

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO CURSO DE  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE FENAZINA-1-ÁCIDO  
CARBOXÍLICO EM *E. coli*: EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DOS  
GENES *tktA* E *ppsA*

DANIEL LOSSA ALTMANN

SÃO CARLOS 2021

DANIEL LOSSA ALTMANN

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE FENAZINA-1-ÁCIDO  
CARBOXÍLICO EM *E. coli*: EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DOS  
GENES *tktA* E *ppsA*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado junto à Universidade  
Federal de São Carlos como requisito  
para a obtenção do título de Bacharel  
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

SÃO CARLOS

2021

DANIEL LOSSA ALTMANN

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE FENAZINA-1-ÁCIDO  
CARBOXÍLICO EM *E. coli*: EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DOS  
GENES *tktA* E *ppsA*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado junto à Universidade  
Federal de São Carlos como requisito  
para a obtenção do título de Bacharel  
em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Local: Online

Horário: 9:00 horas

Data: 11 de novembro de 2021

Dulce Helena Ferreira de Souza

Fernanda Perpétua Casciotori

SÃO CARLOS

2021

À minha mãe, Ivani, a  
grande potencializadora de  
todos os meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe Ivani, minhas irmãs Nádia e Simone por todo o apoio, amor e suporte emocional, sem os quais não teria chegado tão longe.

Em especial, gostaria de agradecer à minha irmã Beatriz, por ter me amado incondicionalmente durante o tempo que estivemos juntos, por me acompanhar de onde quer que seja e representar uma grande inspiração durante toda minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Adilson, por ter visto em mim o potencial de contribuir com o grupo de pesquisa, pelos ensinamentos sólidos em biologia molecular e bioprocessos que me abriram diversas oportunidades, além da paciência em meio aos diversos desafios surgidos.

Agradeço à minha amiga, professora e coordenadora de curso Maria Cristina Pranchevicius, uma das pessoas mais importantes que já passou por minha vida. Agradeço também aos meus professores Marcos Roberto Chiaratti, à Maria Teresa Marques Novo Mansur e ao Facundo Martín Labarque.

Agradeço às minhas amigas Karina Fan, Rachel Marascalchi e Stephany Castor por serem meu alicerce nos mais diferentes âmbitos em meio aos desdobramentos da vida universitária. Obrigado por toda a diversão, paciência e carinho despendidos durante os últimos anos.

Agradeço aos meus ABCamigos, Rodrigo Torres, Bárbara Andrade, Carolina Bernardi, Jaqueline Bispo, Murilo Macedo e Marina Ventura, que andaram ao meu lado mesmo de longe por todos esses anos.

Agradeço aos amigos de laboratório, Josivan Cunha, Laís Portugal, Gabriel Luz, Davi Oliveira e Matheus Hart, pelos bons momentos em meio a pesquisa, ensinamentos e suporte.

Agradeço às agências de fomento, em especial à FAPESP, pelo financiamento concedido durante a graduação.

Agradeço aos meus amigos do espanhol Camila e Pedro, que me ajudaram a me reerguer quando mais precisei e reconstruir a esperança de um futuro melhor.

## RESUMO

Metabólitos secundários conhecidos como fenazinas são compostos aromáticos nitrogenados produzidos particularmente pelos gêneros de bactéria *Pseudomonas* e *Streptomyces*, com aplicações em campo como no controle biológico de pragas e no desenvolvimento de biossensores, por exemplo. Sua biossíntese começa pelo corismato, o produto final da via do chiquimato, caracterizada pela produção de compostos aromáticos do metabolismo microbiano. Os atuais estudos de otimização da produção de fenazinas são voltados para organismos naturalmente produtores que, no entanto, são patogênicos e apresentam baixa produtividade. Nesse estudo, as enzimas transcetolase A (TktA) e fosfoenolpiruvato sintase (PpsA), que atuam na formação dos precursores primários da via do chiquimato, foram superexpressas em *E. coli* na tentativa de aumento da síntese de fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), o precursor de outras fenazinas. Os genes *tktA* e *ppsA* foram clonados individualmente e em conjunto no plasmídeo pRSM4 e transformados em células parentais de *E. coli* QH4 ( $\Delta tyrA$ ,  $\Delta pheA$ ), com o plasmídeo pETM7\_*phzABGFCDE* (genes previamente clonados de *P. aeruginosa*, para síntese de PCA). O cultivo das linhagens em comparação com a parental foi realizado em erlenmeyers, meio TB + 2% glicerol, 30° C, 220 rpm, com indução por IPTG 1 mM. Quantificou-se glicerol e PCA por HPLC e biomassa por densidade ótica do caldo de cultura. As concentrações máximas de PCA atingidas foram em torno de 209 mg/L (para *ppsA* superexpresso individualmente), 763 mg/L (*tktA* superexpresso individualmente), 523 mg/L (*tktA* e *ppsA* configuração monocistrônica), 628 mg/L (*tktA* e *ppsA* configuração pseudo-operon) e 275 mg/L (parental). De forma geral, concluiu-se que a superexpressão de TktA levou a um grande aumento na produção de PCA em *E. coli*, sem prejudicar seu crescimento. Já a superexpressão de PpsA diminuiu a concentração de PCA e prejudicou o crescimento das células.

Palavras chave: Fenazinas, engenharia metabólica, compostos aromáticos, via do chiquimato, metabólitos secundários.

## ABSTRACT

Secondary metabolites known as phenazines are nitrogenated aromatic compounds produced particularly by the bacterium genera *Pseudomonas* and *Streptomyces*, with applications in fields like biological pest control and biosensors development, for instance. Their biosynthesis starts from chorismate, the final product of the shikimate pathway. Current studies to optimize their production rely on natural producers, but these organisms are generally pathogenic or show low productivities. In this study, the enzymes transketolase A (TktA) and phosphoenolpyruvate synthase (PpsA), which act in the formation of primary precursors of the shikimate pathway, were overexpressed in *E. coli* aiming to the heterologous synthesis of phenazine-1-carboxylic acid (PCA), the precursor of other phenazines. The *tktA* and *ppsA* genes were individually and combinatorically cloned on the pRSM4 plasmid, which was transformed into *E. coli* parental cells QH4 ( $\Delta tyrA$ ,  $\Delta pheA$ ), with the plasmid pETM7\_ *phzABGFCDE* (carrying the genes previously cloned from *P. aeruginosa* for PCA biosynthesis). All the strains were cultivated in baffled flasks, TB medium supplemented with 2% of glycerol, at 30 °C, and 220 rpm, induced by IPTG 1mM. PCA and glycerol concentration were determined by HPLC, while the biomass was monitored by optical density readings of the culture broth. The highest PCA titers reached were 209 mg/L (*ppsA* individually overexpressed), 763 mg/L (*tktA* individually overexpressed), 523 mg/L (*tktA* and *ppsA* in monocistronic assembly), 628 mg/L (*tktA* and *ppsA* pseudo-operon assembly), and 275 mg/L (parental strain). Taken together, these results showed that the overexpression of TktA led to a great improvement of PCA production in *E. coli*, without affecting cellular growth. On the other hand, the overexpression of PpsA reduced the PCA titer and impaired cellular growth.

Key-words: Phenazines, metabolic engineering, aromatic compounds, shikimate pathway, secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Biossíntese de PCA.....	14
<b>Figura 2:</b> Biossíntese das fenazinas derivadas de PCA.....	15
<b>Figura 3:</b> Possíveis configurações genéticas obtidas por vetores da série ePathBrick.....	18
<b>Figura 4:</b> Princípios da montagem de biobricks.....	19
<b>Figura 5:</b> Montagem de configurações gênicas em plasmídeos da ePathBrick evidenciando conceitos de <i>biobricks</i> .....	20
<b>Figura 6:</b> Principais estratégias utilizadas para o aumento da concentração de intermediários da via do chiquimato.....	21
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do plasmídeo pRSM4.....	25
<b>Figura 8:</b> Simulação da construção do plasmídeo pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> na configuração monocistrônica.....	29
<b>Figura 9:</b> Simulação da construção do plasmídeo pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> , configuração pseudo-operon.....	30
<b>Figura 10:</b> Screening de recombinantes (pRSM4_ <i>tktA</i> ) por PCR de colônia.....	36
<b>Figura 11:</b> Screening de recombinantes (pRSM4_ <i>ppsA</i> ) por PCR de colônia.....	37
<b>Figura 12:</b> Gel resultante do ensaio de restrição dos clones pRSM4_ <i>tktA</i> e pRSM4_ <i>ppsA</i> .....	38
<b>Figura 13:</b> Mapa representativo dos plasmídeos construídos para super-expressão de transcetolase A (TktA) e fosfoenolpiruvato sintase A (PpsA) em <i>E. coli</i> .....	39
<b>Figura 14:</b> Gel resultante da PCR de colônia no screening dos clones pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> (monocistrônico).....	41
<b>Figura 15:</b> Gel resultante da PCR de colônia no screening dos clones pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> .....	42
<b>Figura 16:</b> Gel resultante do ensaio de restrição dos clones pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> e pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> .....	44
<b>Figura 17:</b> Mapa representativo dos plasmídeos construídos para super-expressão de transcetolase A (TktA) e fosfoenolpiruvato sintase A (PpsA) em <i>E. coli</i> .....	44
<b>Figura 18:</b> <i>E. coli</i> QH4-PCA transformada com o plasmídeo pRSM4_ <i>tktA</i> .....	45
<b>Figura 19:</b> <i>E. coli</i> QH4-PCA transformada com a construção pRSM4_ <i>ppsA</i> .....	46
<b>Figura 20:</b> <i>E. coli</i> QH4-PCA transformada com a construção pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> .....	46
<b>Figura 21:</b> <i>E. coli</i> QH4-PCA transformada com a construção pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> .....	46
<b>Figura 22:</b> Correlação entre valores de absorbância e concentração celular.....	47

<b>Figura 23:</b> Comparação geral entre o perfil de concentração de biomassa entre as linhagens construídas para superexpressão dos genes <i>tktA</i> e <i>ppsA</i> .....	47
<b>Figura 24:</b> Comparação geral entre o perfil de consumo de glicerol entre a linhagem parental e as linhagens construídas para superexpressão dos genes <i>tktA</i> e <i>ppsA</i> .....	48
<b>Figura 25:</b> Comparação geral entre a produção de PCA.....	49
<b>Figura 26:</b> Concentração máxima de PCA atingida por cada linhagem.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Produção de fenazinas em diferentes organismos.....	16
<b>Tabela 2</b> - Sequência de primers utilizados.....	26
<b>Tabela 3</b> - Fragmentos esperados para reações de PCR de colônia no screening dos clones pRSM4_ <i>tktA</i> e pRSM4_ <i>ppsA</i> . ....	35
<b>Tabela 4</b> - Fragmentos esperados no ensaio de restrição dos clones pRSM4_ <i>tktA</i> e pRSM4_ <i>ppsA</i> .....	37
<b>Tabela 5</b> - Fragmentos esperados para reações de PCR de colônia no screening dos clones pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> . ....	40
<b>Tabela 6</b> - Fragmentos esperados no ensaio de restrição dos clones pRSM4_ <i>ppsA_tktA</i> (pseudo-operon). ....	41
<b>Tabela 7</b> - Fragmentos esperados no ensaio de restrição dos clones pRSM4_ <i>ppsA_tktA</i> e pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i> .....	43
<b>Tabela 8</b> - Dados de crescimento celular e parâmetros cinéticos do processo de produção de PCA pelas linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> .....	50
<b>Tabela 9</b> - Produtividades volumétricas e específicas.....	51
<b>Tabela 10</b> - Conversão de glicerol em porcentagem.....	52

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. FENAZINAS E SUAS APLICAÇÕES.....	13
1.2. ENGENHARIA METABÓLICA E MÉTODOS DE CONSTRUÇÃO PLASMIDIAL.....	17
1.3. ALVOS DE ENGENHARIA METABÓLICA VOLTADOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. LINHAGENS BACTERIANAS.....	24
3.2. MEIOS DE CULTIVO.....	24
3.3. PLASMÍDEOS.....	25
3.4. EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
3.5. PRIMERS.....	26
3.6. CLONAGEM DE <i>TKTA</i> E <i>PPSA</i> INDIVIDUALMENTE.....	26
3.7. SCREENING DOS PLASMÍDEOS COM GENES INDIVIDUALMENTE CLONADOS.....	27
3.8. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS COM AMBOS OS GENES EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES.....	28
3.9. SCREENING DE PLASMÍDEOS COM AMBOS OS GENES EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES.....	30
3.10. PREPARO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE PCA.....	31
3.11. CULTIVOS DAS LINHAGENS RECOMBINANTES.....	31
3.12. CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	33
3.13. QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PCA E GLICEROL.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS COM GENES INDIVIDUALMENTE CLONADOS.....	35
4.2. CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS COM AMBOS OS GENES EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES.....	39
4.3. TRANSFORMAÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE PCA COM OS PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS.....	45
4.4. EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES <i>TKTA</i> E <i>PPSA</i> NO ENSAIO DE PRODUÇÃO DE PCA.....	47
5. DISCUSSÃO.....	51

6.	CONCLUSÃO.....	55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. FENAZINAS E SUAS APLICAÇÕES

As fenazinas são produtos naturais provenientes do metabolismo secundário de algumas classes de microrganismos, entre as quais se destacam os gêneros *Pseudomonas* e *Streptomyces*. Tratam-se de compostos aromáticos nitrogenados que apresentam intensa coloração e funções biológicas diversas, como ação bactericida, antifúngica, propriedades antitumorais, entre outras (CHINCHOLKAR E THOMASHOW, 2013). Devido ao seu potencial de aplicação biotecnológica em áreas como agricultura, farmácia e combustíveis, por exemplo, há um grande interesse da comunidade científica nessa classe de moléculas (PIERSON E PIERSON, 2010).

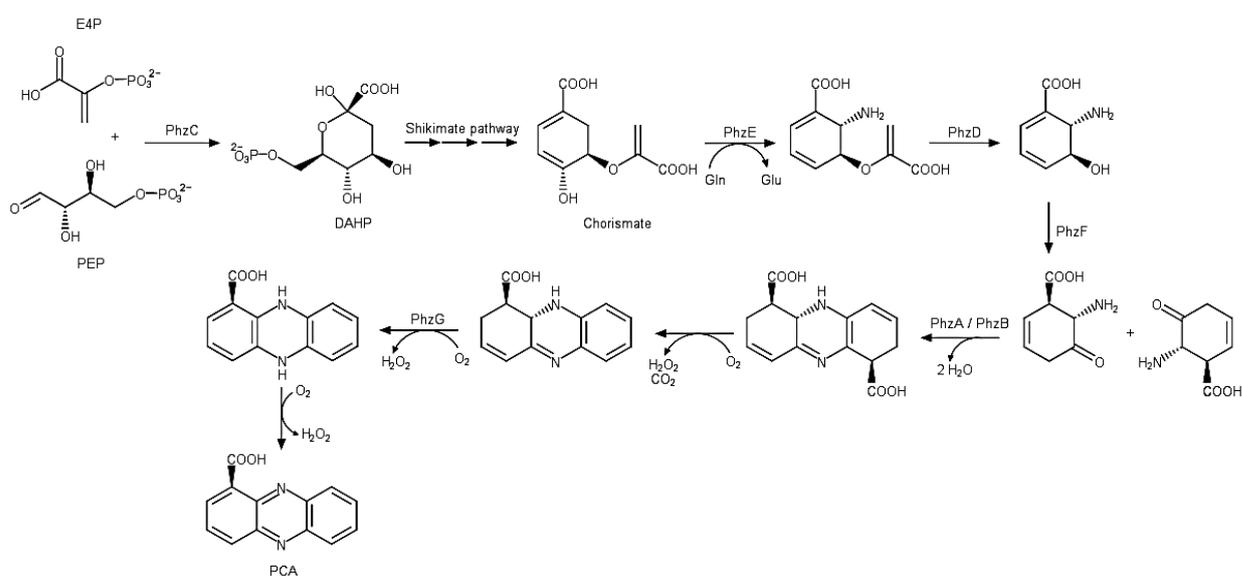
Os mais diversos campos de aplicação das fenazinas são reflexo de como tais moléculas exibem suas funções biológicas nos microrganismos naturalmente produtores. Dois aspectos se fazem marcantes em meio a tais efeitos: as influências na interação com outros organismos e regulações celulares do próprio produtor de fenazinas (CHINCHOLKAR E THOMASHOW, 2013). Em geral, destaca-se o controle biológico dos patógenos presentes em plantas hospedeiras de bactérias produtoras de fenazinas. Podem também modular a dinâmica destas comunidades microbianas, servindo como determinantes de valor adaptativo. Além disso atuam na regulação da fisiologia celular voltada a homeostase redox por meio da atividade de lançadeira de elétrons, favorecem a captação de ferro e promovem a viabilidade celular em ambientes com pouco oxigênio. Finalmente, as fenazinas regulam a expressão gênica e contribuem na formação e arquitetura de biofilme (CHINCHOLKAR E THOMASHOW, 2013).

Atualmente são conhecidas mais de 150 fenazinas de origem natural, além de um universo de milhares dessas moléculas produzidas também por síntese química. Entretanto, essas rotas químicas apresentam baixos rendimentos (CHELUVAPPA, 2014), há produção de uma série de subprodutos tóxicos (CHINCHOLKAR E THOMASHOW, 2013) e o custo do produto final é alto. Dessa forma, o desenvolvimento de bioprocessos para produção de fenazinas a partir de microrganismos se apresenta como uma alternativa atrativa.

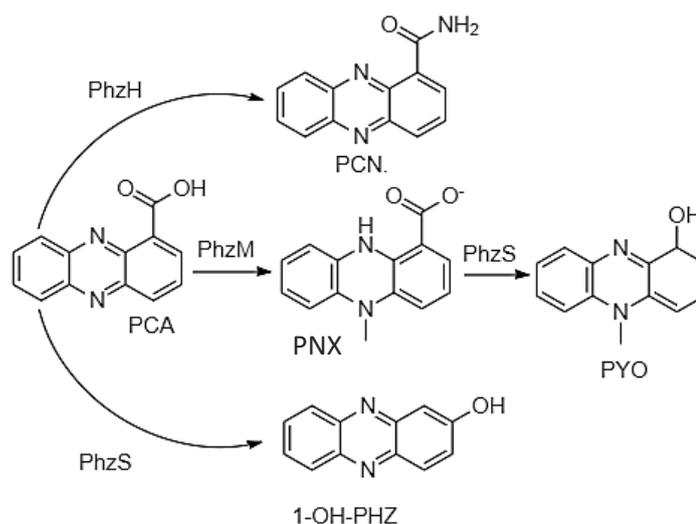
No caso da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, já foram descritas 5 diferentes fenazinas, todas com potencial biotecnológico (MAVRODI et al., 2001). Entre estas, destaca-se o composto fenazina-1-ácido carboxílico (PCA, do inglês *Phenazine-1-Carboxylic Acid*), por se apresentar como precursor comum das demais fenazinas em *P. aeruginosa* e também de outros microrganismos. Trata-se de uma molécula com forte

ação antimicrobiana e antifúngica, tendo já sido registrada comercialmente como um biopesticida sob o nome “*Shenqinmycin*”. Entretanto, devido à baixa produtividade do seu processo de produção atual a partir da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* M18, sua comercialização tem sido inviabilizada diante de pesticidas químicos de menor custo (JIN et al., 2015).

