INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

Estudo da superexpressão de genes da via do chiquimato para melhorar a produção de ácido mucônico em *Escherichia coli*

MATHEUS ARAUJO DOS SANTOS

Foz do Iguaçu
2025

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

Estudo da superexpressão de genes da via do chiquimato para melhorar a produção de ácido mucônico em *Escherichia coli*

MATHEUS ARAUJO DOS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas.
Coorientadora: Dra. Cintia Regina Sargo.

Foz do Iguaçu
2025

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

MATHEUS ARAUJO DOS SANTOS

Estudo da superexpressão de genes da via do chiquimato para melhorar a produção de ácido mucônico em *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas.
(UNILA)

_____
Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz.
(UNILA)

_____
Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini.
(UNILA)

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Dedico este trabalho a Lola, companheira de toda a vida.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leicimar Silva Araujo dos Santos e Nilson Felix dos Santos pelo apoio e suporte fornecido durante minha graduação e sobretudo minha vida, sempre compreendendo e confiando em minhas escolhas. A minha irmã, por incontáveis fins de semana de trabalho, cheios de afeto, conversas, risadas, além de seu apoio e carinho durante todos os anos em que vivemos juntos.

Ao meu orientador, professor Cristian Antonio Rojas, pelo aceite em me orientar e coragem de encarar junto as propostas na participação em competições, iniciações científicas e até aulas de arquearia. Obrigado pelo apoio contínuo e irrestrito, todos os seus ensinamentos foram essenciais para minha formação, e os levarei para minha vida profissional.

A minha coorientadora Dra. Cintia Regina Sargo, pela oportunidade e confiança, por todos apoio e ensinamentos, espero continuar aprendendo contigo nos próximos ciclos da minha carreira.

As minhas gêmeas ruivas, Julia Beatriz dos Santos e Ana Caroline de Lima, ambas do mal, pela amizade, carinho e amor. Sempre sentirei saudades dos diversos momentos que tivemos juntos, sobretudo as incontáveis horas sentados no banco que nos pertencia, as muitas conversas, risadas e aprendizados que levarei para sempre no meu coração.

Aos muitos amigos, Santiago Marsiglia e Patricia Alderete, desde as primeiras semanas de aula me promovendo a melhor das integrações, assim como, Alexander Colmenarez, Gabriel Neuman, Eliane Alves, Alejandro Colmenarez e Vitória Guerra. Obrigado a todos pela amizade e momentos memoráveis.

Á minha segunda família, composta por Maria Beatriz Barmaimon, Giulio Mendes Braatz, Rosâne Marcondes e Samuel Chagas de Assis. Obrigado pela amizade, carinho e amor durante todos esses anos, Giulio e Rô pelo cafezinho e abrigo, Maria pelas conversas e afeto, Samuel pelos conselhos e cuidado. E claro, papai Felipe Justiniano, Michelli Ramires Teixeira e Anderson Lucas Alievi (Dylon), obrigado por serem minhas principais inspirações, e pelo acolhimento que sempre me proporcionam.

Aos participantes do time Synfronteras, em especial, Nájua Kemil El Kadri e meus maiores presentes, Ghadir Rizk e Jamily Brito Dorado, por serem meu porto seguro nos últimos anos em Foz, renovando minhas energias com vossa amizade, carinho, fofoca e momentos de diversão.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Aos Cintiers e agregados, Gabriel Luz Chaves, Richard Daniel Cruz, Carlieze Conceição, Bruna Lais Merlin e Isabelle Taira. Pela amizade e acolhimento em uma nova cidade, vocês foram, são e sempre serão essenciais.

Por fim, a Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), por um ensino público de qualidade, e a proporção de um ambiente de aprendizado que vai além do currículo da graduação, é social, é cultural, é humanitário. E ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) onde passei os dois últimos anos da minha graduação e tive a oportunidade de aprender e executar este trabalho.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Elevador é quase um templo
Exemplo pra minar teu sono
Sai desse compromisso
Não vai no de serviço
Se o social tem dono, não vai

Quem cede a vez não quer vitória
Somos herança da memória
Temos a cor da noite
Filhos de todo açoite
Fato real de nossa história.

Jorge Aragão – Identidade

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

RESUMO

Os objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU, em especial os objetivos 9 e 12 estimulam a adoção de tecnologias sustentáveis, consumo consciente e menor geração de resíduos. Nesse contexto, o estabelecimento de plataformas microbianas e uso de biomassa e resíduos energéticos subutilizados são estratégias promissoras para bioprodução de compostos bioprivilegiados que possam ser utilizados como *drop-in* na cadeia de refino do petróleo. Entre os diversos compostos que tem aplicação industrial e podem ser originados biologicamente, o ácido mucônico (AM) tem ganhado destaque, podendo ser convertido em polímeros comerciais de alto valor agregado, como ácido tereftálico e ácido adípico. Tradicionalmente, a produção industrial de AM provém de matérias-primas petroquímicas e seu processamento em outros derivados acarreta na geração de resíduos tóxicos e gases nocivos como óxido nitroso. Em *Escherichia coli*, uma via para a produção de ácido mucônico pode ser estabelecida a partir da expressão heteróloga de três enzimas, que utilizam como percursor um intermediário nativo da via do chiquimato, o 3-desidroshiquimato (3-DHS). Neste trabalho buscamos otimizar a produção de 3-DHS através da superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* de diferentes organismos em três configurações (operon, pseudo-operon e monocistrônico). Além disso avaliamos glicose e glicerol como fonte de carbono a fim de encontrar a fonte mais adequada para produção de 3-DHS, e consequentemente de ácido mucônico. Por meio desta avaliação, observamos que a superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* podem aumentar o acúmulo de 3-DHS em comparação a uma cepa sem superexpressão, quando cultivada usando glicerol como fonte de carbono, diferentemente do observado ao utilizar glicose. Com glicerol, a cepa controle, sem a superexpressão dos genes *aroB* e *aroD*, foi capaz de produzir 3,9 g/L de 3-DHS, enquanto que as cepas com a superexpressão destes genes produziram de 3,6 a 4,5 g/L. O cassette monocistrônico contendo os genes *aroB* de *E. coli* W e *aroD* de *E. faecalis* foi identificado como o mais eficiente na produção de 3-DHS, atingindo 4,5 g/L após 72 h de cultivo em placa de 96 poços, com rendimento de 0,24 g de 3-DHS por glicerol, e 91% do glicerol consumido.

Palavras-chave: *aroB* e *aroD*; superexpressão; 3-desidrochiquimato; engenharia metabólica; *Escherichia coli*.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

RESUMEN

Los objetivos de desarrollo sostenible de la ONU, especialmente los objetivos 9 y 12, fomentan la adopción de tecnologías sostenibles, el consumo consciente y la menor generación de residuos. En este contexto, el establecimiento de plataformas microbianas y el uso de biomasa y residuos orgánicos subutilizados son estrategias prometedoras para la bioproducción de compuestos bioprivilegiados que pueden utilizarse como *drop-in* en la cadena de refinación del petróleo. Entre los diversos compuestos que tienen aplicación industrial y pueden tener origen biológica, el ácido mucónico (MA) ha ganado protagonismo y puede convertirse en polímeros comerciales de alto valor agregado, como el ácido tereftálico y el ácido adípico. Tradicionalmente, la producción industrial de AM proviene de materias primas petroquímicas y su procesamiento en otros derivados conduce a la generación de desechos tóxicos y gases nocivos como el óxido nitroso. En *Escherichia coli*, se puede establecer una vía para la producción del ácido mucónico mediante la expresión heteróloga de tres enzimas, que utilizan como precursor un intermedio nativo de la vía del chiquimato, el 3-desidrochiquimato (3-DHS). En este trabajo buscamos optimizar la producción del 3-DHS mediante la sobreexpresión de los genes *aroB* y *aroD* de diferentes organismos en tres configuraciones (operón, pseudooperón y monocistrónico). Además, evaluamos la glucosa y el glicerol como fuentes de carbono para encontrar la fuente más adecuada para la producción de 3-DHS, y en consecuencia, el ácido mucónico. Con esta evaluación, observamos que la sobreexpresión de los genes *aroB* y *aroD* pueden aumentar el acumulo de 3-DHS en comparación con una cepa sin sobreexpresión, cuando se cultiva utilizando glicerol como fuente de carbono, diferente de lo que se observa cuando se utiliza glucosa. En glicerol la cepa control, sin sobreexpresión de los genes *aroB* y *aroD*, fue capaz de producir 3,9 g/L de 3-DHS, mientras que las cepas con sobreexpresión de estos genes produjeron de 3,6 a 4,5 g/L. El cassette monocistrónico que contiene los genes *aroB* de *E. coli* W y *aroD* de *E. faecalis* fue identificado como el más eficiente en la producción de 3-DHS, alcanzando 4,5 g/L después de 72 h de cultivo en una placa de 96 pocillos. Con un rendimiento de 0,24 g de 3-DHS por glicerol, y 91% del glicerol consumido.

Palabras clave: *aroB* y *aroD*; sobreexpresión; 3-desidrochiquimato; ingeniería metabólica; *Escherichia coli*.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

ABSTRACT

The UN's sustainable development goals, especially Goals 9 and 12, encourage the adoption of sustainable technologies, conscious consumption, and less waste generation. In this context, the establishment of microbial platforms and the use of underutilized biomass and energy waste are promising strategies for the bioproduction of bioprivileged compounds that can be used as drop-ins in the oil refining chain. Among the various compounds that have industrial applications and can originate biologically, muconic acid (MA) has gained prominence and can be converted into commercial polymers with high added value, such as terephthalic acid and adipic acid. Traditionally, the industrial production of AM relies on the processing of petrochemical feedstocks, resulting in significant environmental damage owing to the consumption of non-renewable resources, in addition its processing into other derivatives leads to the generation of toxic waste and harmful gases, such as nitrous oxide. In *Escherichia coli*, a pathway for muconic acid production can be established using synthetic biology tools to build a new pathway, with the heterologous expression of three enzymes that uses as percursor the 3-dehydroshikimate (3-DHS), an intermediate of the shikimate pathway. 3-DHS. In this study, we aimed to optimize the production of 3-DHS by overexpressing *aroB* and *aroD* from different organisms in three configurations (operon, pseudo-operon, and monocistronic). In addition, we evaluated glucose and glycerol as carbon sources to find the most suitable source for the production of 3-DHS and consequently, muconic acid. Through this evaluation, we observed that overexpression of *aroB* and *aroD* could increase the accumulation of 3-DHS compared to a strain without overexpression when cultivated using glycerol as a carbon source, unlike what is observed when using glucose. In glycerol, the control strain without overexpression of the *aroB* and *aroD* genes, was able to produce 3.9 g/L of 3-DHS, while the strains with overexpression of these genes produced from 3.6 to 4.5 g/L. The monocistronic cassette containing the *aroB* genes from *E. coli* W and *aroD* from *E. faecalis* was identified as the most efficient in the production of 3-DHS, reaching 4.5 g/L after 72 h of cultivation in 96-well plates, with a yield of 0.24 g of 3-DHS/g per glycerol, and 91% of the glycerol consumed.

