

FELIPE MORILLO SANZ DIAS

**Construção de linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir
compostos aromáticos por meio de vias metabólicas sintéticas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2018

FELIPE MORILLO SANZ DIAS

**Construção de linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir
compostos aromáticos por meio de vias metabólicas sintéticas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Jose Gregorio Cabrera Gomez

Versão original.

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Dias, Felipe Morillo Sanz

Construção de linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir compostos aromáticos por meio de vias metabólicas sintéticas / Felipe Morillo Sanz Dias; orientador Luiziana Ferreira da Silva; coorientador José Gregório Cabrera Gomez. -- São Paulo, 2018.

62 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ácido gálico. 2. Biorrefinarias. 3. *Pseudomonas putida*. 4. Engenharia Metabólica. 5. Biologia Sintética. I. da Silva, Luiziana Ferreira, orientador. II. Gomez, José Gregório Cabrera, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Felipe Morillo Sanz Dias

Título da Dissertação: Construção de linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir compostos aromáticos por meio de vias metabólicas sintéticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação em sessão pública realizada a / / , considerou o (a) candidato (a):

Aprovado **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **811/2016** referente ao projeto intitulado: "**Construção das linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir compostos aromáticos por meio das vias metabólicas sintéticas**" sob a responsabilidade de **Felipe Morillo Sanz Dias** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Luiziana Ferreira da Silva**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Dedico este trabalho a todos aqueles que ainda acreditam no poder da pesquisa científica como uma forma de resistência em um mundo onde opiniões parecem valer mais do que os próprios fatos.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por todo o apoio em serviços e infraestrutura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de pesquisa (130434 / 2016-7).

Aos professores Pablo Iván Nickel e Silvia Costa pelo compartilhamento de algumas das linhagens utilizadas neste trabalho.

Aos professores Marcelo José Pena Ferreira e Thiago Olitta Basso, por disponibilizarem a estrutura e equipe disponíveis em seus laboratórios para as análises de quantificação.

À professora Regina Baldini e seus alunos Ana Clara Boechat, Gianluca Nicastro e Gilberto Kaihami por toda a orientação sobre as técnicas de produção de plasmídeos recombinantes e de recombinação homóloga utilizadas neste trabalho, por cederem os plasmídeos pJN105 e pEX18 e por compartilharem alguns reagentes essenciais para a condução dos experimentos realizados.

À incrível orientação dos professores Luiziana Ferreira da Silva e José Gregório Cabrera Gomez.

À Agência USP de Inovação por todo apoio técnico, legal e financeiro oferecido no desenvolvimento e submissão do pedido de patente elaborado em decorrência das invenções geradas por esse estudo.

A todos os técnicos e colegas do Laboratório de Bioprodutos, os quais além de me guiarem nas atividades do dia-a-dia também contribuíram para uma gestão eficiente dos recursos disponíveis e me auxiliaram em grande parte das atividades realizadas.

RESUMO

DIAS, F. M. S. Construção de linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir compostos aromáticos por meio de vias metabólicas sintéticas. 2018. 62 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Compostos aromáticos são moléculas de grande importância para a indústria, produzidas, naturalmente, por plantas e fungos. Algumas destas substâncias, como o ácido gálico, chegam a ter múltiplas aplicações terapêuticas, contudo, sua produção atual possui limitações que vão desde sua baixa concentração nos organismos de origem até problemas de purificação, dificultando ganhos de escala. Sabendo-se que bactérias do gênero *Pseudomonas*, tais como a *Pseudomonas putida*, possuem em seu metabolismo rotas capazes de gerar intermediários para a síntese de compostos aromáticos a partir fontes renováveis de carbono, tais como a glicose e o glicerol, sua utilização poderia aumentar a disponibilidade de tais produtos no mercado. Com isso, o objetivo deste trabalho foi gerar linhagens de *Pseudomonas* capazes de produzir compostos aromáticos de interesse industrial a partir de biomassa, aplicando técnicas de Biologia de Sistemas e Engenharia Metabólica. Após testar diferentes construções para a expressão de genes capazes de levar à produção de ácido protocatecuico e ácido gálico em *P. putida*, foi possível observar a produção e liberação destas moléculas em uma linhagem submetida à deleção dos genes responsáveis pela degradação destas e em cujo plasmídeo de expressão foi adicionado um gene capaz de desregular a principal via metabólica necessária para a geração dos intermediários necessários, a via do ácido chiquímico.

Palavras-chave: Ácido gálico, Biorrefinarias, *Pseudomonas putida*, Engenharia Metabólica, Biologia Sintética.

ABSTRACT

DIAS, F. M. S. **Construction of *Pseudomonas putida* strains capable of producing aromatic compounds by synthetic metabolic pathways**. 2018. 62 p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Aromatic compounds are molecules of great importance to the industry, being naturally produced by plants and fungi. Some of these substances, such as gallic acid, have multiple therapeutic applications, however, their current production has limitations ranging from their low concentration in the organisms of origin to downstream problems, making it difficult to scale. Once bacteria of the genus *Pseudomonas*, such as *Pseudomonas putida*, have in their metabolism routes capable of generating intermediates for the synthesis of aromatic compounds from renewable carbon sources such as glucose and glycerol, their use could increase the availability of such products on the market. Thus, the goal of this work was to generate *Pseudomonas* strains capable of producing aromatic compounds of industrial interest from biomass, applying techniques of Systems Biology and Metabolic Engineering. After testing different constructs for the expression of genes capable of producing protocatechuic and gallic acids in *P. putida*, it was possible to observe the production and release of both compounds by a strain with deletions of genes related to their degradation and transformed with a construction which had an extra gene responsible for deregulating the major metabolic pathway required to generate the necessary intermediates, the shikimate pathway.

Keywords: Gallic acid, Biorefineries, *Pseudomonas putida*, Metabolic Engineering, Synthetic Biology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB	3-hidroxibenzoato
4HB	4-hidroxibenzoato
4HBA	Ácido 4-hidroxibenzóico
AroG	Fosfo-2-dehidro-3-desoxiheptonato aldolase de <i>Escherichia coli</i>
AroG4	Versão mutante (Pro150 -> Leu) da enzima AroG
ATCC	American Type Culture Collection
BTX	Benzeno, tolueno e <i>p</i> -xileno
C -> T	Troca do nucleotídeo citosina pelo nucleotídeo timina
CHO	Corismato
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAH ₇ P	D-arabino-heptulosonato7-fosfato
DHS	3-hidroxichiquimato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
E4P	Eritrose-4-fosfato
GA	Ácido gálico
Gal1	Linhagem <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Δ glpR Δ galTAPR Δ pcaHG
galTAPR	Sequência genômica de <i>P. putida</i> contendo os genes <i>galT</i> , <i>galA</i> , <i>galP</i> e <i>galR</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
J0	Plasmídeo pJN105 vazio
JAQP	Plasmídeo pJN105 contendo os genes <i>aroG4</i> , <i>quiC</i> e <i>pobA</i> *
JQP	Plasmídeo pJN105 contendo os genes <i>quiC</i> e <i>pobA</i> *
LB	Meio Luria-Bertani
ME	Modo elementar
MM	Meio mineral
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NEB	New England Biolabs
PCA	Ácido protocatecuico
pcaHR	Sequência genômica de <i>P. putida</i> contendo os genes <i>pcaH</i> e <i>pcaG</i>

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PobA*	Versão mutante (Tir385 -> Fen) da enzima <i>p</i> -hidroxibenzoato hidroxilase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pro150 -> Leu	Troca do aminoácido prolina na posição 150 da enzima pelo aminoácido leucina
QuiC	3-dehidrochiquimato desidratase de <i>Acinetobacter baumannii</i>
RBS	Sítio de ligação ribossômica
S	Linhagem <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>glpR</i> (considerada a linhagem selvagem, com relação às deleções realizadas por este trabalho)
SHIK	Chiquimato
SLIC	Clonagem independente de ligase de um passo
T -> A	Troca do nucleotídeo timina pelo nucleotídeo adenina
Tir385 -> Fen	Troca do aminoácido tirosina na posição 385 da enzima pelo aminoácido fenilalanina
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ÁCIDO GÁLICO COMO PLATAFORMA PARA O TRATAMENTO DE MÚLTIPLAS DOENÇAS	14
1.2 ESPÉCIES DO GÊNERO <i>PSEUDOMONAS</i> COMO LINHAGENS PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS	18
1.3 BIOLOGIA DE SISTEMAS E ENGENHARIA METABÓLICA	20
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 LINHAGENS UTILIZADAS E MEIOS DE CULTURA	24
3.2 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	25
3.3 PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO	26
3.4 EDIÇÃO GENÔMICA	29
3.5 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM GLICEROL BRUTO	32
3.6 ENSAIOS DE PRODUÇÃO	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	35
4.2 EDIÇÃO GENÔMICA E CLONAGEM DE GENES EM PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO	35
4.3 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM GLICEROL BRUTO	38
4.4 ENSAIOS DE PRODUÇÃO	39
5 CONCLUSÃO	436
REFERÊNCIAS	49
GLOSSÁRIO	55
APÊNDICE A	57
APÊNCICE B	61

1 INTRODUÇÃO

Compostos aromáticos são, em sua maioria, constituídos por moléculas orgânicas contendo um anel benzeno em suas estruturas, o qual é um grupo funcional cíclico muito estável formado por seis átomos de carbono. O princípio por trás dessa estabilidade foi elucidado em 1865 por August Kekulé, que entendeu a alternância de ligações duplas e simples no benzeno, de acordo com revisões sobre a sua obra (ROCKE, 1988). Tal propriedade faz com que compostos aromáticos com diferentes níveis de complexidade estrutural estejam presentes entre os químicos finos, os quais são caracterizados como compostos de alto valor agregado devido a propriedades especiais, tais como atividades terapêuticas e antioxidantes, o que permite sua aplicação em segmentos importantes como o farmacêutico e o agroquímico (MYERS, 2007).

Atualmente, cerca de 60 % da produção mundial de aromáticos vem de unidades de reforma ou craqueamento catalítico do nafta obtido em refinarias de petróleo para produzir benzeno, tolueno e *p*-xileno (BTX) (SANDERS *et al.*, 2008). Apesar destes compostos serem os precursores básicos de muitas moléculas aromáticas, eles são usados, principalmente, para a obtenção de gasolina de alta octanagem, criando uma condição que submete os valores do BTX às variações dos preços globais da gasolina. O benzeno é o bloco de construção mais importante usado para produzir aromáticos finos, sendo alquilado com propileno para formar cumeno, uma molécula que é então oxidada para gerar acetona e fenol, um benzeno hidroxilado a partir do qual a maioria dos produtos químicos aromáticos é feita. Alternativamente, a oxidação parcial do tolueno em benzoato e a sua descarboxilação também produz fenol como produto (EUGENE *et al.*, 2004). Contudo, publicações recentes demonstraram que a geração de BTX a partir de fontes petroquímicas possui limitações que colocam em risco o fornecimento de seus derivados. A substituição crescente de nafta por gás de xisto para obter etano, por exemplo, reduziu a importância das unidades de reforma ou craqueamento catalítico, embora a demanda por aromáticos tenha aumentado significativamente nos últimos anos (STEVENS, 2017). Paralelamente a estes problemas, a substituição de petróleo por fontes renováveis também é uma preocupação urgente em muitos países devido à escassez de novas reservas e às consequências ambientais do seu consumo, como o aquecimento global (STOCKER, 2014). Para enfrentar isso, o consumo de biomassa como matéria-prima tornou-se um grande alvo para a indústria química, embora a escassez de terras agrícolas e a concorrência com as indústrias de alimentos e de biocombustíveis tenham

imposto restrições ao desenvolvimento desta estratégia (GOMEZ *et al.*, 2014). Neste contexto, países agrícolas com uma liderança bem estabelecida, tais como o Brasil e os Estados Unidos, investiram milhões para expandir sua indústria de biocombustíveis usando resíduos orgânicos como matéria-prima, resultando nos chamados biocombustíveis de segunda geração (LIDON *et al.*, 2016), uma estratégia que vem sendo recentemente considerada para a produção de compostos aromáticos finos, tais como os compostos fenólicos (BECER; ISIKGOR, 2015). No entanto, os processos termoquímicos atuais utilizados para converter resíduos de biomassa em produtos químicos são altamente caros devido à alta recalcitrância do material lignocelulósico presente, exigindo novas tecnologias capazes de torná-los mais viáveis (CARPITA; MCCANN, 2015).

Uma solução promissora para este problema é o desenvolvimento de bioprocessos onde os microrganismos consomem fontes simples de biomassa para produzir as moléculas desejadas. Além desses organismos serem capazes de consumir diferentes fontes de nutrientes, eles também podem tornar-se capazes de produzir metabólitos aromáticos em condições ambientais após a aplicação de técnicas simples de manipulação genética (CHAKRABORTY *et al.*, 2016). Para uma melhor compreensão do estado da arte sobre como a produção microbiana de compostos aromáticos finos pode superar os problemas atuais enfrentados pelos métodos tradicionais de extração a partir de biomassa, publicamos recentemente uma revisão sobre o assunto (DIAS; GOMEZ; SILVA, 2017).

1.1 ÁCIDO GÁLICO COMO PLATAFORMA PARA O TRATAMENTO DE MÚLTIPLAS DOENÇAS

O ácido gálico, ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (FIGURA 1), é um composto trifenólico de baixo peso molecular, com um grande poder antioxidante (BADHANI; KAKKAR; SHARMA, 2015).

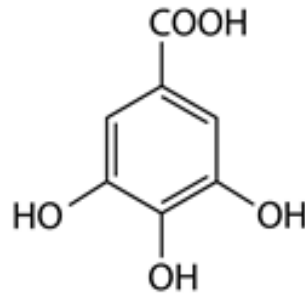


Figura 1 - Estrutura molecular do ácido gálico

Fonte: (INDIAMART, 2017).

Encontra-se presente em plantas, principalmente na forma de taninos hidrolisáveis, os quais são compostos polifenólicos consideravelmente tóxicos, cuja principal função na natureza é afastar herbívoros, além de evitar o ataque de fungos e bactérias (ZEIGER; TAIZ, 2009).

Seu poder antioxidante e antimicrobiano faz com que seja um bom aditivo em alimentos e cosméticos, pois evita a degradação química e biológica. Contudo, o que vem chamando mais a atenção sobre esse composto é sua múltipla atuação no combate e prevenção de uma série de doenças, agindo também como antitumoral, anti-inflamatório e antialérgico, além de também ser potencialmente neuroprotetor e hepatoprotetor (BADHANI; KAKKAR; SHARMA, 2015). Recentemente, estudos mostraram que a combinação de ácido gálico com antibióticos pode fazer com que bactérias resistentes tenham sua tolerância reduzida, abrindo portas para novas opções de tratamento (KOSURU *et al.*, 2018). A resistência a antibióticos tem sido uma das maiores preocupações apontadas pela Organização Mundial da Saúde para os próximos anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014), o que coloca o ácido gálico em posição de destaque dentre as recentes descobertas.

Sua produção em escala industrial ocorre por meio da hidrólise dos taninos presentes em folhas, cascas, legumes, sementes e galhas de árvores que produzem tais compostos, tal como a sumagre (*Rhus coriaria*). Para isso, são utilizados fungos filamentosos produtores de tanase, enzima responsável pela hidrólise dos taninos em ácido gálico (AGUILAR *et al.*, 2015), ou somente a enzima é adicionada ao processo (WAGH, 2010). Devido ao grande número de etapas, à especificidade dos recursos vegetais e às dificuldades encontradas tanto no cultivo de fungos filamentosos como na obtenção de tanases, esse processo tende a ser muito custoso, alcançando baixas performances (WAGH, 2010). A utilização de legumes de tara (*Cesalpinia*

spinosa) como fonte de taninos, por exemplo, é capaz de gerar os melhores resultados para a obtenção de ácido gálico, chegando a uma titulação de 16,56 g/L (WAGH, 2010).

Tradicionalmente, sabe-se que o ácido gálico é formado bioquimicamente nas plantas a partir da rota do ácido chiquímico por uma desidrogenação de 3-hidroxichiquimato (DHS) (DANDEKAR *et al.*, 2011). Porém, sabendo-se que essa via está presente em diversos microrganismos e com a descoberta de que o ácido gálico também pode ser gerado a partir de vias de degradação de aromáticos por fungos e bactérias (AVERESCH; KRÖMER, 2014; DRATHS *et al.*, 2000; FUKUDA, 2010; KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES, 2017; MCKENNA *et al.*, 2014) a possibilidade de integração entre tais vias permite a construção de rotas alternativas de biossíntese (FIGURA 2).

