

RAONÍ KEMPFER PANTOJA

Cultivo de linhagem de *Pseudomonas putida* recombinante em biorreator para produção de compostos fenólicos

Texto submetido ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2021

RAONÍ KEMPFER PANTOJA

Cultivation of recombinant *Pseudomonas putida* in bioreactor for the production of phenolic compounds

Text submitted to the Postgraduate Program in Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo for the title of Master of Science.

Area of concentration: Microbiology
Advisor: Dr. Luiziana Ferreira da Silva
Corrected Version.

São Paulo

2021

RESUMO

PANTOJA, R. K. **Cultivation of recombinant *Pseudomonas putida* in bioreactor for the production of phenolic compounds**. 2021. 58 p. Dissertação (Mestrado em microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os compostos fenólicos em sua maioria apresentam alto valor econômico devido às suas múltiplas aplicações principalmente pelo seu conteúdo de atividades biológicas e químicas de interesse humano. Algumas dessas moléculas, como o ácido gálico, apresentam múltiplas aplicações terapêuticas e geralmente são obtidas a partir de extratos vegetais, portanto, seria ambientalmente correto estudar sua produção microbiana em condições controladas. Até à data, foram obtidas poucas bactérias recombinantes produtoras de fenólicos. Bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem rotas metabólicas capazes sintetizar substâncias aromáticas a partir de fontes renováveis de carbono, além de serem naturalmente resistentes a altas concentrações de compostos aromáticos, o que evidencia a possibilidade do uso de espécies como *Pseudomonas putida* para aumentar a disponibilidade de tais moléculas no mercado. Assim, o presente trabalho propõe a utilização da cepa de *P. putida* previamente modificada em nível genético por meio de técnicas de engenharia metabólica para a produção de fenólicos. Essas modificações consistiram na deleção de genes destinados ao consumo de ácido gálico e inserção ou modificação de genes da rota do chiquimato. O objetivo foi definir parâmetros de cultura para a cepa recombinante em biorreator. A produção foi avaliada em espectrofotômetro atingindo cerca de 2 g/L de cultivo em frascos agitados. A estabilidade do plasmídeo foi demonstrada em até 168 h antes de submeter a cepa a experimentos em biorreator sob condições controladas. Os ensaios do biorreator duraram até 73 h, definindo parâmetros cinéticos para esta cepa, e atingindo 0,2 g/L de produção de ácido gálico por 1,35 g de massa celular por litro que foi medida pela metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) descrita neste trabalho. Resultados indicam a viabilidade da utilização de glicerol na produção de ácido gálico nessa nova recombinante.

PALAVRAS-CHAVE: Biologia sintética. Engenharia metabólica. Glicerol. Ácido gálico.

ABSTRACT

PANTOJA, R. K. **Cultivation of recombinant *Pseudomonas putida* in bioreactor for the production of phenolic compounds**. 2021. 58 p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Phenolic compounds in their majority present high economic value due to their multiple applications mainly because of their content of biological and chemical activities of human interest. Some of these molecules, such as gallic acid, present multiple therapeutic applications and are usually obtained from plant extracts, thus there would be environmentally friendly to study their microbial production under controlled conditions. To date, a few phenolic-producing recombinants bacteria have been obtained. Bacteria of the genus *Pseudomonas* have in their metabolism routes capable of generating intermediates for the synthesis of aromatic substances from renewable carbon sources, besides being naturally resistant to high concentrations of aromatic compounds, which evidences the possibility of the use of species such as *Pseudomonas putida* to increase the availability of such molecules on the market. Thus, the present work proposes the use of *P. putida* strain previously modified at genetic level through metabolic engineering techniques leading to the production of phenolics. It was possible by deletion of genes meant to gallic acid consumption and insertion or modification of genes of shikimate route. The objective was to define culture parameters for this recombinant strain in bioreactor. The production was evaluated in spectrophotometer reaching approximately 2 g.L⁻¹ from shaken flasks cultivation. Plasmid stability was demonstrated up to 168 h before submitting this strain to bioreactor experiments under controlled conditions. Fed-batch assays were conducted for up to 73 h, defining kinetics parameters for this strain, and reaching 0.2 g.L⁻¹ production of gallic acid per 1.35 g of cell mass per liter that was measured by the High Performance Liquid Chromatography methodology described in this work. Results indicated the feasibility of using glycerol to produce gallic acid in this new recombinant.

KEY WORDS: Synthetic biology. Metabolic engineering. Glycerol. Gallic acid.