Key words: *aroB* and *aroD*; overexpression; 3-dehydroshikimate; metabolic engineering; *Escherichia coli*.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Isoformas do ácido mucônico.....17
Figura 2 – Variações de rotas para biossíntese do ácido mucônico a partir da via do chiquimato.....19
Figura 3 – Esquema metabólico da via do chiquimato.....20
Figura 4 – Modelo dos vetores constituintes do sistema ePathBrick com as posições dos sítios de restrição. 21
Figura 5 – Organização para expressão genética em procariotos 22
Figura 6 – Partes utilizadas na construção dos cassettes.....27
Figura 7 – Perfil de crescimento das linhagens.....33
Figura 8 – Produção de 3-DHS após 72 h de cultivo (Glicerol). 34
Figura 9 – Produção de 3-DHS após 72 h de cultivo (Glicose). 36
Figura 10 – Produção de ácido acético após 72 h de cultivo 37
Figura 11 – Consumo da fonte de carbono e rendimento, após 72 h de cultivo.....38
Figura 12 – Mapa do vetor PRSM6 47
Figura 13 – Gel de eletroforese com confirmação e re-confirmação das construções 48
Figura 14 – Representação virtual da digestão para re-confirmação 49

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Registros dos parâmetros funcionais da enzima 3-desidroquinato sintase (EC 4.2.3.4).....30
Tabela 2 – Registros dos parâmetros funcionais da enzima 3-desidroquinato desidratase (4.2.1.10) 31
Tabela 3 – Construções combinatórias dos genes 32
Tabela 4 – Lista de primers.....44

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Reação de amplificação dos genes *aroB* e *aroD* de *E. coli W*.....26
Quadro 2 – Parâmetros de amplificação dos genes *aroB* e *aroD* de *E. coli* W.....27
Quadro 3 – Condições das reações de ligação.....28

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	ácido mucônico
3-DHS	3-desidrochiquimato
HMF	5-hidroximetilfurfural
TAL	lactona de ácido triacético
E4P	eritrose-4-fosfato
PEP	fosfoenolpiruvato
DAHP	3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato
3-DHQ	3-desidroquinato
DNA	ácido desoxirribonucleico
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 IMPACTOS DAS ATIVIDADES INDUSTRIAIS PETROQUÍMICAS 16
1.2 ÁCIDO MUCÔNICO: APLICAÇÕES, PRODUÇÃO INDUSTRIAL E BIOSSÍNTESE 17
1.3 ENGENHARIA METABÓLICA PARA OTIMIZAÇÃO DA VIA DO CHIQUIMATO 20
1.4 BANCOS DE DADOS COMO FONTE DE PARÂMETROS FUNCIONAIS DE ENZIMAS 23

2 JUSTIFICATIVA 24

3 OBJETIVOS 25

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25

4 METODOLOGIA 26

4.1 SELEÇAO E ONTENÇÃO DOS GENES *AROB* E *AROD* 26
4.2 CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DOS CASSETTES DE EXPRESSÃO 27
4.3 CULTIVO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES *AROB* E *AROD* 29

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 30

5.1 PROSPECÇÃO E OBTENÇÃO DOS GENES *AROB* E *AROD* 30
5.2 CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DOS CASSETTES DE EXPRESSÃO 31
5.3 CULTIVO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES *AROB* E *AROD* 33

6 CONCLUSÃO 40

REFERÊNCIAS 41

ANEXOS 43

ANEXO A – Lista de primers 44
ANEXO B – Sequências siintetizadas com códon otimizado 45
ANEXO C – Vetor pRSM6 47
ANEXO D – Confirmação das construções 48

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMPACTOS DAS ATIVIDADES INDUSTRIAIS PETROQUÍMICAS

As mudanças climáticas causadas pela ação antrópica estão relacionadas a produção de energia e atividades industriais dependentes de recursos fósseis, além do uso e modificação da terra, fatores que resultam na emissão de gases do efeito estufa e causam impactos negativos no ecossistema em uma velocidade superior à sua capacidade de regulação (FAWZY *et al.*, 2020).

Grande parte das atividades industriais depende do uso de petroquímicos como matéria-prima, geralmente alcenos de 2 a 4 carbonos e compostos aromáticos como benzeno, tolueno e xilenos, obtidos a partir do refino do petróleo. Essa dependência de recursos fósseis não renováveis representa um desafio significativo, especialmente diante das crescentes preocupações com a sustentabilidade e os impactos ambientais (BEHLING; VALANGE; CHATEL, 2016).

Os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) da ONU (Organização das Nações Unidas), preveem uma série de medidas integradas que visam o fim da pobreza, promoção da paz e a proteção das pessoas, do meio ambiente e clima. Em especial, o objetivo 12 busca “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis” com ações que incluem a gestão sustentável e o uso eficiente dos recursos naturais, o fortalecimento das capacidades científicas e tecnológicas para mudar para padrões mais sustentáveis de produção e consumo, manejar corretamente resíduos químicos e reduzir a produção dos mesmos, entre outros. (AS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL, [2025]; SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOAL 12, [2025]).

Nesse contexto, a substituição por compostos obtidos a partir de biomassas lignocelulósicas ou resíduos agroindustriais surge como uma alternativa promissora. Esses compostos podem desempenhar um papel essencial na transição para uma economia de baixo carbono, oferecendo uma fonte renovável e potencialmente mais sustentável para a produção industrial (BEHLING; VALANGE; CHATEL, 2016).

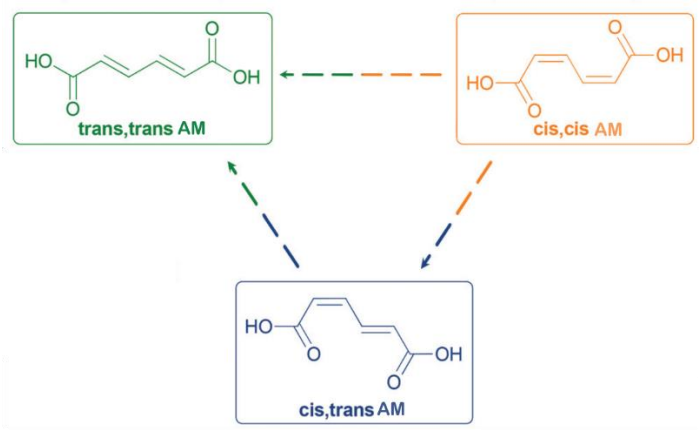
Algumas moléculas como o ácido mucônico (AM), 5-hidroximetilfurfural (HMF) e lactona de ácido triacético (TAL) são consideradas “bioprivilegiadas” pois tem origem biológica e podem ser convertidas em substitutos de petroquímicos ou novas moléculas com aplicação industrial (SHANKS; BROADBELT, 2019).

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

1.2 ÁCIDO MUCÔNICO: APLICAÇÕES, PRODUÇÃO INDUSTRIAL E BIOSSÍNTESE

O ácido mucônico é uma molécula de seis carbonos com duas insaturações e dois grupos carboxila em suas extremidades, e pode se apresentar em três isoformas, cis, cis-AM; cis, trans-AM e trans, trans-AM (Figura 1). O ácido cis,cis-AM tem potencial para produzir compostos de alto valor agregado como ácido adípico, ácido tereftálico e ácido trimelítico, aplicados industrialmente na confecção de polímeros, como nylon-6,6, polietileno tereftálico, poliuretanos além de resinas, ingredientes alimentares e farmacêuticos (XIE *et al.*, 2014).

Figura 1 – Isoformas do ácido mucônico.



Possíveis conformações do ácido muônico, tras,trans; cis,cis ou cis,trans **Fonte**: Adaptado de, (KHALIL *et al.*, 2020).

A produção industrial de ácido mucônico e seus principais produtos (como o ácido adípico) é baseada em resíduos petroquímicos, principalmente benzeno e fenol a partir de clivagens oxidativas ou catalise com pirimidinas, ambos mediados por metais pesados ou álcoois (KHALIL *et al.*, 2020).

Para o ácido adípico, o processo mais comum consiste na catalise oxidativa do benzeno em ciclo-hexano que é misturado com ácido nítrico, gerando como subproduto o óxido nitroso (POLEN; SPELBERG; BOTT, 2013). Essa cadeia produtiva além de recorrer a recursos não renováveis e significativo aporte energético, acaba gerando produtos tóxicos durante o processo de fabricação.

Na natureza alguns microrganismos possuem vias metabólicas de produção de ácido mucônico, como a *Candida* sp., *Acinetobacter* sp., *Rhodococcus* sp. e *Sphingobacterium* sp., são geralmente encontrados no solo e tem capacidade de

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

metabolizar compostos aromáticos, por exemplo através via catabólica do β-cetoadipato onde o AM é um composto intermediário (XIE *et al.*, 2014).

Nessa via, o ácido mucônico é gerado através da ortoclivagem do catecol pela ação da enzima catecol 1,2-dioxigenase, e em seguida é convertido a 3-carboximuconato (CURRAN *et al.*, 2013; KOHLSTEDT *et al.*, 2018). O acúmulo de AM pode ser induzido pela manipulação dessa via catabólica, com a deleção dos genes responsáveis pela conversão do ácido mucônico em 3-carboximuconato (KRUYER; PERALTA-YAHYA, 2017).

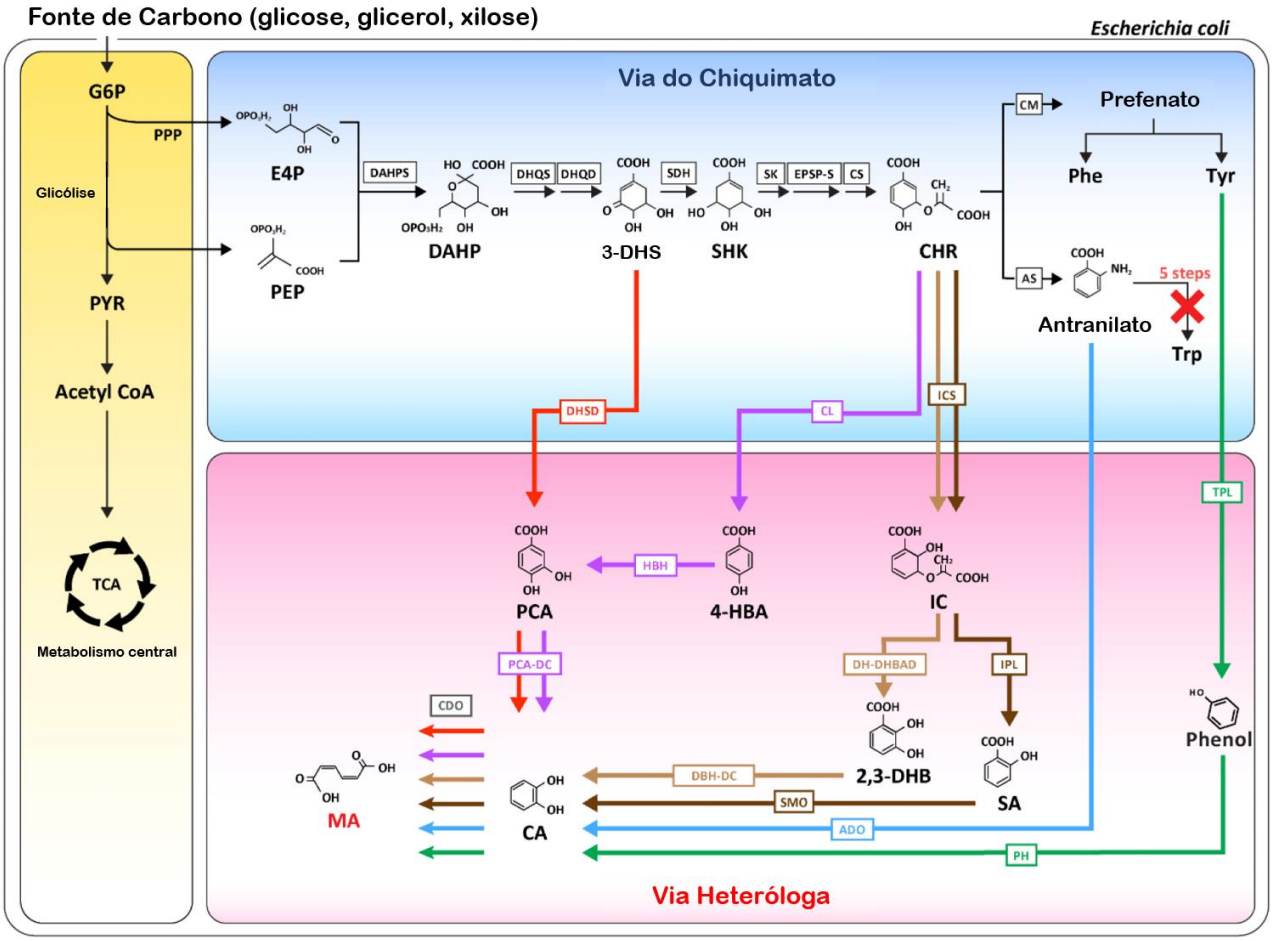
Pelo que se tem conhecimento nenhum organismo é capaz de produzir o ácido mucônico a partir de carboidratos como fonte de carbono naturalmente. Entretanto é possível estabelecer uma rota biossintética pela reengenharia da via do chiquimato, responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano (CHOI *et al.*, 2020).

As rotas de produção podem partir de diferentes intermediários iniciais presentes na via do chiquimato, incluindo o 3-desidrochiquimato , corismato, antranilato e tirosina, utilizando diferentes conjuntos de enzimas como demonstrado na Figura 1 (CHOI *et al.*, 2020).

A biossíntese de ácido mucônico via 3-DHS foi a primeira a ser proposta a partir do trabalho de Draths and Frost (1994). Neste trabalho utilizando *Escherichia coli* fizeram a inserção de três genes heterólogos que codificam as enzimas, desidrochiquimato desidratase, PCA descarboxilase e catecol-1,2-dioxigenase. Essas enzimas são responsáveis pela conversão do 3-DHS em protocatecuato, que posteriormente é convertido em catecol, e por fim a partir do catecol se produz o ácido mucônico, compondo uma das rotas mais utilizadas na engenharia de microrganismos para produção de AM a partir de carboidratos.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Figura 2 – Variações de rotas para biossíntese do ácido mucônico a partir da via do chiquimato.