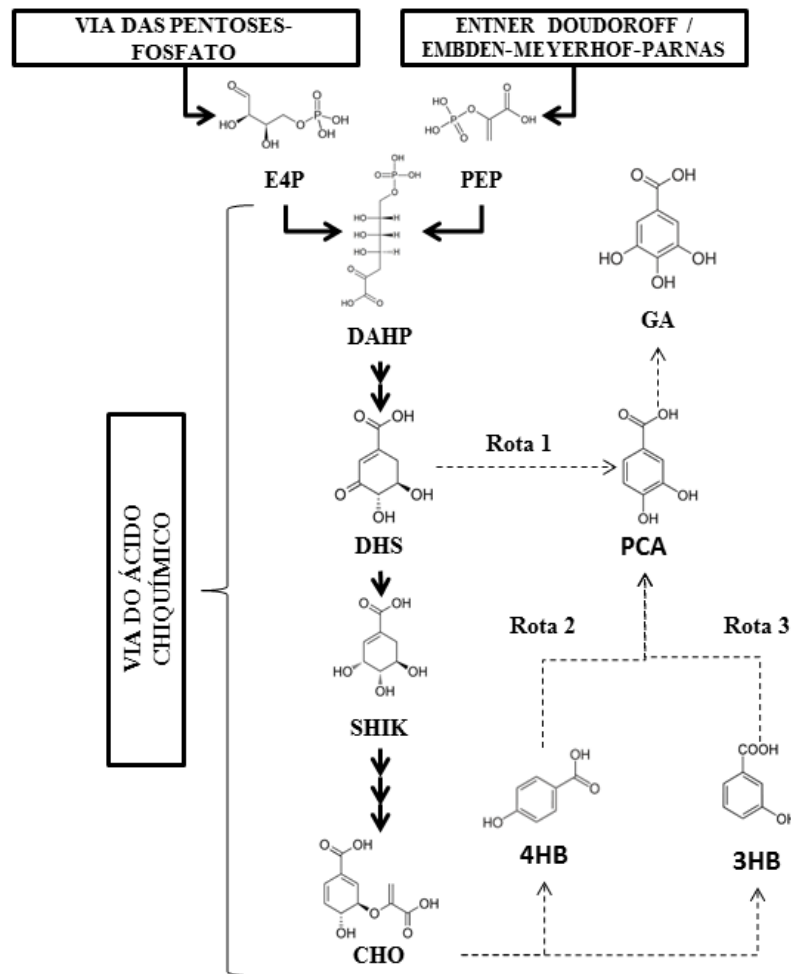


Figura 2 - Possíveis rotas metabólicas que poderiam ser inseridas em *P. putida* para a produção de ácido gálico (GA) a partir da via do ácido chiquímico. Todas as rotas passam pela produção do ácido protocatecuico (PCA) como intermediário, com a diferença de que a Rota 1 considera a conversão de 3-dehidrochiquimato (DHS) a PCA e as outras envolvem a conversão de corismato (CHO) ou em 4-hidroxibenzoato (4HB) ou em 3-hidroxibenzoato (3HB), seguido pela conversão destes compostos em PCA. E4P: eritrose-4-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; DAHP: D-arabino-heptulose-7-fosfato; SHIK: chiquimato. O número de setas corresponde ao número de reações necessárias para a conversão.

Fonte: Autoria própria.

Experimentos com *Escherichia coli*, por exemplo, obtiveram um rendimento de 12 % (g/g) na produção de ácido gálico a partir de glicose (o rendimento máximo teórico é igual a 43 %) e uma titulação de 20 g/L (DRATHS; FROST; KAMBOURAKIS, 2000), valor superior ao visto na produção da molécula a partir de taninos extraídos de *C. spinosa*. Isso torna o processo mais vantajoso sob o ponto de vista de purificação e isolamento do composto, podendo reduzir custos.

Outra vantagem é o fato de que muitos dos compostos aromáticos intermediários também possuem aplicações industriais. O ácido 4-hidroxibenzoico (4HBA), por exemplo, já teve ações antioxidantes, antimicrobianas, antimutagênicas e estrogênicas descritas na literatura (AKASH *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015), enquanto que o ácido protocatecuico (PCA), além de antioxidante e antimicrobiano também possui propriedades neuroprotetoras (CHATTIPAKORN *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2015).

1.2 ESPÉCIES DO GÊNERO *PSEUDOMONAS* COMO LINHAGENS PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS

A conversão de biomassa vegetal em moléculas de maior valor agregado por meio de processos biotecnológicos vem se desenvolvendo a um ritmo bastante intenso nos últimos anos, impulsionada pelo desejo de se estabelecer uma indústria química com baixos impactos ambientais (LOPES, 2015). Ainda assim, ao entendermos o microrganismo não somente como um componente necessário para a catálise de reações dentro de um processo produtivo, mas como um organismo vivo, cujas regras biológicas envolvem, basicamente, a otimização dos recursos disponíveis para sua sobrevivência e reprodução, uma série de limitações à sua aplicação industrial acabam se impondo, podendo resultar em baixas taxas de crescimento, produtividade ou rendimento. Como exemplo, podemos citar necessidades nutricionais específicas que encarecem o meio de cultura utilizado para seu cultivo ou mecanismos de regulação do metabolismo que acabam drenando intermediários da via de síntese de um dado bioproduto (MATTANOVICH *et al.*, 2014).

No caso da produção de compostos aromáticos, dadas às limitações já discutidas sobre o cultivo de células vegetais e fungos filamentosos, a construção de linhagens bacterianas capazes de produzir tais substâncias torna-se uma boa opção, devido à sua versatilidade metabólica e fácil domesticação por meio de manipulações genéticas. Desse modo, os principais fatores críticos de sucesso para a produção de tais compostos tornam-se apenas a capacidade de crescimento em meios com alta concentração de aromáticos e um metabolismo rico em vias metabólicas capazes de gerar intermediários fenólicos (DEBABOV, 2015; KIM; LEE, 2015).

Um gênero que reúne todos esses critérios é o das *Pseudomonas*, com destaque para a *Pseudomonas putida*, uma espécie bacteriana ambiental saprofítica, flagelada, aeróbica e

Gram-negativa, capaz de crescer em ambientes ricos em compostos aromáticos inibitórios. Isso é possível devido a um metabolismo único composto por vias primárias produtoras de cofatores de alto poder redutor, como o NADPH, e vias secundárias capazes de consumir compostos aromáticos normalmente tóxicos a outros organismos como fonte de carbono (BARBE *et al.*, 2016; CHAVARRÍA *et al.*, 2016; LOESCHCKE; THIES, 2015). Além dessa vantagem, a *P. putida* possui em seu metabolismo a via do ácido chiquímico, responsável pela produção de aminoácidos aromáticos e compostos derivados, tais como os fenilpropanóides, sendo uma fonte de intermediários importantes para a síntese de moléculas aromáticas de interesse industrial. Outros benefícios relacionados a essa bactéria envolvem o rápido crescimento em meios com carência em nutrientes, ciclo de vida sem esporulação, ausência de mecanismos de ação patogênica e alta disponibilidade de ferramentas moleculares disponíveis para manipulação genética, uma vez que já possui seu genoma sequenciado (CHAVARRÍA *et al.*, 2016; LOESCHCKE; THIES, 2015).

Sob o ponto de vista de consumo de fontes mais sustentáveis de carbono, a *P. putida* é capaz de consumir de forma bastante eficiente o glicerol bruto oriundo de reações de esterificação na produção de biodiesel (GAO *et al.*, 2014; GOÑI-MORENO *et al.*, 2015), substância considerada um resíduo industrial. Nesses experimentos foi observado que ela é capaz de crescer mais quando glicerol bruto é adicionado como única fonte de carbono em bateladas alimentadas ($59,9 \pm 2,1$ g/L de massa seca, com fator de conversão substrato a célula, $Y_{x/s}$, igual a $58,8 \pm 0,6$ Cmol%), em comparação ao crescimento obtido na presença de glicerol puro ($43,7 \pm 0,9$ g/L de massa seca, com $Y_{x/s}$ igual a $54,8 \pm 0,5$ Cmol%). Quando o mesmo procedimento foi realizado com *E. coli*, o crescimento em ambos os casos foi muito próximo, ainda que o $Y_{x/s}$ em glicerol bruto tenha sido mais baixo ($32,8 \pm 2,1$ g/L de massa seca, com $Y_{x/s}$ igual a $45,8 \pm 0,9$ Cmol% em glicerol puro e $30,9 \pm 0,7$ g/L de massa seca, com $Y_{x/s}$ igual a $42,0 \pm 0,6$ Cmol% em glicerol bruto).

Ao mesmo tempo, a fisiologia resistente a compostos aromáticos inibitórios também faz com que a *P. putida* seja indicada para o consumo de açúcares presentes em hidrolisados de materiais lignocelulósicos (CHAVARRÍA *et al.*, 2016). Apesar de não ser capaz de consumir naturalmente pentoses como a xilose, açúcar presente em grandes quantidades em hidrolisados de bagaço-de-cana, cientistas conseguiram desenvolver a via de consumo desses açúcares em *P. putida* por meio de ferramentas moleculares (RUIJSSENAARS; MEIJNEN; WINDE, 2009) e experimentos com essas linhagens demonstraram uma alta eficiência na produção de compostos de interesse a partir do consumo combinado de xilose e glicerol (BRIEDJLAL *et al.*, 2011).

Tudo isso demonstra o grande valor de *P. putida* para a produção de compostos aromáticos, contribuindo para a maior disponibilidade dessas substâncias no mercado. Porém, para se alcançar esse patamar, rodadas de modificações genéticas e avaliações de performance devem ocorrer, promovendo saltos de qualidade na linhagem bacteriana utilizada, de forma a torná-la apta a bioprocessos de escala industrial.

1.3 BIOLOGIA DE SISTEMAS E ENGENHARIA METABÓLICA

A Biologia de Sistemas se vale dos recentes avanços das chamadas ciências “ômicas”, para mapear todas as substâncias envolvidas em um bioprocessos de interesse, tal como a produção de compostos aromáticos por células microbianas. Dados como o genoma, o transcriptoma, o proteoma, o metaboloma e o fluxoma se integram para formar uma rede de informações a respeito das vias e dos fluxos envolvidos no bioprocessos, revolucionando a forma como alterações genéticas podem ser conduzidas em um determinado organismo (CHEN *et al.*, 2014; LEE; KIM, 2015). Essa mudança de paradigma fez com que a alteração de apenas um gene pela Engenharia Genética se transformasse na alteração de uma série de genes conectados por redes metabólicas, inaugurando, assim, a Engenharia Metabólica (KIM *et al.*, 2008; LEE; KIM, 2015). Como resultado, a Biologia de Sistemas acoplada à Engenharia Metabólica tornou-se uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de bioprocessos nos últimos anos. Integrando essas abordagens, é possível definir um modelo com três rodadas de experimentos para a criação e melhoramento de linhagens industriais (FIGURA 3).

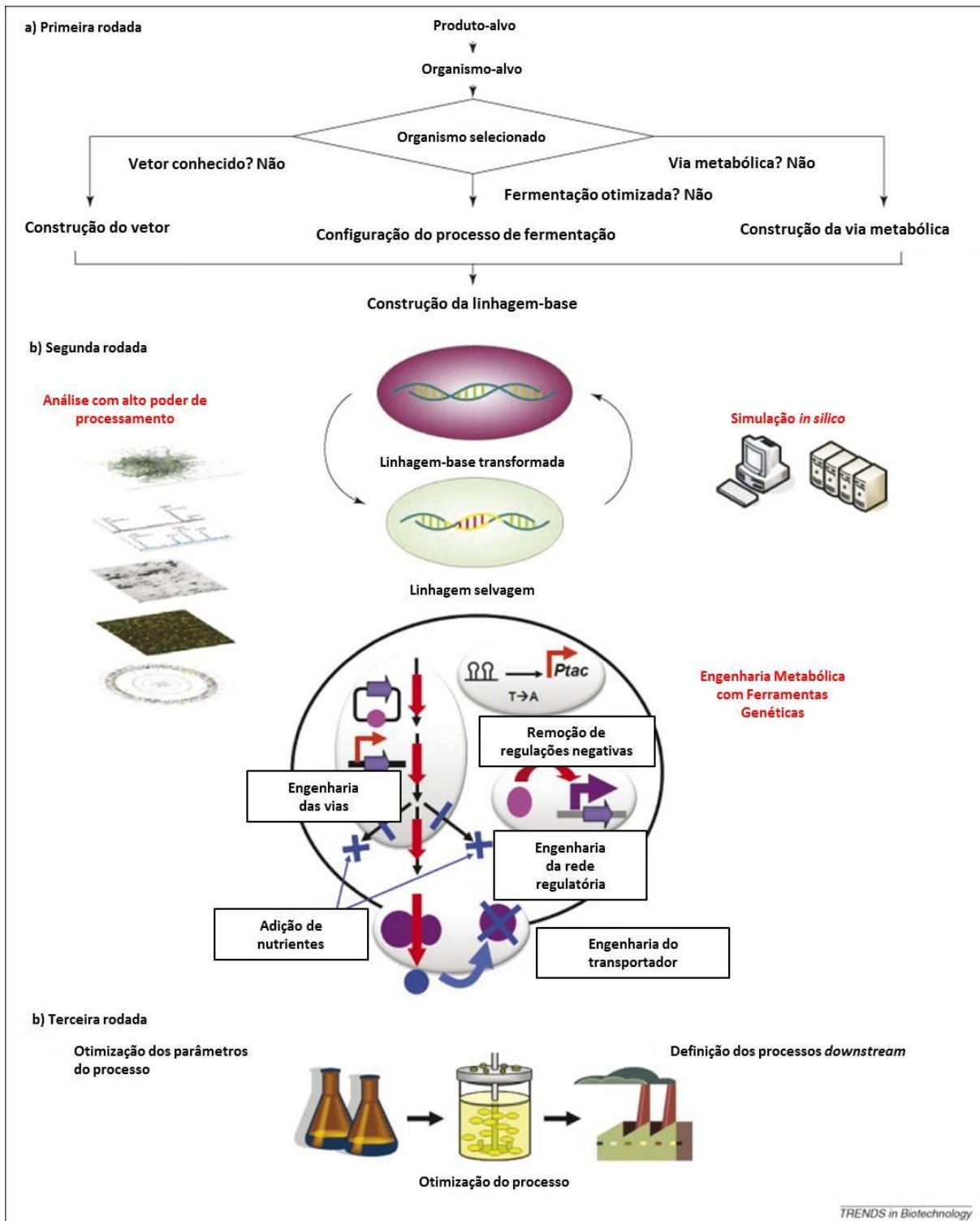


Figura 3 - Rodadas de experimentos necessárias para o desenvolvimento de um bioprocesso. a) Primeira rodada: Construção da linhagem-base produtora do composto de interesse; b) Segunda rodada: Análise do metabolismo global da célula e seus sistemas de regulação; c) Terceira rodada: Aplicação industrial da linhagem e otimização do bioprocesso.

Fonte: Modificado de KIM *et al.* (2008).

Na primeira rodada, o produto final e o organismo responsável por sua produção são definidos, havendo seleção de linhagens com maior tolerância a altas concentrações do bioproduto e sua transformação com plasmídeos construídos a partir de uma análise inicial da fisiologia global da célula e das vias metabólicas necessárias ao bioprocessamento. O objetivo dessa primeira fase é gerar uma linhagem-base produtora da molécula de interesse que será estudada com mais profundidade na próxima rodada de experimentos, em que o mapeamento gênico da bactéria contribuirá para uma visão sistêmica do entendimento do bioprocessamento envolvido e dos fatores que o regulam. Esses dados levarão ao estabelecimento de linhagens capazes de produzir ainda mais, de forma a utilizá-las em uma terceira rodada de experimentos, em que elas serão submetidas às condições de produção industrial. Essa fase gera novos dados sobre o bioprocessamento, conduzindo a novas transformações que fecham o ciclo de experimentações (KIM *et al.*, 2008; LEE; KIM, 2015).

