

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 corrigida.

São Paulo

2019

RESUMO

DIAS, F. M. S. **Construção de linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir compostos aromáticos por meio de vias metabólicas sintéticas**. 2019. 156 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 sua degradação de ambas as substâncias e em cujo plasmídeo de expressão foi adicionado um gene que faz com que uma das principais reações da via do ácido chiquímico não seja inibida na presença de fenilalanina, gerando os intermediários necessários.

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.** 2019. 156 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 acid and gallic acid in *P. putida*, it was possible to observe the production and release of these molecules in a strain that had the genes responsible for the degradation of both substances deleted and in whose expression plasmid was added a gene that causes one of the major reactions of the shikimic acid pathway not to be inhibited in the presence of phenylalanine, generating the necessary intermediate metabolites.

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

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) (FIGURA 1).

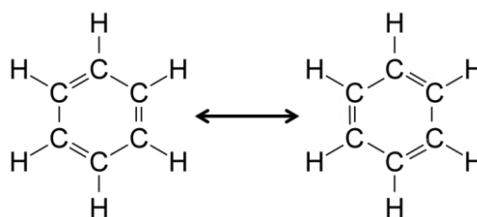


Figura 1 – Alternância de ligações duplas e simples no benzeno. Com a troca de elétrons entre os carbonos que compõe a estrutura cíclica do benzeno há uma constante alternância entre a posição das ligações duplas e simples que os ligam uns aos outros.

Fonte: (SMILES & VILES, 2015).

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 (FIGURA 2).

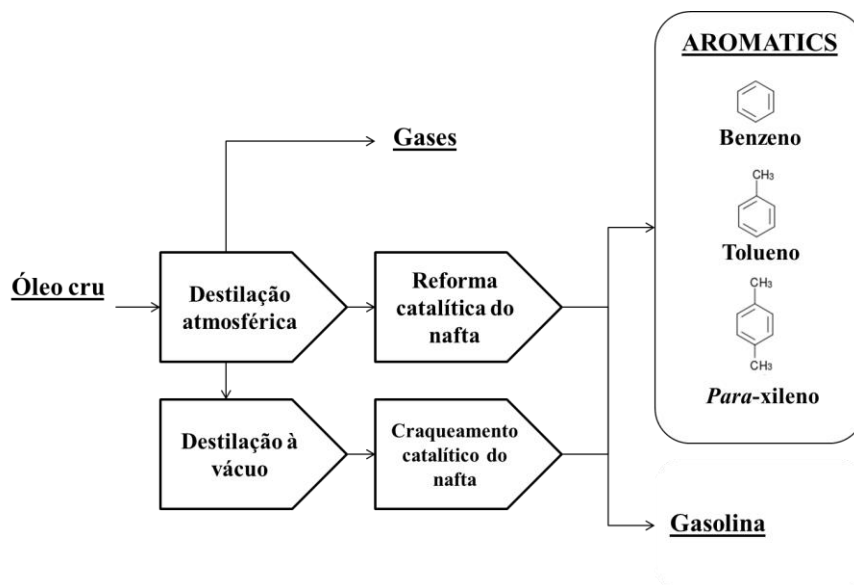


Figura 2 – Esquema geral da produção de compostos aromáticos a partir de rotas petroquímicas. Os principais compostos aromáticos gerados ao final desses processos são o Benzeno, o Tolueno e o Para-Xileno, sendo denominados de BTX.

Fonte: Autoria própria

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) (FIGURA 3).