A biossíntese das fenazinas em *Pseudomonas* é realizada pela ação das enzimas codificadas pelo cluster gênico *phzABCDEFGG* utilizando o corismato como precursor (MAVRODI ET AL., 1998). O corismato, por sua vez, é o último produto da via do chiquimato, por onde são produzidos os compostos aromáticos em bactérias. A ação das enzimas codificadas no cluster *phzABCDEFGG* leva à produção de PCA, como ilustrado na Figura 1. Na maioria das bactérias produtoras de fenazinas, esses genes são flanqueados por um ou mais genes acessórios que codificam enzimas que promovem adição de grupos e modificações na molécula de PCA, gerando outras fenazinas (CHINCHOLKAR E THOMASHOW, 2013). A Figura 2 traz uma representação esquemática da produção de diversas fenazinas por *P. aeruginosa* a partir de PCA.



**Figura 1:** Biossíntese de PCA. Por meio dos precursores eritrose-4-fosfato (E4P) e fosfoenolpiruvato (PEP) e sucessivos passos reacionais relativos à via do chiquimato, obtém-se o corismato. Enzimas codificadas pelo cluster gênico *phzABCDEFGG* convertem esse intermediário em PCA. Fonte: Adaptado de Mavrodi et al., (2001).



**Figura 2:** Biossíntese das fenazinas derivadas de PCA. Entre os genes que flanqueiam o cluster *phzABCDEFG* encontram-se *phzH*, *phzM* e *phzS*. A expressão de *phzH* converte PCA em fenazina-1-carboxamida (PCN), enquanto que *phzM* conjuntamente expresso com *phzS* leva à produção de piocianina (PYO), passando pelo intermediário indicado pela sigla PNX. Por fim, a expressão de *phzS* individualmente gera a conversão de PCA em 1-hidroxifenazina (1-OH-PHZ). Fonte: Própria autoria.

Frente às possibilidades de aplicação dessa classe de moléculas, é notório o desenvolvimento de estudos para sua produção, principalmente em linhagens de bactérias do gênero *Pseudomonas*. De forma geral, durante a tentativa de produção por biossíntese, são observadas variadas estratégias de modificação de vias regulatórias e metabolismo energético do organismo hospedeiro. A tabela 1 apresenta valores de concentrações atingidas durante a produção de cinco fenazinas, em diferentes organismos. Neste sentido, tais estudos refletem-se como repositórios que auxiliam na elucidação de vias de produção e regulação das biomoléculas. Além disso, descrevem potenciais alvos para se atingir aumentos de produtividade.

Alguns trabalhos também sugerem a importância da fonte de carbono utilizada, que por sua vez motiva novos estudos focados diretamente no impacto destes substratos. Entre eles a glicose, farelo de soja, água de maceração de milho e glicerol, os três últimos caracterizando-se como subprodutos de processamentos industriais. No contexto de biorrefinarias, ou seja, a conversão de biomassa em produtos de valor agregado (como biocombustíveis, energia, insumos químicos, materiais e alimentos), tais substratos embasam ainda mais sua importância (OCTAVE E THOMAS, 2009). O glicerol, em especial, ganha destaque frente ao desenvolvimento da indústria de biodiesel. Como subproduto dessas indústrias, as grandes quantidades de glicerol produzido acabaram levando a queda em seu preço. Além de se transformar em um substrato mais rentável em processos fermentativos, quando comparado com outras fontes de carbono, seu caráter

renovável e sustentável favoreceu ainda mais seu valor como alternativa para produção de compostos bioindustriais (GOTTLIEB *et al.*, 2014).

Fenazina	Concentração	Organismo	Modo de operação	Escala	Fonte
PCA	9.882,0 mg/L	<i>P. aeruginosa PA-IV</i>	Batelada alimentada	Biorreator	Jin K. et al. (2015)
PCA	2.597,0 mg/L	<i>P. aeruginosa M18G</i>	Batelada	Erlenmeyer	Li Y. et al. (2008)
PCA	926,9 mg/L	<i>P. aeruginosa PA1201</i>	Batelada	Erlenmeyer	Zhou L et al. (2015)
PCA	80,0 mg/L	<i>P. putida</i>	Batelada	Erlenmeyer	Askitosari T. D. et al. (2019)
PCA	4.771,2 mg/L	<i>P. aeruginosa M18MSU1</i>	Batelada	Erlenmeyer	Du X. et al. (2013)
2-OH-PHZ	258,8 mg/L	<i>P. chlororaphis GP72AN</i>	Batelada	Erlenmeyer	Yue S. et al. (2019)
2-OH-PHZ	450,4 mg/L	<i>P. chlororaphis GP72</i>	Batelada	Erlenmeyer	Liu K. (2016)
PCN	9.200,0 mg/L	<i>P. chlororaphis HT66</i>	Batelada	Biorreator	Peng H. et al. (2018)
PCN	489,5 mg/L	<i>P. aeruginosa PA1202</i>	Batelada	Erlenmeyer	Zhou L et al. (2016)
PCN	424,87 mg/L	<i>P. chlororaphis HT66</i>	Batelada	Erlenmeyer	Peng H. et al. (2018)
PCN	4.100 mg/L	<i>P. chlororaphis HT66LSP</i>	Batelada	Biorreator	Yao R. et al. (2018)
PDC	100 mg/L	<i>P. chlororaphis HT67</i>	Batelada	Erlenmeyer	Guo S. et al. (2017)
PYO	11,0 mg/L	<i>P. putida</i>	Batelada	Erlenmeyer	Askitosari T. D. et al. (2019)
PYO	18,8 mg/L	<i>E. coli 1M2L3H*</i>	Batelada	Biorreator	da Silva, A. J. et al. (2021)

**Tabela 1** - Produção de fenazinas em diferentes organismos. O símbolo “\*” evidencia produção inédita de uma fenazinas em *E. coli*, único trabalho reportado na tabela que não se utilizou de linhagens de *Pseudomonas* para produção. PCA: phenazine-1-carboxylic acid, 2-OH-PHZ: 2-hydroxyphenazine, PCN: phenazine-1-carboxamide, PYO: Pyocyanin PDC: phenazine1,6-dicarboxylic acid. Fonte: Própria autoria.

Em relação às linhagens construídas para produção de fenazinas, são relevantes as questões sobre o tipo de segurança envolvida em sua manipulação, seja para o meio ambiente ou para o manipulador. Espécies do gênero *Pseudomonas* podem apresentar patogenicidade, oferecendo risco ao manipulador. Neste sentido, para produção de fenazinas, alguns autores modificaram genes de virulência das linhagens produtoras (JIN K. *et al.*, 2015) ou ainda optaram por linhagens de *Pseudomonas* não patogênicas (LIU J. *et al.*, 2016). Ademais, organismos geneticamente modificados (GMOs) apresentam riscos para o meio ambiente, pois tais modificações podem conferir a eles vantagem adaptativa. Outro risco seria a transferência de plasmídeos e genes de resistência a outros microrganismos, quando tais sequências encontram-se presentes no interior celular do OGM. Tais eventos levam a alteração da dinâmica populacional microbiana e apresenta risco para a biodiversidade local. Dessa forma as principais medidas de biossegurança em relação a OGMs voltam-se para sua contenção, inativação e correto descarte após utilizá-los (informações conforme a RESOLUÇÃO NORMATIVA N° 24, DE 7 DE JANEIRO DE 2020). Vale ressaltar que em todos os casos reportados na tabela 1 tem-se a presença

de *Pseudomonas* que, quando não patogênicas, apresentam modificações genéticas. O presente trabalho apresenta, portanto, a vantagem de utilização de uma linhagem de *E. coli* não patogênica, restringindo os riscos e cuidados somente ao processamento de OGMs.

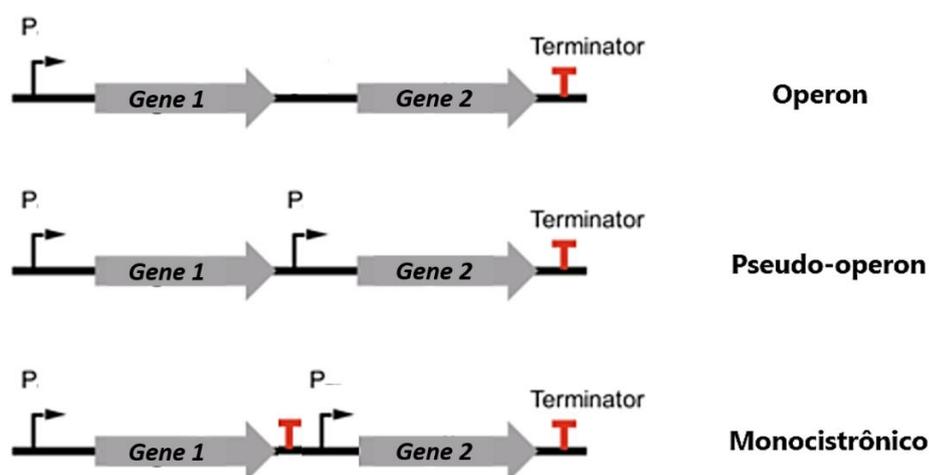
Diante do exposto, este trabalho é resultado de esforços para otimização da produção heteróloga de PCA, tendo em vista seu papel central como intermediário chave de biossíntese de diversas fenazinas e o potencial de inovação biotecnológica provindo desta classe de moléculas. Além disso, diante da complexa rede regulatória envolvida para controlar a produção destes metabólitos secundários nos organismos naturalmente produtores, acreditamos que sua produção em *E. coli* pode ser vantajosa, pois tal regulação pode ser eliminada em um sistema heterólogo de produção, como observado para o estudo de produção de piocianina em *E. coli* realizado previamente pelo grupo de pesquisa (SILVA, 2021). Nesse trabalho foi notório o sucesso na clonagem e expressão do cluster *phzABCDEFG*, com toda a via biossintética de produção de PCA e mais dois genes acessórios para conversão deste intermediário em piocianina. A construção foi realizada de forma episomal utilizando-se o plasmídeo pETM7 como vetor, gerando o plasmídeo pETM7\_ *phzABGFCDE*. Sobretudo, o estudo não só apresentou soluções frente a questões regulatórias como também enfatizou a importância da correta produção de PCA para obtenção de outra fenazina (piocianina). Portanto, a construção de uma linhagem de *E. coli* produtora de altos títulos de PCA também significaria um novo avanço rumo ao desenvolvimento de uma plataforma eficiente de produção de fenazinas.

## 1.2. ENGENHARIA METABÓLICA E MÉTODOS DE CONSTRUÇÃO PLASMIDIAL

De forma geral, a engenharia metabólica se caracteriza como o ramo que estuda a otimização genética e regulatória de células para viabilizar a produção de uma substância de interesse. Utilizando-se ferramentas de engenharia metabólica é possível melhorar a formação de um produto, ou as propriedades celulares de um organismo. Para tal finalidade, são necessárias modificações em um ou mais alvos, como reações bioquímicas, a partir da tecnologia do DNA recombinante (STEPHANOPOULOS et al., 1998). Neste contexto, a expressão episomal através de plasmídeos caracteriza-se como uma dessas ferramentas, que permite não só sintetizar biomoléculas no interior celular como também permite explorar tais alvos selecionados.

Entre as ferramentas disponíveis para fins de engenharia metabólica utilizando células de *E. coli*, encontra-se o conjunto de plasmídeos *ePathBrick* que compõe uma plataforma para montagem de vetores de expressão de vários genes de uma via ou geração combinatória de diversidades de uma via. Utilizando o conceito de *BioBricks*, os vetores utilizados contêm quatro sítios de restrição compatíveis (*AvrII*, *XbaI*, *SpeI* e *NheI*) alocados em posições estratégicas. Estes permitem que os genes clonados possam ser facilmente organizados na forma de *operons*, *pseudo-operons* ou de forma monocistrônica (Figura 3). Tais configurações levam a diferentes níveis de expressão dos alvos selecionados (XU et al, 2012).

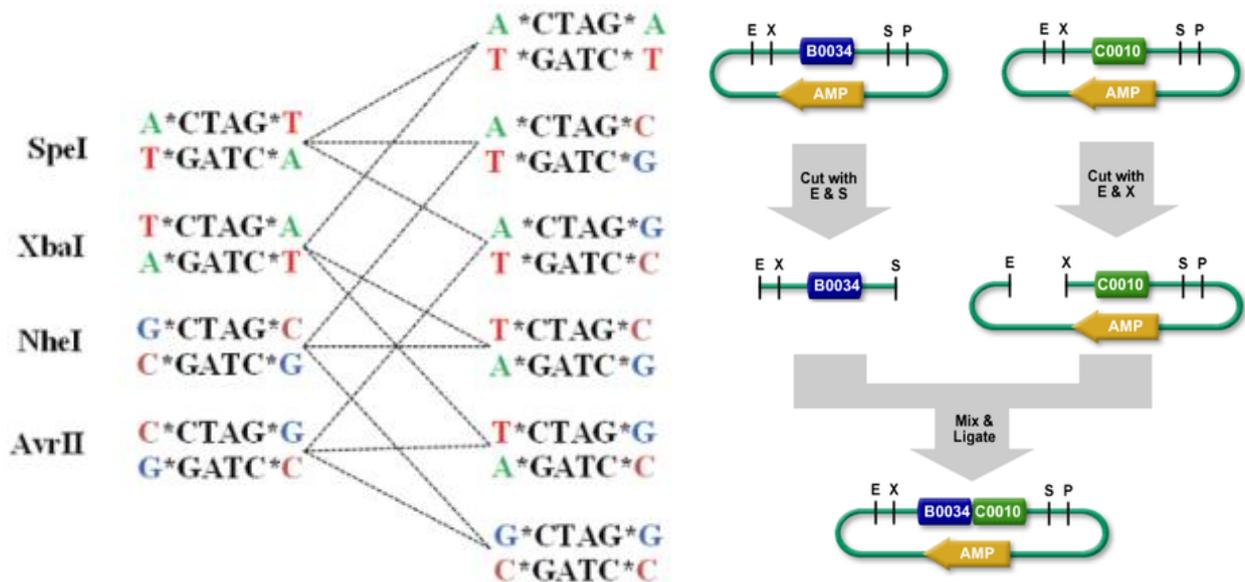
O operon caracteriza-se por um único promotor inicial para todos os genes sequencialmente clonados, que por sua vez também compartilham um único terminador *downstream*. O maior número de transcritos é relativo aos alvos mais próximos do primeiro promotor. Já o pseudo-operon permite o posicionamento de um promotor para cada gene clonado, e um único terminador para toda a combinação. Os alvos mais distantes do primeiro promotor possuem maior nível de transcrição. Por fim, a configuração monocistrônica busca uma transcrição equitativa dos alvos ao posicionar um promotor e um terminador para cada gene clonado (XU et al, 2012).



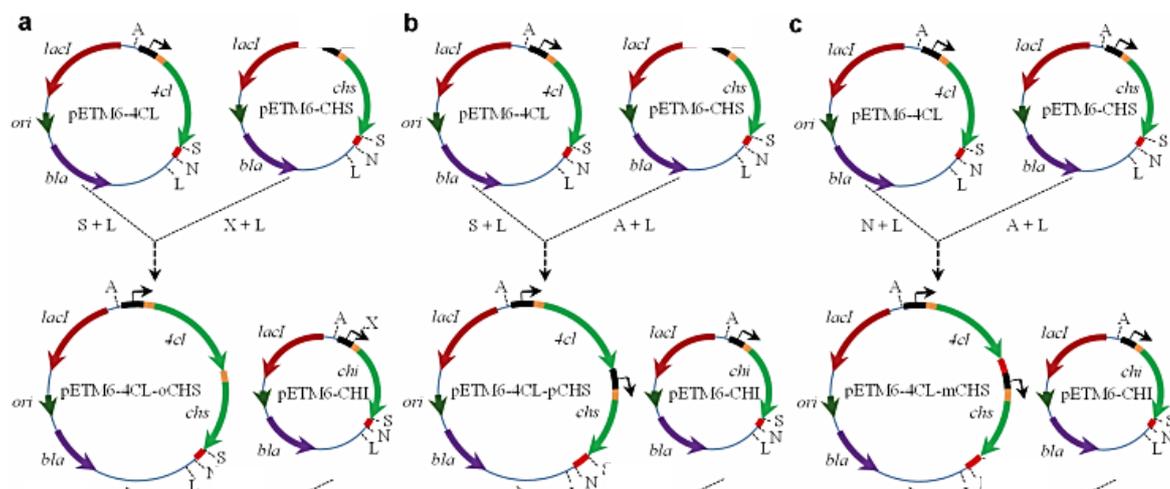
**Figura 3:** Possíveis configurações genéticas obtidas por vetores da série *ePathBrick*. Fonte: Adaptado de Fordjour et al. (2019).

Para estabelecer o encaixe de *biobricks* em sequências nucleotídicas fazem-se necessárias algumas características de um conjunto de enzimas de restrição. O processo simplificado pode ser observado na Figura 4A e 4B. Ao clivarem o sítio alvo, tais enzimas produzem extremidades de fita simples isocaudâmeras, que por sua vez são

complementares entre si. Como exemplo, tem-se a clivagem de um fragmento de DNA com sítio de restrição para *SpeI*, e um outro fragmento com *XbaI*. Como resultado de um pareamento coesivo das extremidades isocaudâmeras geradas, é obtida a ligação dos fragmentos. Conseqüentemente, o método leva ao desaparecimento dos sítios de restrição de ambas as enzimas, impossibilitando que, uma vez unidos, os fragmentos sejam separados por elas. Na Figura 4B observa-se a subclonagem de um gene (azul) em um novo plasmídeo através deste método. Ao cortar o inserto utilizando as enzimas hipotéticas E e S, este pode ser unido à porção do novo vetor digerido com as enzimas hipotéticas E e X. As extremidades cortadas por S e X são complementares e, ao serem ligadas, perdem os sítios de restrição para ambas as enzimas (na região entre os genes representados em azul e verde). Na extremidade proveniente de digestões com a enzima E, seu sítio é mantido e permite novas inserções (XU et al., 2012). Um exemplo da integração entre os princípios de *biobricks* para geração das diferentes configurações genéticas em plasmídeos pode ser observado na Figura 5.