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho consiste em gerar linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir compostos aromáticos de interesse industrial a partir de fontes baratas de carbono, aplicando técnicas de Biologia de Sistemas e Engenharia Metabólica. Para isso, optou-se como foco principal a produção do composto aromático ácido gálico a partir de glicerol em *P. putida* KT2440, de forma a se testar essa conversão como uma prova de conceito. Assim, a partir do objetivo proposto foram adotados os seguintes objetivos secundários:

- 1) Seleção da melhor via metabólica sintética a ser utilizada para a produção de ácido gálico em *P. putida*, por meio de análises *in silico*;
- 2) Definição, isolamento e modificação dos genes heterólogos que serão expressos em *P. putida* para que a via seja inserida em seu metabolismo;
- 3) Construção do plasmídeo de expressão contendo os genes selecionados;
- 4) Deleção de genes responsáveis pela degradação de ácido gálico e intermediários gerados pela via sintética escolhida;
- 6) Produção do ácido gálico a partir de glicerol em ensaios realizados em agitador automático, utilizando-se a linhagem mutante transformada com o plasmídeo de expressão construído.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS UTILIZADAS E MEIOS DE CULTURA

A partir de estudos conduzidos por Goñi-Moreno *et al.* (2015), soube-se que o consumo de glicerol na *P. putida* KT2440 é regulado por um fator de transcrição chamado *glpR*, o qual é expresso constitutivamente, inibindo a expressão dos genes necessários para o transporte e conversão de glicerol livre em intermediários do metabolismo central da bactéria (FIGURA 4).

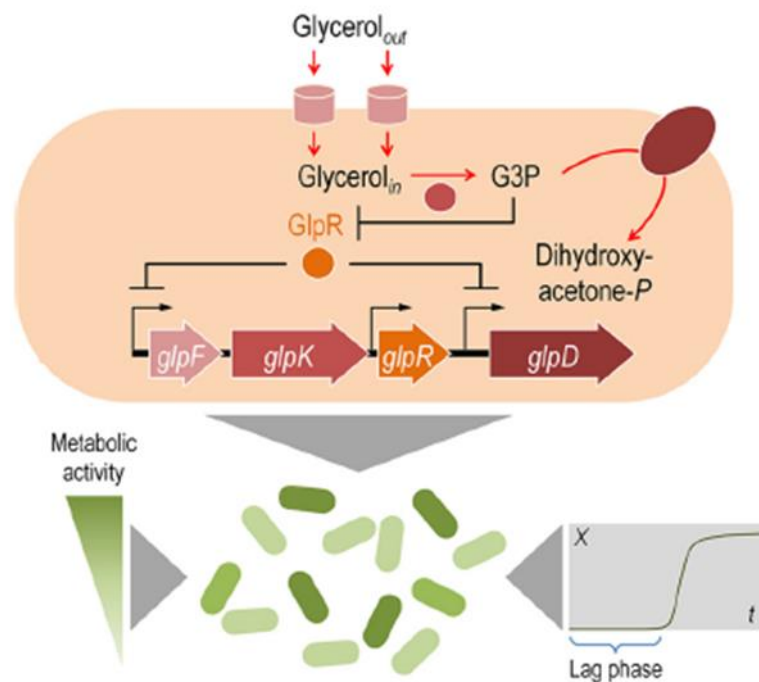


Figura 4 - Sistema de regulação dos genes relacionados ao consumo de glicerol em *P. putida* KT2440

Fonte: (GOÑI-MORENO *et al.*, 2015).

Assim, quando essa linhagem cresce em meio contendo glicerol como única fonte de carbono, sua fase *lag* tende a ser extensa, pois leva certo tempo até que apareçam as primeiras células com mutações espontâneas capazes de reverter tal inibição. Dessa forma, durante todo o estudo foi utilizada a linhagem mutante *P. putida* KT2440 ΔglpR , gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Pablo Iván Nikel, um dos colaboradores do estudo citado.

Além disso, utilizou-se a linhagem de *E. coli* K12 MG1655, disponível em nosso laboratório, tanto para o isolamento do gene *aroG*, como para a validação de um dos plasmídeos de expressão em ensaio no agitador automático. Algumas clonagens foram realizadas em *E. coli* DH10B e *E. coli* S17 λ pir, sendo essa última utilizada nos processos de conjugação necessários para a deleção gênica.

Para o crescimento das linhagens foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB), rico em nutrientes, contendo a seguinte composição (g/L): triptona (10), extrato de levedura (5), NaCl (5) e ágar (20), sendo o último adicionado somente em meio sólido. Além disso, Meio Mineral líquido (MM) foi utilizado para o ensaio de crescimento em glicerol bruto e para os ensaios de produção de ácido gálico, tendo a seguinte composição (g/L): Na₂HPO₄ (3,5), KH₂PO₄ (1,5), (NH₄)₂SO₄ (1), MgSO₄.7H₂O (1), CaCl₂.2H₂O (1), citrato de ferro (III) amoniacal (1) e solução de elementos-traço (1ml/L). Tal solução contém a seguinte composição (g/L): H₃BO₃ (0,30) CoCl₂.6H₂O (0,20), ZnSO₄.7H₂O (0,10), MnCl₂.4H₂O (0,03), NaMoO₄.2H₂O (0,03), NiCl₂.6H₂O (0,02) e CuSO₄.5H₂O (0,01), sendo adaptada de Ramsey *et al.* (1990). No MM, glicerol bruto ou puro foram adicionados na concentração de 10 g/L. Para a preparação do meio Ágar Cetrimide (sólido), foi adicionado 46,7 g/L de ágar cetrimide em uma solução com 10% (volume/volume) de glicerol.

Além disso, carbenicilina era adicionada ao meio quando a bactéria continha o plasmídeo pEX18 (concentração final de 200 μ g/mL para *P. putida* e 150 μ g/mL para *E. coli*) e gentamicina era adicionada quando a bactéria continha o plasmídeo pJN105 (concentração final de 10 μ g/mL para *P. putida* e 40 μ g/mL para *E. coli*).

3.2 ANÁLISE *IN SILICO*

Com base na literatura e em uma extensa busca na base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES, 2017), foram identificadas três rotas das quais o ácido gálico poderia ser produzido a partir da via do ácido chiquímico em *P. putida* com o auxílio da expressão de genes heterólogos (FIGURA 2). Adotando-se a premissa de que a produção de ácido gálico ocorre sem haver crescimento, uma vez que a via do ácido chiquímico consome precursores utilizados na produção de biomassa (E4P e PEP), todas as 50 reações químicas necessárias para a conversão de glicerol em ácido gálico e manutenção da respiração celular foram mapeadas, tomando como base os

estudos conduzidos por Chavarría *et al.* (2015) e Goñi-Moreno *et al.* (2015) sobre o metabolismo da *P. putida* KT2440 e incluindo as 3 rotas sintéticas mapeadas (APÊNDICE A). Em seguida, esses dados foram submetidos a uma análise *in silico* no programa Metatool, de forma a se obter todos os modos elementares possíveis, ou seja, os conjuntos mínimos de reações capazes de levar à conversão desejada sem que haja redundância (MONTEIRO *et al.*, 1999; SRIENC; TRINH; WLASCHIN, 2009) (FIGURA 5).

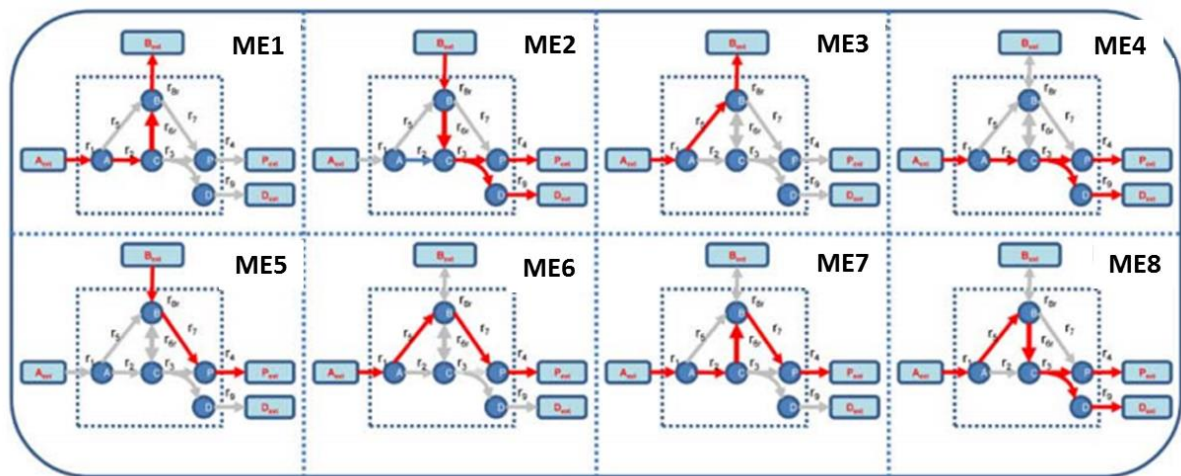


Figura 5 - Esquema geral sobre a definição de diferentes modos elementares (ME) a partir de um conjunto de reações. As setas vermelhas representam o conjunto de reações que caracterizam um ME.

Fonte: Adaptado de SRIENC; TRINH; WLASCHIN (2009).

Por último, os modos elementares de maior rendimento (mol/mol) foram identificados, permitindo a definição de quais rotas metabólicas sintéticas deveriam ser incluídas no metabolismo da *P. putida* KT2440 com o auxílio de plasmídeos de expressão. As vantagens de se utilizar uma análise como essa é a de se considerar não só a estequiometria das principais reações envolvidas na transformação desejada, mas também o equilíbrio de cofatores necessários, dado o conjunto de vias metabólicas que a célula possui.

3.3 PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

Sabendo-se que a conversão de DHS a PCA é feita em *Acinetobacter baumannii* pela enzima 3-dehidrochiquimato desidratase (QuiC), com desempenho superior às versões

ortólogas de outros organismos (BUI *et al.*, 2014), e que a conversão de PCA a ácido gálico pode ser feita por uma versão mutante (Tir385 -> Fen) da enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilase (PobA*) de *Pseudomonas aeruginosa* (DRATHS *et al.*, 2000), tais genes foram amplificados a partir do DNA genômico destas linhagens, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (ERLICH *et al.*, 1988). No caso do gene *quiC* foi desenhado um iniciador da cadeia líder contendo um sítio de ligação ribossômica (RBS) conservado de *Pseudomonas*, utilizado em vetores construídos por Aparício *et al.* (2012), além do sítio de restrição EcoRI, e um iniciador da cadeia reversa contendo um sítio de restrição SmaI (APÊNDICE B). A amplificação foi feita a partir do genoma extraído de colônias de *A. baumannii* ATCC 19606, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Silva Costa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Para o isolamento do gene *pobA** foi utilizado um iniciador da cadeia líder contendo o mesmo RBS, o sítio de restrição SmaI e um iniciador da cadeia reversa contendo a troca de nucleotídeos (T -> A) que levaria à mutação desejada, além do sítio de restrição BcuI (APÊNDICE B). A amplificação foi feita a partir do genoma extraído de amostras liofilizadas de *P. aeruginosa* ATCC 9027, disponíveis no laboratório. Assim, ambos os genes foram amplificados e purificados para depois serem submetidos às enzimas de restrição correspondentes *FastDigest* (Thermo Fischer) e ligados no vetor de expressão pJN105 com o auxílio da enzima *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher), iniciando-se com a inserção do gene *quiC* e, em seguida, do gene *pobA**, para formar o plasmídeo JQP (FIGURA 6).

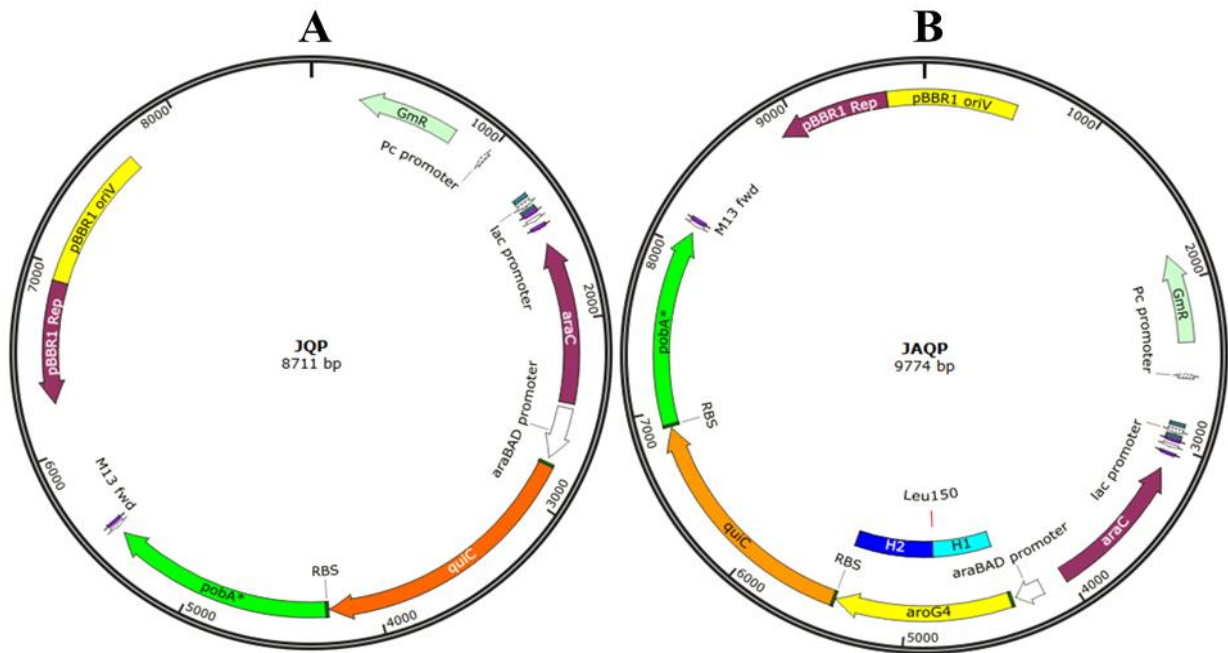


Figura 6 - Plasmídeos de expressão JQP (A) e JAQP (B). Em destaque os braços de homologia construídos para a clonagem do gene *aroG4* no plasmídeo JQP (H1, em azul claro e H2, em azul escuro).

Fonte: Autoria própria.

O vetor pJN105 contém um promotor induzível por L-arabinose, o qual é ideal para a expressão controlada de genes em *Pseudomonas*, uma vez que testes realizados em nosso laboratório demonstraram que vetores com promotores induzíveis por IPTG comportam-se como vetores de expressão constitutiva em espécies desse gênero. Como se espera que a produção de ácido gálico interrompa o crescimento das células, por consumir precursores de biomassa, a utilização de um sistema de expressão controlada torna-se essencial.

Devido ao fato de que a rota sintética necessita da via do ácido chiquímico e que a primeira reação desta via, a condensação de E4P e PEP em DAHP, é catalisada pela enzima fosfo-2-dehidro-3-desoxiheptonato aldolase (AroG), a qual é inibida por fenilalanina, foi necessário clonar no plasmídeo JQP uma versão mutante deste gene, chamada de *aroG4* (Pro150 -> Leu) insensível à inibição (DOROSHENKO *et al.*, 2010). Contudo, como a mutação ocorre no meio do gene, não seria possível utilizar a mesma técnica feita para a obtenção do *pobA**. Assim, foi aplicada a técnica de clonagem independente de ligase de um passo (SLIC), na qual o gene *aroG* de *E. coli* K12 MG1655 foi isolado na forma de dois fragmentos, utilizando, com isso, quatro iniciadores com extremidades homólogas que

permitiam o anelamento entre os fragmentos amplificados por PCR e o vetor digerido com a enzima EcoRI, após submeter os três fragmentos à ação exonucleolítica 3'-5' da enzima *T4 DNA Polymerase* (NEB) (JEONG *et al.*). O resultado deste anelamento foi introduzido em *E. coli* DH10B por choque térmico e o próprio sistema de reparo da bactéria realizou as ligações covalentes necessárias para unir todos os fragmentos em um plasmídeo final. Assim, desenhando tanto o iniciador da cadeia reversa do primeiro fragmento do *aroG*, como o iniciador da cadeia líder do segundo fragmento, ambos com a mutação pontual (C -> T), foi possível clonar o gene em sua versão mutada no plasmídeo JQP, resultando na versão JAQP (FIGURA 6).

