HENRIQUE DA COSTA OLIVEIRA

**IMPACTO DA INATIVAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À SÍNTESE DE
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO (LACTATO E ACETATO) NA PRODUÇÃO DE 1,3-
PROPANODIOL EM LINHAGENS DE *Escherichia coli* RECOMBINANTES**

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

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

OLIVEIRA, H. C. **Impacto da inativação de genes relacionados à síntese de produtos de fermentação (lactato e acetato) na produção de 1,3-propanodiol em linhagens de *Escherichia coli* recombinantes.** 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Este projeto teve como objetivo a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) utilizando glicerol como matéria prima, que pode ser proveniente da indústria de biodiesel. O 1,3-PDO é um produto de interesse na indústria biotecnológica, como precursor para diversos processos. Sua maior aplicação é na produção do bioplástico Politrimetileno Tereftalato (PTT), um termoplástico reciclável não biodegradável com qualidades superiores a do Polietileno Tereftalato (PET). Atualmente, o 1,3-PDO é produzido principalmente por síntese química, utilizando derivados do petróleo, mas a alternativa por microrganismos é vantajosa, pois gera menor emissão de poluentes, usa recursos renováveis e tem menor custo de produção. As bactérias apresentadas nesse trabalho são *Escherichia coli* recombinantes com genes da bactéria naturalmente produtora de 1,3-PDO *Klebsiella pneumoniae*. Analisando os dados da literatura, as Análises de Balanço de Fluxo (FBA) e dados experimentais, este projeto teve como objetivo eliminar total ou parcialmente os subprodutos lactato e acetato de *E. coli* recombinantes e analisar o impacto no metabolismo da bactéria e na produção de 1,3-PDO. Também foi o objetivo analisar o papel do gene *yqhD* na produção, combinando as mutações que produziam mais com as já obtidas, num esforço de melhorar o processo de produção estabelecido. Foram obtidas 4 linhagens da *E. coli* modificadas geneticamente, nas quais os seguintes genes foram alvos de estudo: *ackA*, *ldhA*, *poxB*, *pta* e *yqhD*. Também foram feitas combinações destas linhagens com uma cepa de *E. coli* já obtida com mutação na enzima Isocitrato Desidrogenase, na qual a especificidade por coenzimas foi alterada (NADP⁺ para NAD⁺), o que gerou mais 6 linhagens para estudo. Todos os genes propostos foram deletados e as linhagens tiveram a produção analisada. Com base em resultados preliminares foram construídas novas linhagens combinando as modificações, e todas tiveram a produção testada. A melhor das linhagens foi uma *E. coli* *icd*^{NAD⁺} Δ *yqhD*, cultivada em biorreator. Foram observados aumentos no fator de conversão (até 0,489 mol^{PDO}/mol^{glicérol}) e produtividade (até 0,312g^{PDO}.L⁻¹.h⁻¹). Mutantes derivadas desta, para produzir menos acetato, foram construídas e cultivadas em biorreator. Na tentativa de criar uma linhagem com potencial de ser usada na indústria, um gene essencial foi clonado no plasmídeo de produção, na tentativa de resolver problemas de larga escala. Esse novo plasmídeo, quando usado em uma linhagem específica, elimina a necessidade de usar antibiótico no meio e mantém o elevado número de cópias dos genes de interesse. Novos incrementos poderão ser obtidos explorando diferentes condições de oferta de oxigênio. Os objetivos iniciais foram alcançados: construir linhagens mais produtivas de 1,3-PDO e começar a estudar os efeitos da eliminação de genes responsáveis por alguns subprodutos na produção. Os resultados aqui obtidos ainda puderam indicar a importância de alguns genes, e agora perguntas mais específicas podem ser feitas, bem como hipóteses testadas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. 1,3-propanodiol. Glicerol. *yqhD*. Acetato.