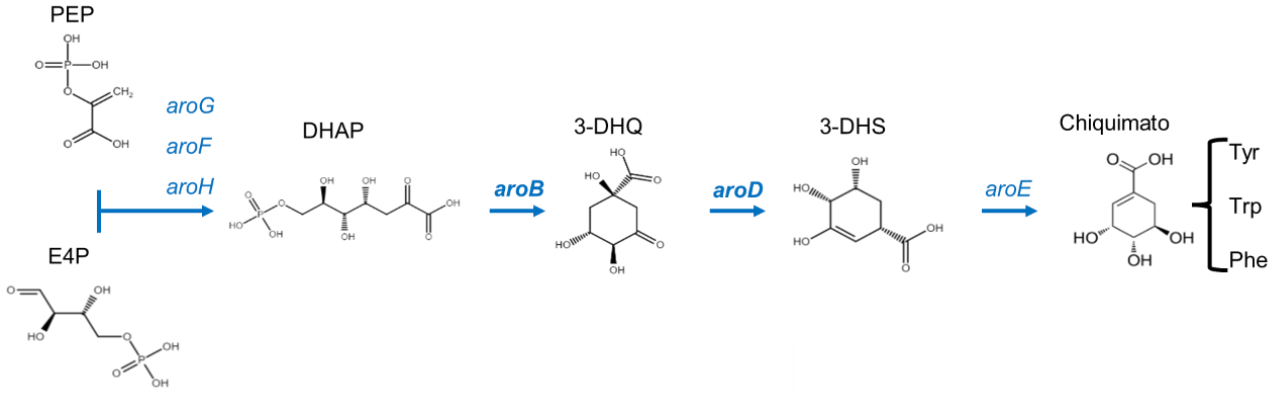
As flexas vermelhas indicam a rota metabólica que usa como percursor inicial o 3-desidrochioquimato e o converte de forma heteróloga em PCA, CA e AM; As flexas lilás, bege, marrom e azuis, indicam as rotas metabólicas que usam como percursor inicial o corismato, que em seguida é convertido de forma heteróloga nos intermediários 4-HBA, PCA, CA e MA; IC 2,3-DHB, CA, MA ou IC AS, CA, MA respectivamente; As flexas verdes, indicam a rota metabólica que usa como percursor inicial a tirosina que é convertida de forma heteróloga Fenol, CA e MA. G6P, glicose-6-fosfato; PPP, via da pentose fosfato; PYR, piruvato; PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrose4-fosfato; DAHP, 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7 fosfato; 3-DHS, 3-desidroshiquimato; SHK, chiquimato; CHR, corismato; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina; Trp, triptofano; 4-HBA, 4-hidroxibenzoato; IC, isocorismato; 2,3-DHB, 2,3-di-hidroxibenzoato; SA, salicilato; PCA, protocatecuato; CA, catecol; AM, ácido mucônico. DAHPS, DAHP sintase; DHQS, DHQ sintase; DHQD, DHQ desidratase; SDH, chiquimato desidrogenase; SK, shiquimato quinase; EPSP-S, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase; CS, corismato sintase; CM, corismato mutase; AS, antranilato sintase; DHSD, 3-DHS desidratase; PCA-DC, protocatecuato descarboxilase; CDO, catecol 1,2-dioxigenase; TPL, tirosina fenol liase; PH, fenol hidroxilase; CL, corismato piruvato-liase; ICS, isocorismato sintase; DH-DHBAD, 2,3-di-hidro-2,3-DHBA desidrogenase; IPL, isocorismato piruvato liase; DBH-DC, 2,3-dihidroxibenzoato descarboxilase; SMO, salicilato 1-monoxigenase; ADO, antranilato 1,2-dioxigenase. **Fonte:** Adaptado de, (CHOI *et al.,* 2020).

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

A via do chiquimato utiliza eritrose-4-fosfato (E4P), da via das pentoses fosfato, e fosfoenolpiruvato (PEP), gerado a partir da glicose. Ambos são combinados para formação da 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) percursor inicial da rota (Figura 2).

A partir do início da via do chiquimato, duas reações antecedem a produção do intermediário 3-desidrochiquimato, a primeira consiste na conversão de DAHP em 3-desidroquinato (3-DHQ), catalisada pela enzima 3-desidroquinato sintase (EC 4.2.3.4), seguida pela catálise de 3-DHQ em 3-DHS, feita pela enzima 3-desidroquinato desidratase (EC 4.2.1.10) (Figura 2). As enzimas das reações são codificadas pelos genes *aroB* e *aroD,* respectivamente, e são considerados alvos importantes nos processos de melhoramento da via (CHOI *et al.*, 2020).

Figura 3 – Esquema metabólico da via do chiquimato.



Principais genes e metabólitos envolvidos na via do chiquimato. PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrose-4-fosfato; DHAP, 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato; 3-DHS, 3-desidroquinato; DHS, desidrochiquimato; Tyr, Tirosina; Trp, triptofano; Phe, fenilalanina; *aroG*, DAHP sintase; *aroF*, DAHP sintase; *aroH*, DAHP sintase; *aroB*, 3-DHQ sintase; *aroD*, 3-DHQ desidratase; *aroE*, chiquimato desidrogenase. **Fonte:** O Autor, 2024.

1.3 ENGENHARIA METABÓLICA PARA OTIMIZAÇÃO DA VIA DO CHIQUIMATO

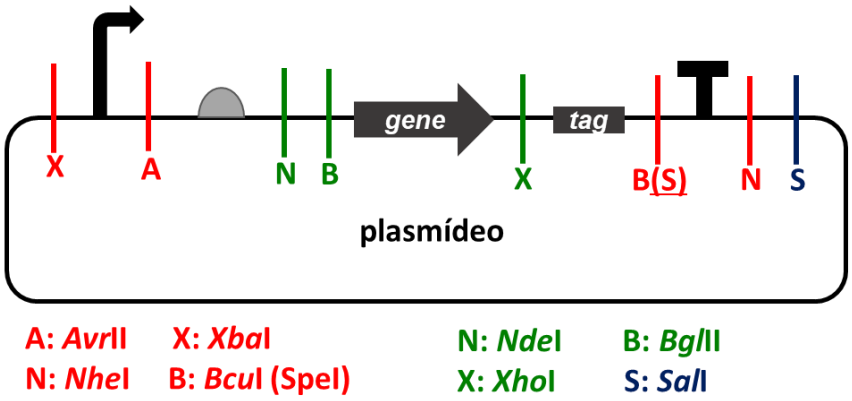
As estratégias de engenharia metabólica para o uso da *Escherichia coli* como chassi, visam aumentar o fluxo de carbono na via do chiquimato, através de manipulação do metabolismo central e seus sistemas de regulação. Além disso, é necessário a implementação de modificações para garantir a continuidade desse fluxo,

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

como a superexpressão dos genes envolvidos nas principais reações da via. (MARTÍNEZ; BOLÍVAR; ESCALANTE, 2015).

Existem diversas ferramentas disponíveis para edição gênica e aplicação de engenharia metabólica, entre elas o sistema ePathBrick fundamentado no conceito de *BioBricks,* que permite a manipulação de partes genéticas de forma modular. O sistema ePathBrick baseia-se em pares de enzimas de restrição, *Avr*II*, Xba*I*,* BcuI (SpeI)*,* e *Nhe*I, que reconhecem diferentes sequencias de DNA e geram terminações de fita simples complementares entre si (Figura 3) (XU *et al.*, 2012).

Figura 4 – Modelo dos vetores constituintes do sistema ePathBrick com as posições dos sítios de restrição.



Representação do vetor, posição das enzims de restrição e partes principais, promotor, RBS, gene (CDS (*coding sequence*)), tag e terminador **Fonte:** O Autor, 2024.

No sistema ePathBrick os genes inseridos não requerem primers para cada ciclo de *assembling*, nessa estratégia os genes são inseridos individualmente por digestão e ligação, podendo utilizar variações do mesmo conjunto de enzimas para montagem sequencial do cassette, além de possibilitar a troca de partes biológicas como promotor, RBS, terminador e a montagem de diferentes configurações de expressão gênica. (XU *et al.*, 2012).

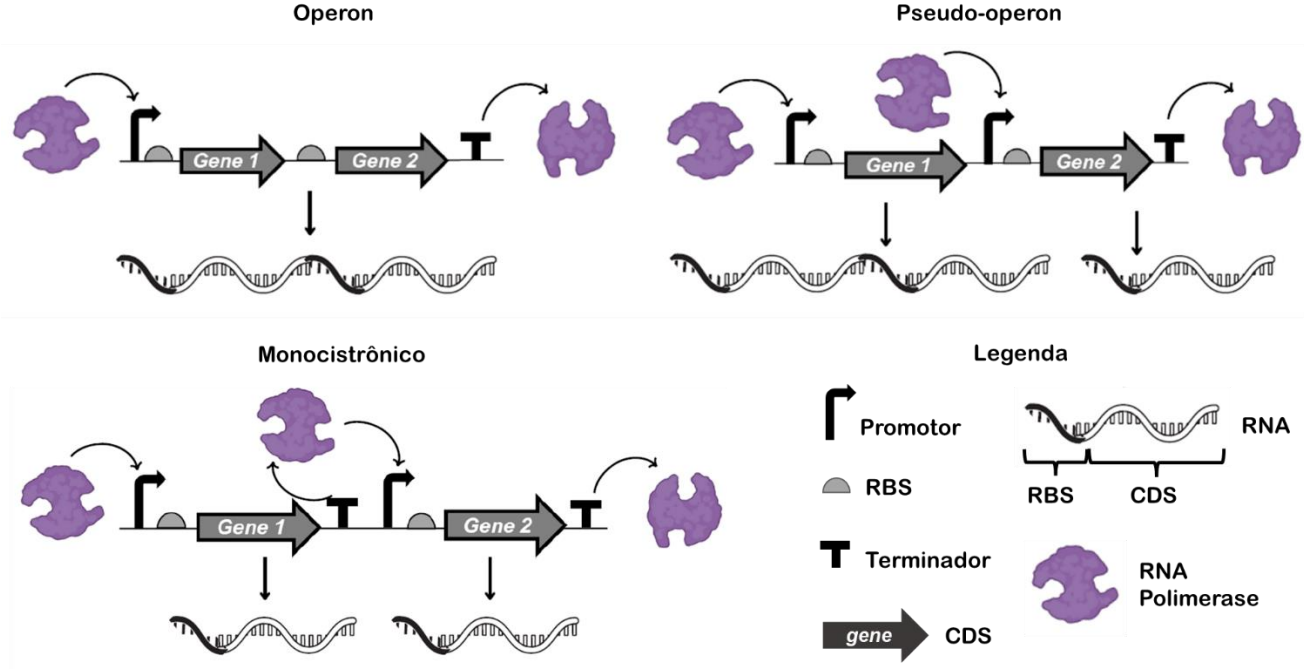
Em procariotos é comum a formação de operons para expressão de genes correlatos, entretanto existem diversos mecanismos de regulação que podem maximizar ou minimizar a expressão enzimática a depender da organização dos genes (XU *et al.*, 2012).

Especificamente, cada componente da via metabólica pode ser organizado na forma de: (i) operon, em que todos os genes alvo compartilham o mesmo promotor e terminador; (ii) pseudo-operon, em que cada gene alvo está sob o controle de um promotor independente, mas compartilhando o mesmo terminador, ou (iii) monocistrônica, em que

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

cada gene alvo está sob o controle de um promotor e terminador independentes (Figura 5).

Figura 5 – Organização para expressão genética em procariotos.



Representação dos sistemas de expressão em operon, pseudo-operon e mocistrônico. Promotor, faz o recrutamento da RNA, polimerase; RNA polimerase, sintetiza o RNA; Terminador, finaliza a região de transcrição liberando a RNA polimerase; Sítio de ligação ao Ribossomo (RBS, do inglês *ribossome biding site*), região do RNA que se liga ao ribossomo para que se inicie a tradução. Sequência codificante (CDS, do inglês, *coding sequence*) região que juntamente com o RBS será traduzida no ribossomo. **Fonte:** O Autor, 2024.

He. et al. (2015) avaliaram a influência da configuração dos genes de interesse para produção de condroitina. Neste estudo, foi identificado que a configuração pseudo-operon foi mais eficiente na produção do composto. Já Jawed. et al. (2020) observaram um declínio na produção de butanol ao empregar o cassette monocistrônico e níveis semelhantes em operon e pseudo-operon.