Todos os genes foram isolados por PCR, utilizando-se as enzimas de alta fidelidade *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB) ou *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB). Além de testes de PCR serem conduzidos para a verificação da clonagem de cada um dos genes, utilizando-se o kit *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), o sequenciamento de todo o operon foi realizado para validar se as mutações desejadas foram feitas corretamente e se mutações indesejadas não haviam sido incorporadas. Para isso, amostras contendo o plasmídeo JAQP junto a iniciadores específicos foram enviadas ao Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP, onde foram sequenciados pelo método de Coulson e Sanger (1975). Tal técnica utiliza o *ABI 3730 DNA Analyser*, um sistema de análise de DNA de 48 capilares. As reações de sequenciamento são feitas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* e as corridas são feitas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. Em seguida, as sequências são analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando o *Base Caller KB*. Para consultar os iniciadores utilizados veja o APÊNDICE B.

3.4 EDIÇÃO GENÔMICA

Um dos fatores que caracteriza a *P. putida* como uma espécie capaz de crescer na presença de compostos inibitórios como o ácido gálico é justamente sua capacidade de degradar tais compostos. No caso, a *P. putida* KT2440 é dotada de operons relacionados a genes que codificam enzimas responsáveis pela degradação tanto do ácido gálico (*galA*) como do intermediário PCA (*pcaHG*) (CANALES *et al.*, 2011; KYOTO ENCYCLOPEDIA OF

GENES AND GENOMES, 2017; THE PSEUDOMONAS GENOMA DATABASE, 2017) (FIGURA 7).

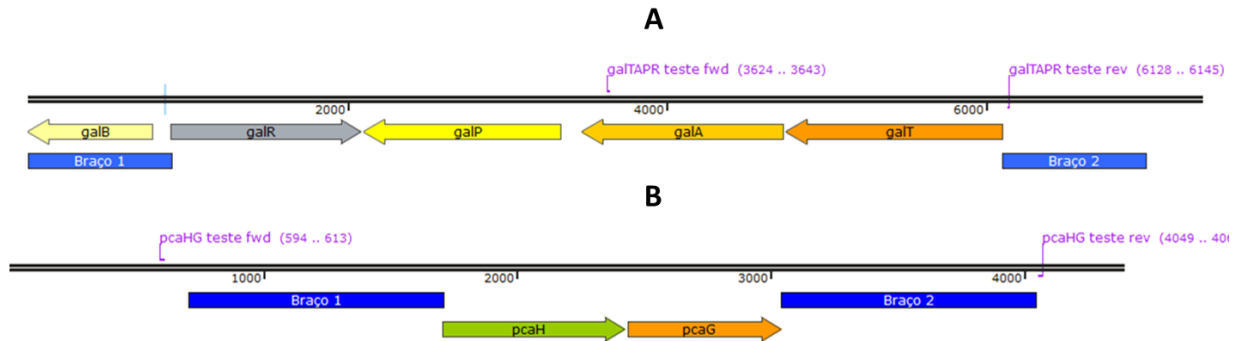


Figura 7 - Organização geral dos operons *galTAP* (A) e *pcaHG* (B) em *P. putida*. Em destaque estão os braços de homologia para ambas as deleções (barras azuis) e as posições dos iniciadores utilizados para a validação das deleções em PCR (em roxo).

Fonte: Autoria própria.

No caso do operon *galTAP*, a enzima GalA (ácido gálico dioxigenase) é responsável pela primeira etapa da rota de degradação de ácido gálico, a qual prossegue com o auxílio de genes que se encontram em outro operon. Já o gene *galT* codifica para um transportador de ácido gálico na membrana interna da célula, enquanto que o gene *galP* codifica para uma porina, a qual está presente na membrana externa. Este operon é regulado pelo fator de transcrição codificado pelo gene *galR*, o qual aumenta sua expressão com o aumento na concentração de ácido gálico no meio (CANALES *et al.*, 2011). Já o operon *pcaHG* codifica para as duas subunidades da enzima protocatecuato 3,4-dioxigenase.

Assim, a técnica de deleção por recombinação homóloga com o auxílio do vetor pEX-18 foi adotada, protocolo que consiste em adicionar ao vetor um *template* de recombinação formado pela junção das duas sequências que flanqueiam as regiões a serem deletadas (braços de homologia de aproximadamente 1000 pb) (BORLEE *et al.*, 2015) (FIGURA 8).

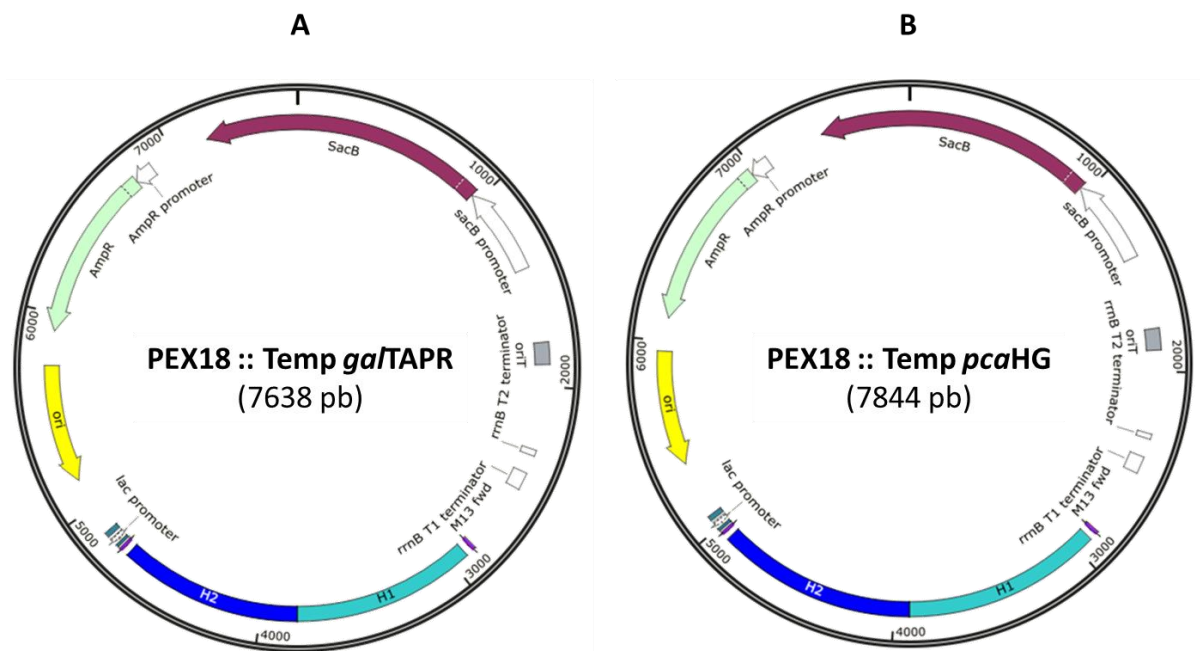


Figura 8 - Construções para a deleção das sequências *galTAPR* (A) e *pcaHG* (B). As barras H1 e H2 referem-se aos braços de homologia que formam os templates de recombinação.

Fonte: Autoria própria.

Uma vez que os genes *galR*, *galT* e *galP* apresentam homologia com outras regiões do genoma de *P. putida* (THE PSEUDOMONAS GENOMA DATABASE, 2017), os braços de homologia foram definidos de forma a delimitar a região a ser deletada desde o gene *galR* ao gene *galT*. Tal protocolo foi utilizado para, inicialmente, remover a sequência *galTAPR*. Uma vez que esse mutante foi obtido, uma segunda rodada foi feita com o objetivo de se deletar o operon *pcaHG*, resultando em uma linhagem denominada Gal1 (*Pseudomonas putida* KT2440 $\Delta glpR \Delta galTAPR \Delta pcaHG$).

No início do procedimento a técnica do SLIC é utilizada para a obtenção da construção que contém o *template* de recombinação e o plasmídeo resultante é inserido por eletrotransformação em uma *E. coli* S17 λ pir, a qual é capaz de transferi-la por conjugação para a *P. putida* em ágar contendo meio rico LB. A conjugação facilita a inserção do vetor pela recombinação homóloga de um dos braços de homologia no genoma, conferindo à *P. putida* a resistência ao antibiótico carbenicilina. Como o vetor possui uma origem de replicação que não é reconhecida pelo sistema de replicação de *Pseudomonas*, ao semear o resultado da conjugação em meio seletivo, tal como o meio Ágar Cetrimide contendo carbenicilina, somente formam colônias as células que tiveram o vetor inserido em seus genomas. Ao mesmo tempo, pela característica do próprio meio, somente as células de *P.*

putida serão capazes de formar colônias. Estas são escolhidas aleatoriamente para validação por PCR, devendo apresentar no gel de agarose a mesma banda presente na amplificação da construção com o template, utilizando-se o iniciador da cadeia líder construído para a amplificação do primeiro braço de homologia e o iniciador da cadeia reversa construído para a amplificação do segundo braço de homologia.

Ao final, quatro colônias com a primeira recombinação validada por PCR são inoculadas, individualmente, em tubos de ensaio contendo meio rico sem antibiótico para que a recombinação ocorra novamente no outro braço de homologia, removendo, com isso, o vetor junto à região de interesse. Após 12h de cultivo, as culturas são diluídas 100.000 vezes e então semeadas em meio LB contendo 15% de sacarose (massa/volume), de modo que as células que ainda possuem o vetor morrem por ação do gene *sacB*, o qual converte a sacarose em um composto tóxico ao organismo.

As colônias que crescem no meio passam por uma nova validação por PCR, de forma a se avaliar se deixaram de apresentar a banda presente na amplificação do genoma da linhagem selvagem. Para a validação da deleção da sequência *galTAPR*, foram utilizados iniciadores internos (FIGURA 7), uma vez que a região deletada era muito grande. Dessa forma, colônias mutantes não deveriam apresentar a banda formada pela amplificação com esses iniciadores. Já no caso dos mutantes $\Delta pcaHG$, foram utilizados iniciadores externos aos braços homólogos (FIGURA 7), de forma a se obter bandas de tamanho reduzido em comparação com a linhagem selvagem.

Além dos testes de PCR conduzidos para a verificação das deleções, utilizando-se o kit *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), iniciadores externos aos braços homólogos de cada região deletada foram desenvolvidos para que os amplicons resultantes das amplificações feitas com a enzima *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB) fossem submetidos a sequenciamento no Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP. Para consultar os iniciadores utilizados veja o APÊNDICE B.

3.5 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM GLICEROL BRUTO

Para avaliar se as deleções gênicas poderiam afetar o crescimento da bactéria, foi comparado o crescimento da linhagem Gall em glicerol bruto e glicerol puro, de forma a se observar se os resultados obtidos mantinham o padrão previamente descrito na literatura para

P. putida. Para isso, uma colônia de Gal1 foi pré-inoculada em meio LB por 12h e, depois, inoculada em MM contendo 10 g/L de glicerol bruto ou puro como únicas fontes de carbono, ajustando a densidade óptica (DO₆₀₀) inicial para 0,1. Em seguida, triplicatas de 700 uL correspondentes a cada cultura foram distribuídas em uma placa de 24 poços e esta foi levada a um leitor de placas Synergy H1 (Biotek, VE, USA) que realizou leituras de DO₆₀₀ a cada 15min por 44h a 30°C.

3.6 ENSAIOS DE PRODUÇÃO

Em um primeiro momento foi feito um ensaio de produção de 72 h em agitador automático comparando a *P. putida* KT2440 Δ *glpR*, referenciada aqui como a linhagem selvagem (S). Nesse ensaio a linhagem foi transformada com o plasmídeo JQP e comparada com a mesma linhagem transformada com o plasmídeo vazio (J0) como controle. O objetivo era avaliar se a presença do gene *aroG4* no plasmídeo e se as deleções gênicas seriam dispensáveis para a produção de GA. Ambas as linhagens foram cultivadas em triplicata em meio mineral contendo 10 g/L de glicerol puro a 30°C, com rotação a 150 rpm, a partir de uma densidade óptica (DO) inicial igual a 0,1. Após atingirem uma DO igual a 0,7, as culturas foram induzidas com L-arabinose, de forma a se manter uma concentração final do indutor igual a 0,2 % (massa/volume). Amostras foram retiradas após o inóculo, após a indução, 1h após a indução 2 h após a indução e, em seguida, somente após 24 h, 36 h, 48 h e 72 h após o inóculo. Foram medidas: DO, massa seca, pH e concentração de glicerol, GA e PCA no meio de cultura. Para isso, o sobrenadante das amostras foi analisado em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando-se o equipamento Dionex modelo Ultimate 3000, coluna Aminex HPX 87 H ,temperatura 40°C, fase móvel 0,5 mL/min com 0,005 mM de H₂SO₄ e detector Dionex UV 280 nm no caso do glicerol e coluna Dionex Acclaim OA (Organic Acids) 5 um, 120 A, 4.0 X 250 mm, temperatura 30 °C, fase móvel 0,6 mL/min ácido acético 0,1 % com 15 % de metanol e detector Dionex UV 280 nm no caso do GA e do PCA. Essa última análise foi gentilmente realizada pela equipe do Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira, do Instituto de Biociências da USP.

Para validar funcionalmente a expressão do operon sintético no plasmídeo JQP este foi inserido por eletrotransformação em *E. coli* K-12 MG1655 e um novo ensaio de 72 h foi feito, uma vez que ela não é capaz de degradar os compostos estudados, tal qual a linhagem S.

Todas as condições foram mantidas, trocando-se apenas a temperatura do cultivo de 30 °C para 37 °C.

Para avaliar se a linhagem Gall seria capaz de produzir ácido gálico e ácido protocatecuico a partir de glicerol puro triplicatas das linhagens Gall-J0, Gall-JQP e Gall-JAQP foram cultivadas conforme o método já descrito, com a indução ocorrendo 24 h após o inóculo. Amostras foram retiradas após o inóculo, após a indução e 48 h após a indução. Foram medidas: massa seca e concentração de glicerol, GA e PCA no meio de cultura em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando-se o equipamento Dionex modelo Ultimate 3000, coluna Aminex HPX 87 H, temperatura 40°C, fase móvel com 0,005 mM H₂SO₄, vazão de 0,5 mL/min e detector Dionex UV 280 nm no caso do glicerol. Para a quantificação de GA e PCA foi utilizado o equipamento Agilent série 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha), com a separação em um Phenomenex (Torrance, CA) Coluna Aqua C18 a uma temperatura de 25°C, vazão de 1,0 mL/min e detector UV 280 nm. A fase móvel consistiu em 2 % (volume/volume) de ácido acético em água (eluente A) e ácido acético a 0,5% em água com acetonitrila (50:50, volume/volume; eluente B) usando o seguinte programa de gradiente: de 10 a 15% B (10 min), 15% B isocrático (3 min), de 15 a 25% B (7 min), de 25 a 55% B (30 min), de 55 a 100% B (1 min), 100 % isocrático (5 min), de 100 a 10 % de B (0,1 min). Essa quantificação de GA e PCA em HPLC foi gentilmente realizada pela equipe do Prof. Dr. Thiago Olitta Basso, da Escola Politécnica da USP, segundo o protocolo desenvolvido por Carle *et al.* (2004).

Por último, o mesmo ensaio foi realizado, visando avaliar se a produção de GA e PCA pela linhagem Gall transformada com o plasmídeo JAQP era favorecida pelas mutações que ela possui. Assim, foi feito um novo ensaio de produção no qual a linhagem S, recebeu o plasmídeo JAQP por eletrotransformação de forma a compara-la com a linhagem Gall contendo o mesmo plasmídeo. Nesse último caso, as concentrações de GA e PCA foram medidas tanto no meio de cultura como intracelularmente, para avaliar a capacidade da célula de secretar os compostos. Foi utilizado o equipamento Dionex modelo Ultimate 3000, Coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, partícula: 3,5µm), eluída a 90% de água acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de acetonitrila de 0-6min, a uma temperatura de 45°C, vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e detector UV 280nm (GA) e 254nm (PCA). Para a avaliação do teor intracelular de GA e PCA o centrifugado celular de cada amostra foi ressuspensionado em água destilada e submetido à lise por sonicação em Ultracleaner 1400 (Milleto) com 10 pulsos de 15 segundos cada. A quantificação final de GA e PCA foi gentilmente realizada pela equipe do Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira, do Instituto de Biociências da USP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Um conjunto de 82 modos elementares foi gerado pela análise *in silico* (APÊNDICE A). Assim, a partir de uma priorização com base no fator de conversão (mol/mol) das equações globais obtidas para cada modo elementar, foi possível identificar que somente a rota sintética que considera a conversão de DHS em PCA e de PCA em GA (FIGURA 2) estava presente nos modos com maior fator de conversão (2,5 mol/mol). Isso resulta em um rendimento máximo teórico (g/g) igual a, aproximadamente, 74 %, considerando as massas molares do glicerol e do ácido gálico iguais a 92,09 g/mol e 170,12 g/mol, respectivamente. Tal resultado reforça a escolha do glicerol como fonte de carbono, uma vez que o rendimento máximo teórico (g/g) para a conversão de glicose em ácido gálico é de apenas 43 %.