ABSTRACT

OLIVEIRA, H. C. **Inactivation impact of genes related to synthesis of fermentation products (lactate and acetate) in 1,3-propanediol production in recombinant strains of *Escherichia coli***. 2017. 99 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

This project aimed at producing 1,3-propanediol (1,3-PD) using glycerol as carbon source, which can be proven from the biodiesel industry. 1,3-PD is a significant product in biotechnology as a precursor to several processes. Its main application is as monomer of the bioplastic Polytrimethylene Terephthalate (PTT), a non-biodegradable recyclable thermoplastic with superior qualities over Polyethylene Terephthalate (PET). 1,3-PD is produced mostly by chemical synthesis from petroleum derivatives. The alternative produced by microorganisms is more advantageous due to the use of renewable raw material and the lower cost of production. The bacteria presented here are recombinant strains of *Escherichia coli*, harboring genes from the natural producer of 1,3-PD, *Klebsiella pneumoniae*. Reviewing the literature, simulations of Flux Balance Analysis (FBA) and experimental observations, this project aimed at eliminating partially or completely the lactate and acetate byproducts in strains of *E. coli*, and at understanding the effects of the mutations in production and growing. We also analyzed the role of the *yqhD* gene in the production of 1,3-PD, combining the mutations that produced more 1,3-PD with each other, to improve the current production process. Four recombinant strains of *E. coli* were first obtained in a first experimentation, in which the following genes were analyzed: *ackA*, *ldhA*, *poxB*, *pta* e *yqhD*. Combinations of these strains was also made with one previously obtained *E. coli* with mutation at the Isocitrate dehydrogenase enzyme, with specificity altered by coenzymes (NAD^+ instead NADP^+), resulting in 6 more strains. All genes of interest were deleted, and the mutants had the production evaluated. Based on preliminary results, new strains were constructed combining the modifications, all tested in shake flasks. The best strain for production was an *E. coli* *icd* ^{NAD^+} Δ *yqhD*, cultivated in bioreactor. It was observed an increase in the yield (up to $0.489 \text{ mol}^{\text{PDO}}/\text{mol}^{\text{glycerol}}$) and productivity (up to $0.312 \text{ g}^{\text{PDO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Mutants lacking genes responsible for acetate formation were obtained from the best strain, in order to reduce acetate at batch. At last, in an attempt to create a strain with potential to be used in industry, an essential gene was cloned in the production plasmid, trying to solve some large-scale problems. This new plasmid used in a specific strain eliminate the use of antibiotics, and still preserve the high copy number of the genes of interest. Further improvements could be achieved by exploring different oxygen supply conditions. The initial objectives were achieved: to construct more productive strains of 1,3-PD and study the effect of the deletion of genes responsible of byproducts. Furthermore, the results obtained in this research could reveal the importance of some genes, and from here, more specific questions and hypothesis can be investigated.

Keywords: *Escherichia coli*. 1,3-propanediol. Glycerol. *yqhD*. Acetate.