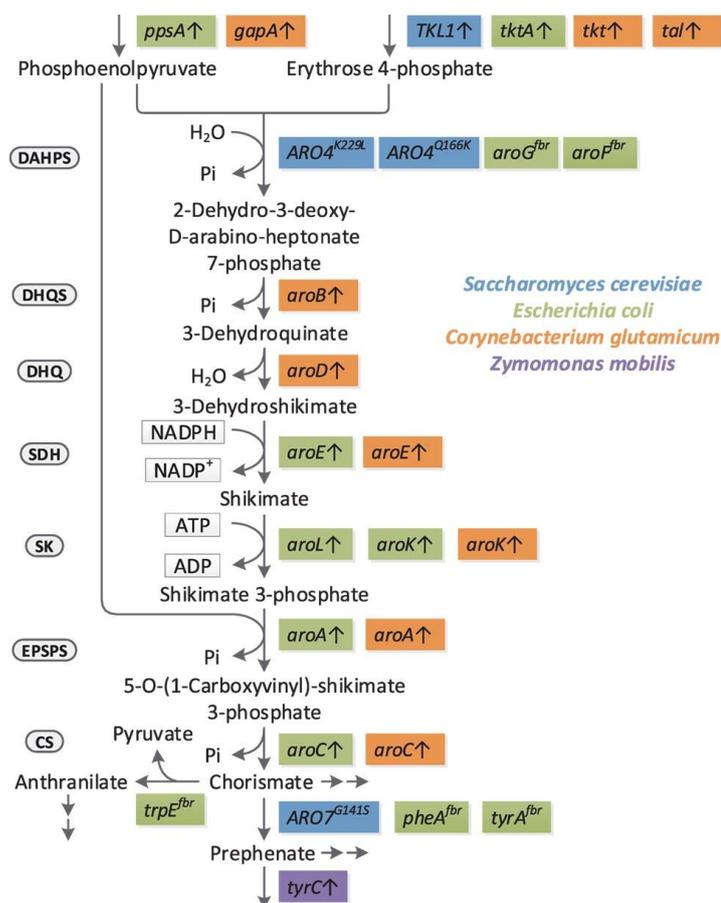
**Figura 4:** Princípios da montagem de *biobricks*. (A) Sítios de restrição relativos a série de enzimas capazes de gerar extremidades isocaudâmeras. (B) Processo de montagem de segmentos de DNA. Fonte: Adaptado de Xu et al (2012); IGEM. Igem Parts Registry. Assembly:Standard assembly. Disponível em: [https://parts.igem.org/Assembly:Standard\\_assembly](https://parts.igem.org/Assembly:Standard_assembly). Acesso em: 11 jun. 2021.



**Figura 5:** Montagem de configurações gênicas em plasmídeos da série ePathBrick evidenciando conceitos de biobricks. (A) Genes unidos em configuração operon. O vetor doador do inserto (PETM6-CHS) é digerido com as enzimas de restrição XbaI (X) (abandonando o promotor em preto do gene *chs*) e Sall (L) (retendo os sítios de NheI (N), SpeI (S) para novas inserções, além do terminador do gene *chs*). O vetor receptor é obtido pela digestão de PETM6-4CL com SpeI (S) (que leva a exclusão do terminador em vermelho do gene *4cl*) e Sall (L). (B) Genes unidos em configuração pseudo-operon. O vetor doador do inserto (pETM6-CHS) é digerido com AvrII (A) (o que mantém o promotor em preto do gene *chs*) e Sall (L) (retendo sítios de restrição para novas inserções e o terminador em vermelho do gene *chs*), enquanto o vetor receptor (pETM6-4CL) é digerido com SpeI (S)/Sall (L) (Abandonando o terminador do gene *4cl*). O sítio SpeI (S) é mantido na sequência do inserto para novas inserções. (C) Genes unidos em configuração Monocistônica. O vetor doador do inserto (pETM6-CHS) é digerido com AvrII (A)/Sall (L) (o que permite reter o promotor e terminador do gene *chs*, além de sítios de restrição para novas inserções) enquanto o vetor receptor (pETM6-4CL) é digerido com NheI (N)/Sall (L) (capaz de reter promotor e terminador do gene *4cl* e sítios de restrição para novas inserções). Caixa preta com seta: promotor T7 e operador lacO; caixa laranja: sítio de ligação do ribossomo; caixa verde com seta: *open read frame* (OFR); Caixa vermelha: terminador T7; bla: gene de resistência a ampicilina; lacI: gene de repressor de lactose; A: AvrII; X: XbaI; S: SpeI; N: NheI; and L: Sall. Fonte: Adaptado de Xu et al (2012).

### 1.3. ALVOS DE ENGENHARIA METABÓLICA VOLTADOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS

A via do chiquimato em microrganismos e plantas permite não só a produção de fenazinas, mas também o desvio de intermediários para a síntese de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) e outras moléculas de importância industrial (HUC CETOGULLARI et. al, 2019). Neste contexto, mecanismos de regulação presentes na via evitam o acúmulo desses intermediários, configurando-se como entraves para produções elevadas de compostos alvo. Portanto, o desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica mostra-se como campo de estudo promissor para contornar desses bloqueios. Várias estratégias referentes ao aumento do fluxo de carbono pela via do chiquimato encontram-se reportadas em literatura (AVERESCH E KRÖMER, 2018), e algumas delas podem ser observadas na Figura 6.



**Figura 6:** Principais estratégias utilizadas para o aumento da concentração de intermediários da via do chiquimato. Algumas das estratégias baseiam-se em mutações sítio dirigidas para modificação de atividade enzimática, como no caso do gene *ARO<sup>G141S</sup>* e superexpressão de enzimas participantes da via. Fonte: Aversch e Krömer, 2018.

O aumento na disponibilidade dos precursores eritrose-4-fosfato (E4P) e fosfoenolpiruvato (PEP) estão entre as abordagens mais efetivas (HUC CETOGULLARI et al., 2019). Para favorecer a formação de maiores quantidades de E4P, a super-expressão da enzima transcetolase tem sido usada com sucesso em diversos estudos (AVERESCH E KRÖMER, 2018; HUC CETOGULLARI et al., 2019). Essa enzima está envolvida no catabolismo de pentoses e representa uma ligação reversível entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato. Em *E. coli* duas isoenzimas são conhecidas (TktA e TktB), sendo a enzima TktA responsável pela maior parte da atividade transcetolase (IIDA et al., 1993).

Para aumentar a disponibilidade de PEP, tanto as reações de formação desse composto quanto as reações de consumo do mesmo têm sido alvo de manipulações. No primeiro caso, as reações catalisadas pelas enzimas PEP-carboxiquinase e PEP-sintase são favorecidas pela super-expressão dos genes *pck* e *ppsA*, aumentando a conversão de oxaloacetato ou piruvato em PEP, respectivamente (HUC CETOGULLARI et al., 2019). Entre essas duas opções, a reação de conversão de piruvato em PEP, catalisada pela PEP-sintase tem sido o alvo preferencial da maioria dos estudos realizados, pois representa

uma maneira de reciclar o PEP utilizado no sistema PTS (*glucose phosphotransferase system*) de captação de glicose e outros carboidratos (CHANDRAN et al., 2003). Neste sistema, a célula é capaz de internalizar e fosforilar a glicose às custas da conversão de PEP em piruvato. Ainda, outra estratégia adotada para reduzir o direcionamento de PEP para vias competitivas é a deleção da piruvato quinase (PykA e PykF) que converte PEP em piruvato na última etapa da glicólise (AVERESCH E KRÖMER, 2018; NODA et al., 2016).

Em *E. coli*, a reação que compromete PEP e E4P para a via do chiquimato, pela formação de DAHP, é realizada por três isoenzimas: AroF, AroG e AroH. As três enzimas são controladas por mecanismo de retroinibição, sendo inibidas por altas concentrações dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano, respectivamente. Versões mutadas dessas enzimas, especialmente AroG e AroF, foram desenvolvidas para se tornarem insensíveis à retroinibição, e a utilização das versões “*feedback-insensitive*” (*fdr*) dessas enzimas se tornou uma prática comum para aumentar o fluxo metabólico pela via do chiquimato (AVERESCH E KRÖMER, 2018; CHEN et al., 2014; HUCCEGULLARI et al., 2019). A combinação do uso de uma DAHP sintase mutada com estratégias para aumentar a disponibilidade de E4P e PEP já foi implementada com sucesso para produção microbiana de diversos compostos aromáticos.

No trabalho de CHEN et al., (2014), a produção de chiquimato atingiu a concentração de 14,6 g/L em um cultivo em batelada alimentada a partir do uso de uma linhagem de *E. coli* com bloqueio nas reações de consumo de chiquimato e super-expressão de PEP-sintase (*ppsA*), transcetolase (*tktA*) e DAHP-sintase mutada (*aroG<sub>fdr</sub>*). O efeito da super-expressão dos genes *ppsA* e *tktA* em uma linhagem superprodutora de triptofano foi avaliado por SHEN e colaboradores (2012). Os autores verificaram que a super-expressão de TktA sozinha ou em conjunto com a PpsA levou a um aumento de 5,6% e 11,9 % na concentração final de produto, respectivamente. Já a super-expressão de PpsA apresentou efeito positivo apenas quando houve também super-expressão de transcetolase (TktA) e de uma DAHP-sintase mutada (AroG<sub>fdr</sub>).

Ademais, a inclusão do gene *aroG<sub>fdr</sub>* ou *aroF<sub>fdr</sub>*, que codifica a enzima DAHP-sintase insensível à retroinibição, seria também uma estratégia interessante, pois essa enzima é responsável pela reação que compromete PEP e E4P para a via do chiquimato. No entanto, o gene *phzC* de *P. aeruginosa* (já clonado no plasmídeo pETM\_*phzABGFCDE* para produção de PCA) é responsável por realizar a mesma reação

(Mentel et al., 2009). Neste sentido, a clonagem do gene *aroGfdr* ou *aroFfdr* não foi prevista neste trabalho.

Atualmente, existem diferentes estudos de otimização para produção de PCA voltados a organismos naturalmente produtores que, no entanto, são patogênicos e de baixa produtividade (PIERSON L.; PIERSON E., 2010). Por outro lado, muitos alvos para aumento da biossíntese de compostos aromáticos, derivados da via do chiquimato, encontram-se reportados em literatura (HUC CETOGULLARI et al., 2019), mas ainda não foram explorados na produção de fenazinas. Neste trabalho, propomos a superexpressão de dois desses alvos, as enzimas TktA e PpsA, em uma linhagem não patogênica de *Escherichia coli* carregando o operon *phz* para produção heteróloga de PCA. As sequências escolhidas provieram da linhagem de *E. coli* K-12 MG1655, devido a suas características cinéticas satisfatórias para o propósito do trabalho em questão, além de questões ligadas a códons preferenciais. As enzimas-alvo atuam na formação dos precursores iniciais da via do chiquimato e, por meio da superexpressão individual e em conjunto das enzimas, visamos avaliar o efeito das mesmas na síntese heteróloga de PCA.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a realização de modificações genéticas nas células de *E. coli* com potencial de favorecer a formação dos precursores da via metabólica de produção de corismato, que é o intermediário-chave para a produção do composto alvo fenazina-1-ácido carboxílico (PCA).

Especificamente, o objetivo foi a clonagem dos genes *tktA* (NC\_000913.3) e *ppsA* (NP\_416217) provenientes de *E. coli* K-12 MG1655 em plasmídeos *ePathBrick* pRSM4 para obtenção dos plasmídeos pRSM4\_ *tktA*, pRSM4\_ *ppsA*, pRSM4\_ *tktA\_ppsA* (monocistrônica), pRSM4\_ *ppsA\_tktA* (pseudo-operon). Posteriormente, realizar a expressão dos genes clonados em células recombinantes de *E. coli* QH4 produtoras de PCA, obter dados de produção e calcular os parâmetros cinéticos por meio dos dados de perfil de consumo do substrato glicerol, perfil de formação de biomassa e perfil de formação de produto PCA. Finalmente, avaliar a influência da superexpressão destes genes em diferentes combinações na formação do produto de interesse PCA, a partir dos dados obtidos.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. LINHAGENS BACTERIANAS

A linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$  foi empregada para construção de plasmídeos de expressão e sua estocagem, enquanto a linhagem de *E. coli* K-12 MG1655 foi utilizada para obtenção das sequências molde dos genes alvo.

Células de *E. coli* QH4 transformadas com o plasmídeo pETM7\_ *phzABGFCDE* (estoque do laboratório, SILVA et al., 2021) e com os plasmídeos construídos foram utilizadas para a produção de PCA. A linhagem QH4 é derivada da linhagem ATCC31884 e possui as deleções  $\Delta$ *pheA*,  $\Delta$ *tyrA* (HUANG et al., 2013). Esta mesma linhagem contendo o plasmídeo pETM7\_ *phzABGFCDE* passou a ser chamada de QH4-PCA neste trabalho.

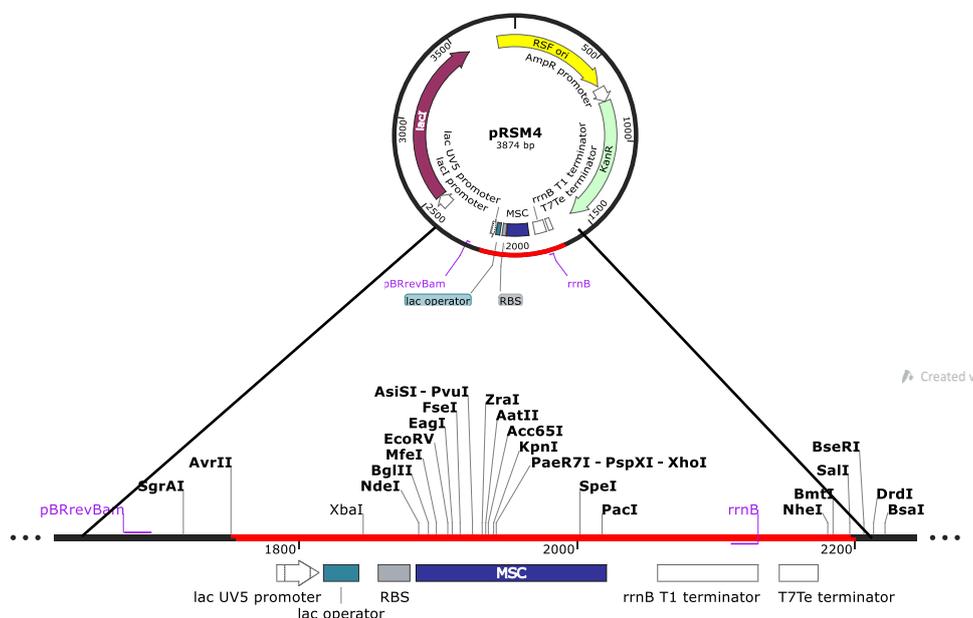
### 3.2. MEIOS DE CULTIVO

Meios de cultura: meio LB, utilizado para inóculos durante a construção dos plasmídeos, foi composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl. Os meios sólidos para plaqueamento eram compostos de LB mais 15 g/L de ágar. Para os ensaios de produção de PCA foi empregado o meio TB (24 g/L extrato de

levedura, 20 g/L triptona, 0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) acrescido de 20 g/L de glicerol. Tal substrato foi escolhido devido a sua rentabilidade e sustentabilidade no contexto de biorrefinarias. Além disso, também foram considerados os experimentos prévios do grupo de pesquisa, que demonstraram produção de piocianina a partir de glicerol superior quando comparada a produção da mesma fenazina tendo a glicose como fonte de carbono. Para recuperação do crescimento celular após transformações por choque térmico foi utilizado meio SOC (preparado com 20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de NaCl, KCl 2,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM e adição de glicose 20 mM). As concentrações finais de antibióticos utilizados foram sempre ajustadas para 50  $\mu\text{g/mL}$  (canamicina) e 80  $\mu\text{g/mL}$  (ampicilina). Todos os genes clonados tiveram sua transcrição induzida por IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) a 1 mM durante os ensaios de produção de PCA.

### 3.3.PLASMÍDEOS

O plasmídeo utilizado para clonagem de ambos os alvos foi o pRSM4. Este tem a mesma sequência do plasmídeo pRSM3 (XU et al., 2012) mas possui o promotor lacUV5 em substituição ao promotor T7 do pRSM3 (SILVA et al., 2021). Detalhes de seu mapa encontram-se na Figura 7.



**Figura 7:** Representação esquemática do plasmídeo pRSM4. (A) Mapa do plasmídeo pRSM4 com suas principais características. (B) Sítio de múltipla clonagem (MSC). Fonte: Própria autoria. Elaborado com o programa SnapGene. LacI gene do repressor do operon Lac; RSE: origem de replicação. KanR gene de resistência a Canamicina; RBS sítio de ligação do ribossomo; MSC sítio de múltipla clonagem.

### 3.4. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico de *E. coli* K-12 MG1655 foi obtido pelo kit de extração *AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen)*, servindo de molde para posterior obtenção dos genes *tktA* e *ppsA*.

O vetor pRSM4 foi obtido por extração plasmidial da linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$  previamente transformada com este plasmídeo (estoque do laboratório), utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*.

### 3.5. PRIMERS

Os *primers* desenhados para flanquear os genes alvo no DNA molde (Tabela 2), após sintetizados pela empresa *Exxtend*, foram diluídos para preparação de soluções estoque com concentração final de 100 pmol/ $\mu$ L, e soluções de trabalho 10 pmol/ $\mu$ L. Adicionalmente, para a realização de *screening* de clones recombinantes, foram utilizados os *primers* já disponíveis no laboratório *pBRrevBam (forward)* e *rrnB (reverse)*, capazes de se anelar respectivamente na região *upstream* ao promotor LacUV5 e no sítio de terminação da tradução, ambos contidos no plasmídeo pRSM4, conforme ilustrado na Figura 7.

Primer	Sequência
<i>tktA NdeI_For</i>	5' GGCC <u>CATATG</u> TCCTCACGTAAGAGCTTG 3'
<i>tktA XhoI_Rev</i>	5' GGC <u>CTCGAG</u> TTACAGCAGTTCTTTTGCTTTCGC 3'
<i>ppsA NdeI_Rev</i>	5' GCG <u>CATATG</u> TCCAACAATGGCTCGTC 3'
<i>ppsA XhoI_For</i>	5' CG <u>CTCGAG</u> TTATTTCTTCAGTTCAGCCAGGC 3'
<i>pBRrevBam</i>	5' GGTGATGTCGGCGATATAGG 3'
<i>rrnB_R</i>	5' GAGAGCGTTCACCGACAAAC 3'

**Tabela 2** - Sequência de *primers* utilizados neste trabalho. Foram adicionados sítios de restrição nos pares de primers destinados a clonagem dos genes *tktA* e *ppsA*. Estas encontram-se destacadas em negrito e sublinhadas na sequência. Fonte: Própria autoria.

### 3.6. CLONAGEM DOS GENES *tktA* E *ppsA* INDIVIDUALMENTE

A amplificação dos genes *tktA* e *ppsA* foi realizada pela reação em cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se DNA genômico de *E. coli* K12 MG1655 e o mix enzimático *Taq High Fidelity Pol Master Mix 2X (Cellco)*, conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas no termociclador *Thermo Electron Corporation PCR*. Configuração: um ciclo de 95° C por 5 minutos, 30 ciclos com três etapas, sendo a

primeira a 95°C por 15 segundos, a segunda a 55.8°C por 30 segundos, e a terceira a 72°C por 4 minutos, e ao final um ciclo de 72°C por 5 minutos. Tal programa foi realizado para as demais PCRs descritas neste trabalho. Os amplicons de interesse foram recuperados pelo kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)*, segundo instruções do fabricante e quantificados em *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)*. Para cada um dos amplicons purificados, bem como para o vetor pRSM4 extraído, foram realizadas reações de digestão com enzimas de restrição em tampão *FastDigest Green Buffer 10X (Thermo Scientific)*. Foram utilizadas as enzimas *XhoI (FastDigest, Thermo Scientific)* e *NdeI (FastDigest, Thermo Scientific)*, com reações preparadas conforme protocolo do fabricante. Uma etapa de tratamento com *FastAP thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific)* foi adicionada ao final da reação de digestão do vetor para prevenir uma possível posterior recircularização de moléculas parcialmente digeridas. Os produtos da digestão foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)*. Cada amostra foi quantificada em *NanoDrop*. As reações de ligação foram preparadas na proporção 3:1 (inserto:vetor) e conduzidas com *T4 DNA ligase Fast Ligation (Thermo Scientific)*, conforme instruções do fabricante.