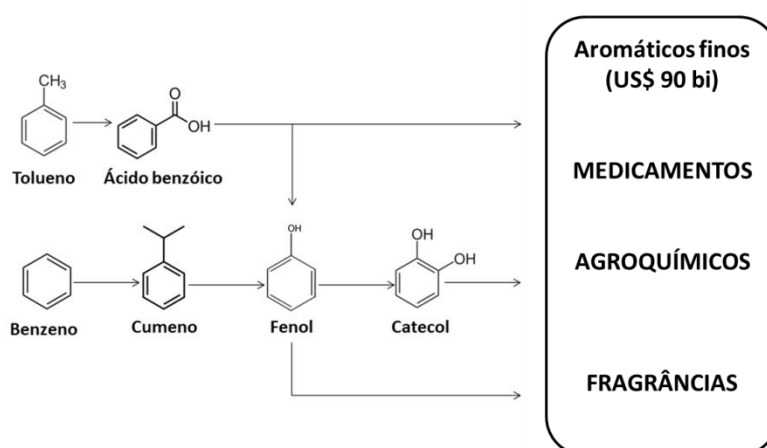


Figura 3 – Principais vias de obtenção de aromáticos finos a partir de BTX. Grande parte dos aromáticos finos, ou seja, substâncias de alto valor agregado, são obtidos a partir de tolueno ou benzeno, tendo o fenol como principal intermediário.

Fonte: Autoria própria

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-tridroxibenzoico (FIGURA 4), é um composto trifenólico de baixo peso molecular, com um grande poder antioxidante devido ao fato de que o grupo hidroxila na posição *para* (posição 4), ou seja, oposta ao grupo carboxila, acaba tendo uma energia de ligação baixa que faz com que ele doa facilmente um elétron junto ao seu átomo de hidrogênio para outras moléculas de poder redutor mais baixo, de forma a ser estabilizado pelo compartilhamento de elétrons dos grupos hidroxila das posições *orto* (3 e 5) (BADHANI; KAKKAR; SHARMA, 2015).

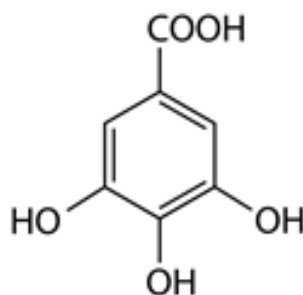


Figura 4 - Estrutura molecular do ácido gálico

Fonte: (INDIAMART, 2017).

Encontra-se presente em plantas, principalmente na forma de taninos hidrolisáveis, os quais são compostos polifenólicos 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 tenha potencial como aditivo em alimentos e cosméticos, pois evita a degradação química e biológica. Contudo, o que vem chamando mais a atenção sobre esse composto é o seu potencial no combate e prevenção de uma série de doenças, podendo agir como antitumoral, anti-inflamatório e antialérgico, além de ter ações neuroprotetora e hepatoprotetora também descritas (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 baixo desempenho (WAGH, 2010). A utilização de legumes de tara (*Cesalpinia spinosa*) como fonte de taninos, por exemplo, é capaz de gerar bons resultados para a obtenção de ácido gálico, chegando a uma titulação de 16,56 g/L (WAGH, 2010).

Sabe-se que o ácido gálico é formado bioquimicamente nas plantas a partir da rota do ácido chiquímico por uma desidrogenação de 3-dehidroxichiquimato (DHS) (DANDEKAR *et al.*, 2011) (FIGURA 5). Essa via também está presente em diversos microrganismos, sendo a via responsável pela formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e, conseqüentemente, todos os fenilpropanóides que se originam a partir de um ou mais desses aminoácidos (FIGURA 5).