1 INTRODUÇÃO

Em estudos realizados no Laboratório de Bioprodutos (FLORA, 2015), foram construídas linhagens de *Escherichia coli* contendo um plasmídeo multicópias com os genes de síntese de 1,3-Propanodiol (1,3-PDO) de *Klebsiella pneumoniae* GLC29, isolada por SILVA (2010). Os genes clonados formam uma via bioquímica que utiliza NADH para formar 1,3-PDO, e a partir de ensaios e simulações, observou-se que aumentar a disponibilidade de NADH na célula permitiria uma maior produção do 1,3-PDO. Uma forma de suprir mais desse cofator foi mudar a especificidade de enzimas de NADP^+ para NAD^+ , e a melhor linhagem obtida foi uma *E. coli* com tais modificações na Isocitrato Desidrogenase (ICDH). Esta linhagem, *E. coli* MG1655 *icd*^{NAD⁺}, entretanto, também apresenta o gene *yqhD* no cromossomo, que codifica uma enzima similar à de *K. pneumoniae*, e que utiliza NADPH para produzir 1,3-PDO, e sua presença não foi estudada no trabalho já feito. Em diversos cultivos realizados foi relatada a formação de compostos indesejados, sendo lactato e acetato os principais subprodutos nesse processo, e a taxa de conversão não aumentou tanto como se pretendia na linhagem com especificidade por coenzima modificada. Assim, a eliminação ou diminuição significativa da capacidade de produzir tais subprodutos poderia ter um impacto maior sobre a produção, sobretudo em condições de microaerobiose, em que um aumento do fluxo no ciclo de Krebs poderia compensar o ATP perdido na produção de Acetato. Seguindo esta mesma linha de pesquisa, seria interessante tentar entender a participação do gene *yqhD* no processo, e de que forma este contribui na produção. Ainda seria interessante entender o uso dos cofatores, bem como tentar aproveitar desse conhecimento para melhorar ainda mais a produção. Por último, ainda há espaço para explorar a eliminação de subprodutos para esse processo estabelecido.

CONCLUSÕES

Foram construídas e analisadas todas as linhagens propostas, bem como feito combinações das melhores delas. As técnicas de nocaute, tanto Datsenko e Wanner (2000) quanto CRISPR foram bastante eficientes, bem como a transdução com o fago P1. A metodologia foi implementada no laboratório e novas mutações devem ser feitas utilizando o material disponível. Sobre a análise das cepas obtidas foi possível ver como a produção de acetato pode ser importante para célula, pois quando retirado totalmente a via para esse subproduto, seu crescimento fica bastante comprometido. O gene *yqhD* também parece ser bastante importante no metabolismo, talvez não da forma como pensávamos, visto que a deleção deste diminui a velocidade específica de crescimento. Foi possível obter uma linhagem com eficiência de produção bastante alta e que se manteve ao longo do tempo, a linhagem de *E. coli* *icd*^{NAD⁺} Δ *yqhD*. Uma boa linhagem não produtora de acetato também foi testada no biorreator. Por último, e até o momento, foi construído um plasmídeo (pBBR1 MCS-2::*dha* + *icd*^{NAD⁺}) que pode ser de bastante interesse para a indústria, pelo fato de não depender de antibiótico quanto utilizado na linhagem *E. coli* Δ *icd*. Com base nos ensaios feitos com as linhagens mutantes, foi aberto um leque de possibilidades de melhoramento e combinações tanto para a linhagem *E. coli* *icd*^{NAD⁺} Δ *yqhD*, que teve bom cultivo em biorreator, quanto para uma *E. coli* Δ *icd*, que seria um passo mais próximo da linhagem ideal para a produção em maior escala. Embora não tenha sido feita uma análise de fluxo do metabolismo (MFA), com as observações já se pode formular melhor perguntas a serem respondidas, de uma forma mais específica, que deve se dar em trabalhos posteriores. O processo de melhor entendimento está ocorrendo, bem como a montagem de melhores linhagens.

REFERÊNCIAS*

- BIEBL, H. et al. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 289-297, 1999.
- CELÍŃSKA, E. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 519-530, 2010.
- CHANG, Y. -Y; WANG, A. -Y; CRONAN, J. E. Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (*poxB*) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*) gene. **Molecular Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1019–1028, 1994.
- CHEN, R.; GREER, A.; DEAN, A. M. A highly active decarboxylating dehydrogenase with rationally inverted coenzyme specificity. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 92, p. 11666-11670, 1995.
- CHEN, X. Z. et al. Engineering glycolysis branch pathways of *Escherichia coli* to improve heterologous protein expression. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2063–2070, 2014.
- CHEREPANOV, P.P.; WACKERNAGEL, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. **Gene**, n. 158, p. 9-14, 1995.
- CHOI, Y. J.; LEE, S. Y. Microbial production of short-chain alkanes. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 571–574, 2013.
- CIRIMINNA, R. et al. Understanding the glycerol market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 1-8, 2014.
- DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, 2000.
- DURNIN, G. et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 148–161, 2009.
- ENJALBERT, B. et al. Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

FLORA, A. B. **Detecção e clonagem de genes de biossíntese de 1,3-propanodiol a partir de glicerol em *Klebsiella pneumoniae* GLC29**. 2015. 192 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 391–396, 2005.