Estudos demonstram que a superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* em diferentes chassis microbianos, incluindo *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Corynebacterium glutamicum*, podem levar a um incremento significativo na produção de metabólitos derivados da via do chiquimato, como o próprio chiquimato (LI *et al.*, 2023), 3-DHS (Choi et al., 2018) e ácido mucônico (PYNE *et al.*, 2023). A maior parte dos trabalhos que adotam essa estratégia utilizam os genes *aroB* e *aroD* de *E. coli*.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

1.4 BANCOS DE DADOS COMO FONTE DE PARÂMETROS FUNCIONAIS DE ENZIMAS

A busca por enzimas mais eficientes desempenha um papel crucial na biologia sintética, especialmente no contexto do princípio da ortogonalidade. Este princípio busca identificar e utilizar partes biológicas que desempenhem a mesma função em diferentes organismos, ampliando as possibilidades de aplicação de recursos biológicos (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014).

Ao explorar bancos de dados, como o BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase: https://www.brenda-enzymes.org), é possível acessar informações detalhadas sobre a cinética, estrutura e especificidade de enzimas provenientes de uma ampla diversidade de organismos, permitindo a seleção de variantes mais eficientes e adaptadas a processos específicos (CHANG *et al.*, 2021). Quando integradas a estratégias de engenharia metabólica, essas enzimas com características melhoradas potencializam a construção de plataformas procarióticas mais robustas, ampliando a eficiência e a viabilidade dos bioprocessos industriais.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

2 JUSTIFICATIVA

O uso de plataformas microbianas para produção de ácido mucônico a partir de fontes de carbono é uma abordagem que se alinha com alguns dos objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU (AS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL, [2025]).

Buscando o fortalecimento das capacidades científicas e tecnológicas para padrões mais sustentáveis de produção e consumo, e estimulando maior adoção de tecnologias e processos industriais limpos e ambientalmente corretos (SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOAL 9, [2025]; SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOAL 12, [2025]).

Parte desse processo encontra-se na superação das limitações inerentes a aplicação de plataformas microbianas, que podem ser alcançadas pelo uso de ferramentas como design racional de sistemas biológicos, engenharia metabólica e biologia sintética (SHANKS; BROADBELT, 2019). Partindo desse princípio, são abordados nesse trabalho os problemas que envolvem a manipulação de genes da via do chiquimato responsáveis por reações centrais no processo de produção de 3-DHS, percursor para a biossíntese de ácido mucônico.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

3 OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo principal avaliar o efeito da superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* na produção do 3-DHS, um intermediário chave da via de produção do ácido mucônico, em *E. coli*. Neste contexto, buscamos verificar o efeito da origem do gene *aroD*, assim como identificar o melhor sistema de superexpressão dos genes *aroB* e *aroD*, entre as configurações operon, pseudo-operon e monocistrônico, para o acúmulo de 3-DHS.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar genes *aroB* e *aroD* que expressem enzimas mais eficientes em relação as nativas de *E. coli*. e testá-los experimentalmente;
- Construir e clonar cassettes de expressão em diferentes configurações, utilizando os genes *aroB* e *aroD* de diferentes espécies;
- Avaliar a melhor construção para o o acúmulo de 3-DHS a partir de ensaios de triagem de alto rendimento (*High-throughput screening* – HTS) com as cepas construídas;
- Selecionar a fonte de carbono mais promissora para a produção de 3-DHS.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

4 METODOLOGIA

Todas as atividades foram realizadas nas dependências dos laboratórios de nível de biossegurança I (NBI) do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

4.1 SELEÇAO E ONTENÇÃO DOS GENES *AROB* E *AROD*

Para seleção de genes alternativos de *aroB* e *aroD*, foram utilizados os dados de parâmetros funcionais das enzimas 3-desidroquinato sintase codificada por *aroB* e 3-desidroquinato desidratase codificada por *aroD* disponíveis no banco de dados BRENDA (https://www.brenda-enzymes.org). O parâmetro mais determinante para escolha dos candidatos está relacionado a eficiência enzimática, dado pelo valor de Kcat/KM.

Ambos os genes *aroB* e *aroD* oriundos de *E. coli* foram obtidos por amplificação do DNA genômico via PCR (anexo A). A extração foi realizada de acordo com o protocolo do kit, *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation©, an affiliate of Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda. https://www.promega.com.br/) enquanto a PCR foi realizada utilizando o kit, *2X Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific© Waltham, Massachusetts, EUA. https://www.thermofisher.com).

Quadro 1 – Reação de amplificação dos genes *aroB* e *aroD* de *E. coli W*

Reagente	**Volume**	**Concentração Final**
2X Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix	25 µL	1x
Forward primer	2,5 µL (10 pmol)	25 pmol
Reverse primer	2,5 µL (10 pmol)	25 pmol
Template DNA	1 µL	100 ng
Água nuclease free	19 µL	
Volume total	50 µL	

Fonte: O Autor, 2024.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Quadro 2 – Parâmetros de amplificação dos genes *aroB* e *aroD* de *E. coli* W.

Passo		**Temperatura**	**Tempo**
Desnaturação inicial		98 ºC	2 minutos
Desnaturação	35 Ciclos	98 ºC	8 segundos
Anelamento		60 ºC	10 segundos
Extensão		72 ºC	1 minuto e 20 segundos
Extensão final		72 ºC	5 minutos

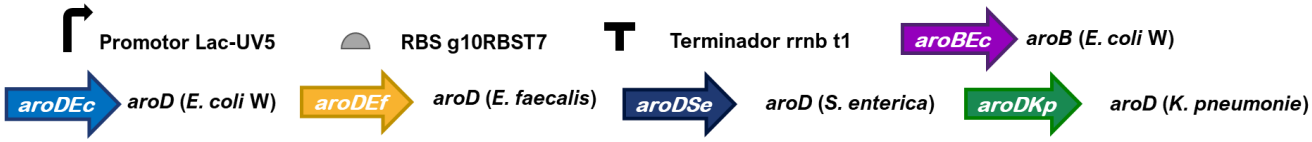
Fonte: O Autor, 2024.

O gene *aroD* de outros organismos selecionados para esse estudo passaram por otimização de códon para expressão em *E. coli*, para otimização foi utilizado o software Benchling (https://benchling.com), em seguida os genes foram sintetizados externamente (GeneScript© A860 Centennial Ave Piscataway, NJ 08854, EUA. https://www.genscript.com) (anexo B).

4. 2 CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DOS CASSETTES DE EXPRESSÃO

Foram construídos vinte e cinco sistemas de expressão. O *assembling* foi realizado utilizando o sistema de digestão e ligação ePathBrick no plasmídeo pRSM6 (nº de cópias ~100; marcador de seleção, Canamicina) (anexo C), derivado de Xu. *et al.* (2012). As partes biológicas como promotor, RBS, e terminador são componentes do vetor pRSM6 e não foram modificadas. Todas as construções são controladas pelo promotor Lac-UV5 num sistema induzível, sítio de ligação ao ribossomo do gene 10 do bacteriófago T7 (g10RBS), com o terminador rrnb t1.

Figura 6 – Partes utilizadas na construção dos cassettes



Partes importantes para o sistema de expressão e genes utilizados. **Fonte:** O Autor, 2024.

As enzimas de restrição FastDigest (Thermo scientific) foram utilizadas para as construções dos vetores. Primeiramente foram feitas as clonagens dos genes *aroB* e *aroD* individualmente. Para digestão do vetor e inserto foram utilizadas as enzimas *Xho*I e *Nde*I. Para as construções em operon e pseudo-operon utilizou-se as enzimas *Bcu*I e *Sal*I

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

para digerir o vetor e *XmaJ*I e *Sal*I ou *Xba*I e *Sal*I para os insertos. Na construção em monocistrônico foram utilizadas no vetor, *Nhe*I e *Sal*I e nos insertos *Xba*I e *Sal*I.

Os fragmentos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, por 35 minutos a 90 V, em seguida foram purificados de acordo com o protocolo do kit, *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific© Waltham, Massachusetts, EUA. https://www.thermofisher.com).

Com as partes purificadas foi realizada reação de ligação utilizando a T4 DNA ligase (Thermo Scientific© Waltham, Massachusetts, EUA. https://www.thermofisher.com), a reação permaneceu em temperatura ambiente *overnight*. Em seguida a reação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5α (Thermo Scientific© Waltham, Massachusetts, EUA. https://www.thermofisher.com) por choque térmico. As células transformadas foram plaqueadas em meio com antibiótico (Canamicina) e incubadas a 37°C por cerca de 16 horas.

Quadro 3 – Condições das reações de ligação.

Vetor (ng)	Proporção 1 em relação ao inserto (75 ng)
Inserto (ng)	Proporção 3 em relação ao vetor *
T4 DNA ligase	1 µL
T4 buffer	2 µL
Água livre de DNAse	Completar para 20 µL
Total	20 µL

* A quantidade de DNA do inserto deve ser 3 vezes superior à de vetor, esse cálculo deve levar em consideração o tamanho do vetor e do inserto, foi utilizada a aplicação NEBiocalculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation) para determinar a massa de cada inserto na reação. **Fonte:** O Autor, 2024.

As construções foram confirmadas por PCR (anexo A) a partir das colônias que cresceram após a transformação. As colônias positivas para amplificação do inserto foram incubadas em meio liquido a 37°C *overnigth*, com o cultivo foi feita miniprep para re-confirmação das construções a partir da digestão do plasmídeo. Após a segunda confirmação, as cepas de DH5α portando os plasmídeos com inserto, foram preservadas em glicerol 25%, e mantidas a -80°C. Os vetores extraídos foram utilizados para transformação de uma linhagem modificada de *E. coli* W, que possui maior potencial para produção de 3-DHS, quando comparada a uma cepa selvagem de *E. coli* W

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

4.3 CULTIVO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES *AROB* E *AROD*

Para o cultivo de avaliação do efeito da superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* foram utilizadas as vinte e cinco linhagens contendo os vetores de expressão e uma linhagem controle sem o vetor. O ensaio foi conduzido no equipamento *Growth Profile* 960 (EnzyScreen© Herenweg 29R, 2105 MB Heemstede, Países Baixos. https://www.enzyscreen.com/), em microplacas de 96 poços por 72 horas a 37°C e rotação de 225 rpm. Após 2 horas de ensaio, adicionou-se 1mM de IPTG para induzir os genes referente expressão das enzimas 3-desidroquinato sintase e 3-desidroquinato desidratase.

O meio de cultura utilizado foi o MR modificado: extrato de levedura 3 g/L, $NaHCO_3$ 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 9 g/L, KH_2PO_4 6,67 g/L, $(NH_4)_2HPO_4$ 4 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0,8 g/L, ácido cítrico 0.8 g/L e 0,5 % de TMS (solução traço de metal). TMS contendo $FeSO_4.7H_2O$ 10 g/L, $CaCl_2.2H_2O$ 2 g/L, $ZnSO_4.7H_2O$ 2,2 g/L, $MnSO_4.H_2O$ 0,38 g/L, $CuSO_4.5H_2O$ 1 g/L, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0,14 g/L, $Na_2B_4O_7.10H_2O$ 0,02 g/L (SONG et al., 2016). Duas fontes de carbono foram avaliadas neste estudo, sendo: glicerol 20 g/L e glicose 20 g/L.

Para o pré-inóculo, colônias isoladas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL com 10 mL de LB Lennox e incubados em shaker a 37°C com 250 rpm de rotação, *overnight*. O inóculo foi feito a partir da diluição do pré-inóculo em meio MR para atingir $DO600_{nm}$ de 1,0 a fim de iniciar os ensaios com $DO600_{nm}$ de 0,1.

O equipamento Liquid Handler Hamilton Microlab® STAR (Core II) foi utilizado para preparar as oito microplacas para este ensaio. Para cada poço da microplaca foi transferido 225 uL de meio de cultivo MR, 25 uL de inóculo, e posteriormente 1 uL de IPTG 1 mM para indução da superexpressão. Foram utilizadas 8 placas, 4 com meio contendo glicerol e 4 contendo meio com glicose, e as linhagens foram distribuídas nas placas por linhas, sendo 12 poços para cada linhagem.

Após as 72 h de experimento as amostras foram coletadas em duplicata, centrifugadas, filtradas e o sobrenadante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com a coluna Aminex HPX-87H; fase móvel H_2SO_4 1,0 mM; 0,7 mL/min; temperatura da coluna 50ºC, usando radiação UV e refratometria diferencial (RI) com os detectores: RID e DAD comprimentos de onda no DAD: 210 e 236.

Os metabólitos analisados foram a fonte de carbono (glicerol ou glicose), produto final (3-DHS) e acetato, subproduto resultante da fermentação anaeróbica em *E. coli*, e produto indesejado no cultivo.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROSPECÇÃO E OBTENÇÃO DOS GENES *AROB* E *AROD*

Para a enzima 3-desidroquinato sintase (EC 4.2.3.4) identificamos apenas três registros no banco de dados BRENDA contendo o parâmetro funcional Kcat/KM. Conforme demonstrado na Tabela 1, a enzima proveniente de *E. coli* ATCC 11775 apresenta um valor de Kcat/KM entre 3,5 a 18 vezes superior ao observado para as outras duas enzimas relatadas na literatura. Por isso optamos por utilizar apenas o gene *aroB* nativo de *E. coli* nesse trabalho.