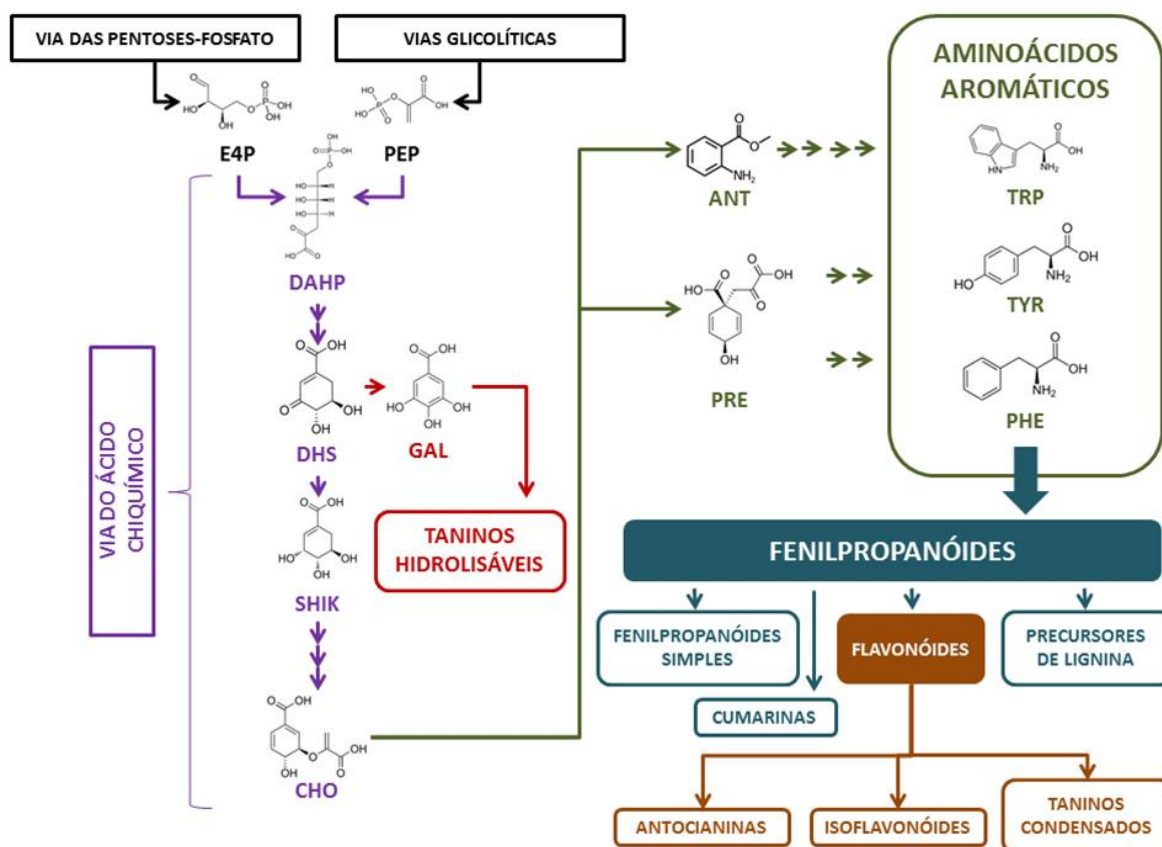


Figura 5 – Esquema geral da via do ácido chiquímico e seus derivados fenólicos. A via do ácido chiquímico está presente tanto nas plantas como nos microrganismos, sendo necessária para a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina (PHE), tirosina (TYR) e triptofano (TRP). E4P: eritreose-4-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; DAHP: D-arabino-heptulosonato7-fosfato; DHS: 3-dehidrochiquimato; SHIK: chiquimato;

CHO: corismato; GAL: ácido gálico; ANT: antranilato; PRE: prefenato. O número de setas até a síntese dos aminoácidos aromáticos corresponde ao número de reações necessárias para cada conversão.

Fonte: Autoria própria

Com a descoberta de que o ácido gálico também pode ser gerado a partir de vias de degradação de compostos 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 rotas permitiria a construção de rotas alternativas de biossíntese (FIGURA 6).