GONZALEZ, R. et al. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 5, p. 234–245, 2008.

GUO, X. et al. BudC knockout in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion from glycerol to 1,3-propanediol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 60, n. 6, p. 557–563, 2013.

GUYER, M. S. et al. Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 45, p. 135-140, 1981.

JIANG et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 2506 – 2514, 2015.

KANG, T. S.; KORBER, D. R.; TANAKA, T. Bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol in thin stillage-based media by engineered *Lactobacillus panis* PM1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 629–635, 2014.

KING, Z. A.; FEIST, A. M. Optimal cofactor swapping can increase the theoretical yield for chemical production in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 24, p. 117–128, 2014.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, n. 166, p. 175-176, 1995.

LAKSHMANAN, M. et al. Cofactor modification analysis: a computational framework to identify cofactor specificity engineering targets for strain improvement. **Journal of bioinformatics and computational biology**, v. 11, n. 6, p. 1-19, 2013.

LEE, C. S. et al. A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 963-972, 2015.

MA, C. et al. Relaxing the coenzyme specificity of 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* by rational design. **Journal of Biotechnology**, v. 146, n. 4, p. 173–178, 2010.

MAERVOET, V. et al. 1,3-propanediol production with *Citrobacter werkmanii* DSM17579: effect of a *dhaD* knock-out. **Microbial Cell Factories**, p. 1-11, 2014.

MOSBERG, J. A.; LAJOIE, M. J.; CHURCH, G. M. Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. **Genetics**, v. 186, n. 3, p. 791–799, 2010.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245–248, 2010.

PAKRASI, H. B. Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. **Annual review of genetics**, v. 29, p. 755–76, 1995.

PRZYSTAŁOWSKA, H.; LIPÍŃSKI, D.; SŁOMSKI, R. Biotechnological conversion of glycerol from biofuels to 1,3-propanediol using *Escherichia coli*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 1, p. 23-34, 2015.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-17, 2014.

SAXENA, R. K. et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 895-913, 2009.

SCHELLENBERGER, J. et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. **Nature Protocols**, v. 6, n. 9, p. 1290–1307, 2011.

SHIPMAN, S. L. et al. Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition. **Science**, v. 353, n. 6298, p. aaf1175, 2016.

SILVA, G. P. **Bioconversão do glicerol em 1,3-propanodiol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* GLC29**. 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

SILVA, G. P. DA et al. 1,3-Propanediol: Produção, aplicações e potencial biotecnológico. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 527–534, 2014.

SINGH, A. et al. Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 76–81, 2011.

TANG, X. et al. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1628-1634, 2009.

VAIDYANATHAN, H. et al. Glycerol conversion to 1,3-propanediol is enhanced by the expression of a heterologous alcohol dehydrogenase gene in *Lactobacillus reuteri*. **Applied Microbiology and Biotechnology express**, p. 1-8, 2011.

VEMURI, G. N. et al. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: Transcriptional regulation and effect of the redox ratio. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3653–3661, 2006.

ZHAO, L. et al. Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 3, p. 313–320, 2009.

ZHU, Y. et al. Metabolic changes in *Klebsiella oxytoca* in response to low oxidation-reduction potential, as revealed by comparative proteomic profiling integrated with flux balance analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 2833–2841, 2014.

ZHUGE, B. et al. Expression of 1,3-propanediol oxidoreductase and its isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 6, p. 2177–2184, 2010.