Para transformação, foram utilizadas alíquotas de 100 µL da linhagem de *E. coli* DH5α já competente, em estoque, com 10 µL de produto de ligação, por choque térmico a 42°C por 45 segundos. Imediatamente em seguida foram adicionados 250 µL de meio SOC para incubação em *shaker* durante uma hora, a 37 ° C sob agitação de 225 rpm. As amostras foram plaqueadas em meio LB com Canamicina e incubadas a 37°C durante 16 horas. O mesmo procedimento de transformação descrito aqui foi utilizado ao longo de todo o trabalho.

### 3.7.SCREENING DOS PLASMÍDEOS COM GENES INDIVIDUALMENTE CLONADOS

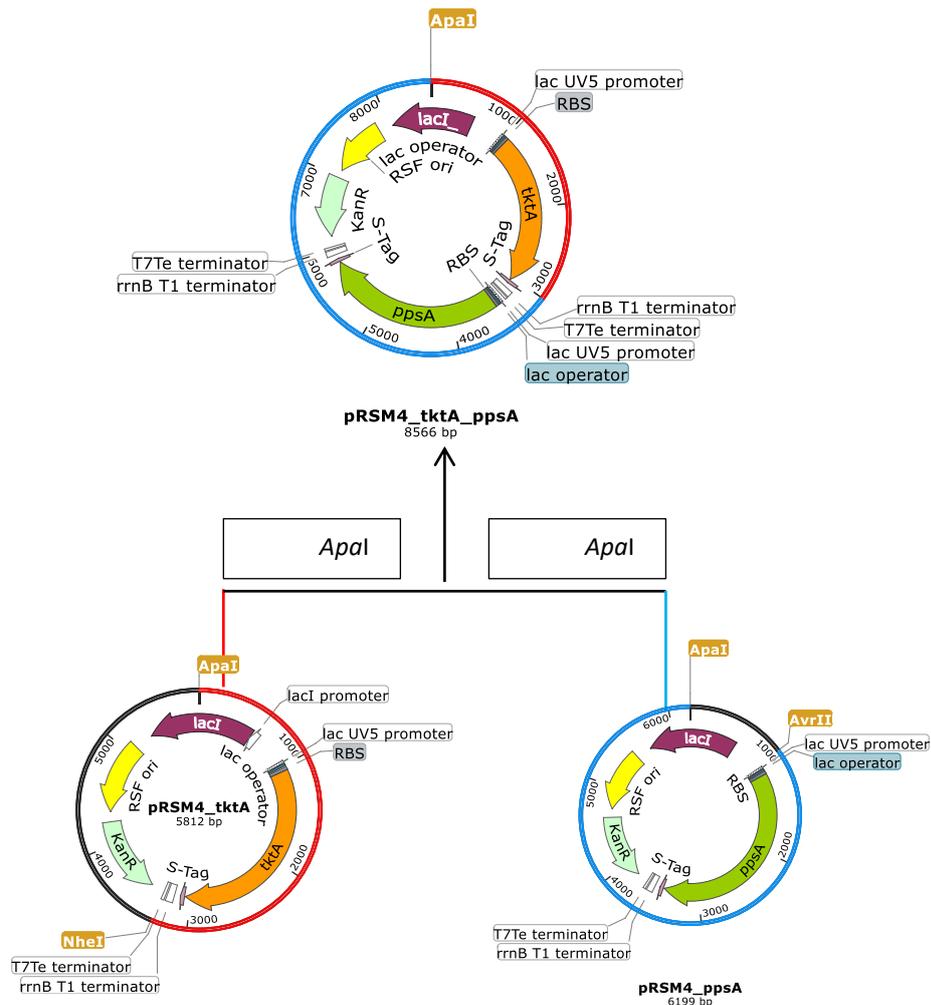
A primeira etapa de *screening* dos plasmídeos construídos pRSM4\_ *tktA* e pRSM4\_ *ppsA* se deu por PCR de colônia, por meio do mix de *primers pBRrevBam (forward) + rrnB (reverse)*. A reação para o teste de cada colônia foi preparada com *GoTaq G2 Green Master Mix (Promega)* e uma colônia como molde. O controle positivo foi elaborado com DNA genômico como molde, e os *primers* usados na amplificação dos genes *tktA* ou *ppsA*. Controles negativos foram preparados com *primers pBRrevBam + rrnB* e pRSM4 como molde. A partir dos clones identificados como positivos por meio da PCR de colônia, seguiu-se com o segundo passo de *screening*, por ensaio de restrição.

Nesta etapa o DNA plasmidial extraído de três clones de cada construção foi digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI* (*FastDigest*, *Thermo Scientific*). As colônias com resultado positivo foram estocadas a -80°C em criotubos de 2 mL, com glicerol 20 % (v/v) como agente crioprotetor. Os plasmídeos extraídos de dois clones positivos de cada construção foram enviados para sequenciamento pela empresa Myleus facility.

### 3.8. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS COM AMBOS OS GENES EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES

A segunda etapa de experimentos se deu pela montagem de dois plasmídeos com ambos os genes, *tktA* e *ppsA*. Foram escolhidas as configurações monocistrônica e pseudo-operon. Para a montagem de ambas as configurações, é necessário utilizar a enzima *SalI* (Xu et al., 2013). Entretanto, como o sítio de restrição *SalI* encontrava-se presente dentro da sequência dos dois genes de interesse, utilizou-se como alternativa a enzima *ApaI* (*FastDigest*, *Thermo Scientific*).

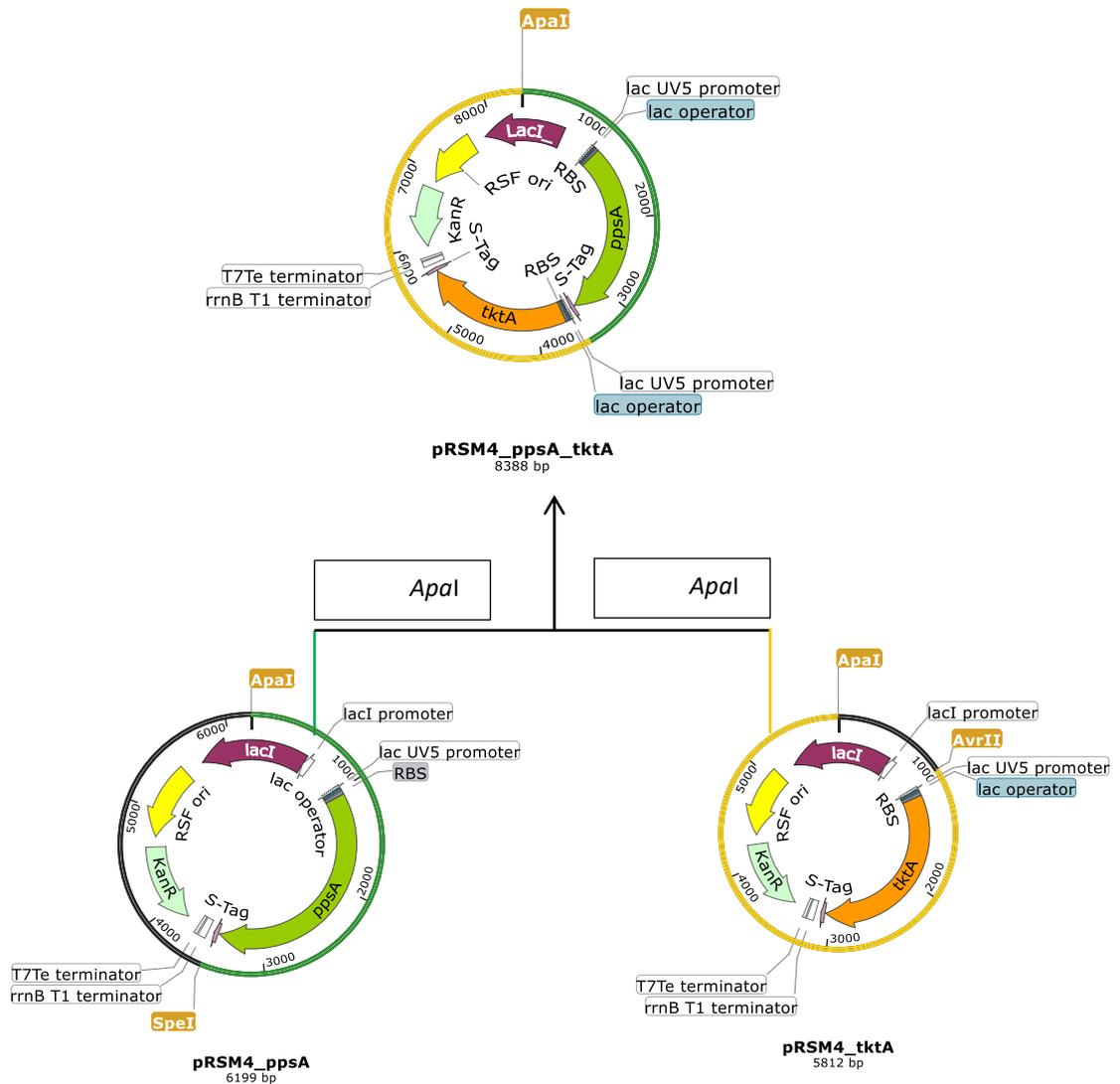
As digestões e ligação para obtenção da configuração monocistrônica foram conduzidas como ilustrado na Figura 8.



**Figura 8** - Simulação da construção do plasmídeo pRSM4\_tktA\_ppsA na configuração monocistrônica. Com as enzimas *ApaI* e *NheI* um fragmento contendo o gene *tktA* foi digerido (Vermelho) a partir do plasmídeo doador pRMS4\_tktA, enquanto que com *ApaI* e *AvrII* foi obtido um fragmento contendo o gene *ppsA* (Azul) a partir do plasmídeo receptor pRMS4\_ppsA. Estes fragmentos foram ligados nas extremidades complementares de *ApaI* e pelas extremidades isocaudâmeras geradas por *AvrII* e *NheI*, gerando o plasmídeo pRSM4\_tktA\_ppsA. Fonte: Própria autoria. Elaborada com o programa SnapGene.

Os reagentes e procedimentos foram análogos aos descritos anteriormente, com exceção das enzimas de restrição (discriminadas na figura 8), além da proporção dos fragmentos purificados (sendo 2:1 fragmento com *tktA* para o fragmento com *ppsA*).

A Figura 9 ilustra os passos de digestão e ligação do plasmídeo em configuração pseudo-operon. Os reagentes e procedimentos foram análogos aos descritos anteriormente, com exceção das enzimas de restrição (discriminadas na figura 9), além da proporção dos fragmentos purificados (sendo 2:1 fragmento com *ppsA* para o fragmento com *tktA*).



**Figura 9:** Simulação da construção do plasmídeo pRSM4\_ppsA\_tktA, configuração pseudo-operon. Com as enzimas *ApaI* e *SpeI* um fragmento contendo o gene *ppsA* foi digerido (Verde) a partir do plasmídeo doador pRMS4\_ppsA, enquanto que com *ApaI* e *AvrII* foi obtido um fragmento contendo o gene *tktA* (Amarelo) a partir do plasmídeo receptor pRMS4\_tktA. Estes fragmentos foram ligados nas extremidades complementares de *ApaI* e pelas extremidades isocaudâmeras geradas por *AvrII* e *SpeI*, gerando o plasmídeo pRSM4\_ppsA\_tktA. Fonte: Própria autoria. Elaborado com o programa SnapGene.

### 3.9. SCREENING DE PLASMÍDEOS COM AMBOS OS GENES EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES

As colônias resultantes da transformação foram submetidas à PCR de colônia para confirmação da presença de cada gene em ambas as construções. Para evidenciar a presença dos genes *tktA* e *ppsA* na construção monocistrônica, o gene *tktA* foi amplificado com primers *pBRrevBam* e *tktA XhoI\_Rev*, e *ppsA* amplificado com primers *ppsA XhoI\_For* e *rrnB*. Para confirmar os dois genes na construção em pseudo-operon, as reações foram conduzidas de maneira análoga. O gene *tktA* identificado por *tktA NdeI\_For* e *rrnB*, enquanto *ppsA XhoI\_Rev* e *pBRrevBam* foram utilizados para a PCR

de *ppsA*. A análise de restrição foi novamente realizada: para a construção monocistrônica, foram utilizadas as enzimas *KpnI*, *NcoI* e *NheI* (*FastDigest*, Thermo Scientific). Para os plasmídeos em pseudo-operon, foram realizadas digestões com as enzimas *EcoRI*, *ApaI* e *NcoI* (*FastDigest*, Thermo Scientific).

### 3.10. PREPARO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE PCA

A etapa seguinte deu-se pela transformação da linhagem produtora *E. coli* QH4-PCA com os plasmídeos construídos, a fim de se criar quatro novas linhagens recombinantes. Quatro amostras de células foram submetidas a um procedimento para torná-las competentes. A linhagem QH4-PCA foi inoculada em falcon de 15 mL com 5 mL de meio LB e ampicilina. O antibiótico foi requerido junto ao meio como marcador de seleção sempre que linhagens com pETM7 se encontravam sendo cultivadas, pois esse plasmídeo possui gene de resistência à ampicilina. Após 16 horas, quatro alíquotas de 100 µL foram individualmente transferidas para quatro falcons de 15 mL, com 3 mL de LB e ampicilina. A densidade ótica das amostras foi mensurada em espectrofotômetro e acompanhada por aproximadamente 1 hora e meia, até atingir um valor de absorvância a 600 nm próximo a 0,6. As células foram transferidas para quatro microtubos de 1,5 mL, centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm, tiveram seu sobrenadante descartado e foram ressuspensas com 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Posteriormente foram mantidas em gelo por 5 minutos para que fosse iniciada a transformação. Cada amostra recebeu 100 ng de um dos plasmídeos construídos (pRSM4\_*ppsA*, pRSM4\_*tktA*, pRSM4\_*ppsA\_tktA* e pRSM4\_*tktA\_ppsA*). O mesmo procedimento de transformação por choque térmico descrito anteriormente foi realizado na sequência. Cada uma teve 100 µL de seu volume plaqueado em meio LB-ágar com canamicina e ampicilina e todas foram incubadas por 16 horas a 37°C.

Para confirmação dos clones que receberam o novo plasmídeo, colônias de <sup>28</sup>cada uma das placas foram selecionadas e repicadas em estrias para novo meio LB-ágar com canamicina e ampicilina. Por fim, cada construção teve duas colônias escolhidas para serem estocadas a -80°C em criotubos de 2 mL com glicerol 20 % (v/v).

### 3.11. CULTIVOS DAS LINHAGENS RECOMBINANTES

Os cultivos foram divididos em duas etapas, sendo a primeira referente às linhagens com plasmídeos contendo os genes clonados individualmente. A segunda foi realizada com as células de construções gênicas monocistrônica e pseudo-operon. Para o cultivo

inicial, a linhagem parental *E. coli* QH4-PCA, a linhagem *E. coli* QH4-PCA + pRSM4\_*ppsA* e *E. coli* QH4-PCA + pRSM4\_*tktA* foram inoculadas individualmente em falcons de 15 mL com 5 mL de meio LB com antibiótico adequado.

Após 16 horas, duas alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada falcon e transferidas para frascos aletados de 250 mL com 50 mL de meio TB suplementado com 2% glicerol. Dessa forma foram obtidas duas réplicas para cada tratamento. No meio da linhagem parental somente foi adicionado o antibiótico ampicilina, enquanto para as outras linhagens adicionou-se também canamicina. Neste momento foram retiradas duas amostras de cada réplica, uma delas destinada a determinação da densidade ótica dos cultivos, realizada a 600 nm em espectrofotômetro, e outra foi centrifugada e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. Em seguida os erlenmeyers foram incubados em *shaker* a 30°C, sob agitação de 225 rpm, durante aproximadamente 50 horas.

O crescimento celular foi acompanhado ao longo de todo cultivo com leituras de DO a 600nm em intervalos de tempo variados. No momento em que cada réplica atingiu a DO de aproximadamente 1,0, estas foram induzidas com IPTG 1 mM. Simultaneamente às leituras, alíquotas foram coletadas e estocadas, a fim de serem analisadas posteriormente em HPLC para determinação das concentrações de substrato (glicerol) e produto (PCA).

A segunda etapa de cultivos foi realizada de maneira análoga, dessa vez com as linhagens parental, *E. coli* QH4-PCA + pRSM4\_*ppsA\_tktA* e *E. coli* QH4-PCA + pRSM4\_*tktA\_ppsA*. O cultivo foi mantido por aproximadamente 50 horas.

A correlação entre massa seca e DO foi determinada experimentalmente ao longo de um cultivo realizado previamente a este trabalho. Oito amostras foram coletadas em diferentes momentos, tiveram sua absorbância e volume aferidos. Em seguida foram filtradas, retendo a biomassa em membranas com poro de 0,22 µm previamente pesadas. Essas por sua vez passaram por processos de secagem em estufa. Por fim foram novamente pesadas para determinar a variação de massa celular após a perda de água. Com os dados de massa celular e volume filtrado, foi determinada a concentração celular de cada ponto coletado. Uma curva foi então construída correlacionando os dados de concentração em função da densidade ótica de cada ponto, representada pela seguinte equação:  $X=0,4918.y$   $R^2 = 0,9902$ , em que X representa gDCW/L (gramas de massa seca, do inglês *Dry Cell Weight*) e y os valores de absorbância em densidade ótica.

### 3.12. CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ): Em cada cultivo, a partir dos dados de absorbância obtidos ao longo do tempo, foi possível realizar a conversão desses valores em concentração de biomassa em cada ponto com a equação  $X = 0,4918 \cdot y$ . Foi então plotado um gráfico de  $\ln(X)$  vs Tempo (h) e identificada a fase exponencial de crescimento. Todos os pontos presentes nesta fase foram utilizados para a construção de um novo gráfico de  $\ln(X)$  vs Tempo (h), em que sua inclinação indicava o valor de  $\mu_{max}$ . A curva é descrita pela seguinte equação:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{max} \cdot t$$

Em que X representa o valor de concentração de biomassa;  $X_0$  é a concentração de biomassa no instante  $t=0$ ;  $\mu_{max}$  a velocidade específica máxima, e t o tempo.