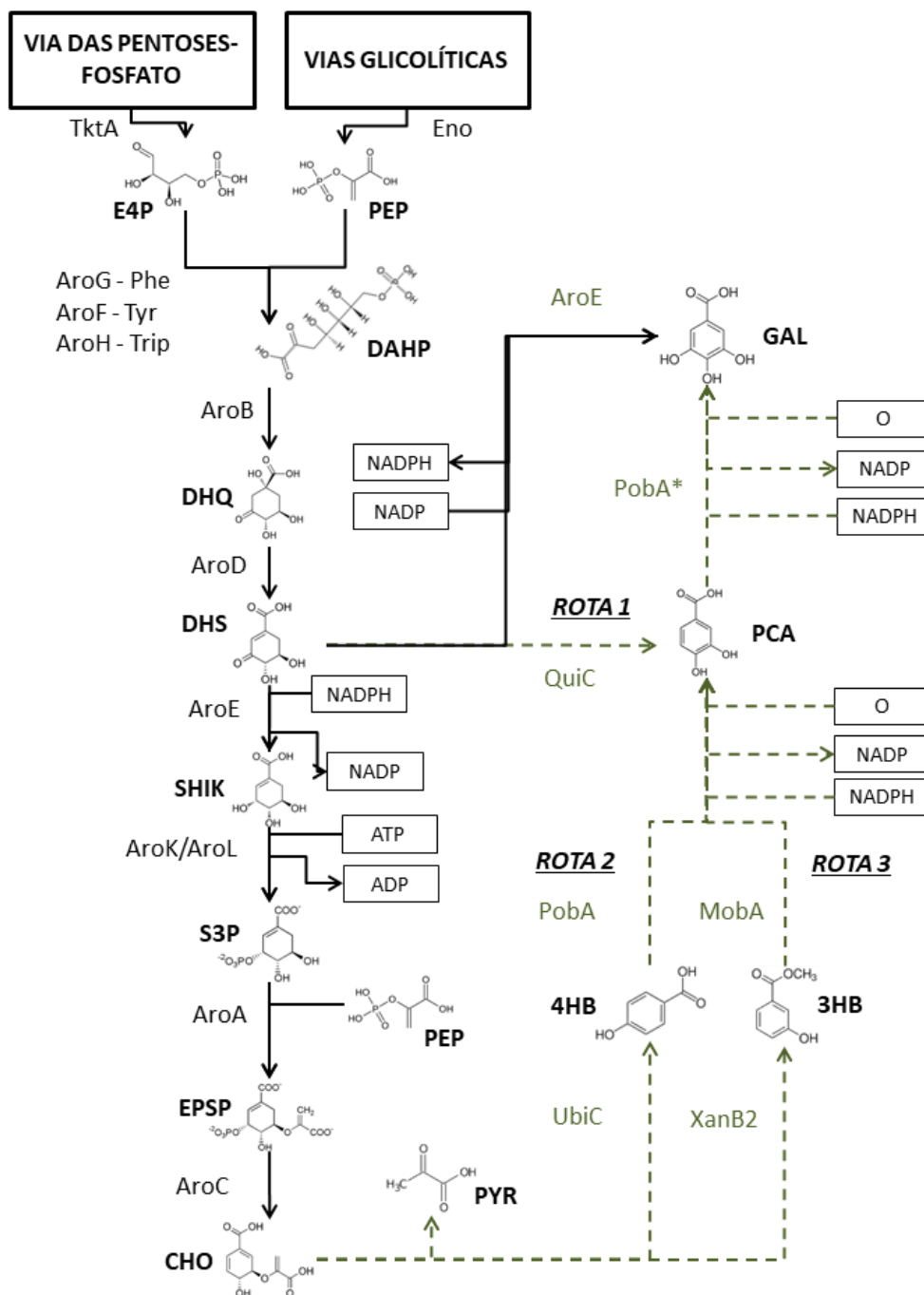


Figura 6 - Possíveis rotas metabólicas que poderiam ser inseridas em *P. putida* para a produção de ácido gálico (GA) a partir da via do ácido chiquímico. Todas as rotas passam pela produção do ácido protocatecuico (PCA) como intermediário, com a diferença de que a Rota 1 considera a conversão de 3-dehidrochiquimato (DHS) a PCA e as outras envolvem a conversão de corismato (CHO) em 4-hidroxibenzoato (4HB) ou em 3-hidroxibenzoato (3HB), seguido pela conversão destes compostos em PCA. Metabólitos - E4P: eritrese-4-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; DAHP: D-arabino-heptulose-7-fosfato; DHQ: 3-dehidroquinato; SHIK: chiquimato; S3P: chiquimato 3-fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato; PYR: piruvato. Enzimas - Eno: enolase; TktA: transcetolase; AroG - Phe, AroF - Tyr e AroH - Trip: DHAP sintases inibidas por

fenilalanina, tirosina e triptofano, respectivamente; AroB: 3-dehidroquinato sintase; AroD: 3-dehidroquinato desidratase; AroE: chiquimato desidrogenase; AroK/AroL: chiquimato quinase; AroA: 3-fosfochiquimato 1-carboxiviniltransferase; AroC: corismato sintase; UbiC: corismato piruvato liase de *Escherichia coli*; XanB2: 3-hidroxibenzoato de *Xanthomonas campestris pv. campestris*; MobA: 3-hidroxibenzoato 4-monooxigenase de *Comamonas testosteroni*; PobA: *p*-hidroxibenzoato hidroxilase de *Pseudomonas aeruginosa*; PobA*: versão mutante (Tir385 -> Fen) da enzima PobA; QuiC: 3-dehidrochiquimato desidratase de *Acinetobacter baumannii*.

