser observadas e estudadas.

6 REFERÊNCIAS

- Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. ANP. 2021. Disponível em: <
<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/arquivos-anuario-estatistico-2021/anuario-2021.pdf>>
- AHN, J. H.; JANG, Y.-S.; LEE, S. Y. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 54–66, dez. 2016.
- AZAPAGIC, A. Sustainability considerations for integrated biorefineries. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 1–4, jan. 2014.
- BECKER, J. et al. Metabolic flux engineering of l-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*—over expression and modification of G6P dehydrogenase. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 2, p. 99–109, out. 2007.
- BORODINA, I. et al. Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine. **Metabolic Engineering**, v. 27, p. 57–64, jan. 2015.
- CHAVES, G. L. et al. Improving 3-hydroxypropionic acid production in *E. coli* by in silico prediction of new metabolic targets. **New Biotechnology**, v.72, p.80-88, dec. 2022.
- CHEN, Y. et al. Coupled incremental precursor and co-factor supply improves 3-hydroxypropionic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 22, p. 104–109, mar. 2014.
- CHEN, Y.; NIELSEN, J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 165–172, fev. 2016.
- CHENG, Z. et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose via malonyl-CoA pathway by engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 897–904, jan. 2016.
- CHUN, A. Y. et al. Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of *Escherichia coli* W. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 5, p. 858–865, set. 2014.
- CINTOLESI, A. et al. Quantitative analysis of the fermentative metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 1, p. 187–198, jan. 2012.
- COUVREUR, J. et al. Wheat and Sugar Beet Coproducts for the Bioproduction of 3-Hydroxypropionic Acid by *Lactobacillus reuteri* DSM17938. **Fermentation**, v. 3, n. 3, p. 32, 6 jul. 2017.
- CRESS, B. F. et al. CRISPathBrick: Modular Combinatorial Assembly of Type II-A CRISPR Arrays for dCas9-Mediated Multiplex Transcriptional Repression in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 9, p. 987–1000, 18 set. 2015.
- DA SILVA, A. J. et al. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production. **Metabolic Engineering**, v. 64, p. 15–25, mar. 2021.
- DE FOUCHÉCOUR, F. et al. Process engineering for microbial production of 3-hydroxypropionic acid. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 4, p. 1207–1222, jul. 2018.
- DELLA PINA, C.; FALLETTA, E.; ROSSI, M. A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. **Green Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1624, 2011.
- DIEN, B. S.; NICHOLS, N. N.; BOTHAST, R. J. Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 259–264, 1 out. 2001.

- DOBSON, R.; GRAY, V.; RUMBOLD, K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 217–226, 1 fev. 2012.
- EL-MANSI, E. M. T.; HOLMS, W. H. Control of Carbon Flux to Acetate Excretion During Growth of *Escherichia coli* in Batch and Continuous Cultures. **Microbiology**, v. 135, n. 11, p. 2875–2883, 1 nov. 1989.
- ERICKSON, B.; NELSON; WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 2, p. 176–185, fev. 2012.
- FINA, A. et al. Benchmarking recombinant *Pichia pastoris* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 1671–1682, jul. 2021.
- FU, X. et al. Semi-industrial scale (30 m³) fed-batch fermentation for the production of D -lactate by *Escherichia coli* strain HBUT-D15. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 221–228, 1 fev. 2017.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 6, 2008.
- HEO, W. et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose and xylose by alleviation of metabolic congestion due to glycerol flux in engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 285, p. 121320, ago. 2019.
- JANG, Y.-S. et al. Bio-based production of C2-C6 platform chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 10, p. 2437–2459, out. 2012.
- JERS, C. et al. Production of 3-Hydroxypropanoic Acid From Glycerol by Metabolically Engineered Bacteria. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 124, 24 maio 2019.
- JIANG, X.; MENG, X.; XIAN, M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 995–1003, abr. 2009.
- JUNG, W. S. et al. Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 116–122, maio 2014.
- KATSUBE, S.; ANDO, T.; YONEYAMA, H. L-Alanine Exporter, AlaE, of *Escherichia coli* Functions as a Safety Valve to Enhance Survival under Feast Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4942, 7 out. 2019.
- KILDEGAARD, K. R. et al. Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 53, dez. 2016.
- KO, Y. et al. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* J2B for co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol: Reduction of acetate and other by-products. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1096–1103, nov. 2017.
- KOCHARIN, K.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. Improved polyhydroxybutyrate production by *Saccharomyces cerevisiae* through the use of the phosphoketolase pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 8, p. 2216–2224, ago. 2013.
- KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. CRISPR-Cas: Evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. **RNA Biology**, v. 10, n. 5, p. 679–686, maio 2013.
- KUMAR, V.; ASHOK, S.; PARK, S. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 945–961, nov. 2013.