Coefficiente de conversão de substrato em produto ( $Y_{mgPCA/gGlicerol}$ ): A partir da concentração de PCA obtida nas amostragens ao longo do tempo, foi calculada a variação de produto entre cada ponto (P) coletado e a concentração inicial de PCA ( $P_0$ ), durante a fase exponencial, representado pela relação:

$$\Delta P = (P - P_0)$$

A partir da concentração de substrato (S) obtido nas amostragens ao longo do tempo, foi calculada a variação de substrato entre cada ponto coletado (S) e a concentração inicial de substrato ( $S_0$ ), durante a fase exponencial. Para manter os valores positivos, todos os valores foram multiplicados por -1:

$$-\Delta S = (S - S_0)$$

Por fim, foi plotado um gráfico de  $\Delta P$  vs  $-\Delta S$ , com sua inclinação equivalente ao coeficiente de conversão de substrato em produto e curva representada pela seguinte equação:

$$Y_{gP/gS} = \frac{\Delta P}{-\Delta S}$$

Conversão de glicerol (%): A porcentagem de glicerol consumido ao longo de diferentes tempos do cultivo foi calculada para todas as linhagens nos tempos  $t=32$  h e

t=50 h, obtida através da seguinte equação, em que S representa a concentração de glicerol:

$$\text{Conversão de glicerol (\%)} = \left(1 - \frac{S}{S_0}\right) \times 100$$

Produtividade volumétrica ( $P_p$ ): Com a variação de concentração de cada ponto (P) de PCA e sua concentração inicial ( $P_0$ ) ao longo do tempo em cada cultivo, foi possível calcular este parâmetro utilizando a seguinte equação:

$$P_p = \frac{(P - P_0)}{t}$$

O  $t$  utilizado é referente ao instante de produtividade de cada ponto.

Produtividade específica ( $P_e$ ): Este fator é obtido pela razão entre a concentração de PCA e a concentração celular em um mesmo momento do cultivo.

$$P_e = \frac{P}{X}$$

### 3.13. QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PCA E GLICEROL

O perfil de concentração de glicerol em cada cultivo foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (sistema Waters Co; Bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor RID) utilizando a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) como fase estacionária e uma solução de  $H_2SO_4$  5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 L.min<sup>-1</sup> e 45°C. Já o perfil de concentração de PCA foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (sistema Shimadzu Bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996), utilizando a coluna C18 (Sunfire Waters, Milford, EUA) a 25 °C conectada ao detector UV/VIS 274 nm, solução A:  $H_2O$  contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético, e solução B: Acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético, ambas com vazão de 0,6 mL/min. As fases móveis foram injetadas em modo gradiente, seguindo as seguintes proporções (A:B) em porcentagem ao longo do tempo: de 0 a 2 minutos, 98:2; de 2 a 14 minutos, 85:15; de 14 a 16 minutos, 98:2, de 16 a 20 minutos, 98:2. Todas as amostras foram filtradas previamente em filtro PVDF 0,22 µm. As análises foram realizadas com a ajuda do aluno de doutorado Josivan Cunha e das técnicas Thais Castral e Alyne Veroli.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS COM GENES INDIVIDUALMENTE CLONADOS

Após as etapas de amplificação por PCR, digestão e purificação, os amplicons digeridos e vetores purificados foram considerados com pureza, integridade e concentração adequadas para as etapas subsequentes. Ao final dos processos de ligação e transformação, diversas colônias foram obtidas para *screening*.

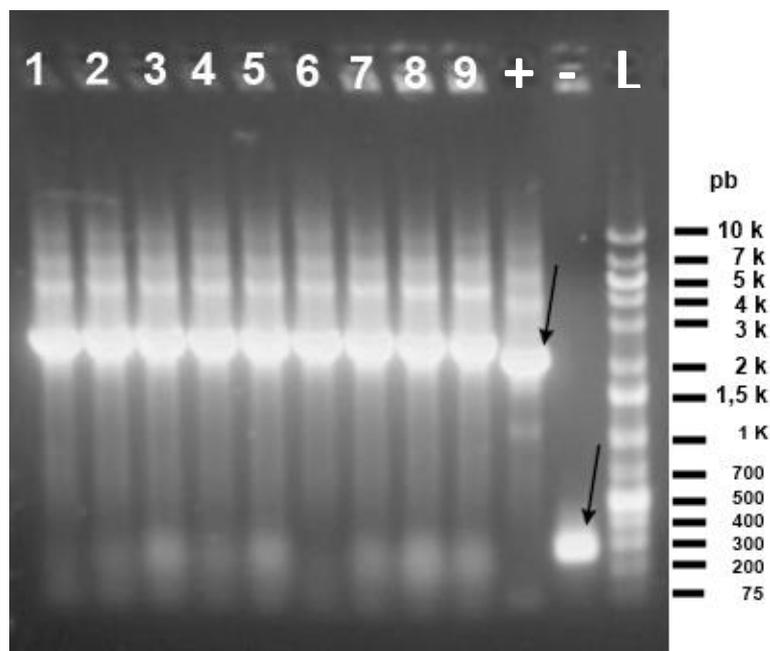
A fim de facilitar o *screening*, simulações da PCR de colônia foram realizadas no programa SnapGene® de acordo com cada molde e par de *primers* utilizados, obtendo assim os tamanhos de fragmentos esperados. Estes encontram-se na Tabela 3, a seguir. Era esperado que colônias negativas não apresentassem fragmentos na altura do gene alvo ou apresentassem bandas inespecíficas, por isso utilizou-se o símbolo “\*” para os fragmentos destes moldes.

Reação PCR	Primers	Molde	Fragmento (pb)
Testes <i>tkta</i>	<i>pBRrevBam + rrnB</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>tkta</i>	2394
Testes <i>tkta</i>	<i>pBRrevBam + rrnB</i>	Colônia negativa pRSM4_ <i>tkta</i>	*
Controle positivo <i>tkta</i>	<i>tkta XhoI_Rev + tkta NdeI_For</i>	Genoma <i>E. coli</i> K12 MG1655	2010
Testes <i>ppsA</i>	<i>pBRrevBam + rrnB</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>ppsA</i>	2781
Testes <i>ppsA</i>	<i>pBRrevBam + rrnB</i>	Colônia negativa pRSM4_ <i>ppsA</i>	*
Controle positivo <i>ppsA</i>	<i>ppsA XhoI_Rev + ppsA NdeI_For</i>	Genoma <i>E. coli</i> K12 MG1655	2396
Controle negativo	<i>pBRrevBam + rrnB</i>	pRSM4	456

**Tabela 3:** Fragmentos esperados para reações de PCR de colônia no *screening* dos clones pRSM4\_*tkta* e pRSM4\_*ppsA*. O mesmo controle negativo foi utilizado para ambos os testes. Fonte: Própria autoria.

Na Figura 10 pode ser observado o resultado das reações de PCR. Percebe-se que todas as colônias testadas apresentaram uma banda de forte intensidade e de mesma altura, ligeiramente superior a banda presente no controle positivo, conforme esperado (Tabela 3). Nas reações teste, o amplicon de 2394 pb possuía parte da sequência do plasmídeo em suas extremidades, devido aos *primers* utilizados (*pBRrevBam* e *rrnB*), capazes de se anelar na região *upstream* ao promotor LacUV5 e no terminador de

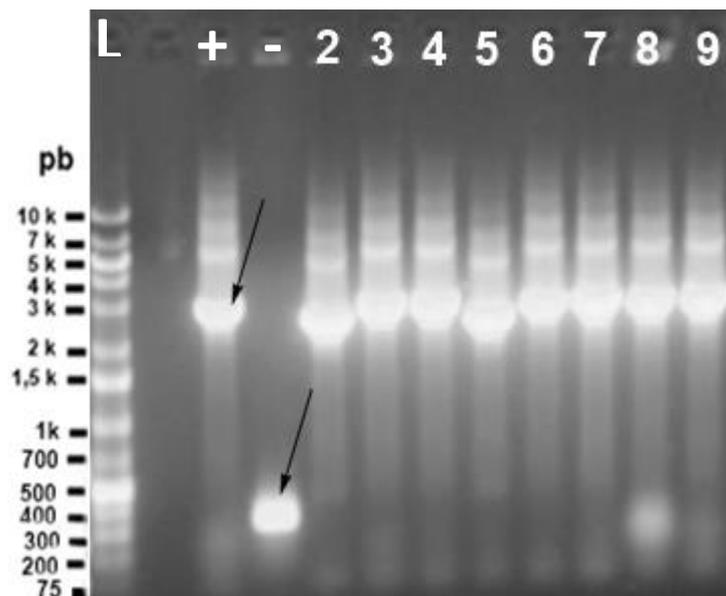
tradução *rrnB* T1. Já para o controle positivo, os *primers* anelaram-se diretamente nas extremidades do gene, resultando em menor amplicon (2010 pb).



**Figura 10:** *Screening* de recombinantes (pRSM4\_ *tktA*) por PCR de colônia. As nove primeiras raias são referentes às reações de PCR teste *tktA*, enumeradas de maneira idêntica a marcação de clones nas placas de transformação. A banda marcada com a primeira seta recebeu o controle positivo (+). Este indica a banda referente ao gene *tktA*, com a altura esperada do fragmento de 2010 pb. A seguinte seta indica o controle negativo (-). A última raia observada é referente ao padrão de peso molecular (L), cujos tamanhos de seus fragmentos encontram-se marcados à direita da figura. Fonte: Própria autoria.

O controle negativo indicou que a amplificação do gene *tktA* realmente só ocorreu quando um molde para ele estava presente, e não devido a possível contaminação ou por amplificação inespecífica dos *primers*.

Portanto, com base nos pontos levantados e na comparação com o marcador de peso molecular, todas as colônias submetidas à PCR foram consideradas positivas e as células referentes às raias 7, 8 e 9 foram escolhidas para a análise de restrição. A seguir, na Figura 11, encontra-se o resultado do *screening* para o segundo plasmídeo.



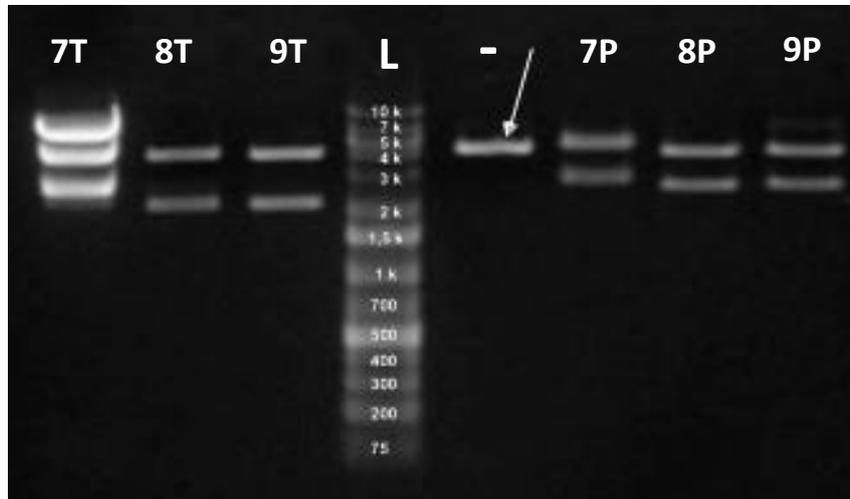
**Figura 11:** *Screening* de recombinantes (pRSM4\_ppsA) por PCR de colônia. O marcador de peso molecular pode ser observado à esquerda (L). A primeira seta indica o controle positivo (+). A banda de maior intensidade é referente ao gene *ppsA*, com base no tamanho do amplicon esperado de 2396 pb, em comparação com o marcador de peso molecular. A banda com segunda seta representa o controle negativo (-), enquanto as demais raias receberam reações PCR teste *ppsA*, enumeradas de acordo com a mesma marcação realizada nas placas. A reação 1 não foi aplicada, iniciando a aplicação no gel a partir da reação 2. Fonte: Própria autoria.

Duas situações foram observadas: em 2 e 5, bandas de forte intensidade se encontram abaixo do controle positivo, enquanto em 3, 4, 6, 7, 8 e 9 podem ser observadas bandas ligeiramente acima do mesmo controle. No primeiro caso, os clones foram considerados negativos, pois suas bandas não apresentaram tamanho esperado. Nos restantes, o fragmento formado com 2781 pb, indicou que todos estes clones eram positivos, pelo mesmo motivo descrito na análise da PCR de colônia anterior. Para a análise de restrição foram escolhidas as células referentes às raias 7, 8 e 9. A fim de facilitar a análise de restrição dos dois clones, simulações de digestão foram realizadas no programa SnapGene® de acordo com cada molde e enzimas utilizadas, obtendo assim os tamanhos de fragmentos esperados. Estes encontram-se na Tabela 4 a seguir.

Reação Digestão	Enzimas	Molde	Fragmentos (pb)
Teste <i>tktA</i>	<i>NdeI</i> + <i>XhoI</i>	pRSM4_ <i>tktA</i>	3818 e 1994
Teste <i>ppsA</i>	<i>NdeI</i> + <i>XhoI</i>	pRSM4_ <i>ppsA</i>	3818 e 2381
Controle negativo	<i>NdeI</i> + <i>XhoI</i>	pRSM4	3818 e 56

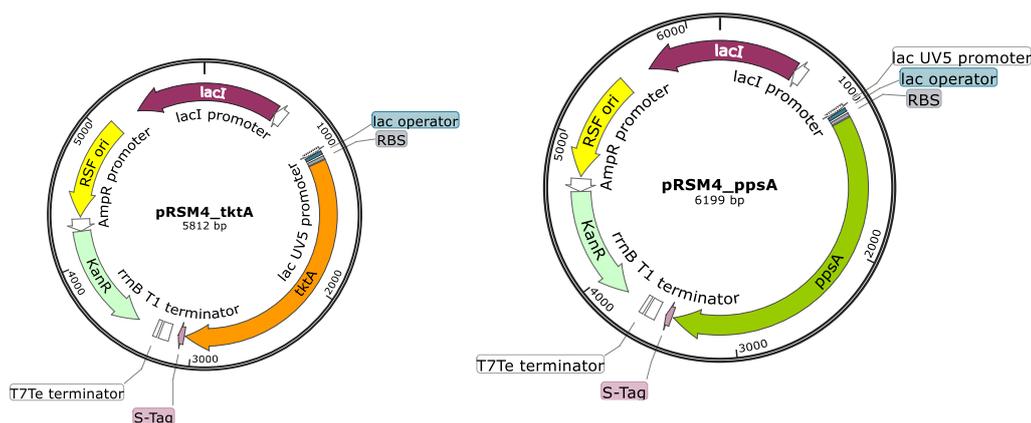
**Tabela 4:** Fragmentos esperados no ensaio de restrição dos clones pRSM4\_ *tktA* e pRSM4\_ *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

Os DNAs plasmidiais dos clones escolhidos 7, 8 e 9 (teste *tktA*) e 7, 8 e 9 (teste *ppsA*) foram extraídos, quantificados e digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Na Figura 12 a seguir, pode ser observado o resultado desta etapa.



**Figura 12:** Gel resultante do ensaio de restrição dos clones pRSM4\_*tktA* e pRSM4\_*ppsA*. Nos três primeiros poços (7T, 8T e 9T) foram aplicadas amostras de digestão dos plasmídeos 7, 8 e 9 (teste *tktA*). Em seguida o marcador de peso molecular (L), controle (-) com pRSM4 digerido, e nos três últimos (7P, 8P e 9P) digestões dos plasmídeos 7,8 e 9 (teste *ppsA*). Fonte: Própria autoria.

Na amostra 7T foi possível observar uma digestão incompleta do plasmídeo 7 (teste *tktA*), além de bandas que também poderiam estar relacionadas a seus diferentes níveis de torção. Este não foi mais utilizado nas etapas subsequentes. As duas digestões seguintes mostraram fragmentos de tamanho esperado, com primeira banda na altura do vetor e segunda banda na altura do inserto. Os plasmídeos 8 e 9 (teste *tktA*) foram então considerados positivos. Para o gene *ppsA*, o plasmídeo da amostra 7P apresentou duas bandas, porém estas estavam ligeiramente acima da altura esperada, sendo, portanto, descartado. Por outro lado, os plasmídeos 8 e 9 (teste *ppsA*), resultaram como positivos devido a suas bandas apresentarem alturas esperadas para o inserto e vetor. A Figura 13 apresenta o esquema dos dois plasmídeos construídos nessa etapa.



**Figura 13:** Mapa representativo dos plasmídeos construídos para super-expressão de transcetolase A (TktA) e fosfoenolpiruvato sintase A (PpsA) em *E. coli*. pRSM4\_tktA (A) e pRSM4\_ppsA (B). Fonte: Própria autoria. Elaborado com o programa SnapGene.

Após a confirmação por meio de PCR de colônia e ensaio de restrição, as colônias 8 e 9 (com pRSM4\_tktA) e 8 e 9 (com pRSM4\_ppsA) foram estocadas em criotubos a -80°C com glicerol 20%. Os plasmídeos extraídos das colônias 8 e 9 de cada construção foram também enviados para sequenciamento. Foi feito então o alinhamento das sequências provenientes dos fragmentos sequenciados com as suas sequências referência utilizando o programa SnapGene, *in silico*. Pelo mesmo programa, a sequência referência de cada gene encontrava-se inserida no sítio de múltipla clonagem dos vetores pRSM4, como observado na Figura 13, também em formato FASTA. O programa mostrou também a qualidade dos fragmentos sequenciados, em que as extremidades se encontravam com baixa qualidade (picos mal resolvidos) e as regiões centrais em alta qualidade (picos bem resolvidos). Tal característica do sequenciamento não levou a problemas analíticos, pois as regiões escolhidas para serem sequenciadas experimentalmente abarcavam porções *upstream* e *downstream* à posição dos genes inseridos nos plasmídeos. Nesse sentido, os ruídos do sequenciamento se encontravam na região do vetor e não dos insertos. Não foi encontrado nenhum tipo de mutação de inserção de base, deleção, inversão, tão pouco mutações do tipo *frameshift*, silenciosa ou *stop códons* nas regiões analisadas, para ambos os genes. Dessa forma, os plasmídeos pRSM4\_tktA (9) e pRSM4\_ppsA (9) foram selecionados como positivos e utilizados posteriormente para a transformação da linhagem *E. coli* QH4-PCA.

#### 4.2. CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS COM AMBOS OS GENES EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES

Somente os plasmídeos pRSM4\_tktA (9) e pRSM4\_ppsA (9), já extraídos e quantificados, foram utilizados para as duas construções subsequentes, devido suas

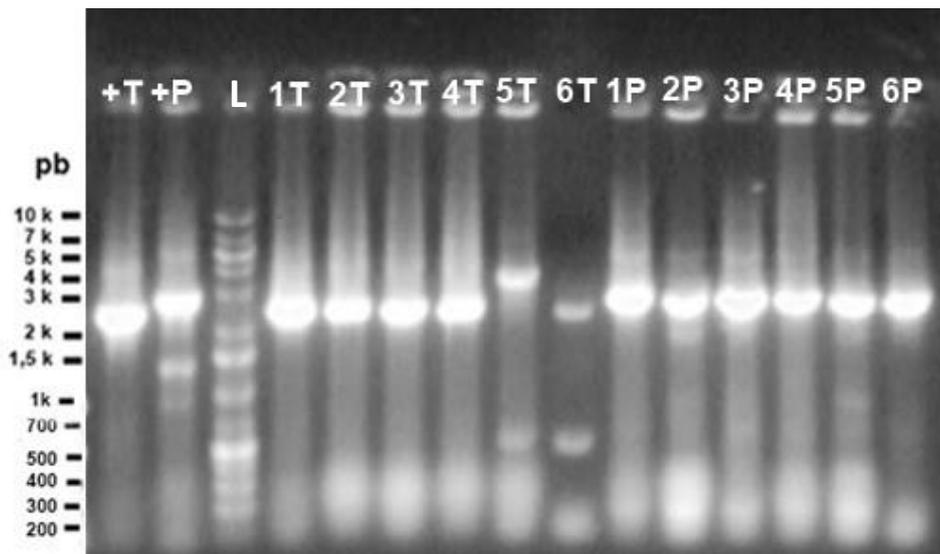
maiores concentrações. Após as ligações entre os insertos e seus respectivos vetores, as reações foram utilizadas nas duas transformações de alíquotas da linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$ , obtendo ao final quatro placas. Duas delas referentes a colônias da transformação com pRSM4\_ *tkta\_ppsA* (monocistrônico), e as outras duas resultantes da transformação com pRSM4\_ *ppsA\_tkta* (pseudo-operon).