Cofatores - NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida; NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; O: oxigênio. As setas cheias representam reações presentes no organismo da *Pseudomonas putida* e as setas tracejadas representam reações que requerem enzimas expressas por genes de outras espécies.

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-hidroxibenzóico (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).

Sabe-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), tal como a enzima AroZ de *Klebsiella baumannii*, utilizado no experimento citado acima (DRATHS; FROST; KAMBOURAKIS, 2000). Ao mesmo tempo, 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; FROST; KAMBOURAKIS, 2000), a qual passa a hidroxilar o PCA no lugar do 4HB. Essas e outras opções de enzimas produzidas pelo metabolismo secundário de uma série de organismos (FIGURA 6) geram possibilidades interessantes para a criação de ramificações na via do ácido chiquímico com o objetivo de se produzir ácido gálico em microrganismos.

Por último, devido ao fato de que a primeira reação da via do ácido chiquímico, a condensação de E4P e PEP em DAHP é catalisada pela enzima fosfo-2-dehidro-3-desoxiheptonato aldolase em suas versões AroG, inibida por fenilalanina, AroF, inibida por tirosina e AroH, inibida por triptofano, foi estudada a possibilidade de se trabalhar com uma versão mutante do gene *aroG*, chamada de *aroG4* (Pro150 -> Leu) a qual seria insensível à inibição por fenilalanina, mantendo, com isso, a via do ácido chiquímica ativa (DOROSHENKO *et al.*, 2010) para a produção de compostos derivados.

1.2 ESPÉCIES DE *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 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 de nutrientes, ciclo de vida sem esporulação, ausência de mecanismos de ação patogênica e alta disponibilidade de ferramentas moleculares para sua manipulação genética, além de já possuir o 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. Sabe-se que para cada 100 kg de biodiesel produzido são gerados 10 kg de glicerol bruto, como resultado do processo de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal (CHEN & LIU, 2016). Contudo, apesar do glicerol ser uma substância bastante visada para a produção de cosméticos e produtos de higiene pessoal, as impurezas existentes em sua versão bruta, tais como metanol, sais, metais pesados e ácidos graxos residuais impõem como restrição a necessidade de processos de purificação que inviabilizam sua utilização por esses segmentos, fazendo com que ele seja tratado como resíduo industrial. Foi observado que a *P. putida* 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 modificações genéticas (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 desempenho devem ocorrer, promovendo saltos de qualidade na linhagem bacteriana utilizada, de forma a torná-la apta a bioprocessos de escala industrial.

1.3 DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO EM *PSEUDOMONAS PUTIDA*

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).