- KUMAR, V.; ASHOK, S.; PARK, S. Microbial Production of 3-Hydroxypropionic Acid from Renewable Sources: A Green Approach as an Alternative to Conventional Chemistry. Em: BISARIA, V. S.; KONDO, A. (Eds.). **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 381–407.
- KWAK, S.; PARK, Y.-C.; SEO, J.-H. Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant *Escherichia coli* expressing *Lactobacillus brevis* dhaB and dhaR gene clusters and *E. coli* K-12 aldH. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 432–439, maio 2013.
- LAN, E. I. et al. Metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic 3-hydroxypropionic acid production from CO₂ using *Synechococcus elongatus* PCC 7942. **Metabolic Engineering**, v. 31, p. 163–170, set. 2015.
- LARENTIS, A. L. et al. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 671, dez. 2014.
- Lee SY: High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tib Tech* 1996, 14:98-105.
- LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138–145, set. 2012.
- LIU, W.; WANG, P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 4, p. 369–384, jul. 2007.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, K. et al. New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 46, dez. 2012.
- MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A.; GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 809–817, 30 jun. 2003.
- MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial physiology**. 4th ed ed. New York: Wiley-Liss, 2002.
- MOHAN RAJ, S. et al. Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 4, p. 649–657, set. 2009.
- NGUYEN-VO, T. P. et al. Development of 3-hydroxypropionic-acid-tolerant strain of *Escherichia coli* W and role of minor global regulator yieP. **Metabolic Engineering**, v. 53, p. 48–58, maio 2019.
- NGUYEN-VO, T. P. et al. Systems evaluation reveals novel transporter YohJK renders 3-hydroxypropionate tolerance in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 19064, dez. 2020.
- NIELSEN, J.; TILLEGREEN, C. B.; PETRANOVIC, D. Innovation trends in industrial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 40, n. 10, p. 1160–1172, out. 2022.
- PAPAGIANNI, M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 50, 2012.
- PARK, S. J. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 5-aminovalerate and glutarate as C₅ platform chemicals. **Metabolic Engineering**, v. 16, p. 42–47, mar. 2013.

- PONTRELLI, S. et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 16–46, nov. 2018.
- RAJ, S. M. et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1440–1446, dez. 2008.
- RATHNASINGH, C. et al. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. **Biotechnology and Bioengineering**, p. n/a-n/a, 2009.
- RATHNASINGH, C. et al. Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 4, p. 633–640, fev. 2012.
- SANFORD, K. et al. Scaling up of renewable chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 112–122, abr. 2016.
- SANKARANARAYANAN, M.; ASHOK, S.; PARK, S. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by acid tolerant *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1039–1050, 1 jul. 2014.
- SHOJAOSADATI, S. A. et al. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. **IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY**, v. 6, n. 2, p. 22, 2008.
- SIEDLER, S.; BRINGER, S.; BOTT, M. Increased NADPH availability in *Escherichia coli*: improvement of the product per glucose ratio in reductive whole-cell biotransformation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 929–937, dez. 2011.
- SILVA, D. B.; SOUZA, B. R. DE; ANTERO, R. V. P. Produção biotecnológica de produtos de valor agregado utilizando glicerol residual proveniente da síntese de biodiesel. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, v. 17, n. 2, p. 63–86, 19 dez. 2017.
- SONG, C. W. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 7, p. 2025–2034, jul. 2013.
- SONG, C. W. et al. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of 3-Hydroxypropionic Acid and Malonic Acid through β -Alanine Route. **ACS Synthetic Biology**, v. 5, n. 11, p. 1256–1263, 18 nov. 2016.
- SPAANS, S. K. et al. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 29 jul. 2015.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, maio 2005.
- SUYAMA, A. et al. Production of 3-hydroxypropionic acid via the malonyl-CoA pathway using recombinant fission yeast strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 392–399, out. 2017.
- TOUCHON, M. et al. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 1, p. e1000344, 23 jan. 2009.
- VALDEHUESA, K. N. G. et al. Recent advances in the metabolic engineering of microorganisms for the production of 3-hydroxypropionic acid as C3 platform chemical. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3309–3321, abr. 2013.
- VEMURI, G. N.; EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Effects of Growth Mode and Pyruvate Carboxylase on Succinic Acid Production by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1715–1727, abr. 2002.

WANG, S. et al. The Expression Modulation of the Key Enzyme Acc for Highly Efficient 3-Hydroxypropionic Acid Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 902848, 11 maio 2022.

WERPY, T.; PETERSEN, G. **Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.osti.gov/servlets/purl/15008859>>. Acesso em: 8 dez. 2021.

WILLKE, TH.; VORLOP, K.-D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 131–142, dez. 2004.

YANG, J. et al. A novel MVA-mediated pathway for isoprene production in engineered E. coli. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 5, dez. 2016.

YANG, J. et al. The challenges and prospects of Escherichia coli as an organic acid production host under acid stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 21–22, p. 8091–8107, nov. 2021.

ZHANG, X. et al. L -Malate Production by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 427–434, 15 jan. 2011.

ZHAO, Z. et al. Cytosolic NADPH balancing in *Penicillium chrysogenum* cultivated on mixtures of glucose and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 63–72, jan. 2011.