O primeiro passo de *screening* dessas placas foi a PCR de colônia, sendo realizado em duas etapas: a primeira para verificação dos genes em configuração monocistrônica e em seguida em pseudo-operon. A seguir encontra-se a Tabela 5 com informações sobre os fragmentos esperados na PCR de colônia para a construção monocistrônica, baseados em cada molde e par de *primers* presentes nas reações.

Reação PCR	Primers	Molde	Fragmento (pb)
Teste <i>tkta</i> (monocistrônico)	<i>pBRrevBam + tkta XhoI_Rev</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>tkta_ppsA</i>	2214
Teste <i>tkta</i> (monocistrônico)	<i>pBRrevBam + tkta XhoI_Rev</i>	Colônia negativa pRSM4_ <i>tkta_ppsA</i>	*
Teste <i>ppsA</i> (monocistrônico)	<i>ppsA XhoI_For + rrnB</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>tkta_ppsA</i>	2574
Teste <i>ppsA</i> (monocistrônico)	<i>ppsA XhoI_For + rrnB</i>	Colônia negativa pRSM4_ <i>tkta_ppsA</i>	*
Controle positivo do gene <i>tkta</i>	<i>pBRrevBam + tkta XhoI_Rev</i>	pRSM4_ <i>tkta</i>	2214
Controle positivo do gene <i>ppsA</i>	<i>ppsA XhoI_Rev + pBRrevBam</i>	pRSM4_ <i>ppsA</i>	2600

**Tabela 5:** Fragmentos esperados para reações de PCR de colônia no *screening* dos clones pRSM4\_ *tkta\_ppsA*. Fonte: Própria autoria. Era esperado que as colônias negativas não apresentassem nenhuma banda na altura dos genes testados, situação representada com “\*” no quadro acima.

A seguir, na Figura 14, encontra-se o resultado da PCR de colônia. Foram testadas seis colônias, numeradas de 1 a 6. Uma parte de suas células serviu de molde para busca do gene *tkta* (reações 1T à 6T) enquanto outra parte foi usada para busca de *ppsA* (reações 1P à 6P). Dessa forma, para que o clone testado fosse considerado positivo, este deveria apresentar bandas nas alturas esperadas para ambos os genes. Pode-se perceber ao observar a imagem que todas as reações de 1P à 6P apresentaram uma banda na mesma altura do controle positivo do gene *ppsA*, evidenciando que elas possuíam este inserto integrado em seu plasmídeo. Por outro lado, somente as reações de 1T à 4T apresentaram bandas de forte intensidade na altura esperada do controle positivo do gene *tkta*. A reação 5T não apresentou banda na altura esperada, enquanto 6T apresentou um fragmento de menor intensidade na altura esperada para o gene *tkta*. Frente a essas informações, somente os clones 1, 2, 3 e 4 foram considerados positivos, sendo os três primeiros selecionados para análise de restrição.



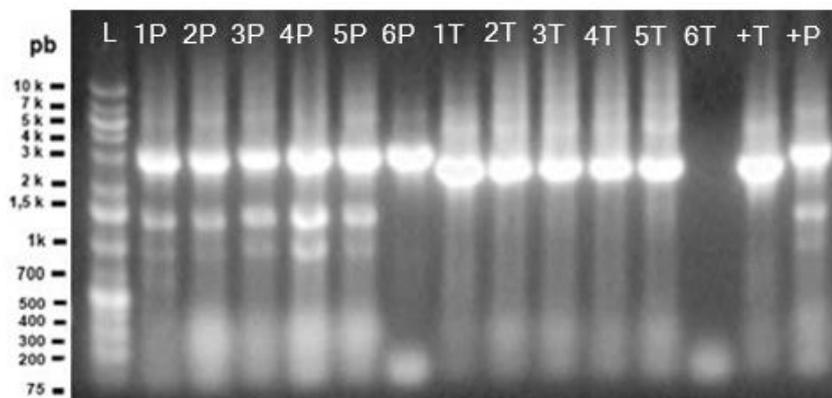
**Figura 14:** Gel resultante da PCR de colônia no *screening* dos clones pRSM4\_ *tktA*\_ *ppsA* (monocistrônico). A primeira raia, “+T” recebeu o controle positivo do gene *tktA* e a segunda “+P”, o controle positivo do gene *ppsA*. Em seguida pode ser observado o marcador de peso molecular (L). Representados como 1T, 2T, 3T, 4T, 5T e 6T, estão as reações teste *tktA*. Por fim, as raias 1P, 2P, 3P, 4P, 5P e 6P são referentes às reações teste *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

Para a construção em pseudo-operon foram realizadas as mesmas análises. Assim, o quadro de fragmentos esperados foi elaborado (Tabela 6), referente às reações de PCR para os testes da construção pseudo-operon.

Reação PCR	Primers	Molde	Fragmento (pb)
Teste <i>tktA</i> (pseudo-operon)	<i>tktA NdeI_For e rrnB</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>ppsA</i> _ <i>tktA</i>	2187
Teste <i>tktA</i> (pseudo-operon)	<i>tktA NdeI_For e rrnB</i>	Colônia negativa pRSM4_ <i>ppsA</i> _ <i>tktA</i>	-
Teste <i>ppsA</i> (pseudo-operon)	<i>ppsA XhoI_Rev e pBRrevBam</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>ppsA</i> _ <i>tktA</i>	2600
Teste <i>ppsA</i> (pseudo-operon)	<i>ppsA XhoI_Rev e pBRrevBam</i>	Colônia negativa pRSM4_ <i>ppsA</i> _ <i>tktA</i>	-
Controle positivo do gene <i>ppsA</i>	<i>ppsA XhoI_Rev, pBRrevBam</i>	pRSM4_ <i>ppsA</i>	2600
Controle positivo do gene <i>tktA</i>	<i>pBRrevBam, tktA XhoI_Rev</i>	pRSM4_ <i>tktA</i>	2214

**Tabela 6:** Fragmentos esperados no ensaio de restrição dos clones pRSM4\_ *ppsA*\_ *tktA* (pseudo-operon). Fonte: Própria autoria

O resultado do *screening* por PCR de colônia para a construção pseudo-operon encontra-se a seguir, na Figura 15.



**Figura 15** - Gel resultante da PCR de colônia no *screening* dos clones pRSM4\_ *tktA\_ppsA*. A primeira raia recebeu o marcador de peso molecular (L). Representados como 1P, 2P, 3P, 4P 5P e 6P, estão as reações teste *ppsA*, enquanto 1T, 2T, 3T, 4T, 5T e 6T são referentes às reações teste *tktA*. A raia “+T recebeu o controle positivo do gene *tktA* e a “+P”, o controle positivo do gene *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

Assim como no *screening* para a construção monocistrônica, os clones foram divididos e utilizados nas reações para o *screening* da construção em pseudo-operon. Bandas para ambos os genes nas alturas esperadas eram necessárias para validar uma das colônias como positiva. Rastros e bandas inespecíficas foram observados, porém não influenciaram na análise. Pode ser observado que todas as reações de 1P à 6P apresentaram banda de forte intensidade na altura do controle positivo para o gene *ppsA*. Por outro lado, somente as reações de 1T à 5T apresentaram uma banda na altura esperada do controle para o gene *tktA*. A reação 6T só apresentou rastros de pequenos fragmentos, fazendo com que a colônia 6 fosse considerada negativa. Portanto, com exceção desta última, todas as outras foram consideradas positivas. Os clones 1, 2 e 3 foram escolhidos para análise de restrição.

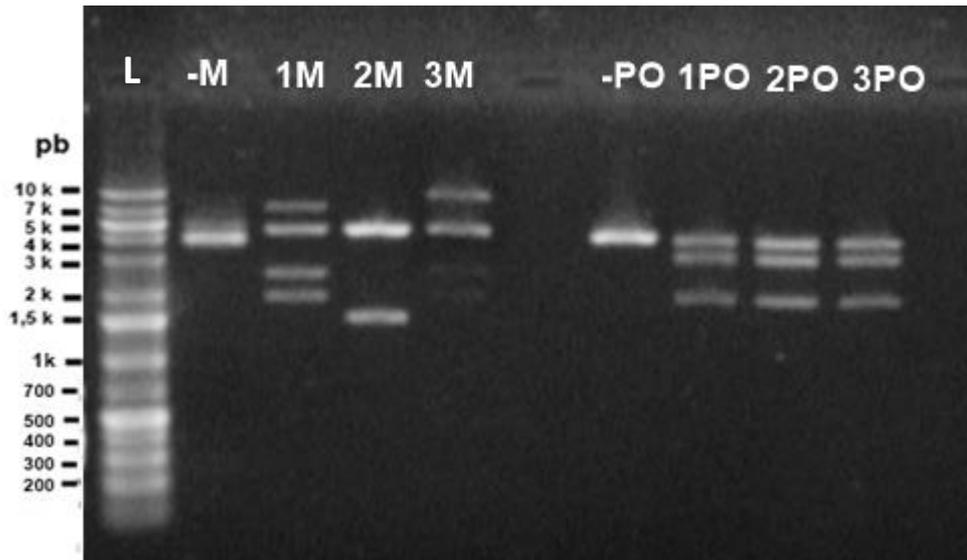
Foi feita a extração plasmidial das colônias selecionadas para análise de ambas as construções. A seguir encontra-se a Tabela 7 com os fragmentos esperados para cada reação de digestão, com base no molde e enzimas utilizadas.

Reação Digestão	Enzimas	Molde	Fragmentos (pb)
Teste monocistrônico	<i>KpnI</i> + <i>NcoI</i> e <i>NheI</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>tktA_ppsA</i>	4351, 2373 e 1842
Teste pseudo-operon	<i>ApaI</i> + <i>NcoI</i> + <i>EcoRI</i>	Colônia positiva pRSM4_ <i>ppsA_tktA</i>	3638, 2920 e 1830
Controle - monocistrônico	<i>KpnI</i> + <b><i>NcoI</i></b> e <i>NheI</i>	pRSM4	3634 e 240
Controle - pseudo-operon	<i>ApaI</i> + <b><i>NcoI</i></b> + <b><i>EcoRI</i></b>	pRSM4	3874

**Tabela 7:** Fragmentos esperados no ensaio de restrição dos clones pRSM4\_ *ppsA\_tktA* e pRSM4\_ *tktA\_ppsA*. Fonte: Própria autoria.

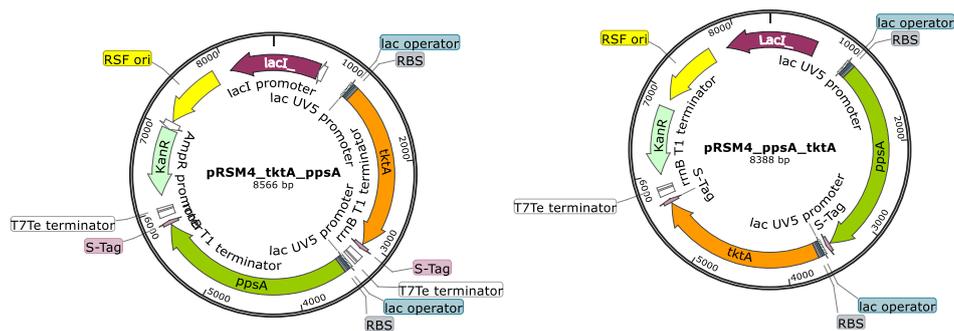
As enzimas foram escolhidas por meio de simulações no programa SnapGene, buscando sítios de restrição de única clivagem. As enzimas destacadas em negrito no quadro possuem sítios de reconhecimento nas sequências dos genes clonados, mas não são capazes de clivar o plasmídeo pRSM4. A escolha das enzimas levou em consideração o tamanho dos possíveis fragmentos formados. Estes deveriam possuir uma diferença significativa a fim de serem separados durante a eletroforese, permitindo resolução visual quando o gel fosse levado a luz UV. Dessa forma, os plasmídeos positivos deveriam ter uma de suas bandas de tamanho próximo ao controle além de outros fragmentos esperados.

A seguir, na Figura 16, encontra-se o resultado do gel de separação dos fragmentos de todas as reações. Na raia do controle monocistrônico, pode-se observar uma banda intensa referente ao fragmento de 3634 pb. A reação 1M apresentou 4 bandas, sendo a primeira referente ao plasmídeo linear, indicando uma digestão ainda não finalizada. O tamanho do plasmídeo pRSM4\_ *tktA\_ppsA* circular é de 8566 pb, indicando que esta banda citada estava de acordo com o esperado. As outras três bandas apresentaram os tamanhos previstos na simulação do ensaio de restrição no software SnapGene. Dessa forma, o clone 1 foi considerado positivo para o plasmídeo pRSM4\_ *tktA\_ppsA*.



**Figura 16:** Gel resultante do ensaio de restrição dos clones pRSM4\_tktA\_ppsA e pRSM4\_ppsA\_tktA. Marcados como 1M, 2M e 3M encontravam-se os plasmídeos digeridos dos clones 1, 2 e 3 do teste monocistrônico, enquanto 1PO, 2PO e 3PO são referentes aos clones 1, 2 e 3 do teste pseudo-operon. Na primeira raia pode ser observado o marcador de peso molecular. Simbolizados por “-M” e “- OP” estão os controles negativos para o teste monocistrônico e pseudo operon, respectivamente. Fonte: Própria autoria.

O controle do teste pseudo-operon apresentou uma banda intensa próxima à altura de 4 kbp, conforme esperado. Nas reações 1OP, 2OP e 3OP puderam ser vistas todas as bandas esperadas, entre elas o fragmento de tamanho próximo ao do controle. Todos os clones referentes à estas digestões foram considerados positivos para o plasmídeo pRSM4\_ppsA\_tktA. As representações dos plasmídeos construídos nesta etapa encontram-se na Figura 17 a seguir.

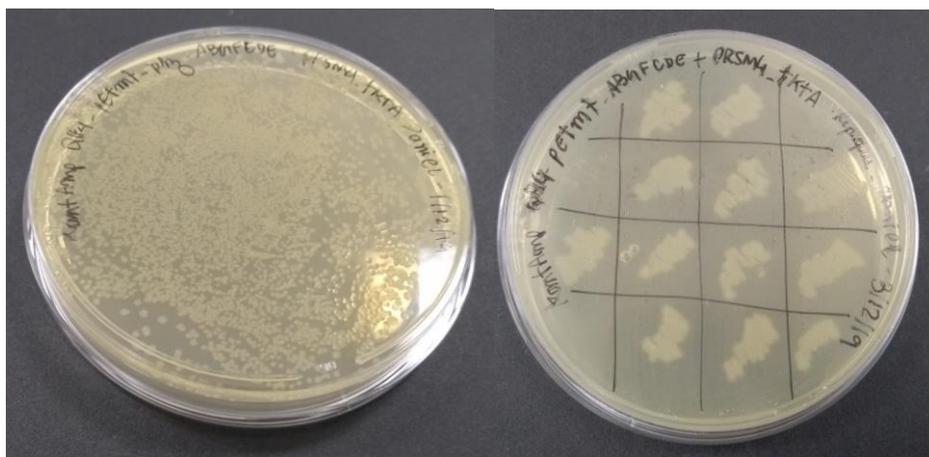


**Figura 17:** Mapa representativo dos plasmídeos construídos para super-expressão de transcetolase A (TktA) e fosfoenolpiruvato sintase A (PpsA) em *E. coli* na configuração monocistrônica (A) e pseudo-operon (B). Fonte: Própria autoria. Elaborado com o programa SnapGene.

Após a confirmação por meio dos *screenings*, as colônias 1 (com construção monocistrônica) e as colônias 1 e 2 (genes em pseudo-operon) foram estocadas em criotubos a -80°C com glicerol 20%. Os plasmídeos das colônias 1 de ambas as construções foram utilizados para transformar a linhagem de *E. coli* QH4-PCA.

#### 4.3. TRANSFORMAÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE PCA COM OS PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS

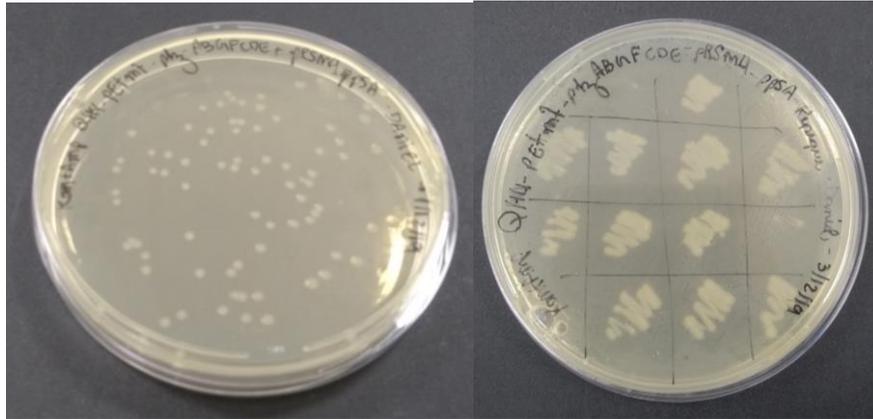
A primeira etapa de transformação da linhagem QH4-PCA com os plasmídeos de genes individualmente clonados resultou em quatro placas em meio LB-ágar com canamicina e ampicilina. Na Figura 18, a seguir, podem ser vistas duas placas referentes à transformação com pRSM4\_ *tktA*.



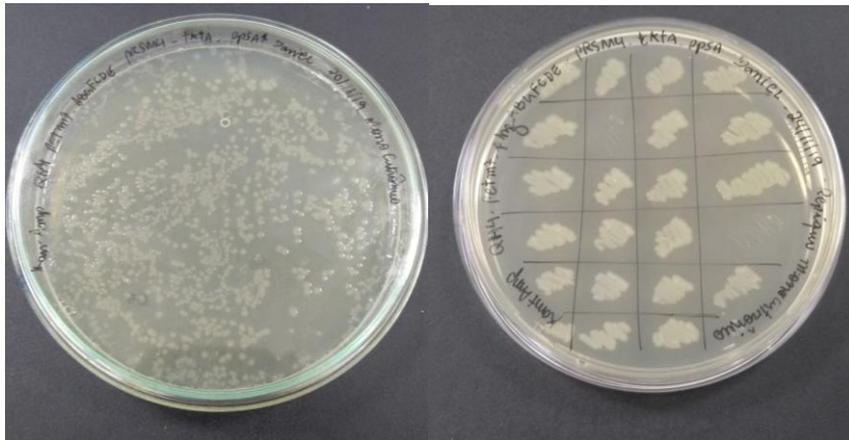
**Figura 18:** *E. coli* QH4-PCA transformada com o plasmídeo pRSM4\_ *tktA*. Fonte: Própria autoria

A placa da esquerda é referente ao plaqueamento da transformação. Devido ao grande número de colônias obtidas, foi feito o repique de algumas colônias isoladas (placa da direita). O método de repique com marcadores de seleção (canamicina e ampicilina) foi o único *screening* realizado após a transformação. Três das colônias identificadas como positivas por seu crescimento foram estocadas a -80°C em glicerol 20% além de serem posteriormente utilizadas para o cultivo.