4.2 EDIÇÃO GENÔMICA E CLONAGEM DE GENES EM PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

A dupla deleção pôde ser confirmada comparando-se a amplificação do genoma da linhagem Gal com o genoma da linhagem S e com os plasmídeos utilizados para ambas as recombinações em PCR (FIGURA 9).

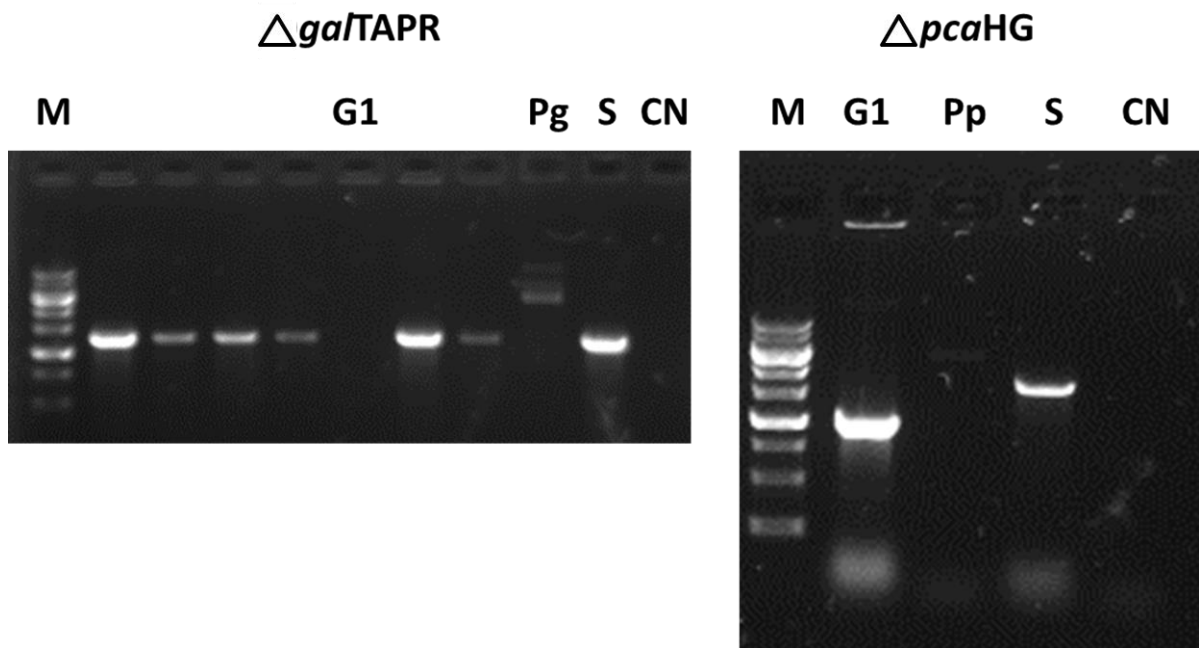


Figura 9 - Foto de gel de agarose feito para a validação das deleções na linhagem Gal1. As amostras sem identificação na primeira foto correspondem a ampliações do genoma de colônias da linhagem S que participaram do processo de edição gênica, mas não apresentaram a deleção desejada. M: Marcador molecular, G1: Genoma da linhagem Gal1, Pg: Plasmídeo PEX18::Temp *galTAPR*, S: Genoma da linhagem selvagem, CN: Controle negativo e Pp: Plasmídeo PEX18::Temp *pcaHG*

Fonte: Autoria própria.

Uma vez que foram utilizados iniciadores internos para a validação da deleção da sequência *galTAPR* (FIGURA 7), ou seja, que possuem homologia com parte da região deletada, o que se observa no gel é que a amplificação do genoma da linhagem Gal1 não apresenta a banda formada na amplificação do genoma da linhagem S. Já no caso da deleção que resultou na mutação $\Delta pcaHG$, foram utilizados iniciadores externos à região deletada (FIGURA 7) e o que se observa é a formação de uma banda de tamanho reduzido na amostra da linhagem Gal1 em comparação com a da linhagem S. Com isso, ambos os resultados apontam para a deleção das duas sequências de interesse.

Além disso, a inserção de cada gene heterólogo no plasmídeo de expressão PJN105 também foi confirmada por PCR (FIGURA 10).

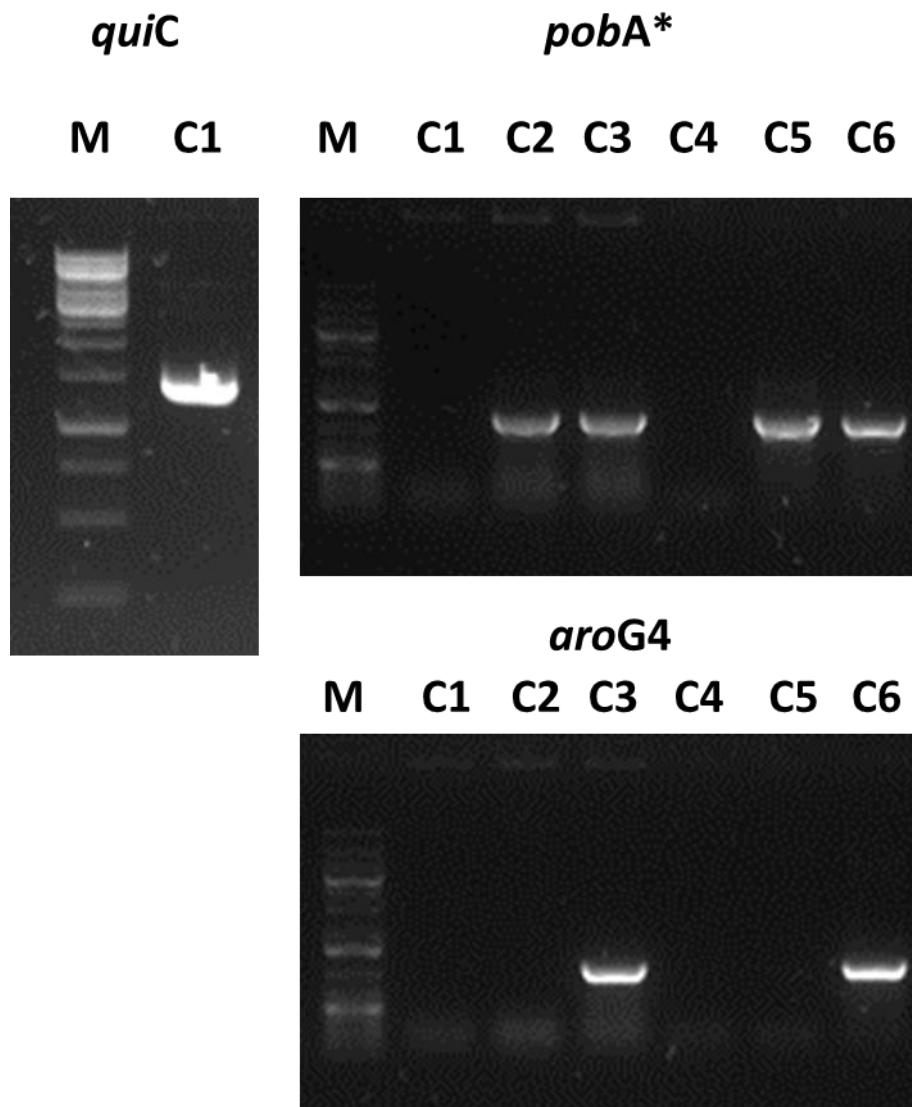


Figura 10 - Fotos dos géis de agarose feitos para a validação das inserções dos genes *quiC*, *pobA e *aroG4* no plasmídeo pJN105. M: Marcador molecular, C1-6: Colônias testadas em cada rodada.**

Fonte: Autoria própria.

Todos os sequenciamentos apresentaram os resultados esperados, contudo, foi identificada uma troca de nucleotídeos no RBS que antecede o gene *aroG4* no plasmídeo JAQP (FIGURA 11).



Figura 11 - Mutação pontual no RBS do gene *aroG4*.

Fonte: Autoria própria.

Dado que essa sequência foi sintetizada internamente ao primeiro iniciador de cadeia líder utilizado, assume-se que o erro foi decorrente do processo de síntese química do iniciador pela empresa Exxtend. Contudo, uma vez que a mutação não ocorreu na região correspondente à sequência de *Shine-Dalgarno* (AGGAGGA), considerou-se que ela não impactaria a expressão do gene, pois a ligação do RNA mensageiro resultante da transcrição deste com o RNA ribossômico estaria garantida, dando início ao processo de tradução.

4.3 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM GLICEROL BRUTO

Como resultado do ensaio de crescimento, foram obtidas as curvas apresentadas na Figura 12.

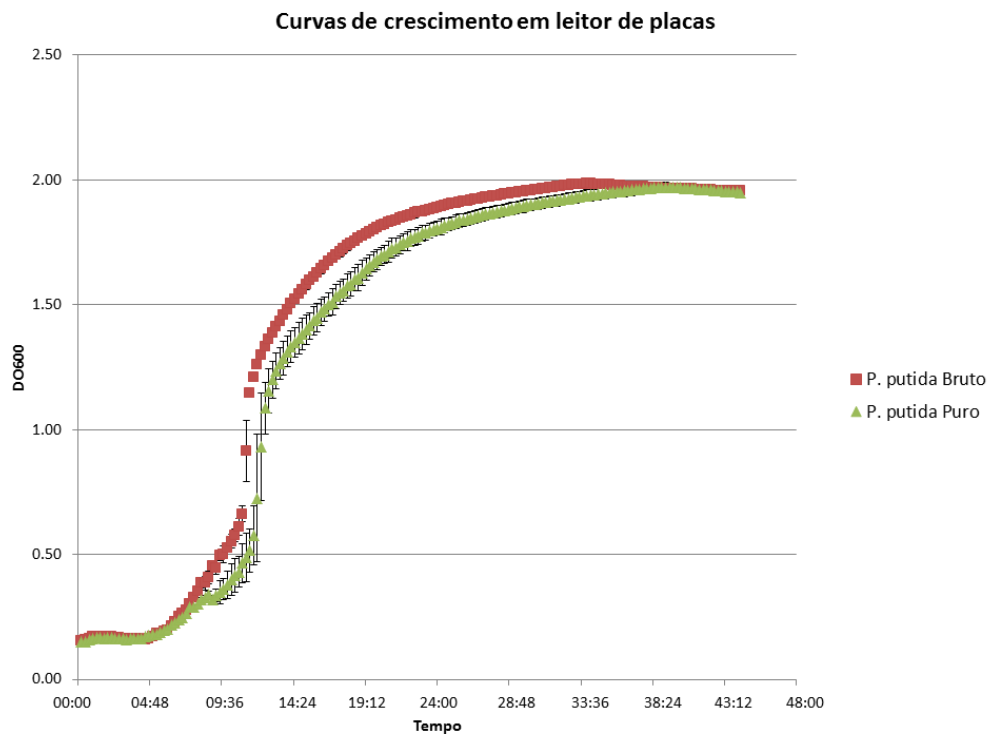


Figura 7 - Crescimento de *P. putida* Gal1 em meio mineral contendo glicerol bruto como única fonte de carbono (quadrados em vinho) e em meio mineral contendo glicerol puro como única fonte de carbono (triângulos verdes).

Fonte: Autoria própria.

Com base nessas curvas, foi identificado o crescimento exponencial no intervalo de tempo entre 04:59:46 e 08:44:46, sendo possível calcular a taxa específica de crescimento máxima (μ_{\max}) de ambas as condições ($0,098 \text{ h}^{-1}$ em glicerol bruto e $0,075 \text{ h}^{-1}$ em glicerol puro). Isso mostra que a linhagem criada apresenta uma maior taxa de crescimento em glicerol bruto, correspondendo ao padrão já apresentado na literatura para *P. putida* (GAO *et al.*, 2014) e revelando que as deleções realizadas não afetaram o consumo de glicerol pela bactéria.

4.4 ENSAIOS DE PRODUÇÃO

Uma vez que os resultados foram negativos para a produção de GA e PCA na linhagem S contendo o plasmídeo JQP, levantou-se a hipótese de que o problema poderia estar ou na construção ou na degradação dos compostos pelo próprio metabolismo da bactéria. Dessa forma, a avaliação dos resultados obtidos a partir do cultivo de *E. coli* K12 MG1655 transformada com o JQP permitiram esclarecer essa questão, uma vez que essa espécie não

possui os genes necessários à degradação. Nesse ensaio foi possível notar um baixo acúmulo tanto de ácido gálico como de PCA no meio, concluindo-se que a construção estava adequada, o que implicaria no fato de que as deleções seriam pré-requisitos necessários para que os compostos se acumulassem no meio (FIGURA 13).

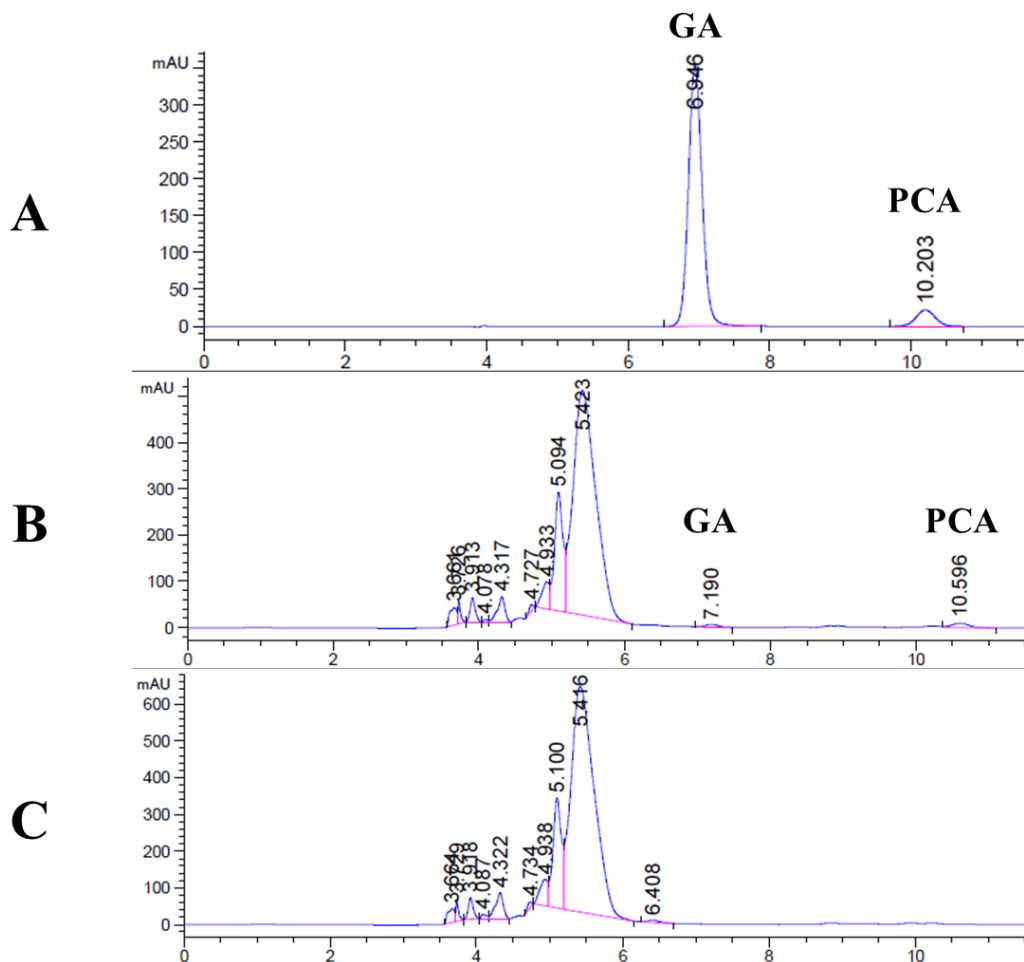


Figura 13 - Cromatograma do ensaio de produção de PCA e ácido gálico em *E. coli*. A) Tempos de retenção de ácido gálico e PCA utilizados como padrão. B) Cromatograma de uma amostra obtida a partir do cultivo de *E. coli* contendo o plasmídeo JQP. C) Cromatograma de uma amostra obtida a partir do cultivo de *E. coli* contendo o plasmídeo J0 (controle negativo).