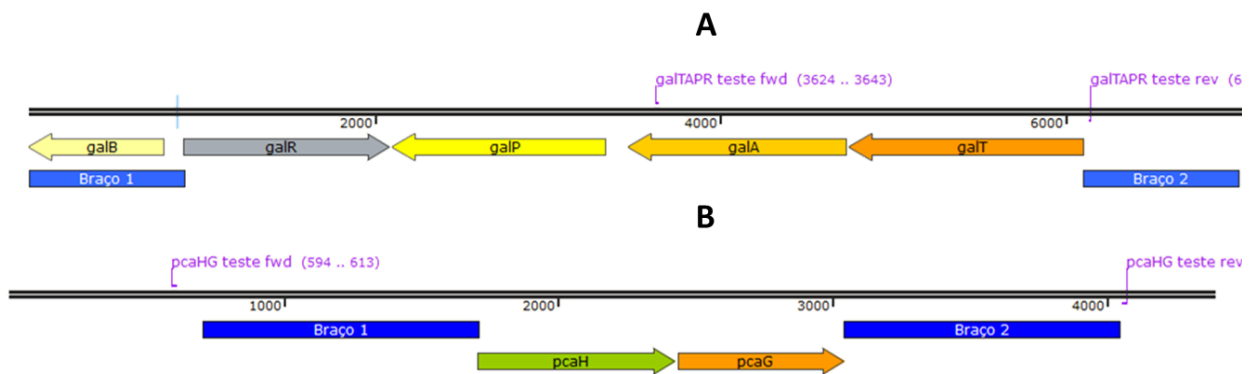


Figura 7 - Organização geral dos operons *galTAP* (A) e *pcaHG* (B) em *P. putida*. Em destaque estão os braços de homologia para ambas as deleções (barras azuis) e as posições dos iniciadores utilizados para a validação das deleções em PCR (em roxo).

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 da 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.

Experimentos mostraram que mutações no gene *galT* foram capazes de interromper o crescimento de *P. putida* quando o ácido gálico era oferecido como única fonte de carbono apontando a importância desse transportador para a captura do composto no meio. Sabe-se que esse transportador possui muitas homologias com permeases de ácido protocatecuico, cujo gene aparece em mais de uma região do genoma de *P. putida*. Da mesma forma, a porina expressa pelo gene *galP* possui grandes similaridades com porinas da família OprD (CANALES *et al.*, 2011).

1.4 CONSUMO DE GLICEROL EM *PSEUDOMONAS PUTIDA*

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 8).

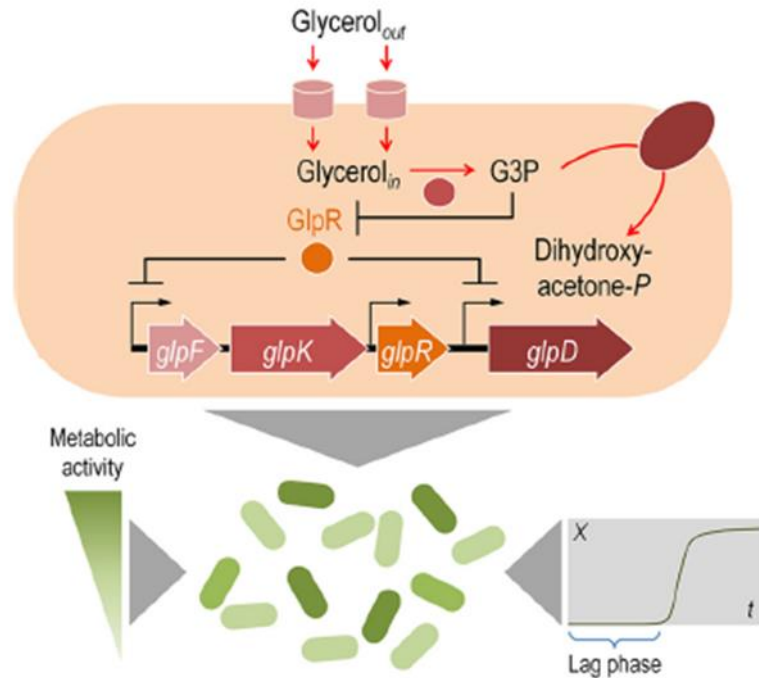


Figura 8 - Sistema de regulação dos genes relacionados ao consumo de glicerol em *P. putida* KT2440

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, fazendo com que a eliminação do fator *glpR* seja importante para a construção de uma linhagem que cresça na presença de glicerol.

1.5 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 bioprocessamento 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 bioprocesso, 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 9).