Tabela 1 – Registros dos parâmetros funcionais da enzima 3-desidroquinato sintase (EC 4.2.3.4)

Organismo	Condição experimental	Kcat/KM (mMs-1)
Actinidia chinensis	pH 6.8, 25°C	156
Pyrococcus furiosus	pH 6.8, 25°C	811
Escherichia coli	pH 6.8, 25°C	2807

Fonte: BRENDA, [2023].

Para a enzima 3-desidroquinato desidratase (4.2.1.10) identificamos 33 registros no banco de dados BRENDA com valores de Kcat/KM reportados. A Tabela 2 apresenta uma seleção dos dados mais relevantes, incluindo as três enzimas com os maiores valores de Kcat/KM, provenientes de *Salmonella entérica* ATCC 700720*, Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Enterococcus faecalis* ATCC 700802 que foram escolhidas para avaliação neste trabalho. Como referência comparativa, também analisamos a enzima nativa de *E. coli* K12 cujo valor de Kcat/KM é de 160 $mM^{-1}s^{-1}$. Essa análise permitiu identificar as opções mais promissoras para otimização da produção de 3-DHS. A tabela 2 também inclui os dados de de Kcat/KM das enzimas de *Corynebacterium glutamicum* e *Pseudomonas putida*, que também são utilizadas como chassi para produção de ácido mucônico, entretanto, não foram avaliadas nesse estudo.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Tabela 2 – Registros dos parâmetros funcionais da enzima 3-desidroquinato desidratase (4.2.1.10).

Organismo	Condição experimental	Kcat/KM (mMs-1)
Salmonella enterica	Não especificado	5800
Enterococcus faecalis	pH 7.5, 25°C	1700
Klebsiella pneumoniae	Não especificado	780
Corynebacterium glutamicum	Não especificado	190
Escherichia coli	Não especificado	160
Pseudomonas putida	Não especificado	130

Fonte: BRENDA, [2023].

5.2 CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DOS CASSETTES DE EXPRESSÃO

As confirmações das construções foram feitas por PCR e posteriormente re-confirmadas por digestão (Anexo D). Das 25 construções, 5 foram com os genes *aroB* e *aroD* clonados individualmente. Para operon e pseudo-operon foram feitos 8 cassettes, com todas as combinações possíveis entre os dois genes, na ordem *aroBD* e *aroDB*. Finalizando com 4 construções em monocistrônico, montadas com a combinação dos genes na ordem *aroBD* (Tabela 3).

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Tabela 3 – Construções combinatórias dos genes.

Linhagem	*aroB*	*aroD*	Configuração	Ordem
1	-	-	-	-
2	*E. coli*	-	-	*aroB*
3	-	*E. coli*	-	*aroD*
4	-	*E. faecalis*	-	*aroD*
5	-	*S. enterica*	-	*aroD*
6	-	*K. pneumoniae*	-	*aroD*
7	*E. coli*	*E. coli*	Operon	*aroBD*
8	*E. coli*	*E. faecalis*	Operon	*aroBD*
9	*E. coli*	*S. enterica*	Operon	*aroBD*
10	*E. coli*	*K. pneumoniae*	Operon	*aroBD*
11	*E. coli*	*E. coli*	Operon	*aroDB*
12	*E. coli*	*E. faecalis*	Operon	*aroDB*
13	*E. coli*	*S. enterica*	Operon	*aroDB*
14	*E. coli*	*K. pneumoniae*	Operon	*aroDB*
15	*E. coli*	*E. coli*	Pseudo-operon	*aroBD*
16	*E. coli*	*E. faecalis*	Pseudo-operon	*aroBD*
17	*E. coli*	*S. enterica*	Pseudo-operon	*aroBD*
18	*E. coli*	*K. pneumoniae*	Pseudo-operon	*aroBD*
19	*E. coli*	*E. coli*	Pseudo-operon	*aroDB*
20	*E. coli*	*E. faecalis*	Pseudo-operon	*aroDB*
21	*E. coli*	*S. enterica*	Pseudo-operon	*aroDB*
22	*E. coli*	*K. pneumoniae*	Pseudo-operon	*aroDB*
23	*E. coli*	*E. coli*	Monocistrônico	*aroBD*
24	*E. coli*	*E. faecalis*	Monocistrônico	*aroBD*
25	*E. coli*	*S. enterica*	Monocistrônico	*aroBD*
26	*E. coli*	*K. pneumoniae*	Monocistrônico	*aroBD*

Fonte: O Autor, 2024.

Os vetores de expressão foram transformados em uma linhagem de *E. coli* W que permite o acúmulo de 3-DHS naturalmente, com modificações que aumentam o fluxo de carbono para via do chiquimato, por isso foi escolhida para o estudo de superexpressão dos genes da via.

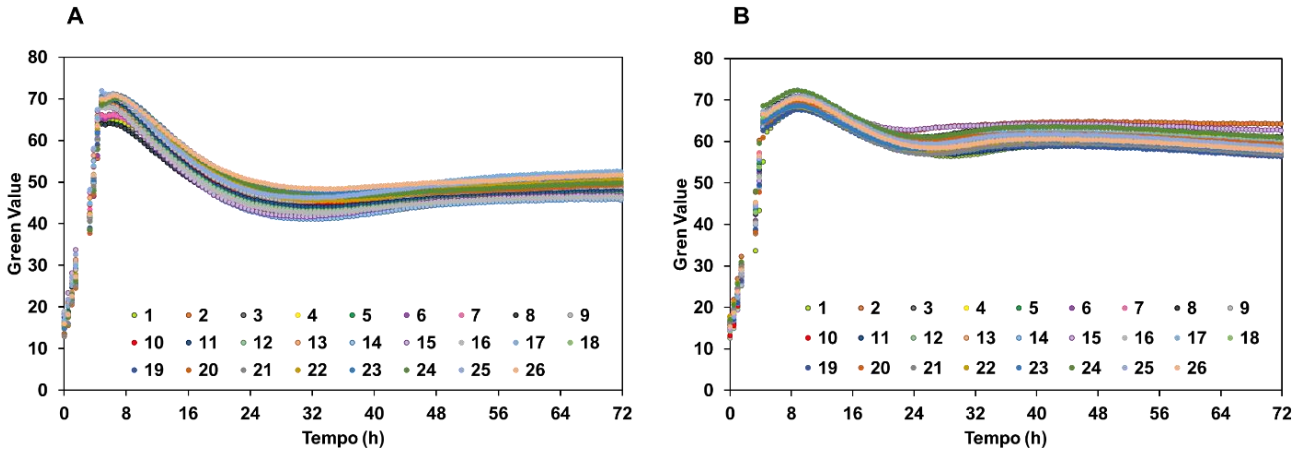
Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

5.3 CULTIVO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES *AROB* E *AROD*

A Figura 7 mostra o crescimento celular das 26 cepas avaliadas neste trabalho para as diferentes combinações de genes *aroB* e *aroD*. Ao comparar a linhagem 1 sem superexpressão, com as linhagens de 2-26 com superexpressão, observa-se o mesmo perfil de crescimento, um indicativo de que a superexpressão não causou impacto significativo no crescimento celular. Não foram observadas pelos valores de *green value* diferenças no perfil de crescimento entre as linhagens e as duas fontes de carbono.

Vale destacar que os dados obtidos no *Growth profiler* são gerados através de imagens e resultam em *green values*. Esses valores são relativos à diferença de cor nos pixels das imagens durante o tempo, e podem representar um perfil de crescimento, entretanto, trata-se de uma unidade arbitrária que não possui correlação linear com crescimento celular, apenas um indicativo de aumento em biomassa, sendo possível apenas comparar a diferença entre as linhagens do experimento.

Figura 7 – Perfil de crescimento das linhagens.

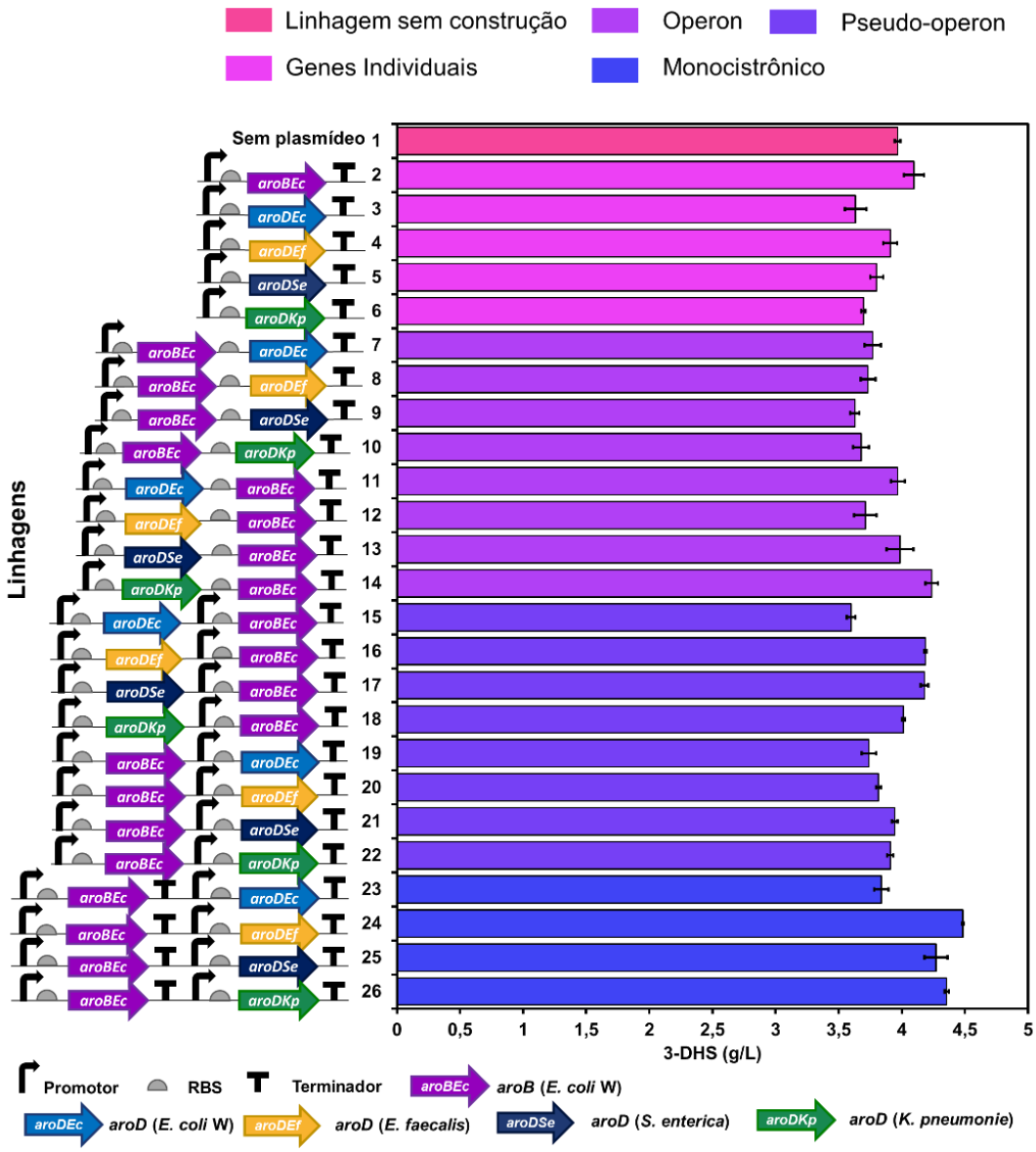


Perfil de crescimento das linhagens construídas para superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* ao utilizar; A) meio de cultura com 20 g/L de glicerol e B) 20 g/L de glicose. Os dados para cada linhagem são o resultado da média do valor de *green value* de 12 poços. **Fonte:** O Autor, 2024.

A Figura 8 ilustra o impacto da superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* no acúmulo de 3-DHS quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono. Os títulos de 3-DHS ao utilizar glicerol variaram de 3,62 a 4,48 g/L para as diferentes construções avaliadas, enquanto, para a cepa controle (sem superexpressão dos genes *aroB_aroD*) o acúmulo foi de 3,96 ± 0,024 g/L.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Figura 8 – Produção de 3-DHS após 72 h de cultivo (Glicerol).