Fonte: Autoria própria.

É importante observar que a *E. coli* possui em seu metabolismo vias de consumo de arabinose presente no meio, o que poderia explicar as baixas concentrações encontradas, uma vez que a indução da expressão dos genes heterólogos presentes no plasmídeo JQP estaria prejudicada.

Imediatamente após o término do ensaio com as linhagens Gal1-J0, Gal1-JQP e Gal1-JAQP, constatou-se a oxidação da cultura contendo a linhagem Gal1-JAQP, sugerindo o acúmulo de ácido gálico, uma vez que este oxida com muita facilidade, conforme descrito por Draths *et al.* (2000) (FIGURA 14).



Figura 14 - Oxidação da cultura contendo Gal1 com o plasmídeo JAQP. A) Comparação entre as culturas contendo os plasmídeos J0, JQP e JAQP. B) Foto mostrando em detalhe a diferença de cor entre Gal1-J0 e Gal1-JAQP.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos em HPLC confirmaram a hipótese gerada a partir da análise da oxidação das culturas, mostrando acúmulo de GA e PCA somente nas triplicatas da linhagem Gal1-JAQP, o que indicaria que, além da deleção dos genes de degradação, a desregulação da via do ácido chiquímico provocada pela expressão do gene *aroG4* também seria de extrema importância para a produção de GA em *P. putida* (FIGURA 15).

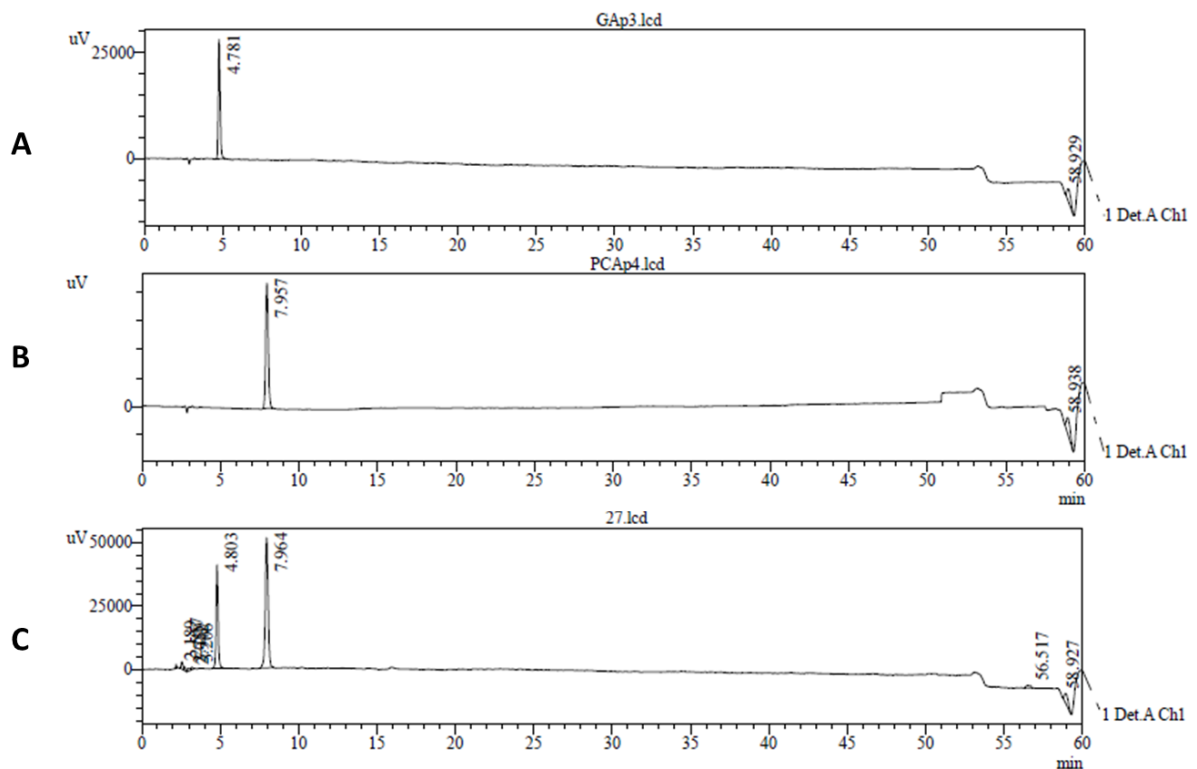


Figura 15 - Cromatograma do ensaio de produção de PCA e ácido gálico em *P. putida* Gal1. A) Tempo de retenção de ácido gálico utilizado como padrão. B) Tempo de retenção de PCA utilizado como padrão. C) Cromatograma de uma amostra obtida a partir do cultivo de Gal1 contendo o plasmídeo JAQP após 72h de cultivo.

Fonte: Autoria própria.

Comparando a quantificação do crescimento, do consumo de glicerol e da produção de ácido gálico e PCA, pode-se notar que, de fato, quando a linhagem JAQP produz os compostos de interesse há interrupção de seu crescimento, apesar de manter o consumo de glicerol (FIGURA 16), confirmando a premissa adotada na modelagem realizada.

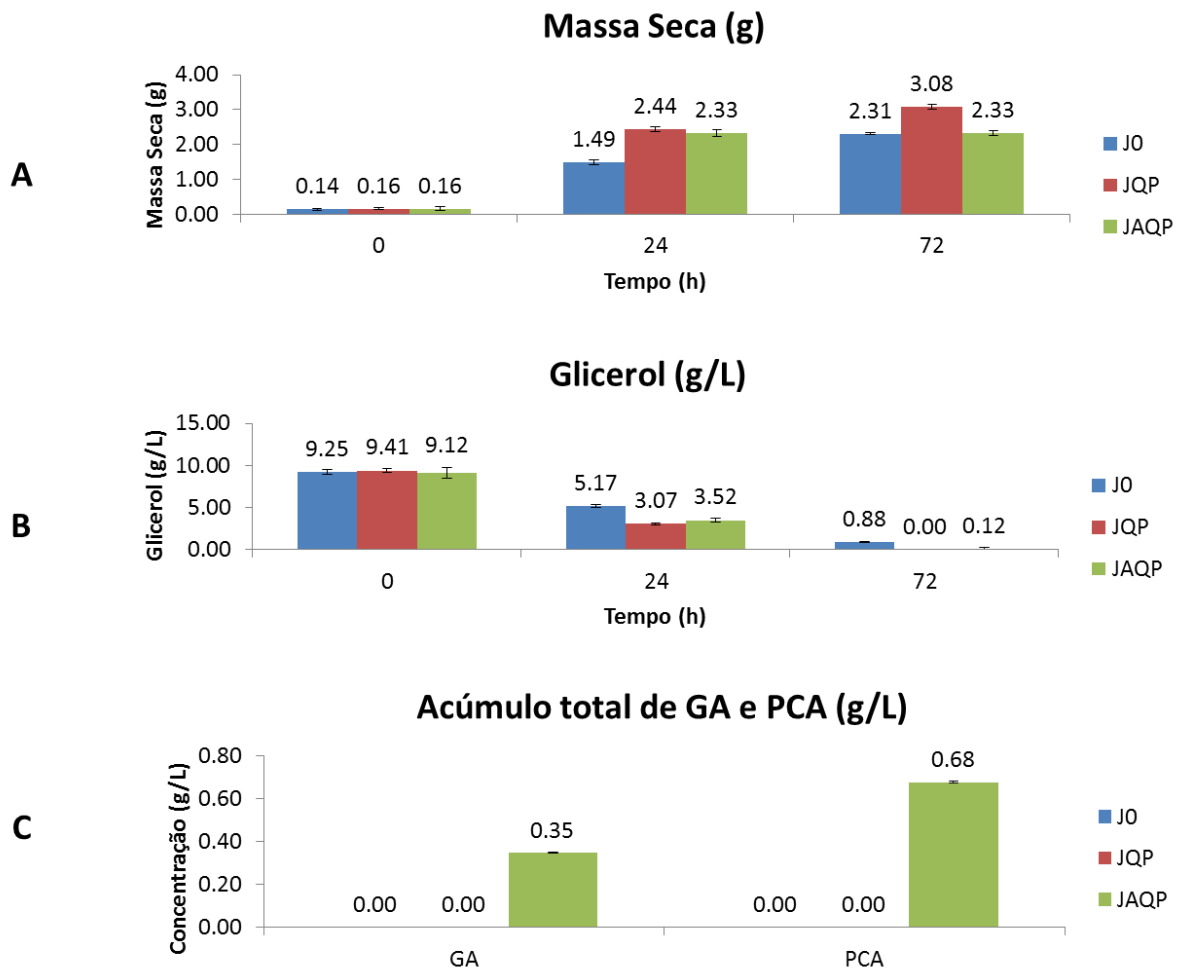


Figura 16 – Quantificação de massa seca (A), glicerol (B), ácido gálico (GA) e PCA (C) após ensaio de 72h com a linhagem Gal1 contendo os plasmídeos J0, JQP ou JAQP.

Fonte: Autoria própria.

Além disso, deve-se salientar que, além de não se detectar acúmulo dos compostos de interesse, há maior crescimento de biomassa e consumo de glicerol na linhagem JQP, em comparação com a linhagem controle (J0). Uma possível explicação é a de que, com a via do ácido chiquímico regulada normalmente, a expressão dos genes heterólogos pode permitir uma recuperação coordenada de NADP. Tal hipótese poderia ser testada com a avaliação dos resultados obtidos em ensaios em biorreator em ferramentas de análise de fluxos metabólicos.

Outro destaque é o fato de que há uma maior conversão (g/g) de glicerol em PCA (20 %) do que em ácido gálico (10 %), quando avaliamos somente o intervalo entre a indução (24h) e o término do ensaio (72h). Nesse caso, três hipóteses poderiam explicar tal resultado: o fato de que o ácido gálico se oxida mais facilmente que o PCA; uma maior afinidade dos transportadores por PCA, reduzindo sua concentração intracelular e, com isso, sua

disponibilidade para a conversão em ácido gálico; ou uma atividade enzimática maior de QuiC do que de PobA*. No último ensaio realizado, quando foram comparadas as linhagens S-JAQP e Gal1-JAQP, as medições das concentrações intra e extracelulares de GA e PCA em Gal1-JAQP revelaram que há pouca presença desses compostos intracelularmente, indicando que, para ambas as moléculas, a secreção para o meio extracelular é alta (FIGURA 17).

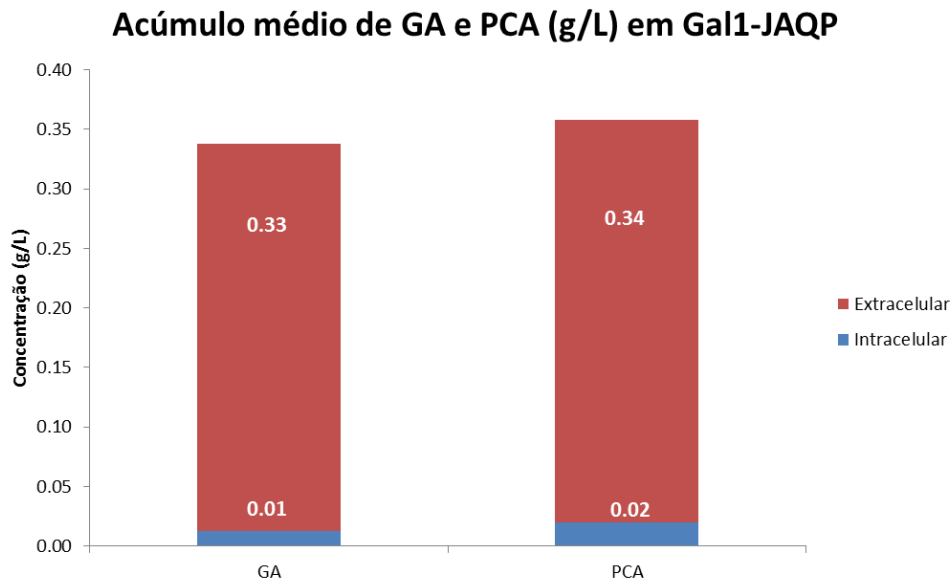


Figura 17 – Quantificação intracelular e extracelular de GA e PCA após ensaio de 72h com a linhagem Gal1 contendo o plasmídeo JAQP.

Fonte: Autoria própria.

Futuros trabalhos poderão testar as outras hipóteses, de forma a possibilitar novos desenvolvimentos capazes de aumentar o acúmulo de ácido gálico no meio.

Quando comparamos os outros resultados gerais deste último ensaio notamos que os compostos são produzidos somente na linhagem Gal1, revelando então que a sua produção em *P. putida* não seria possível sem que as deleções fossem feitas (FIGURA 18).

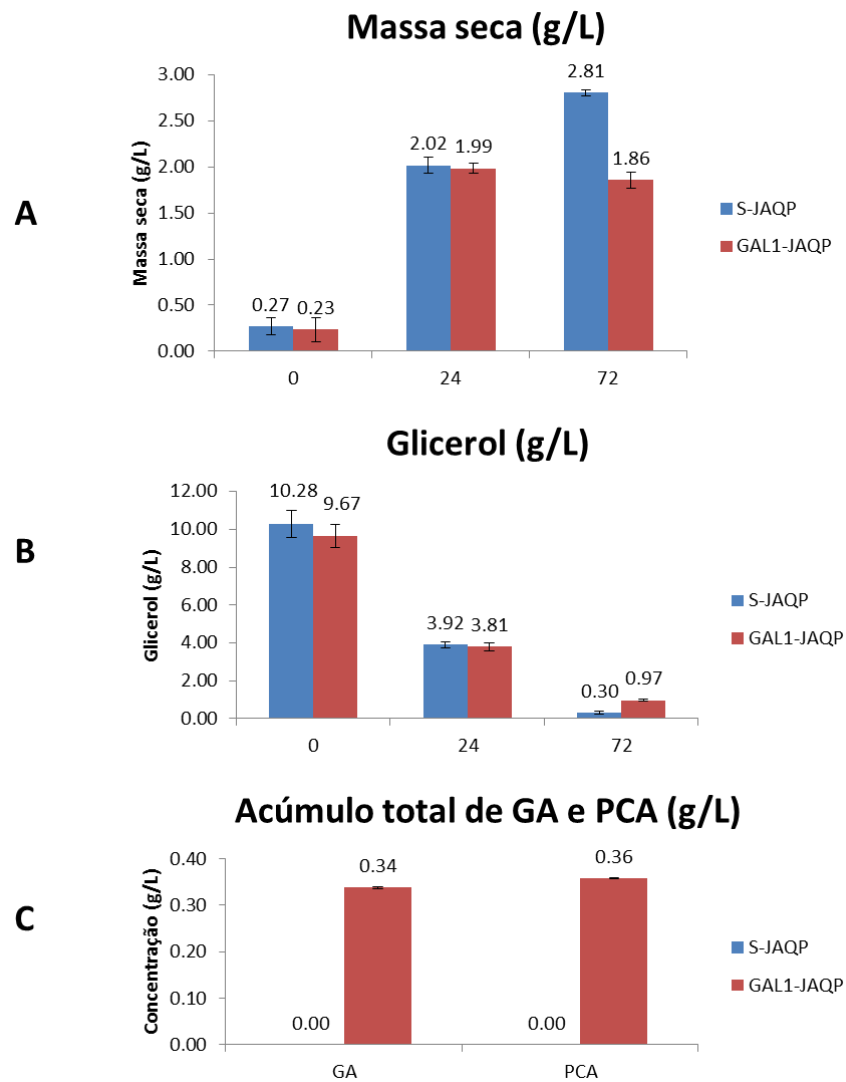


Figura 18 – Quantificação de massa seca (A), glicerol (B), ácido gálico (GA) e PCA (C) após ensaio de 72h com as linhagens Gal1 e S contendo o plasmídeo JAQP. A concentração de GA e PCA corresponde à soma das concentrações intra e extracelulares.

Fonte: Autoria própria.