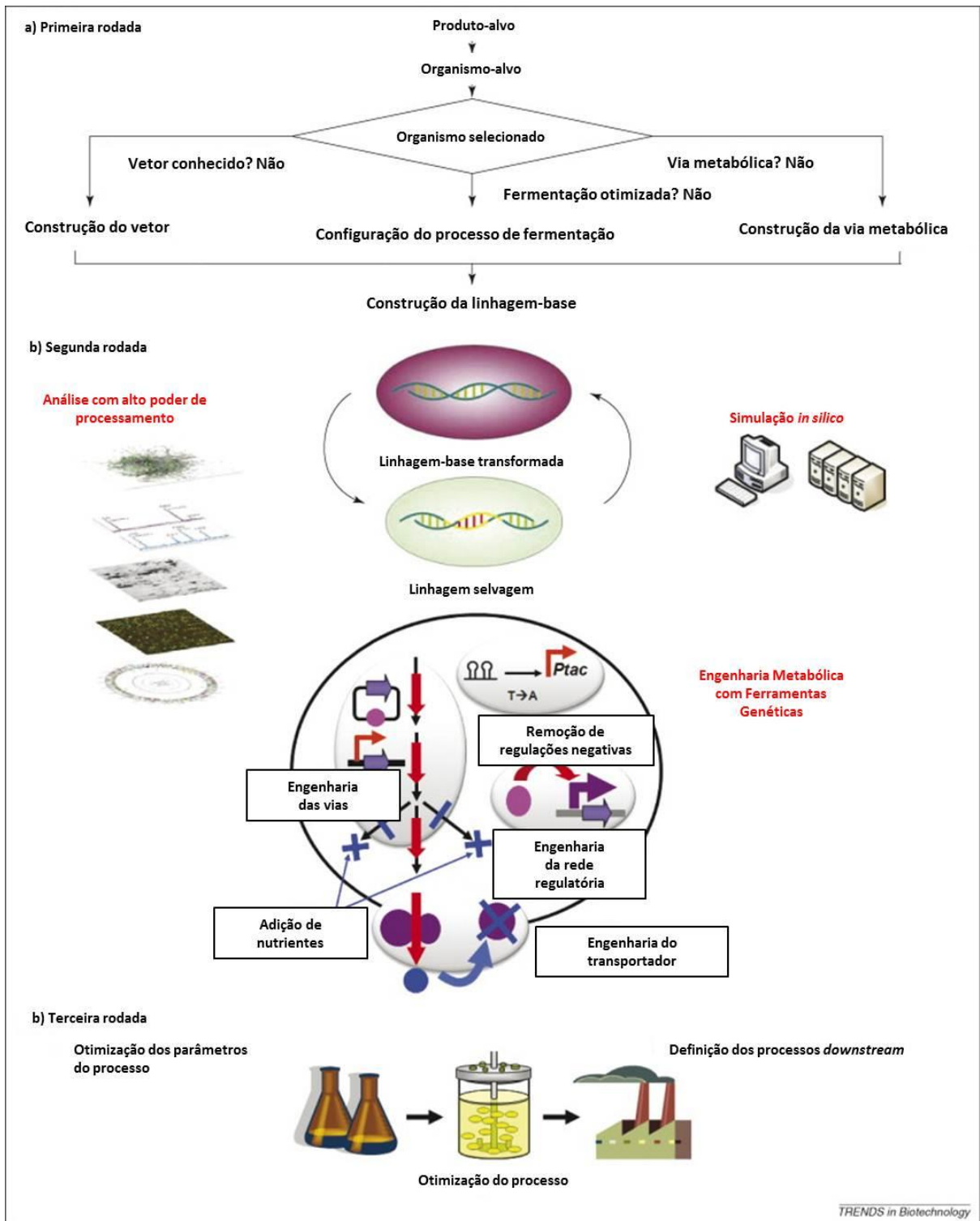


Figura 9 - Rodadas de experimentos necessárias para o desenvolvimento de um bioprocesso. a) Primeira rodada: Construção da linhagem-base produtora do composto de interesse; b) Segunda rodada: Análise do metabolismo global da célula e seus sistemas de regulação; c) Terceira rodada: Aplicação industrial 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).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nos objetivos traçados para esse estudo é possível concluir, primeiramente, 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 destacar que a inclusão do gene mutante *aroG4* foi essencial, nesse caso, 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 24.