Resultados da superexpressão distribuídos pela variação da origem do gene *aroD* e a configuração dos genes *aroB_aroD* no plasmídeo pRSM6 (operon, pseudo-operon e monocistrônico) e o impacto destas variações no acúmulo de 3-DHS ao utilizar glicerol como fonte de carbono. Dados obtidos após 72 horas de cultivo, analisados em duplicata com desvio padrão de ± 0,007 a ± 0,104. **Fonte:** O Autor, 2024.

No trabalho de Liu, et al., (2014) foram superexpressos os genes *aroB* e *aroD* para melhorar a produção de chiquimato em *Bacilus subtilis*, e observaram que apenas a superexpressão do gene *aroD* resultou num aumento dos títulos de chiquimato em 53%.

Curiosamente, no grupo de superexpressão dos genes individuais, as cepas que superexpressavam o gene *aroD* (linhagens 2-5) obtiveram concentrações entre 3,6 g/L e 3,9 g/L, que não representa um aumento em relação a cepa controle que produziu

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

3,9 g/L de 3-DHS. No caso da cepa de superexpressão do gene *aroB* houve um aumento de 0,1 g/L na produção, apesar desse valor não ser considerado significativo quando comparado a cepa controle, observamos uma produção maior quando comparada a superexpressão do gene *aroD*.

As construções em operon, com gene *aroB* posicionado logo após o promotor (linhagens 7-10), não favoreceram o acúmulo do produto em relação a linhagem 1, com produção igual ou inferior aos 3,9 g/L da cepa controle. Quando esse gene estava mais próximo ao terminador, houve maior variação nas concentrações de 3-DHS. As linhagens 11 e 13 tiveram acúmulo de 3,9 g/L, enquanto a linhagem 12 teve produção inferior (3,7 g/L) e a linhagem 14 produziu 0,3 g/L a mais que a cepa controle, com 4,2 g/L do metabólito final.

Nos sistemas em pseudo-operon, quando o gene *aroB* estava logo após o promotor (linhagens 19-22), também se observou que o acúmulo de 3-DHS não aumentou em relação ao controle, com produções iguais ou inferiores a 3,9 g/L. Já quando o gene *aroB* estava mais próximo ao terminador, as concentrações ficaram entre 4,0 g/L (cepa 18) e 4,2 g/L nas cepas 16 e 17, representando um aumento real na produção em relação a linhagem 1. Por outro lado, a linhagem 15 contendo o gene *aroD* nativo obteve uma produção inferior, com 3,6 g/L de concentração final.

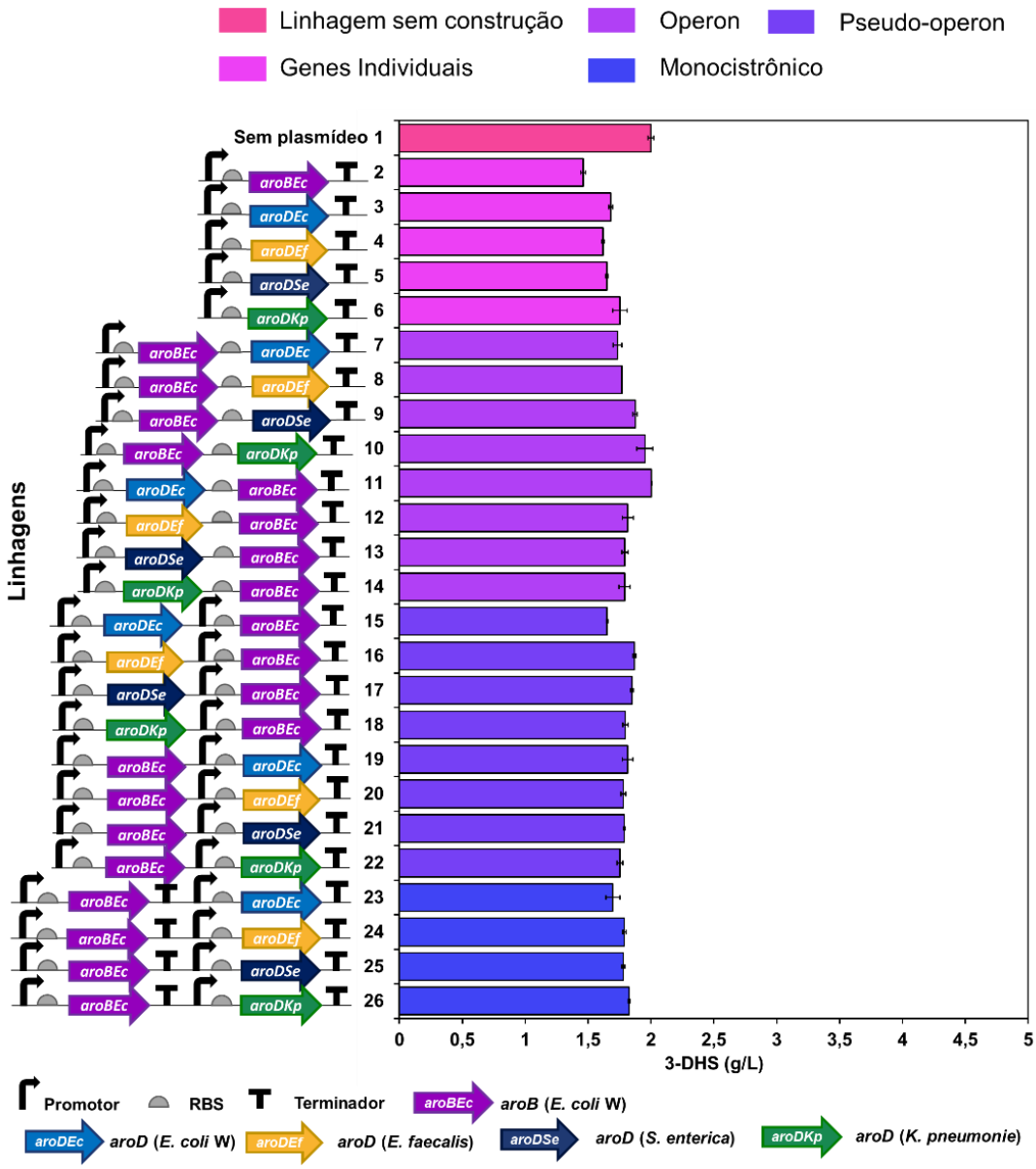
Com exceção do cassette que continha o gene *aroD* nativo, os sistemas de expressão na configuração monocistrônica (linhagens 24, 25 e 26) apresentaram os melhores resultados de produção de 3-DHS, com títulos de 4,5 g/L; 4,2 g/L e 4,4 g/L, respectivamente.

O cassette monocistrônico contendo os genes *aroB* de *E. coli* e *aroD* de *E. faecalis* (construção 24 - **Figura 8**) foi o mais eficiente na produção de 3-DHS e selecionado para as etapas futuras de engenharia genética do grupo de pesquisa para construção de um chassi procariótico superprodutor de ácido mucônico.

A Figura 9 mostra o impacto da superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* no acúmulo de 3-DHS quando glicose foi utilizado como fonte de carbono. Os títulos de 3-DHS ao utilizar glicose variaram de 1,4 a 2,0 g/L para as diferentes construções avaliadas, enquanto, para a cepa controle (sem superexpressão dos genes *aroB* e *aroD*) o acúmulo foi de 1,9 ± 0,021 g/L

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Figura 9 – Produção de 3-DHS após 72 h de cultivo (Glicose).



Resultados da superexpressão distribuídos pela variação da origem do gene *aroD* e a configuração dos genes *aroB* e *aroD* no plasmídeo pRSM6 (operon, pseudo-operon e monocistrônico) e o impacto destas variações no acúmulo de 3-DHS ao utilizar **glicose** como fonte de carbono. Dados obtidos após 72 horas de cultivo, analisados em duplicata com desvio padrão de ± 0,008 a ± 0,108. **Fonte:** O Autor, 2024.

No comparativo entre a figura 8 e 9 pode-se observar um maior acúmulo de 3-DHS nas linhagens que foram cultivadas no meio contendo glicerol como fonte de carbono. O uso de glicerol promoveu uma produção de 3-DHS 2,3 vezes maior em comparação à glicose.

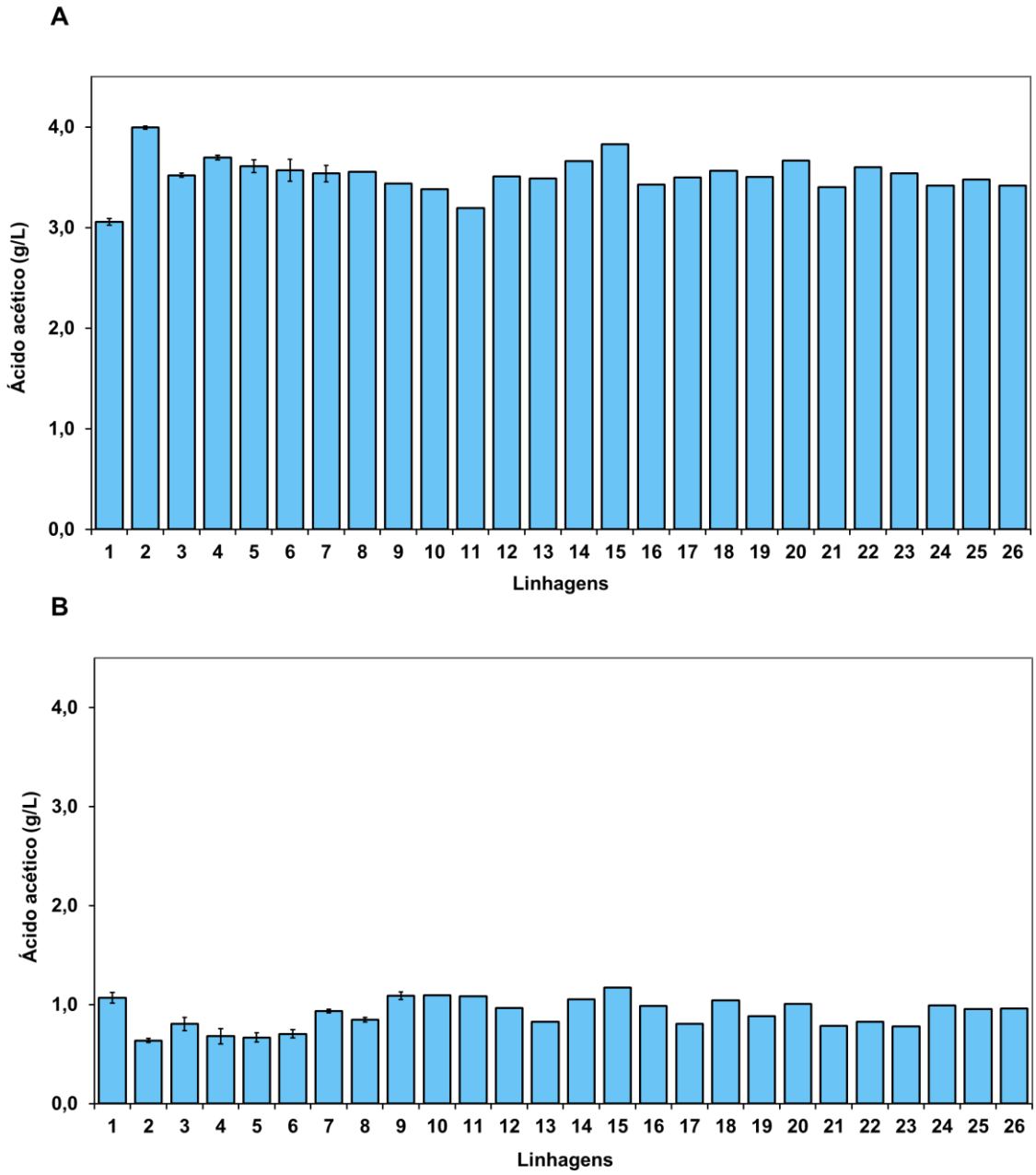
As linhagens cultivadas com glicose não produziram concentrações de 3-DHS superiores ao controle, indicando que nessa condição, as superexpressões não tiveram efeito positivo no acúmulo do produto alvo. Com a linhagem parental tendo a maior

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

produção, com aproximadamente 2,0 g/L de 3-DHS, por outro lado a produção de acetato foi a menor entre as linhagens com cerca de 3,0 g/L que entre outros fatores discutidos abaixo podem justificar ao melhor desempenho da cepa sem superexpressão.

A Figura 10 apresenta os dados de produção de ácido acético pelas diferentes linhagens construídas e avaliadas neste projeto ao utilizar glicose (Figura 10A) e glicerol (Figura 10B).

Figura 10 – Produção de ácido acético após 72 h de cultivo.