Vale destacar, também, a manutenção do padrão de crescimento já observado para a linhagem Gal1-JAQP, a qual deixa de crescer após a indução, apesar de manter o consumo de glicerol.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que, a partir do mapeamento de todas as reações disponíveis no metabolismo da célula de interesse e do levantamento das possíveis rotas que podem ser inseridas sinteticamente pela expressão de genes heterólogos, testes *in silico* são capazes de apontar quais genes devem ser expressos na célula, reduzindo, com isso, a quantidade de construções a serem testadas. Além disso, com o uso de técnicas de edição genômica e construção de plasmídeos contendo operons sintéticos com mutações sítio-dirigidas é possível reverter o metabolismo do organismo, fazendo com que ele passe de consumidor a produtor de uma dada molécula de interesse. Vale descartar que a inclusão do gene mutante *aroG4* foi essencial para garantir que a via do ácido chiquímico não fosse inibida pela presença de fenilalanina na célula, de forma a direcionar a E4P e o PEP para a produção de DHS, precursor metabólico necessário às reações exercidas pela via sintética introduzida. Com tudo isso, conseguimos resumir as principais descobertas realizadas por este trabalho conforme o esquema geral da Figura 19.

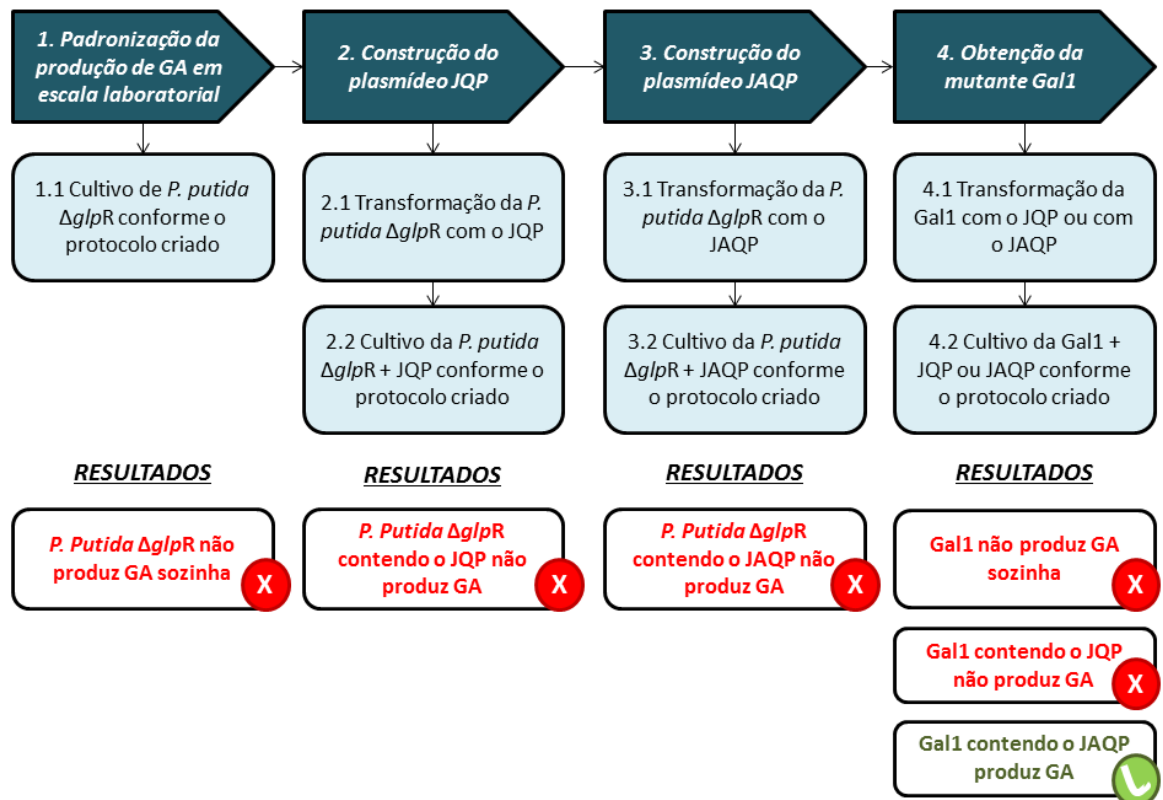


Figura 19 – Esquema geral dos testes realizados por esse estudo e seus resultados. O termo “sozinha” nos resultados obtidos nas etapas 1. e 4. Refere-se ao fato da linhagem ter sido cultivada com o plasmídeo vazio (J0), ou seja, sem qualquer um dos genes heterólogos de interesse.

Ao adotar o ácido gálico como um composto aromático modelo foi possível fazer com que a *Pseudomonas putida* o produzisse a partir de glicerol, por meio de ferramentas de Biologia de Sistemas e Engenharia Metabólica, tornando tal resultado uma prova de conceito capaz de revelar o potencial desta espécie como plataforma para a produção de uma série de outros compostos aromáticos.

Além dos testes necessários para se avaliar os motivos por trás do maior acúmulo de PCA quando comparado com a molécula alvo, outro importante desdobramento desse projeto envolve estudos de acúmulo em biorreatores, definindo-se os parâmetros necessários para a obtenção de ganhos de escala que poderiam levar a uma utilização dessa linhagem em modelos industriais. Tais experimentos poderiam gerar novos dados sobre o metabolismo da bactéria durante a produção, levando a novas modelagens que otimizariam ainda mais o acúmulo do composto no meio, dando início a mais um ciclo de estudos dentro do conceito de Biologia de Sistemas. Por fim, o desenvolvimento de construções que substituam o promotor utilizado por promotores que naturalmente expressem o operon sintético no início da fase

estacionária da célula pode levar a ganhos de escala por eliminar a necessidade de indução por L-arabinose. Somado a isso, a inserção desses novos operons no genoma da bactéria poderia levar a um ganho ainda maior por excluir a aplicação de gentamicina, utilizada para garantir a não proliferação de células que tenham perdido o plasmídeo ao longo do crescimento.

Por último, esse desenvolvimento caracteriza invenções nunca antes descritas na literatura, dando início a uma nova linha de pesquisa com grande potencial de proteção à propriedade intelectual. Devido a isso, já foi dada entrada ao processo de obtenção de patente junto à Agência USP de Inovação (201890232), visando à proteção da linhagem mutante obtida, do plasmídeo desenvolvido e do método de cultivo padronizado. Espera-se que, com isso, seja possível fazer com que as tecnologias geradas possam ser transferidas para a indústria, contribuindo com a criação de biorrefinarias que utilizem o glicerol bruto gerado nas usinas de biodiesel em um processo de produção sustentável de ácido gálico no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR *et al.* Gallic Acid Production with Mouldy Polyurethane Particles Obtained from Solid State Culture of *Aspergillus niger* GH1. **Appl Biochem Biotechnol**, Alemanha, n.176, p.1131–1140, 2015.
- AKASH *et al.* A comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. **Int J Pharm Sci Rev Res**, Holanda, n.22, p.109–115, 2013.
- APARICIO *et al.* The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. **Nucleic acids research**, Reino Unido, v.D1, n.41, p.D666-D675, 2012.
- AVERESCH, N. J. H.; KRÖMER, J. O. Tailoring strain construction strategies for muconic acid production in *S. cerevisiae* and *E. coli*. **Metab. Eng. Commun**, Holanda, n.1, p.19-28, 2014.
- BADHANI, B.; KAKKAR, R.; SHARMA, N. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Adv**, Reino Unido, n.5, p.27540–27557, 2015.
- BARBE, *et al.* The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. **Environmental microbiology**, Estados Unidos, v.10, n.18, p.3403–3424, 2016.
- BECER, C. R.; ISIKGOR, F. H. Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polym Chem**, Reino Unido, n.6, p.4497-4559, 2015.
- BORLEE *et al.* Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. **Nature protocols**, Reino Unido, v.11, n.10, p.1820, 2015.

BRIEDJLAL *et al.* Improved p-hydroxybenzoate production by engineered *Pseudomonas putida* S12 by using a mixed-substrate feeding strategy. **Appl Microbiol Biot**, Estados Unidos, n.90, p.885–893, 2011.

BUI *et al.* **Methods for producing isomers of muconic acid and muconate salts**. U.S. Patent, Estados Unidos, n.8809583, p.1, 2014.

CANALES *et al.* Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the gal cluster from *Pseudomonas putida*. **Molecular microbiology**, Estados Unidos, v.2, n.79, p.359-374, 2011.

CARLE *et al.* Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, Estados Unidos, v.14, n.72, p.4360-4367, 2004.

CARPITA, N. C.; MCCANN, M. C. Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. **Journal of experimental botany**, Reino Unido, v.14, n.66, p.4109-4118, 2015.

CHAKRABORTY *et al.* Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends Food Sci Technol**, Holanda, n.53, p.60-74, 2016.

CHATTIPAKORN *et al.* Pharmacological properties of protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine. **Evidence-Based Complementary Altern Med**, Egipto, n.2015, p.1-11, 2015.

CHAVARRÍA *et al.* From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical. **Current opinion in chemical biology**, Holanda, n.34, p.20-29, 2016.

CHAVARRÍA *et al.* *Pseudomonas putida* KT2440 metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhoefer-Parnas and Pentose

Phosphate Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos, v.43, n.290, p.25920–25932, 2015.

CHEN *et al.* Systems metabolic engineering of microorganisms to achieve large-scale production of flavonoid scaffolds. **J. Biotechnol, Holanda**, n.188, p.72–80, 2014.

COULSON. A.R.; SANGER, F. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J. Mol. Biol.**, n. 94, vol. 3, p. 441–8, 1975.

DANDEKAR *et al.* Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). **Plant Mol. Biol**, Alemanha, n.75, p.555–565, 2011.

DEBABOV, V. G. Modern approaches to the creation of industrial microorganism strains. **Russian Journal of Genetics**, Rússia, n.51, p.365-376, 2015.

DIAS, F. M.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Exploring the Microbial Production of Aromatic Fine Chemicals to Overcome the Barriers of Traditional Methods. **Advances in Applied Science Research**, 2017, v. 8, n.1, p. 94-109, 2017.

DOROSHENKO *et al.* Pho regulon promoter-mediated transcription of the key pathway gene *aroG* improves the performance of an l-phenylalanine-producing *Escherichia coli* strain. **Applied microbiology and biotechnology**, Estados Unidos, v.6, n.88, p.1287-1295, 2010.

DRATHS *et al.* Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: replacing natural product isolation with microbial catalysis. **J. Am. Chem. Soc**, Estados Unidos, n.122, p.9042–9043, 2000.

ERLICH *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Estados Unidos, v.4839, n.239, p.487–491, 1988.

EUGENE, S. K.; LUC, G. V.; NGUYEN, M. T. **General and theoretical aspects of phenols. Em: The Chemistry of Phenols**. 2. ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, 2004. 1694p.

FERREIRA *et al.* Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chem**, Holanda, n.173, p.501-513, 2015.

FUKUDA *et al.* Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. **J Bacteriol.**, Estados Unidos, v.13, n.192, p.3394-3405, 2010.

GAO *et al.* Crude glycerol as feedstock for the sustainable production of p-hydroxybenzoate by *Pseudomonas putida* S12. **N. Biotechnol**, Reino Unido, v.1, n.31, p.114-119, 2014.

GOMEZ *et al.* Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **Int J Biol Macromol**, Holanda, n.71, p.2-7, 2014.

GONI-MORENO *et al.* The glycerol-dependent metabolic persistence of *Pseudomonas putida* KT2440 reflects the regulatory logic of the GlpR repressor. **MBio**, Estados Unidos, v.12, n.6, p.e00340-15, 2015.

INDIAMART. Gallic acid. Disponível em: <<http://bit.ly/2tpXtTq>> Acesso em: 22 jul. 2017

JEONG *et al.* One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. **Applied and environmental microbiology**, Estados Unidos, v.15, n.78, p.5440-5443, 2012.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>> Acesso em: 23 jul. 2017

KIM *et al.* Application of systems biology for bioprocess development. **Trends in Biotechnology**, Holanda, v.8, n.26, p.404-412, 2008.

KIM, U. K.; LEE, S. Y. Systems strategies for developing industrial microbial strains. **Nature Biotech**, Reino Unido, v.10, n.33, p.1061-1072, 2015.

KIM, U. K.; LEE, S. Y. Systems strategies for developing industrial microbial strains. **Nature Biotech**, Reino Unido, v.10, n.33, p.1061-1072, 2015.

KOSURU, R.Y *et al.* Revealing the dual role of gallic acid in modulating ampicillin sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Future Microbiology**, Reino Unido. v. 13, n.3, 2018.

LIDON *et al.* The fall of oil prices and the effects on biofuels. **Trends Biotechnol**, Holanda, n.34, p.3-6, 2016.

LOESCHCKE, A.; THIES, S. *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. **Applied microbiology and biotechnology**, Alemanha, v.15, n.99, p.6197-6214, 2015.

LOPES, M. S. G. Engineering biological systems toward a sustainable bioeconomy. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, Holanda, n.42, p.813–838, 2015.

MATTANOVICH *et al.* Old obstacles and new horizons for microbial chemical production. **Curr. Opin. Biotechnol**, Holanda, n.30, p.101–106, 2014.

MCKENNA *et al.* Rational engineering of a novel pathway for producing the aromatic compounds p-hydroxybenzoate, protocatechuate, and catechol in *Escherichia coli*. **Process Biochem**, Holanda, n.49, p.1843–1850, 2014.

MONTERO *et al.* METATOOL: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, Reino Unido, v.3, n.15, p.251-257, 1999.

MYERS, R. L. The 100 most important chemical compounds. Estados Unidos: Greenwood Press, 2007. 326p.

RAMSAY, B. A. *et al.* Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Appl Environ Microbiol** n. 56, p. 2093–2098. 1990.

ROCKE, A.J. **Kekulé's Benzene Theory and the Appraisal of Scientific Theories. Em:** DONOVAN, A.; LAUDAN, L.; LAUDAN, R. *Scrutinizing Science. Synthese Library (Studies in Epistemology, Logic, Methodology, and Philosophy of Science)*, v. 193. Dordrecht: Springer, 1988.

RUIJSSENAARS, H. J.; MEIJNEN, J. P.; WINDE, J. H. Establishment of oxidative D-xylose metabolism in *Pseudomonas putida* S12. **Appl Environ Microbiol**, Estados Unidos, n.75, p.2784–2791, 2009.

SANDERS, J.; HAVEREN, J. V.; SCOTT, E. L. Bulk chemicals from biomass. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Estados Unidos, v.2, n.1, p.41-57, 2008.

SRIENC, F.; TRINH, C. T.; WLASCHIN, A. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. **Applied microbiology and biotechnology**, Estados Unidos, v.5, n.81, p.813-826, 2009.

STEVENS, P. The shale gas revolution: developments and changes. Disponível em: <<http://bit.ly/2gSWmJX>> Acesso em: 22 jul. 2017

STOCKER, T. **Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Estados Unidos: Cambridge University Press, 2014. 1552p.

THE PSEUDOMONAS GENOMA DATABASE. **Home**. Disponível em: <Pseudomonas.com> Acesso em: 23 jul. 2017

WAGH, S. A. **Bioconversion of tannic acid to gallic acid by using fungal tannase**. 2010. 160f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - University of Pune, Índia, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Disponível em: <<https://bit.ly/1hV6O7E>> Acesso em: 17 nov. 2018.

ZEIGER, E.; TAIZ, L. **Metabólitos secundários e defesa vegetal. Em:** ZEIGER, E.; TAIZ, L. *Fisiologia Vegetal*. 4. ed. Brasil: Artmed, 2009. 1338p.

GLOSSÁRIO

Biorrefinaria: modelo industrial a partir do qual uma determinada fonte de biomassa é utilizada para a obtenção de diversos produtos tais como combustíveis e substâncias químicas de aplicação industrial.

Braços de homologia: sequências gênicas utilizadas para compor um *template* de recombinação, no qual cada braço possui uma sequência de nucleotídeos idêntica a uma determinada região no genoma com a qual ele deverá se parear.

Compostos aromáticos: moléculas orgânicas que possuem uma configuração na qual há trocas de elétrons entre alguns de seus átomos de forma cíclica, alternando entre ligações duplas e simples. Em sua maioria, tal configuração é dada pela presença de um radical benzeno, no qual os elétrons são compartilhados entre seis átomos de carbono ligados entre si na forma de anel.

Conjugação: técnica por meio da qual uma bactéria transfere um cromossomo unifilamentar à outra bactéria por meio da projeção de apêndices proteicos denominados pili.

Deleção gênica: consiste em retirar do genoma de uma célula uma determinada sequência correspondente a um ou mais genes. Como resultado desse procedimento a célula deixa de expressar permanentemente o fenótipo existente na presença do(s) gene(s) que estava(m) presente(s).