Todas as observações acima são análogas às obtidas para as transformações com o plasmídeo pRSM4\_ *ppsA*, pRSM4\_ *ppsA\_tktA* e pRSM4\_ *tktA\_ppsA*. A seguir, na Figura 19, Figura 20 e Figura 21, encontram-se os registros fotográficos de cada uma das placas das transformações em conjunto com sua placa repicada.



**Figura 19** - *E. coli* QH4-PCA transformada com a construção pRSM4\_ppsA. Fonte: Própria autoria.



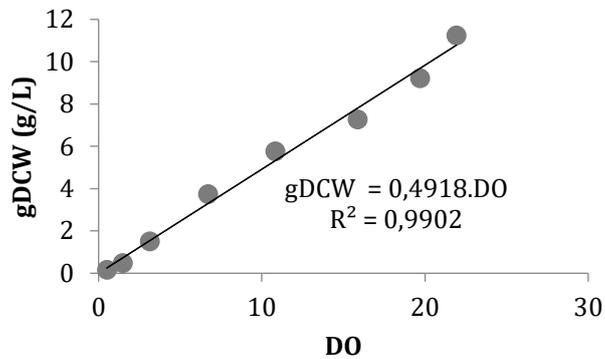
**Figura 20** - *E. coli* QH4-PCA transformada com a construção pRSM4\_tktA\_ppsA. Fonte: Própria autoria.



**Figura 21** - *E. coli* QH4-PCA transformada com a construção pRSM4\_tktA\_ppsA. Fonte: Própria autoria.

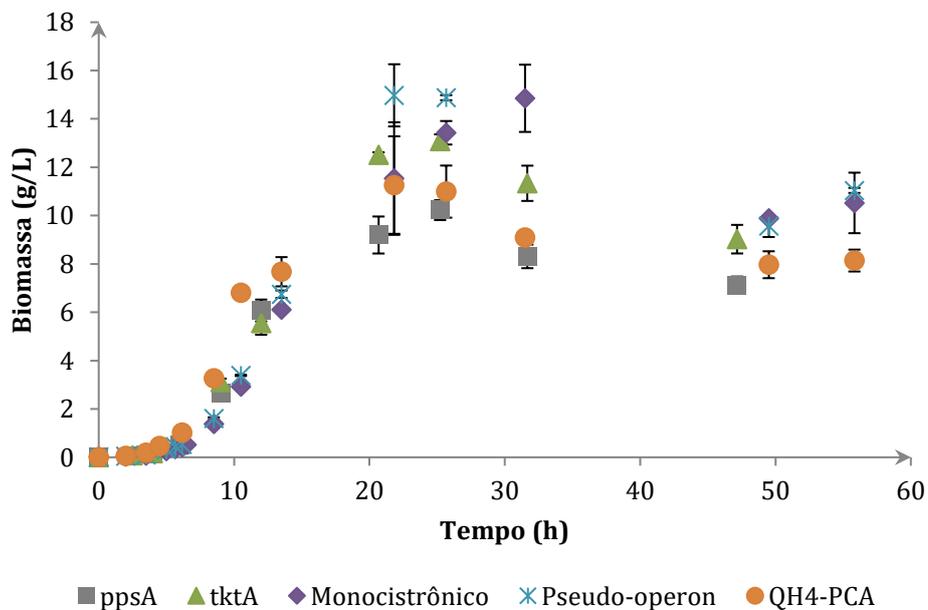
#### 4.4.EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES *tktA* E *ppsA* NO ENSAIO DE PRODUÇÃO DE PCA

O experimento para a determinação da concentração celular a partir da absorbância resultou no gráfico apresentado na figura 22.



**Figura 22:** Correlação entre valores de absorbância e concentração celular. Fonte: Própria autoria.

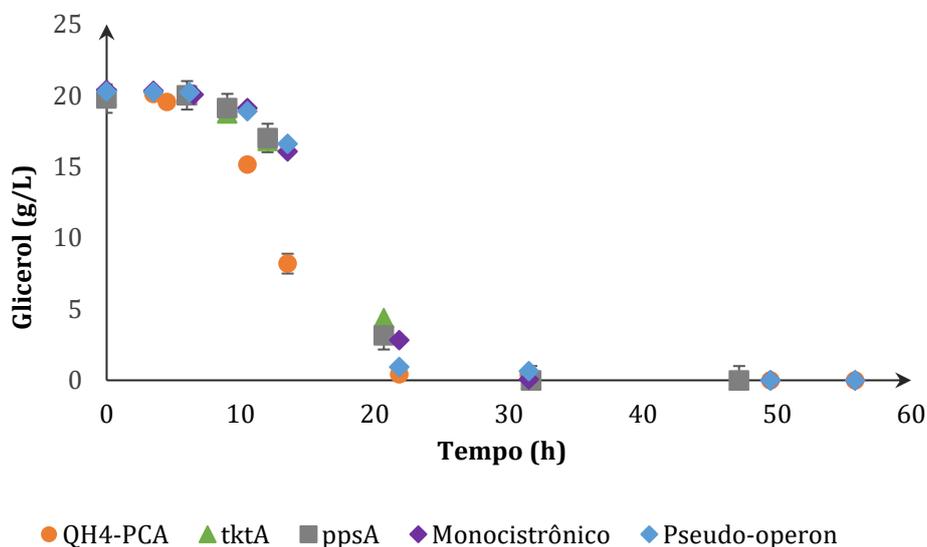
A partir dos dados sobre a quantificação do consumo de glicerol e produção de biomassa e PCA, foi possível obter o perfil de concentração desses componentes para cada linhagem, observados nas figuras 23, 24 e 25. Os dados das duas etapas de cultivo foram unidos para facilitar a comparação entre as linhagens.



**Figura 23:** Comparação geral entre o perfil de concentração de biomassa entre a linhagem parental e as linhagens construídas para superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

A partir da Figura 23, pode-se observar que o padrão de crescimento entre as linhagens foi variado em diferentes fases. A linhagem QH4-PCA parental foi a primeira a atingir a DO de 1, iniciando a fase exponencial antes dos outros grupos. Em torno de 20 horas de cultivo essa apresentou uma queda em seu crescimento. Por outro lado, as linhagens QH4-PCA com pRSM4\_ppsA e QH4-PCA com pRSM4\_tktA, mesmo com seu perfil de concentração similar e iniciando a fase exponencial posteriormente à parental, mantiveram seu crescimento por um período mais prolongado além de não apresentarem queda tão acentuada ao final do experimento. As linhagens referentes à construção monocistrônica e pseudo-operon mantiveram um padrão de crescimento muito semelhante entre si até as primeiras 15 horas de cultivo. Porém em torno de 25 horas a linhagem pseudo-operon ultrapassou o crescimento da linhagem monocistrônica. Em seguida, ambas tiveram uma queda acentuada e concentração final do cultivo semelhante, no entanto superior a linhagem QH4-PCA. Já a linhagem com super-expressão do gene *ppsA* apresentou, de forma geral, menor formação de biomassa ao longo do cultivo que as demais linhagens avaliadas.

Acerca do consumo de substrato, a Figura 24 apresenta os perfis de concentração de glicerol ao longo dos cultivos para todas as linhagens avaliadas.

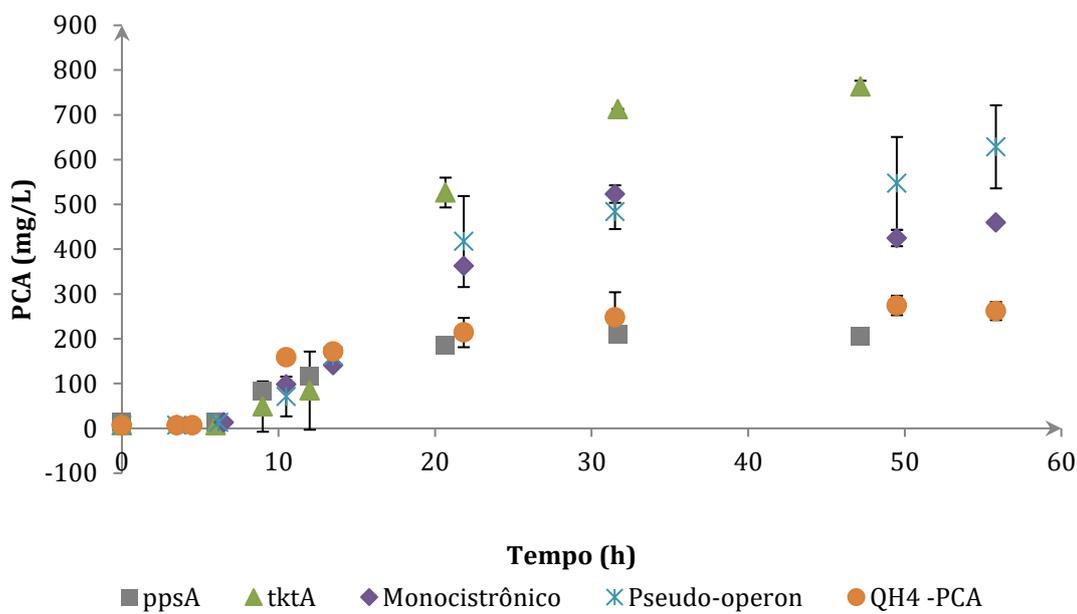


**Figura 24:** Comparação geral entre o perfil de consumo de glicerol entre a linhagem parental e as linhagens construídas para superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

De forma geral, o perfil de consumo de glicerol foi muito semelhante para todas as linhagens. Foi observado que a linhagem parental apresentou um decaimento mais

acentuado de seu substrato, atingindo 50% de consumo próximo às 10 horas de cultivo. Próximo a 20 horas, todas as linhagens estavam próximas do consumo de 100% de glicerol. Após as 30 horas, foi notada a depleção completa do substrato em questão.

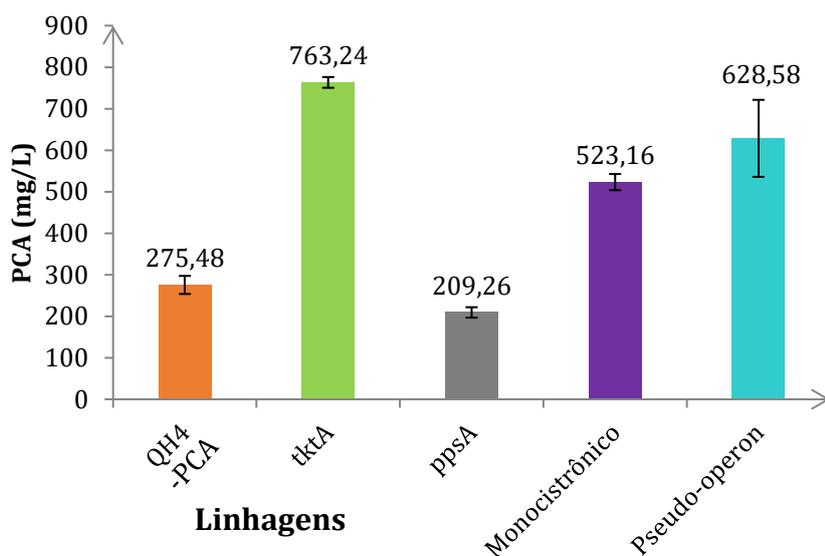
A produção de PCA pelas diferentes linhagens é apresentada na Figura 25, a seguir.



**Figura 25:** Comparação geral entre o perfil de produção de PCA entre a linhagem parental e as linhagens construídas para superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

Com o perfil de concentração de PCA obtido para cada linhagem testada, foi possível perceber uma considerável variação em fases avançadas do cultivo. Próximo a 20 horas, as linhagens *tktA*, monocistrônica e pseudo-operon passaram a atingir valores muito superiores à linhagem parental, o que se manteve até o final do cultivo. A linhagem pseudo-operon, superou a produção de PCA em relação à linhagem monocistrônica ao final do cultivo. Entre as três linhagens citadas, *tktA* se manteve com as concentrações evidentemente mais elevadas em relação a todas as outras linhagens, em especial durante o período entre 20 e 48 horas de cultivo. Por outro lado, *ppsA* apresentou a menor produção do composto em torno de 20 horas (em relação a todas as linhagens) e se manteve como a menos elevada até o encerramento do ensaio.

A título de comparações entre valores máximos de produção, também foram plotados os pontos máximos de PCA produzidos por cada uma das linhagens durante os cultivos, os quais podem ser observados na Figura 26.



**Figura 26** - Concentração máxima de PCA atingida por cada linhagem. Fonte: Própria autoria.

A partir dos dados dos cultivos em duplicata das cinco linhagens comparadas, foram determinadas a concentração máxima de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), o fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ), para cada uma das linhagens, conforme apresentado na tabela 8.

Linhagem	Biomassa (g/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s}$ (mg/g)
QH4-PCA	14,9	0,67	12,9
tktA	13,1	0,62	35,1
ppsA	10,2	0,56	7,9
Monocistrônico	14,8	0,55	24,0
Pseudo-operon	14,9	0,52	24,2

**Tabela 8:** Dados de crescimento celular e parâmetros cinéticos do processo de produção de PCA pelas linhagens recombinantes de *E. coli*. Fonte: Própria autoria.

Houve baixa variação nos valores de biomassa e PCA a partir de 32 horas de cultivo, o que levou a uma análise mais detalhada dos parâmetros de produtividade neste intervalo. Assim, foram escolhidos os pontos próximos a 32 horas de batelada para cálculo da produtividade volumétrica e conversão de glicerol. Estes foram comparados com os pontos de produtividade volumétrica e conversão de glicerol próximos ao tempo de 50 horas. Além disso, para elucidar melhor as características de produção no instante em que as linhagens atingiram sua concentração máxima de PCA, foram calculados para cada uma delas os valores de produtividade específica máxima. Os dados encontram-se presentes na tabela 9 e 10.

Linhagem	$P_p$ (mg/L.h)	$P_p$ (mg/L.h)	$P_{p\ max}$ (mg/L.h)	$P_{e\ max}$ (mg/g)
	t=32 h	t=50 h		
QH4-PCA	7,7	5,4	14,5 (10,0 h)	34,4 (49,5 h)
<i>tktA</i>	22,3	16,0	25,2 (20,7 h)	84,6 (47,2 h)
<i>ppsA</i>	6,2	4,1	8,7 (12,0 h)	31,3 (9,0 h)
Monocistrônico	16,4	8,4	16,4 (32 h)	43,6 (55,8 h)
Pseudo-operon	15,1	10,9	18,8 (21,8 h)	56,9 (55,8 h)

**Tabela 9:** Produtividades volumétricas e específicas. Produtividades volumétricas obtidas nos instantes t=32 h, t=50 h para cada linhagem; produtividades volumétricas máximas e produtividades específicas máximas obtidas para cada linhagem nos instantes *t* indicado entre parênteses. Fonte: Própria autoria.

Linhagem	Conversão de Glicerol	Conversão de Glicerol
	t=32 h	t=50 h
QH4-PCA	98,0%	100,0%
<i>tktA</i>	100,0%	100,0%
<i>ppsA</i>	100,0%	100,0%
Monocistrônico	99,7%	100,0%
Pseudo-operon	96,8%	100,0%

**Tabela 10:** Conversão de glicerol em porcentagem. Conversões de glicerol obtidas nos instantes t=32 h, t=50 h para cada linhagem. Fonte: Própria autoria.

## 5. DISCUSSÃO

Entre potenciais antitumorais, pesticidas, antimicrobianos e antifúngicos, as fenazinas embasam sua importância e demonstram a necessidade de se elucidar os melhores caminhos para uma melhor produção em maiores escalas. Até o momento, os resultados mais significativos de concentração de PCA foram obtidos por organismo naturalmente produtor e patogênico (*Pseudomonas*). Dessa forma o presente trabalho se mostrou como uma alternativa promissora não só para sua biossíntese em um organismo mais seguro (*E. coli*), mas também uma possível plataforma de novos incrementos e aumento na produção de outras fenazinas. Este estudo também demonstrou como plasmídeos da série *ePathBrick* serviram como eficientes ferramentas de expressão para os alvos escolhidos. Estes ainda permitiram análises combinadas de genes e seu consequente impacto na produção da molécula alvo.

Não só nas etapas de clonagem, mas também durante a combinação de sequências gênicas nos plasmídeos, foram obtidos resultados muito satisfatórios. Plasmídeos com genes individualmente clonados pRSM4\_ *tktA* e pRSM4\_ *ppsA* passaram por passos de *screenings* evidenciando uma alta quantidade de clones positivos. Isso possibilitou dar

continuidade aos passos de combinação genética sem grandes obstáculos. Novamente, foi observado um andamento favorável e eficiente na obtenção de clones com plasmídeos pRSM\_ *tktA\_ppsA* e pRSM4\_ *ppsA\_tktA*. Tais resultados foram relacionados a uma série de fatores. Pode-se destacar as análises de qualidade de amostras de plasmídeos, DNA genômico e fragmentos de DNA extraídos, que possibilitaram a seleção de amostras mais íntegras; qualidade dos equipamentos e reagentes utilizados, em especial as enzimas de restrição e polimerases, visto altos rendimentos de produtos de reação; otimização de temperaturas de anelamento dos primers; protocolos de clonagem e transformação bem estabelecidos pelo grupo de pesquisa e por fim a qualidade e velocidade nas leituras de sequenciamento contratadas. Após etapas bem sucedidas na construção de linhagens recombinantes capazes de superexpressar todos os alvos de interesse, foram levantadas observações acerca da produção de PCA durante os cultivos.

A diferença nos parâmetros cinéticos e pontos máximos de produção de PCA (Parental 275 mg/L, *tktA* 763 mg/L, *ppsA* 209 mg/L, Monocistrônico 523 mg/L e pseudo-operon 628 mg/L) levaram a elaboração de algumas hipóteses para elucidar o desvio do resultado inicial esperado, ou seja, contribuição aditiva de ambos os genes no aumento da concentração do produto alvo. Com base nessas informações, foi também analisado o tempo de cultivo mais adequado para comparações de produtividade.

De forma geral, com exceção da linhagem com *ppsA* superexpresso individualmente, todas as outras apresentaram produção superior à parental (QH4-PCA), como pode ser observado na figura 24. A superexpressão de PpsA prejudicou a produtividade e crescimento celular, visto que no grupo com a enzima codificada individualmente, foi observada a redução nos parâmetros calculados em relação à parental (observado na Tabela 8 e na Figura 24). Devido a isso, as maiores concentrações máximas de PCA apresentadas pelas linhagens monocistrônica e pseudo-operon (em relação à parental) foram justificadas pela presença de TktA. Além disso, na literatura, tal gene (*ppsA*) somente apresentou resultados atrativos na produção de compostos aromáticos quando a glicose foi empregada como fonte de carbono. O mecanismo de captação de glicose envolve sua fosforilação a partir do consumo de PEP, e a reação da PpsA tende a repor o PEP consumido. Quando o glicerol é usado como fonte de carbono, não há consumo de PEP na sua captação, e a superexpressão da PpsA parece não ter se feito tão necessária para a reposição do intermediário, e somente levou a uma possível sobrecarga metabólica devido a sua síntese proteica.