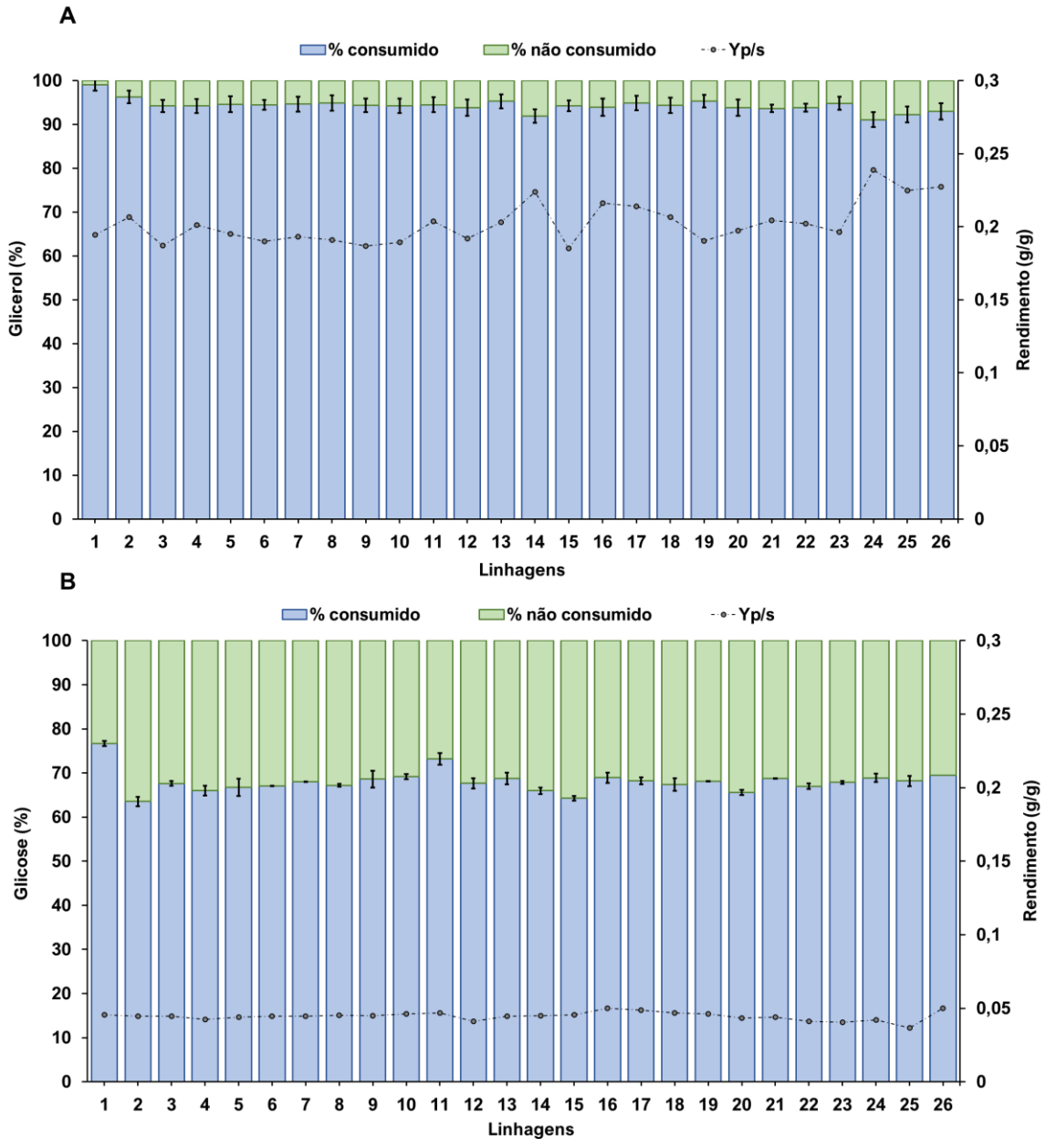


Acúmulo de ácido acético nas linhagens cultivadas em meio com glicose (A) dados analisados em duplicata com desvio padrão de ± 0,006 a ± 0,153; e glicerol (B) dados analisados em duplicata com desvio padrão de ± 0,004 a ± 0,164. **Fonte:** O Autor, 2024.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

O ácido acético é um sub-produto comumente produzido pela bactéria *E. coli*, principalmente em condições de limitação de oxigênio (não aplicáveis aos nossos ensaios) ou em situações de excesso de substrato, principalmente glicose, por meio de um mecanismo conhecido como superfluxo metabólico (do inglês, *overflow metabolism)*. Esse fenômeno ocorre quando o fluxo de glicose convertido em piruvato e, subsequentemente, oxidado a acetil-CoA excede a capacidade de assimilação do acetil-CoA pela via do ciclo do ácido cítrico e/ou pela cadeia transportadora de elétrons. Nessas condições, o acetil-CoA é desviado para a formação de acetato, esse fenômeno pode explicar os resultados observados.

Figura 11 – Consumo da fonte de carbono e rendimento, após 72 h de cultivo.



Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

(A) Consumo de Glicerol representado em barras dado em (%), rendimento representado em pontos dado em (Yp/s, em g 3-DHS/ g glicerol), os dados foram analisados em duplicata com desvio padrão de ± 0,104 a ± 1,869; (B) Consumo de Glicose representado em barras dado em (%) e rendimento representado em pontos dado em (Yp/s, em g 3-DHS/ g glicose), os dados foram analisados em duplicata com desvio padrão de ± 0,017 a ± 1,951. **Fonte:** O Autor, 2024.

Um outro parâmetro fundamental para avaliar o impacto da superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* é o rendimento em produto (Yp/s), que mede a eficiência na conversão do substrato fornecido em produto-alvo. As Figuras 11A e 11B apresentam os dados de consumo de glicerol e glicose, respectivamente, bem como os rendimentos obtidos para as 26 linhagens analisadas.

Observa-se que, nos cultivos com glicerol, a maior parte do substrato foi consumida, com consumo variando entre 91 e 99%, enquanto, nos cultivos com glicose, o consumo variou entre 63 e 76%. Essa maior eficiência no consumo de glicerol, associada a uma maior produção de 3-DHS, e menor produção de acetato, resultou em rendimentos significativamente superior nos ensaios com glicerol, atingindo valores 4,4 vezes maiores em comparação aos ensaios realizados com glicose. Esses resultados reforçam o potencial do glicerol como fonte de carbono preferencial para maximizar a produção de 3-DHS, e consequentemente de ácido mucônico.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou o impacto da superexpressão dos genes *aroB* e *aroD* na produção de 3-DHS, um intermediário chave na via de biossíntese do ácido mucônico, em *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que a superexpressão desses genes podem ser uma estratégia eficaz para o aumento do acúmulo de 3-DHS, quando cultivados usando glicerol como fonte de carbono, com destaque para as configurações monocistrônicas, que apresentaram os melhores resultados em termos de título de 3-DHS e rendimento em 3-DHS. Além disso, verificou-se que o microrganismo de origem para o gene *aroD* exerce influência significativa sobre a eficiência da produção de 3-DHS. O cassette monocistrônico contendo os genes *aroB* de *E. coli* e *aroD* de *E. faecalis* possibilitou a produção de 4,48 g/L ± 0,007 g/L de 3-DHS, sendo superior a produção da nossa cepa controle 3,96 ± 0,024 g/L.

Notou-se também que o uso de glicerol, um resíduo abundante da indústria de biodiesel, como fonte de carbono, em comparação à glicose, proporcionou maiores títulos e rendimentos de 3-DHS, reforçando seu potencial como substrato renovável para o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

REFERÊNCIAS

AS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. [2025]. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br. Acesso em: 26 jan. 2025.

BEHLING, R.; VALANGE, S.; CHATEL, G. Bioprivileged Molecules: Creating Value from Biomass. **Green Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1839–1854, 2016. https://doi.org/10.1039/C5GC03061G.

CAMERON, D. E.; BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. A brief history of synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 381–390, maio 2014. https://doi.org/10.1038/nrmicro3239.

CHANG, A.; JESKE, L.; ULBRICH, S.; HOFMANN, J.; KOBLITZ, J.; SCHOMBURG, I.; NEUMANN-SCHAAL, M.; JAHN, D.; SCHOMBURG, D. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D498–D508, 8 jan. 2021. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025.

CHOI, S.; LEE, H.-N.; PARK, E.; LEE, S.-J.; KIM, E.-S. Recent Advances in Microbial Production of cis,cis-Muconic Acid. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1238, 25 ago. 2020. https://doi.org/10.3390/biom10091238.

CURRAN, K. A.; LEAVITT, J. M.; KARIM, A. S.; ALPER, H. S. Metabolic engineering of muconic acid production in Saccharomyces cerevisiae. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 55–66, jan. 2013. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.003.

DRATHS, K. M.; FROST, J. W. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 1, p. 399–400, jan. 1994. https://doi.org/10.1021/ja00080a057.

FAWZY, S.; OSMAN, A. I.; DORAN, J.; ROONEY, D. W. Strategies for mitigation of climate change: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 2069–2094, 1 nov. 2020. https://doi.org/10.1007/s10311-020-01059-w.

HE, W.; FU, L.; LI, G.; ANDREW JONES, J.; LINHARDT, R. J.; KOFFAS, M. Production of chondroitin in metabolically engineered E. coli. **Metabolic Engineering**, v. 27, p. 92–100, jan. 2015. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.11.003.

JAWED, K.; ABDELAAL, A. S.; KOFFAS, M. A. G.; YAZDANI, S. S. Improved Butanol Production Using FASII Pathway in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, v. 9, n. 9, p. 2390–2398, 18 set. 2020. https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00154.

KHALIL, I.; QUINTENS, G.; JUNKERS, T.; DUSSELIER, M. Muconic acid isomers as platform chemicals and monomers in the biobased economy. **Green Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1517–1541, 2020. https://doi.org/10.1039/C9GC04161C.

KOHLSTEDT, M.; STARCK, S.; BARTON, N.; STOLZENBERGER, J.; SELZER, M.; MEHLMANN, K.; SCHNEIDER, R.; PLEISSNER, D.; RINKEL, J.; DICKSCHAT, J. S.; VENUS, J.; B.J.H. VAN DUUREN, J.; WITTMANN, C. From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered Pseudomonas putida. **Metabolic Engineering**, v. 47, p. 279–293, maio 2018.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.003.

KRUYER, N. S.; PERALTA-YAHYA, P. Metabolic engineering strategies to bio-adipic acid production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 136–143, jun. 2017. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.006.

LI, Z.; GAO, C.; YE, C.; GUO, L.; LIU, J.; CHEN, X.; SONG, W.; WU, J.; LIU, L. Systems engineering of Escherichia coli for high-level shikimate production. **Metabolic Engineering**, v. 75, p. 1–11, jan. 2023. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.10.010.

LIU, D.-F.; AI, G.-M.; ZHENG, Q.-X.; LIU, C.; JIANG, C.-Y.; LIU, L.-X.; ZHANG, B.; LIU, Y.-M.; YANG, C.; LIU, S.-J. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by Bacillus subtilis strains. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 40, 2014. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-40.

MARTÍNEZ, J. A.; BOLÍVAR, F.; ESCALANTE, A. Shikimic Acid Production in Escherichia coli: From Classical Metabolic Engineering Strategies to Omics Applied to Improve Its Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 23 set. 2015. DOI 10.3389/fbioe.2015.00145. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00145/abstract. Acesso em: 8 dez. 2024.

POLEN, T.; SPELBERG, M.; BOTT, M. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 75–84, ago. 2013. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.008.

PYNE, M. E.; BAGLEY, J. A.; NARCROSS, L.; KEVVAI, K.; EXLEY, K.; DAVIES, M.; WANG, Q.; WHITEWAY, M.; MARTIN, V. J. J. Screening non-conventional yeasts for acid tolerance and engineering Pichia occidentalis for production of muconic acid. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 5294, 31 ago. 2023. https://doi.org/10.1038/s41467-023-41064-5.

SHANKS, B. H.; BROADBELT, L. J. A Robust Strategy for Sustainable Organic Chemicals Utilizing Bioprivileged Molecules. **ChemSusChem**, v. 12, n. 13, p. 2970–2975, 2019. https://doi.org/10.1002/cssc.201900323.

SONG, C. W.; KIM, J. W.; CHO, I. J.; LEE, S. Y. Metabolic Engineering of Escherichia coli for the Production of 3-Hydroxypropionic Acid and Malonic Acid through β-Alanine Route. **ACS Synthetic Biology**, v. 5, n. 11, p. 1256–1263, 18 nov. 2016. https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00007.

SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOAL 12: CONSUMO E PRODUÇÃO RESPONSÁVEIS | AS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. [2025]. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/12. Acesso em: 26 jan. 2025.

XIE, N.-Z.; LIANG, H.; HUANG, R.-B.; XU, P. Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 3, p. 615–622, maio 2014. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.001.