Edição genômica: procedimento por meio do qual modificações no genoma da célula são feitas, podendo ser mutações pontuais, deleções ou inserções de novas sequências.

Expressão constitutiva: considera-se uma expressão gênica constitutiva aquela que não precisa de indutores de expressão para ocorrer.

Expressão gênica: manifestação fenotípica de um determinado genótipo por conta da transcrição e tradução do(s) gene(s) relacionado(s) a ele.

Genes heterólogos: são genes de outras espécies expressos em uma determinada célula, podendo estar inseridos no genoma dessa célula ou em plasmídeos.

Indutores de expressão: são substâncias que induzem a expressão de um determinado gene ou conjunto de genes que fazem parte de um mesmo operon.

Material lignocelulósico: composição da biomassa vegetal, contendo lignina, celulose e hemicelulose como principais componentes.

Operon: configuração gênica na qual um conjunto de genes em sequência é transcrito ao mesmo tempo por estarem sob ação de um mesmo promotor.

Origem de replicação: região do cromossomo onde se ligam as proteínas que darão início à replicação do DNA.

Plasmídeos: são pequenos cromossomos bacterianos circulares que tem sido historicamente utilizados em aplicações biotecnológicas para a expressão de genes heterólogos em diversos tipos de células.

Promotor: região do DNA que se liga às proteínas responsáveis pela transcrição de um determinado gene ou de um operon.

Recalcitrância: denomina-se recalcitrância a alta estabilidade de algumas moléculas, tornando-as difíceis de serem quebradas em moléculas menores por ações químicas ou físicas.

Sequência de Shine-Dalgarno: sequência presente nos genes e que se mantém no RNA mensageiro resultante da transcrição destes, sendo o local de inserção desse RNA no ribossomo durante o processo de tradução.

Template de recombinação: sequência gênica formada pela junção de braços homólogos dispostos um ao lado do outro, os quais possuem sequências de nucleotídeos idênticas a determinadas regiões no genoma com as quais deverão se parear.

APÊNDICE A – Dados para estudo *in silico*

1. Arquivo de entrada para o Metatool:

Produção de GA em *P. putida* KT2440
 #
 #
 #
 #
 -ENZREV
 EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10 AS3 AS4 AS6 GA_SINT3
 GA_SINT4 GA_SINT5 GA_SINT6

-ENZIRREV
 GLN3 EMP10 GLN3 ED1 ED2 VP1 VP5 GLY1 GLY2 AS1 AS2 GA_SINT1 GA_SINT2 AS5 AS7 CK1
 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8 CPD OXNAD OXFAD PNTAB SDH AD1 AD2 UQR

-METINT
 G6P PG6 KDPG2 Rb15P Rb5P X5P S7P E4P F6P F16P DHP G3P BPG13 PG3 PG2 PEP snG3P DHAP
 DHQ DHS PCA SHI S3P EPSP CHO 4HB 3HB NADP NADPH NAD NADH PIR CoASH AcCoa Oxa Cit
 IsoCit aCeto SucCoa Suc Fuma Mal FAD FADH2 ADP ATP UQ UQH

-METEXT
 Glyext CO2 O GA

-CAT
 GLY1 : Glyext + ATP = snG3P + ADP .
 GLY2 : snG3P + UQ = DHP + UQH .
 GLN3 : F16P + ADP = F6P + ATP .
 EMP2 : G6P = F6P .
 EMP4 : F16P = G3P + DHP .
 EMP5 : DHP = G3P .
 EMP6 : G3P + NAD = BPG13 + NADH .
 EMP7 : BPG13 + ADP = PG3 + ATP .
 EMP8 : PG3 = PG2 .
 EMP9 : PG2 = PEP .
 EMP10 : PEP + ADP = PIR + ATP .
 ED1 : PG6 = KDPG2 .
 ED2 : KDPG2 = PIR + G3P .
 VP1 : G6P + NADP = PG6 + NADPH .

VP5 : $PG6 + NADP = NADPH + Rb15P + CO2$.
 VP6 : $Rb15P = Rb5P$.
 VP7 : $Rb15P = X5P$.
 VP8 : $Rb5P + X5P = S7P + G3P$.
 VP9 : $G3P + S7P = E4P + F6P$.
 VP10 : $X5P + E4P = F6P + G3P$.
 AS1 : $E4P + PEP = DHAP$.
 AS2 : $DHAP = DHQ$.
 AS3 : $DHQ = DHS$.
 GA_SINT1 : $DHS = PCA$.
 GA_SINT2 : $PCA + NADPH + O = GA + NADP$.
 AS4 : $DHS + NADPH = SHI + NADP$.
 AS5 : $SHI + ATP = S3P + ADP$.
 AS6 : $S3P + PEP = EPSP$.
 AS7 : $EPSP = CHO$.
 GA_SINT3 : $CHO = PIR + 4HB$.
 GA_SINT4 : $CHO = PIR + 3HB$.
 GA_SINT5 : $4HB + O + NADPH = PCA + NADP$.
 GA_SINT6 : $3HB + O + NADPH = PCA + NADP$.
 CPD : $PIR + NAD + CoASH = AcCoa + NADH + CO2$.
 CK1 : $AcCoa + Oxa = CoASH + Cit$.
 CK2 : $Cit = IsoCit$.
 CK3 : $IsoCit + NADP = aCeto + NADPH + CO2$.
 CK4 : $CoASH + aCeto + NAD = NADH + CO2 + SucCoa$.
 CK5 : $SucCoa + ADP = CoASH + Suc + ATP$.
 CK6 : $Suc + FAD = FADH2 + Fuma$.
 CK7 : $Fuma = Mal$.
 CK8 : $Mal + NAD = Oxa + NADH$.
 OXNAD : $NADH + 3 ADP + O = NAD + 3 ATP$.
 OXFAD : $FADH2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP$.
 UQR : $UQH = UQ$.
 SDH : $NADPH + NAD = NADP + NADH$.
 PNTAB : $NADH + ATP + NADP = NAD + ADP + NADPH$.
 AD1 : $PIR + CO2 + ATP = Oxa + ADP$.
 AD2 : $Oxa + ATP = PEP + ADP + CO2$.

2. Modos elementares resultantes da análise:

- 1: no net transformation of external metabolites
- 2: no net transformation of external metabolites

- 3: Glyext + 6 O = 3 CO₂
- 4: Glyext + 6 O = 3 CO₂
- 5: 2.95238 Glyext + 3.71429 O = 1.85714 CO₂ + GA
- 6: 2.95238 Glyext + 3.71429 O = 1.85714 CO₂ + GA
- 7: 3.33333 Glyext + 6 O = 3 CO₂ + GA
- 8: 3.33333 Glyext + 6 O = 3 CO₂ + GA
- 9: 4.22222 Glyext + 3.33333 O = CO₂ + 1.66667 GA
- 10: 4.22222 Glyext + 3.33333 O = CO₂ + 1.66667 GA
- 11: Glyext + 6 O = 3 CO₂
- 12: 2.88889 Glyext + 3.33333 O = 1.66667 CO₂ + GA
- 13: 2.88889 Glyext + 3.33333 O = 1.66667 CO₂ + GA
- 14: 3 Glyext + 4 O = 2 CO₂ + GA
- 15: 3 Glyext + 4 O = 2 CO₂ + GA
- 16: 2.88235 Glyext + 3.29412 O = 1.64706 CO₂ + GA
- 17: 2.88235 Glyext + 3.29412 O = 1.64706 CO₂ + GA
- 18: 2.92857 Glyext + 3.57143 O = 1.78571 CO₂ + GA
- 19: 2.92857 Glyext + 3.57143 O = 1.78571 CO₂ + GA
- 20: 3.5 Glyext + 7 O = 3.5 CO₂ + GA
- 21: 3.5 Glyext + 7 O = 3.5 CO₂ + GA
- 22: 4 Glyext + 10 O = 5 CO₂ + GA
- 23: 4 Glyext + 10 O = 5 CO₂ + GA
- 24: 9.66667 Glyext + 6 O = CO₂ + 4 GA
- 25: 5 Glyext + 4 O = CO₂ + 2 GA
- 26: 3 Glyext + 5 O = 2 CO₂ + GA
- 27: 2.72222 Glyext + 2.66667 O = 1.16667 CO₂ + GA
- 28: 2.72222 Glyext + 2.66667 O = 1.16667 CO₂ + GA
- 29: 5 Glyext + 3.63636 O = CO₂ + 2 GA
- 30: 5 Glyext + 3.63636 O = CO₂ + 2 GA
- 31: Glyext + 6 O = 3 CO₂
- 32: Glyext + 6 O = 3 CO₂
- 33: 3.06061 Glyext + 4.36364 O = 2.18182 CO₂ + GA
- 34: 3.06061 Glyext + 4.36364 O = 2.18182 CO₂ + GA
- 35: 3.11111 Glyext + 4.66667 O = 2.33333 CO₂ + GA
- 36: 3.11111 Glyext + 4.66667 O = 2.33333 CO₂ + GA
- 37: 3.03333 Glyext + 4.2 O = 2.1 CO₂ + GA
- 38: 3.03333 Glyext + 4.2 O = 2.1 CO₂ + GA
- 39: 6.03704 Glyext + 4.44444 O = CO₂ + 2.44444 GA
- 40: 3.13333 Glyext + 3.2 O = CO₂ + 1.2 GA
- 41: 5 Glyext + 4 O = CO₂ + 2 GA
- 42: 8.11111 Glyext + 5.33333 O = CO₂ + 3.33333 GA

- 43: $2.66667 \text{ Glyext} + 2.66667 \text{ O} = 1 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
44: $2.66667 \text{ Glyext} + 2.66667 \text{ O} = 1 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
45: $\text{Glyext} + 6 \text{ O} = 3 \text{ CO}_2$
46: $3.11111 \text{ Glyext} + 4.66667 \text{ O} = 2.33333 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
47: $3.11111 \text{ Glyext} + 4.66667 \text{ O} = 2.33333 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
48: $3 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
49: $3 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
50: $3 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
51: $3 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
52: $3.11111 \text{ Glyext} + 4.66667 \text{ O} = 2.33333 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
53: $3.11111 \text{ Glyext} + 4.66667 \text{ O} = 2.33333 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
54: $3.11111 \text{ Glyext} + 4.66667 \text{ O} = 2.33333 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
55: $3.11111 \text{ Glyext} + 4.66667 \text{ O} = 2.33333 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
56: $8.11111 \text{ Glyext} + 5.33333 \text{ O} = \text{CO}_2 + 3.33333 \text{ GA}$
57: $3.13333 \text{ Glyext} + 3.2 \text{ O} = \text{CO}_2 + 1.2 \text{ GA}$
58: $5 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = \text{CO}_2 + 2 \text{ GA}$
59: $3 \text{ Glyext} + 5 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
60: $3 \text{ Glyext} + 5 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
61: $3 \text{ Glyext} + 5 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
62: $3.13333 \text{ Glyext} + 3.2 \text{ O} = \text{CO}_2 + 1.2 \text{ GA}$
63: $5 \text{ Glyext} + 3.69231 \text{ O} = \text{CO}_2 + 2 \text{ GA}$
64: $5 \text{ Glyext} + 3.69231 \text{ O} = \text{CO}_2 + 2 \text{ GA}$
65: $3 \text{ Glyext} + 4.22222 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
66: $3 \text{ Glyext} + 4.22222 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
67: $5.33333 \text{ Glyext} + 18 \text{ O} = 9 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
68: $5.33333 \text{ Glyext} + 18 \text{ O} = 9 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
69: $3.33333 \text{ Glyext} + 7 \text{ O} = 3 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
70: $8.11111 \text{ Glyext} + 5.33333 \text{ O} = \text{CO}_2 + 3.33333 \text{ GA}$
71: $\text{Glyext} + 6 \text{ O} = 3 \text{ CO}_2$
72: $3 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
73: $3 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
74: $4.5 \text{ Glyext} + 13 \text{ O} = 6.5 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
75: $4.5 \text{ Glyext} + 13 \text{ O} = 6.5 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
76: $5 \text{ Glyext} + 4 \text{ O} = \text{CO}_2 + 2 \text{ GA}$
77: $3 \text{ Glyext} + 5 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
78: $\text{Glyext} + 6 \text{ O} = 3 \text{ CO}_2$
79: $3.33333 \text{ Glyext} + 6 \text{ O} = 3 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
80: $3.33333 \text{ Glyext} + 6 \text{ O} = 3 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
81: $3 \text{ Glyext} + 5 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$
82: $3 \text{ Glyext} + 5 \text{ O} = 2 \text{ CO}_2 + \text{GA}$

APÊNDICE B – Iniciadores utilizados

1. Iniciadores para a clonagem de genes:

<i>quiC</i> fwd	CCCATAGAATTCAGGAGGAAAAACATATGAATACATTACGTTTAACTACTC TTGCATTAGG
<i>quiC</i> rev	TCCTTACCCGGGTTATTTAGTTTGTACGGCCGAAC TAAGTTCAGAC
<i>pobA*</i> fwd	CCATAACCCGGGAGGAGGAAAAACATATGAAGACTCAAGTCGCCATCATC GGCGC
<i>pobA*</i> rev	CGGCGTACTAGTTCATTTCGACGGCCTCGTAGGGCAGTCCCACGAAGTTCTCG CCTGCAGGTCGACTCTAGAGACTAGTAGGAGGAAAAACATATGAATTATCA GAACGACG
<i>aroG4</i> H1 fwd	CGAGATATTGTAGGGTGATCATATCGAG
<i>aroG4</i> H1 rev	GATCACCTACAATATCTCGCTGACCTGATGAGC
<i>aroG4</i> H2 fwd	ATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAGCTCTTACCCGCGACGCGCTTT
<i>aroG4</i> H2 rev	

2. Iniciadores para a construção de *templates* de recombinação:

<i>galTAPR</i> H1 fwd	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGTCATGCCAGGTTCTCCGTC
<i>galTAPR</i> H1 rev	ACCACGCATGGATCATAAAGGGCTCCCGG
<i>galTAPR</i> H2 fwd	CCTTATGATCCATGCGTGGTCACCTTTG
<i>galTAPR</i> H2 rev	ATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCAGGTACGCCATGGCAG
<i>pcaHG</i> H1 fwd	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGGAAGTGCCATGGGTGAAG
<i>pcaHG</i> H1 rev	CTTCACCTCACATGCCGGTTTCTCTCTTG
<i>pcaHG</i> H2 fwd	AACCGGCATGTGAGGTGAAGCTTGGGGC
<i>pcaHG</i> H2 rev	ATTCGAGCTCGGTACCCGGGACGATTTCCCCATTGCCAG

3. Iniciadores para a validação das deleções por PCR:

<i>galTAPR</i> teste fwd	GAAGATTCTAGAATAGTGGATCAGCCCACGCC
<i>galTAPR</i> teste rev	GCCTTAGAATTCCCCGGCGCAATTCACACC
<i>pcaHG</i> teste fwd	GGTCTCACTTGGTCCCTGTT
<i>pcaHG</i> teste rev	CGAGAAGCACAAGGCAATCCT

4. Iniciadores para o sequenciamento dos plasmídeos de expressão:

JQP_f1	CGTCACACTTTGCTATGC
JQP_f2	ATCGCTTCTGTATTGGGG

JQP_f3	TGGTTCATGTGTACCAGATC
JQP_f4	ACAACGTGATCCTCGAAC
JQP_f5	TTCGCCCTGTGCAGC
JQP_r1	CGTTGTAAAACGACGGCC
JQP_r2	TCGTCCGACCAGTCCTC
JQP_r3	TGTTCCAGCACCCCG
JQP_r4	TGCAGGCACAGCAAATACA
JQP_r5	AAGGTTATTGCTTGAACGG
AroG Fwd1	CCTGACGCTTTTTATCGCAAC
AroG Fwd2	GTGAGTTTCTCGATATGATCACC
AroG Fwd3	GAGCCTCGAGAGCGGGGA
AroG Rev1	GGCTTGTTCAATTGCCCA
AroG Rev2	CGCGCAGAATGATATGGC
AroG Rev3	CCGCGACAGGATCATGAATT

5. Iniciadores para o sequenciamento das regiões deletadas:

galTAPR 1	ACAAAGTCGGCGGAATGTGC
galTAPR teste rev	GCCTTAGAATTCCCCGGCGCAATTCACACC
PD 1	CATCGACCACGTTGTCGCT
PD 2	GCAACCCGAAACGCTGG