Vale ressaltar que o glicerol se destaca como uma fonte de carbono renovável, sustentável e subproduto de processos industriais, podendo assim representar uma opção mais rentável em comparação a outros substratos, como é o caso da glicose (GOTTLIEB et al., 2014). Nesse contexto, encontram-se reportados em literatura algumas estratégias voltadas para seu melhor aproveitamento, empregando a superexpressão de genes presentes em sua degradação. Um exemplo proveniente de estudos de Gottlieb et al. (2014), é relativo ao aumento da produção de L-fenilalanina em *E. coli*, combinando cópias extras de alguns genes envolvidos no metabolismo do glicerol, além de um dos alvos explorados nesse trabalho, o gene *tktA*. Os resultados sugeriram que o balanço entre as vias da pentose fosfato e neoglicogênese, mais ativas decorrente da superexpressão dos alvos supracitados, foi capaz de aumentar o suprimento dos precursores chave da via do chiquimato (eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato). Tais achados embasam a importância do desenvolvimento de estratégias para consumo do glicerol como substrato, e apontam novamente o gene *tktA* como alvo essencial neste processo.

Frente a aparente baixa variação nos perfis de concentração celular e concentração de PCA entre as 32 horas de batelada e 50 horas (final do cultivo), os valores de  $P_p$  nestes instantes ajudaram a elucidar qual o melhor momento para encerramento dos ensaios. Nesse sentido, foi encontrado que todas as produtividades volumétricas apresentaram um decaimento significativo neste intervalo, evidenciando que o prolongamento até 50 horas pode ser desvantajoso em relação a mão de obra demandada e recursos investidos. O cálculo de conversão de glicerol em porcentagem ao longo destes dois pontos (presente na tabela 10) embasou tal observação. Em 32 horas de cultivo, todas as linhagens já apresentavam valores superiores a 96% de conversão do substrato (as linhagens *tktA* e *ppsA* já haviam até mesmo esgotado completamente o glicerol, com 100% de consumo). Posteriormente, em 50 horas de cultivo, as linhagens restantes também o depletaram. Dessa forma, faz sentido não se observar aumentos de produtividade após 32 h de cultivo, visto que praticamente já não havia mais substrato disponível para consumo e conversão em PCA após este momento.

Em relação a produtividades, as possíveis conclusões levantadas a partir da análise de ambos os momentos seriam em sua maioria as mesmas, visto que as linhagens seguiram as mesmas relações de  $P_p$  maiores e menores entre si neste intervalo de tempo. Houve apenas uma exceção, com relação a ordem de superioridade de  $P_p$  das linhagens monocistrônica e pseudo-operon, que se inverteu próximo a 50 horas. Para entender a validade desta inversão de valores, as medidas de dispersão das linhagens foram

analisadas neste ponto. Percebeu-se que em especial, a linhagem pseudo-operon apresentou grandes desvios-padrões na produção de PCA, não só no momento de produção máxima, mas também em outros pontos do cultivo. A amplitude deste desvio por sua vez levou a inferência de que os valores reais de produção de PCA pela linhagem em questão não seriam significativamente diferentes da linhagem monocistrônica. Os valores muito próximos de  $P_{p\ max}$  e  $P_{e\ max}$  (16,4 e 43,6 para monocistrônica e 18,8 e 56,9 para pseudo-operon, respectivamente) seguiram a mesma inferência, ou seja, devido aos altos desvios em tais pontos, não foram considerados significativamente diferentes.

Era esperado que a configuração dos genes em pseudo-operon fosse mais vantajosa em relação a configuração monocistrônica. Segundo Xu et al. (2012), a estrutura secundária característica do terminador de um gene antecedente pode gerar um impedimento estérico no promotor do gene *downstream* a ele em uma configuração monocistrônica, o que não seria observado em configuração pseudo-operon. Como *tktA* se encontrava na posição downstream à *ppsA* na linhagem com plasmídeo em configuração pseudo-operon, acredita-se que sua atividade não enfrentaria tais problemas mencionados, além de ter sua transcrição muito favorecida devido aos dois promotores LacUV5 atuarem gerando seus transcritos. Tudo isso justificaria uma possível produção superior em PCA da linhagem com genes superexpressos em configuração pseudo-operon em relação à linhagem com genes monocistrônicos. No entanto, novamente, a análise das medidas de dispersão impediu a inferência de que a linhagem pseudo-operon foi melhor do que a monocistrônica, tendo em vista que os valores de biomassa e PCA, além de próximos, estavam muito dispersos.

Para a linhagem com *TktA* superexpresso individualmente, os valores de biomassa e  $\mu_{max}$  foram próximos aos atingidos pela parental, mostrando que a modificação não prejudicou o crescimento celular. Além disso, com a análise de seus parâmetros de produtividades foram identificadas características muito interessantes para essa linhagem. Aqui, vale ressaltar sua produtividade específica máxima, que atingiu um valor de 84,6 mg/g, evidentemente superior em relação a todas as outras linhagens. Ao relacionar tal achado com as altas concentrações celulares atingidas ao longo do cultivo, percebe-se que *tktA* levou a uma produção de células equivalente à parental, porém capazes de produzir quantidade muito superior da molécula alvo. Por fim, não só o perfil de concentração de produto evidentemente superior às outras linhagens ao longo do cultivo, mas também o valor máximo da molécula alvo produzida deixaram clara a importância da superexpressão do gene *tktA* na formação de PCA.

A superexpressão de *tktA* gerou um impacto impressionante na produção da molécula alvo, com um incremento de 178% na concentração de PCA em relação à parental. Por fim, seus valores de  $Y_{p/s}$  e  $P_{p\ max}$  calculados evidenciaram um grande aproveitamento do substrato direcionado à síntese de PCA, também extremamente superiores em relação a parental, com valor de  $Y_{p/s}$  272% e  $P_{p\ max}$  173% maiores em relação à parental. Tal observação foi justificada frente às reações da enzima TktA, associadas a um melhor aproveitamento de intermediários glicolíticos via formação de eritrose-4-fosfato (E4P), precursor da via do chiquimato. Em outras palavras, o resultado obtido também indica que a disponibilidade do precursor E4P é um fator limitante para a produção da PCA. Ao comparar com valores atingidos por outros trabalhos em literatura, a linhagem construída neste trabalho já foi capaz de superar a produção de *P. putida* (ASKITOSARI T. D. et al., 2019), com 80,0 mg/L e se encontrou muito próxima da produção de *P. aeruginosa* PA1201, com 926,9 mg/L (ZHOU L et al. 2015). Ainda que a produção seja inferior a algumas linhagens reportadas, é importante destacar que somente um alvo foi explorado e sozinho apresentou resultados significativos. Isso, portanto, embasa a importância de novas abordagens para atingir maiores incrementos utilizando a plataforma construída neste trabalho. Além disso deve-se levar em consideração os modos de operação e volume dos ensaios. O maior resultado obtido para produção de PCA foi de 9.882,0 mg/L (JIN K. et al, 2015), porém o autor lançou mão de uma série de modificações em linhagem patogênica, além de ter conduzido o cultivo em biorreator dotado de controle de pH e concentração de oxigênio dissolvido (que são impraticáveis em escala de shaker). Ademais, operou o reator no sistema de batelada alimentada, que favorece grandemente a obtenção de maiores concentrações finais de produto. Assim, do ponto de vista de processo, um próximo passo importante para incrementos na produção de PCA seria o aumento na escala de cultivo para reatores de bancada operados em batelada alimentada, para avaliar o desempenho e parâmetros cinéticos da melhor linhagem produtora em condições mais favoráveis de cultivo.

## 6. CONCLUSÃO

Em linhas gerais, a partir dos resultados e discussões levantadas, foi possível delimitar uma série de conclusões. De diferentes maneiras, os alvos estudados impactaram significativamente a produção de PCA. Essa variação decorreu do tipo de alvo sendo superexpresso, ora apresentando melhores resultados, ora desfavorecendo a

produção da molécula alvo. Além disso, é importante destacar a versatilidade oferecida pelo uso dos vetores *ePathBrick*. Eles possibilitaram a obtenção de alto número de clones recombinantes positivos em diferentes etapas dos experimentos de construção plasmidial. Tal facilidade fez com que não fosse despendido muito tempo e recursos para repetição de experimentos, facilitando o processo como um todo.

Especificamente em relação a superexpressão do gene *ppsA*, este prejudicou a produção de PCA além do crescimento celular, frente a uma possível sobrecarga metabólica e mal aproveitamento do substrato utilizado no cultivo.

Acerca das linhagens super-expressando os dois genes combinados, ainda que fosse esperado que a configuração em pseudo-operon se apresentasse mais vantajosa em relação a monocistrônica, não foram observados resultados significativos para distinguir a real diferença entre as duas construções na produção de PCA.

Por fim, a escolha do alvo *tktA* se mostrou extremamente satisfatória. Sua superexpressão individual promoveu um impressionante aumento de 178% na produção de PCA (763 mg/L), em comparação com a linhagem parental de *E. coli* QH4 (275,5 mg/L). Além disso, houve grande aumento nos parâmetros significativos do processo como  $Y_{p/s}$  e  $P_{p\ max}$ , 272% e 173% respectivamente maiores em relação aos valores encontrados para a linhagem parental. Com os valores de concentração de biomassa e  $\mu_{\max}$  de 0,62 h<sup>-1</sup> encontrados para a *tktA* muito próximos aos encontrados para a linhagem parental, conclui-se que a modificação não afetou o crescimento celular. Ademais, a alta produtividade específica máxima analisada em conjunto com as concentrações celulares atingidas mostrou que as células formadas em concentração equivalente a parental são capazes de produzir quantidade muito maior de PCA.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASKITOSARI, Theresia D.; BOTO, Santiago T.; BLANK, Lars M.; ROSENBAUM, Miriam A. Boosting Heterologous Phenazine Production in *Pseudomonas putida* KT2440 Through the Exploration of the Natural Sequence Space. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, 28 ago. 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.01990.

AVERESCH, Nils J. H.; KRÖMER, Jens O. Metabolic Engineering of the Shikimate Pathway for Production of Aromatics and Derived Compounds—Present and Future Strain Construction Strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 6, 26 mar. 2018. DOI 10.3389/fbioe.2018.00032.

CHANDRAN, S.S.; YI, J.; DRATHS, K.M.; VON DAENIKEN, R.; WEBER, W.; FROST, J.W. Phosphoenolpyruvate Availability and the Biosynthesis of Shikimic Acid. *Biotechnology Progress*, vol. 19, nº 3, p. 808–814, 6 jun. 2003. DOI 10.1021/bp025769p.

CHELUVAPPA, Rajkumar. Standardized chemical synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *MethodsX*, vol. 1, p. 67–73, 2014. DOI 10.1016/j.mex.2014.07.001.

CHEN, Xianzhong; LI, Mingming; ZHOU, Li; SHEN, Wei; ALGASAN, Govender; FAN, You; WANG, Zhengxiang. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving shikimate synthesis from glucose. *Bioresource Technology*, vol. 166, p. 64–71, ago. 2014. DOI 10.1016/j.biortech.2014.05.035.

CHINCHOLKAR, Sudhir; THOMASHOW, Linda (Orgs.). *Microbial Phenazines*. [S. l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2013. DOI 10.1007/978-3-642-40573-0.

CTNBio, Diário Oficial da União (2020) - RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 24, DE 7 DE JANEIRO DE 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-normativa-n-24-de-7-de-janeiro-de-2020-237272300>. Acesso em 23 de nov. 2021.

DA SILVA, Adilson José; CUNHA, Josivan de Souza; HREHA, Teri; MICOCCI, Kelli Cristina; SELISTRE-DE-ARAUJO, Heloisa Sobreiro; BARQUERA, Blanca; KOFFAS, Mattheos A.G. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production. *Metabolic Engineering*, vol. 64, p. 15–25, mar. 2021. DOI 10.1016/j.ymben.2021.01.002. *Microbiologica Sinica*. 2015 Apr;55(4):401-411. PMID: 26211314.

DU, Xilin; LI, Yaqian; ZHOU, Wanping; ZHOU, Quan; LIU, Haiming; XU, Yuquan. Phenazine-1-carboxylic acid production in a chromosomally non-scar triple-deleted mutant *Pseudomonas aeruginosa* using statistical experimental designs to optimize yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, n° 17, p. 7767–7778, 1 maio 2013. DOI 10.1007/s00253-013-4921-y.

FORDJOUR, Eric; ADIPAH, Frederick Komla; ZHOU, Shenghu; DU, Guocheng; ZHOU, Jingwen. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21 (DE3) for de novo production of l-DOPA from d-glucose. *Microbial Cell Factories*, vol. 18, n° 1, 25 abr. 2019. DOI 10.1186/s12934-019-1122-0.

GUO, Shuqi; WANG, Yining; DAI, Bona; WANG, Wei; HU, Hongbo; HUANG, Xianqing; ZHANG, Xuehong. PhzA, the shunt switch of phenazine-1,6-dicarboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, n° 19, p. 7165–7175, 5 set. 2017. DOI 10.1007/s00253-017-8474-3.

HUANG, Qin; LIN, Yuheng; YAN, Yajun. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 110, n° 12, p. 3188–3196, 11 jul. 2013. DOI 10.1002/bit.24988.

HUC CETOGULLARI, Damla; LUO, Zi Wei; LEE, Sang Yup. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microbial Cell Factories*, vol. 18, n° 1, 26 fev. 2019. DOI 10.1186/s12934-019-1090-4.

IGEM. Igem Parts Registry. Assembly: Standard assembly. Disponível em: [https://parts.igem.org/Assembly:Standard\\_assembly](https://parts.igem.org/Assembly:Standard_assembly). Acesso em: 11 jun. 2021.

IIDA, A; TESHIBA, S; MIZOBUCHI, K. Identification and characterization of the tktB gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, vol. 175, n° 17, p. 5375–5383, set. 1993. DOI 10.1128/jb.175.17.5375-5383.1993.

IN, Kaiming; ZHOU, Lian; JIANG, Haixia; SUN, Shuang; FANG, Yunling; LIU, Jianhua; ZHANG, Xuehong; HE, Ya-Wen. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metabolic Engineering*, vol. 32, p. 30–38, nov. 2015. DOI 10.1016/j.ymben.2015.09.003.

JIN, Kaiming; ZHOU, Lian; JIANG, Haixia; SUN, Shuang; FANG, Yunling; LIU, Jianhua; ZHANG, Xuehong; HE, Ya-Wen. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metabolic Engineering*, vol. 32, p. 30–38, nov. 2015. DOI 10.1016/j.ymben.2015.09.003.

LIU, Kaiquan; HU, Hongbo; WANG, Wei; ZHANG, Xuehong. Genetic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for the enhanced production of 2-Hydroxyphenazine. *Microbial Cell Factories*, vol. 15, n° 1, 28 jul. 2016. DOI 10.1186/s12934-016-0529-0.

MAVRODI, Dmitri V.; BONSTALL, Robert F.; DELANEY, Shannon M.; SOULE, Marilyn J.; PHILLIPS, Greg; THOMASHOW, Linda S. Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, vol. 183, n° 21, p. 6454–6465, nov. 2001. DOI 10.1128/jb.183.21.6454-6465.2001.

MAVRODI, Dmitri V.; KSENZENKO, Vladimir N.; BONSTALL, Robert F.; COOK, R. James; BORONIN, Alexander M.; THOMASHOW, Linda S. A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Journal of Bacteriology*, vol. 180, n° 9, p. 2541–2548, maio 1998.

Mentel, M., Ahuja, E.G., Mavrodi, D.V., Breinbauer, R., Thomashow, L.S., Blankenfeldt, W., 2009. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem Eur. J. Chem. Biol.* 10, 2295–2304. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900323>

NODA, Shuhei; SHIRAI, Tomokazu; OYAMA, Sachiko; KONDO, Akihiko. Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives. *Metabolic Engineering*, vol. 33, p. 119–129, jan. 2016. DOI 10.1016/j.ymben.2015.11.007.

OCTAVE, Stéphane; THOMAS, Daniel. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*. [S. l.]: Elsevier BV, jun. 2009. DOI 10.1016/j.biochi.2009.03.015.

PENG, Huasong; ZHANG, Pingyuan; BILAL, Muhammad; WANG, Wei; HU, Hongbo; ZHANG, Xuehong. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microbial Cell Factories*, vol. 17, n° 1, 25 jul. 2018. DOI 10.1186/s12934-018-0962-3.

PENG, Huasong; TAN, Jian; BILAL, Muhammad; WANG, Wei; HU, Hongbo; ZHANG, Xuehong. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* strains using statistical experimental designs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 34, n° 9, 9 ago. 2018. DOI 10.1007/s11274-018-2501-0.

PIERSON, Leland S., III; PIERSON, Elizabeth A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 86, n° 6, p. 1659–1670, 30 mar. 2010.

SHEN, Tong; LIU, Qing; XIE, Xixian; XU, Qingyang; CHEN, Ning. Improved Production of Tryptophan in Genetically Engineered *Escherichia coli* with TktA and PpsA Overexpression. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, p. 1–8, 2012. DOI 10.1155/2012/605219.

SnapGene software (from Insightful Science; available at [snapgene.com](http://snapgene.com))

XU, Peng; VANSIRI, Amerin; BHAN, Namita; KOFFAS, Mattheos A. G. ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, vol. 1, n° 7, p. 256–266, 4 maio 2012. DOI 10.1021/sb300016b.

YAO, Ruilian; PAN, Keli; PENG, Huasong; FENG, Lei; HU, Hongbo; ZHANG, Xuehong. Engineering and systems-level analysis of *Pseudomonas chlororaphis* for production of phenazine-1-carboxamide using glycerol as the cost-effective carbon source. *Biotechnology for Biofuels*, vol. 11, n° 1, 4 maio 2018. DOI 10.1186/s13068-018-1123-y.

YUE, Sheng-Jie; HUANG, Peng; LI, Song; JAN, Malik; HU, Hong-Bo; WANG, Wei; ZHANG, Xue-Hong. Enhanced Production of 2-Hydroxyphenazine from Glycerol by a Two-Stage Fermentation Strategy in *Pseudomonas chlororaphis* GP72AN. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 68, n° 2, p. 561–566, 16 dez. 2019. DOI 10.1021/acs.jafc.9b05033.

ZHOU, Quan; SU, Jinjiang; JIANG, Haixiang; HUANG, Xianqing; XU, Yuquan. Optimization of phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA/qscR*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18GQ harboring pME6032Phz using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 86, n° 6, p. 1761–1773, 13 fev. 2010. DOI 10.1007/s00253-010-2464-z.

ZHOU L, JIANG H, JIN K, SUN S, ZHANG W, ZHANG X, HE YW. Isolation, identification and characterization of rice rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201 producing high level of biopesticide "Shenqinmycin" and phenazine-1-carboxamide. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2015 Apr 4;55(4):401-11. Chinese. PMID: 26211314.