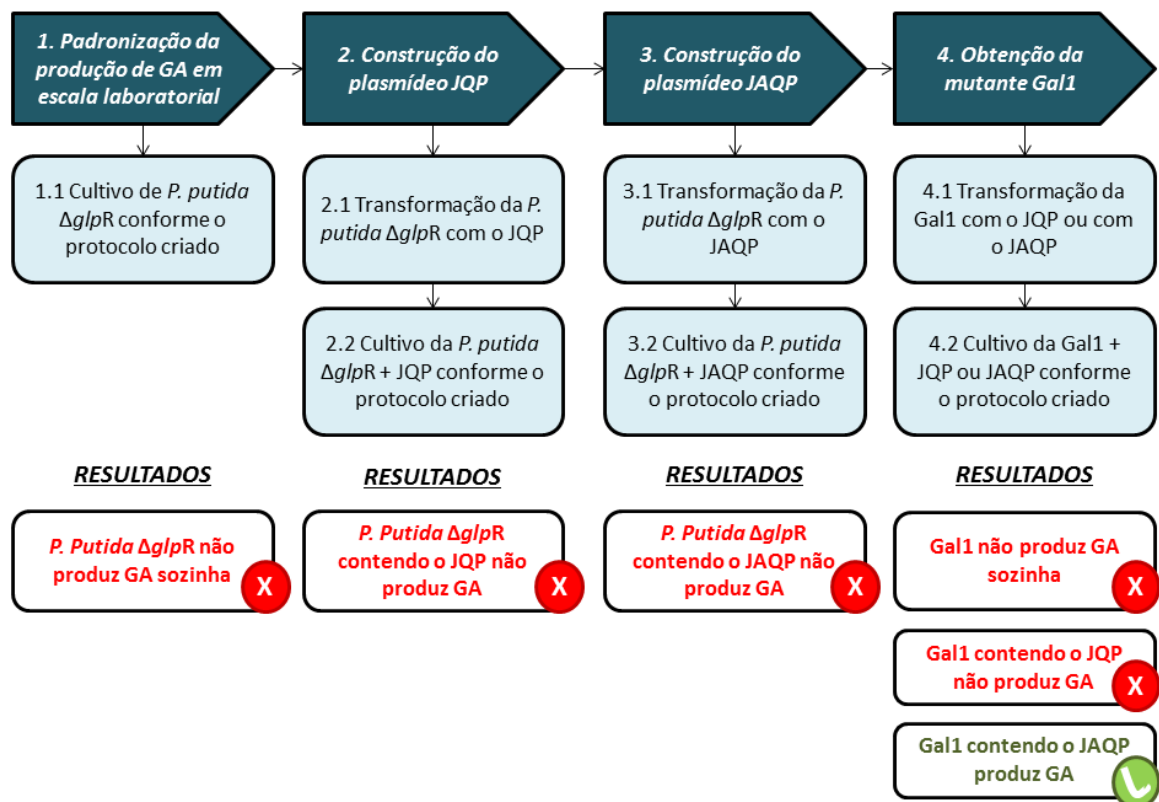


Figura 24 – Esquema geral dos testes realizados por esse estudo e seus resultados. O termo “sozinha” nos resultados obtidos nas etapas 1. e 4. refere-se ao fato da linhagem ter sido cultivada com o plasmídeo vazio (J0), ou seja, sem qualquer um dos genes heterólogos de interesse.

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 utilizem promotores de fase estacionária do crescimento, tais como os promotores σS (JAISHANKAR &

SRIVASTAVA, 2017) 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.

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.

CHEN, Z.; LIU, D. Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol. **Biotechnol Biofuels**, Reino Unido, v.9, p.205, 2016.

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* Fbr improves the desempenho 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.

FUQUA, C. & NEWMAN, J. R. Broad-host-range expression vectors that carry the l-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. **Gene**, Holanda, n.227, v.2, p.197–203, 1999.

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.

GOÑI-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.

HOANG, T.T. *et al.* A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Gene**, Holanda, v.212, n.1, p.77–86, 1998.

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

JAISHANKAR, J.; SRIVASTAVA, P. Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. **Front. Microbiol.** v.8, n.2000 Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>. Acesso em: 04/05/2019.

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.

PÉREZ-PANTOJA, D.; NÍKEL, P.; DE LORENZO, V. Pyridine nucleotide transhydrogenases enable redox balance of *Pseudomonas putida* during biodegradation of aromatic compounds. **Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.18, n.10, p.3565–3582, 2016.

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.

SMILES & VILES. August 31, 2015. Disponível em: < <https://bit.ly/2vgS832>> Acesso em: 20 abr. 2019

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.