XU, P.; VANSIRI, A.; BHAN, N.; KOFFAS, M. A. G. ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, v. 1, n. 7, p. 256–266, 20 jul. 2012. https://doi.org/10.1021/sb300016b.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

ANEXOS

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

ANEXO A – LISTA DE PRIMERS

Tabela 4 – Lista de primers.

Função	Sequência
Amplificação gene *aroB* de *E. coli* inserção do sítio *Nde*I *(Forward)*	5’-GGCCCATATGAAAACCGTAACTGTAAAAGATCTCG-3'
Amplificação gene *aroB* de *E. coli* inserção do sítio *Xho*I *(Reverse)*	5’-GGCCCTCGAGTTATGCCTGGTGTAAAATAGTTAATACCG-3'
Amplificação gene *aroD* de *E. coli* inserção do sítio *Nde*I *(Forward)*	5’-GCGAGATCTATGGAGAGGATTGTCGTTACTC-3'
Amplificação gene *aroD* de *E. coli* inserção do sítio *Xho*I *(Reverse)*	5’-GCTCTCGAGTTACGCTGATTGACAATCGG-3'
Primer de confirmação *(Forward)*	5’-GAGAGCGTTCACCGACAAAC-3'
Primer de confirmação *(Reverse)*	5’-GGTGATGTCGGCGATATAGG-3'

Fonte: O Autor, 2024.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

ANEXO B – SEQUÊNCIAS SIINTETIZADAS COM CÓDON OTIMIZADO

aroD – E. feacalis

cacttttttcaccttctgaatcacttgttttgttcgaatgtctttaaataatttcttaatacttgtacggatagttggcccggtgcggacgct
tgctgggctgagccaaaagttagtgccgacccgaacagttgacctgttacgcgactaatcatccctaactgtcccattgacata
gtaacgattgggacggatgcataatgggtgtacatttcattggttgctgaaagtaacgtaagtacatctgtcgcatcttgtggcatc
acagctattttacaaatatccgcctgacgcatttgcatttggcgtaaccgcgcgacaatctcctcttgcgacggtgttttctgaaagt
cgtgattacagagaacaattttaatccccgccttttagcttcgtgaattaacgtatctgccgccagcggattcgcaaataattcaa
tatctaataaatccaacgcacctttttttcactaattcatgatacaaagcaaaataatttttcctcagaaaaagccatttcgccgccttc
ttttgtgtacgaaaagttaacaataacggtttttgccccaaccgttccattacttgttgtgaaagattacatacatcggaaaaatca
gcgacattttcataatagtctaaacgccattctaccaaatcacaatctagtgtttggctcgccgttgcttcggccaaaatatcctcg
gctgttggagcaacaatgggcaccacaattttgggattcccttcacctattcgcacatttttgactataactggcttcacagttccac
ctaact

aroD – K. peneumoniae

gccatccggatatcaggagagcatatccatcacttcacgcagcttagcgatggcgatctgccccggcgcggaggcctgacc
aacggtaccgaaggtcatcgccgaaccgaacaagcgcccggtgacccggctaacgccaccggatttgcccatcgacatgg
tgatcagcggacgcgtcgcatacttctctttcatggtcagcgtggcggcgagcaaggtgagtacgtcctgcggcgactgcggc
atcaccgcgatcttcggcagatcggcccccagatcctgcatgcggcgcaggcgatagataatatcttcctgagcgggggtctt
atggaaatcatgattactcatgatcaccttgacgcccgcggcatgcgcatcgtcaaccagcgcgcggatctgcgcttcatcatt
gaacagttcgatatcgataacatcaaccagtccactgcgtgcggcctcgcggttgagcgcaaaataggcttcgtcgctgagct
cggtttcgccaccttctttcttactgcggaaggtaaacagcagcggaagcgctttcagcgcgccacggatttccgccagcgcg
gccatcacctgggccatctctctgacctgggcaaagtggtcaacgcgccattcgataatatcggcgccggcatcgaccaggc
cgtgggcgttacccagtatctcatccagggttttaccgatcagcggtacacaaatgagggtttccccttcctgaaaggtgatgttc
tttacggttactgcatttgtcatgtaggtatccatta

aroD – S. peneumoniae

taaccgtgttaaggtaataaagacagcggctttcaatgaatatggaacatattcatgtcagataactatttatttttattgtggcaga
aagagaatattccgccacacgataaagtattacgcctggtgcaatatagttaatacggtacgcagatcggctaccgatatttgtc
ccggcgcagatgctttttttcaccgcgccaaacgttgccgcagaaccgaacacttcgccggcaagacgagatattaccccggtt
ttcgacatcgacatggtaataatcggacgatccgcatagcgctcctgcatttctacagtggcggtaagtaaggtcaggacatcg
gctttagtctgtggcatgacggcgatcttcggaatatcagcgcccagttcctgcattttacgcagacgctgaacaatctcttccgct
gcgggcgttttatgaaaatcatggttagacatgatcaccgcaacattgtgttgatgagcatagccgacggtggctttcacctcatc

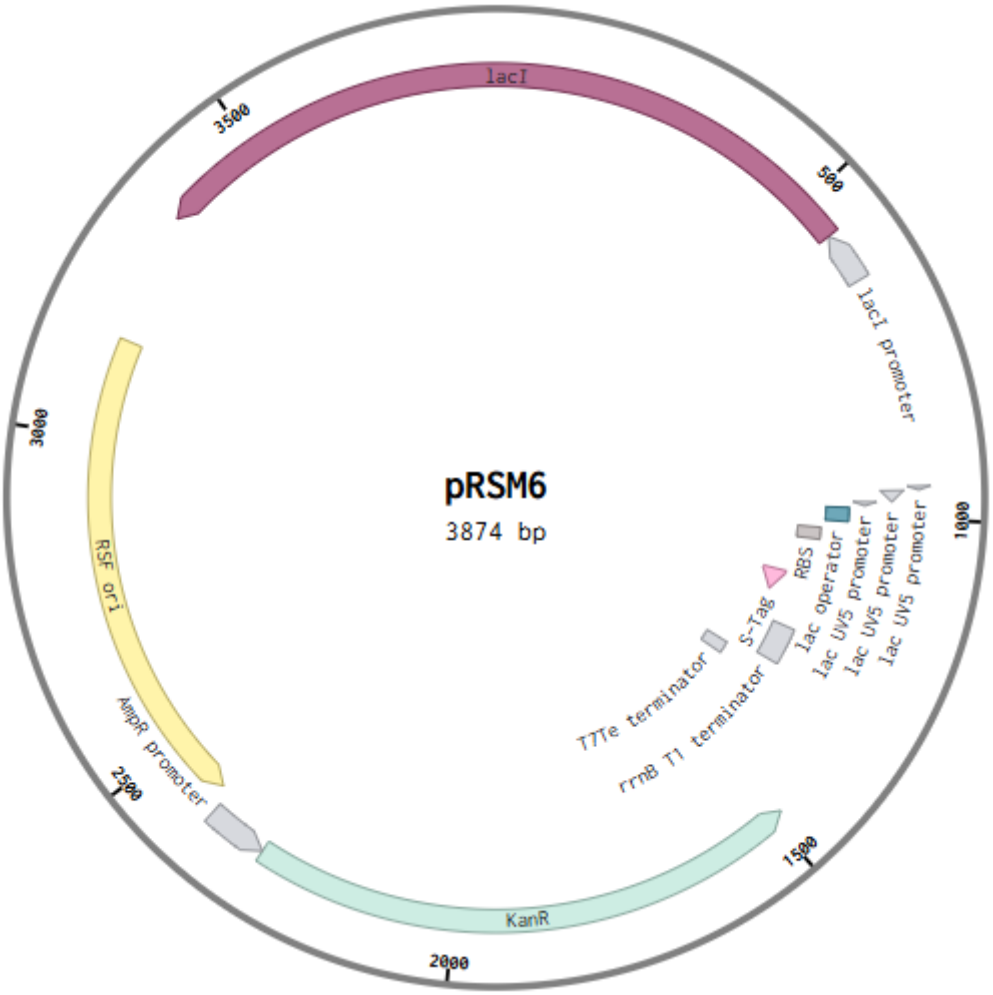
Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

gtcgccggtaaaaagctcaagatcgatcatatcgaccagaccgctgtcaaccgctgcacgattcagatcgatatactgtccgg
tggttagcgcctgttcgccgccttctttcgcgctgcggaaggtaaatagcaagggtttatcggtaataatctcccggatggcgcc
ggcggcctcaagtacgctttccgccgttgtcacgttggcaaaatggtcaacgcgccactccagaatatcgaaatccgcttcac
ggtaggcgagtgcttccgatttcacatcggtaatggtttttcccattagcgacacaatgatctttggcgcgccttcgccaaccacg
agatctcttacagttacggttttcatttggtacccttcattgtcattcgtcgcaattataattttaccggtcaggctgtgaatcccatcac
ctgctttacatagtccaatggaaacgcttttcctgtccacagttcaaactgttcggctcc

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

ANEXO C – VETOR PRSM6

Figura 12 – Mapa do vetor PRSM6.

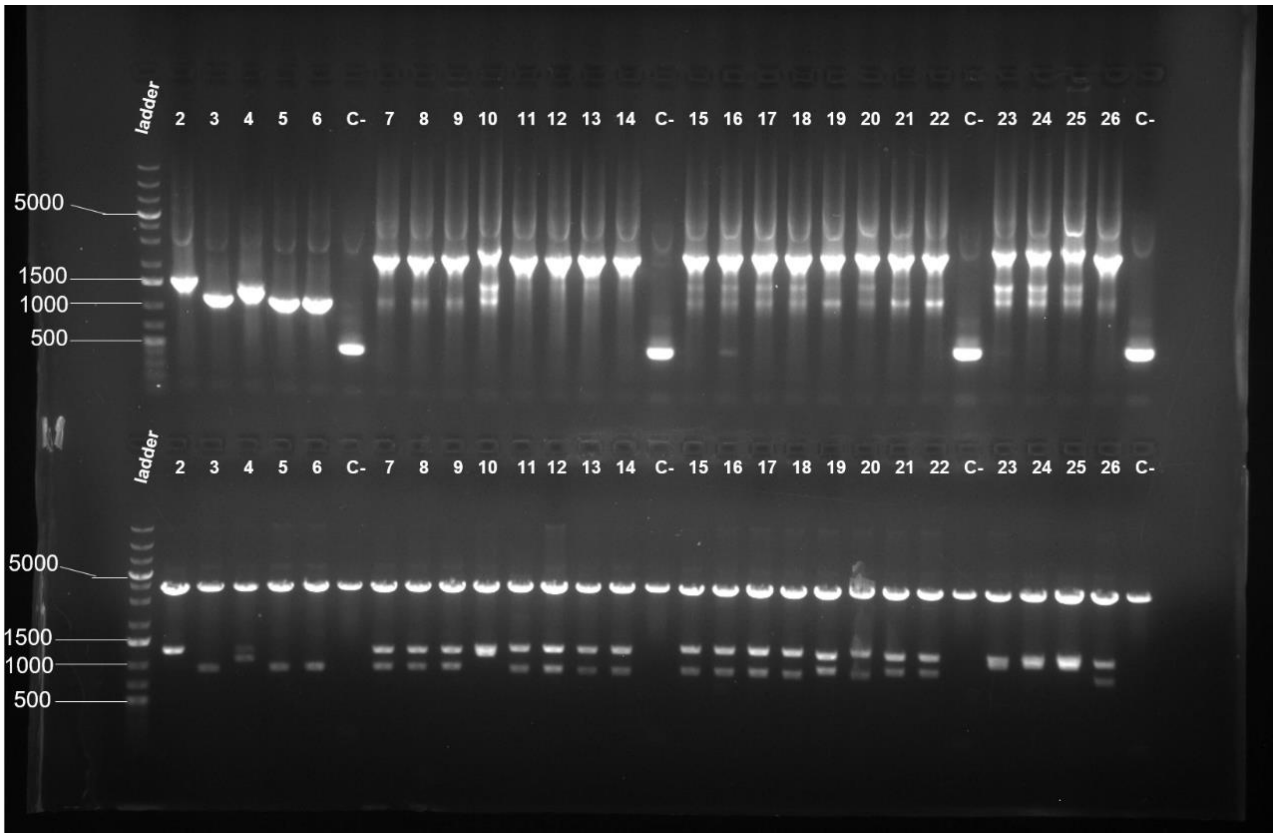


Plasmídeo derivado de Xu. et al. (2012). Componente do repositório interno do LNBR (CNPEM). Origem de replicação RSF, com numero de cópias ~100; marcador de seleção, Canamicina; conjunto de partes para expressão; região LacI para clonagem com validação *white-blue screeninng.*

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

ANEXO D – CONFIRMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES

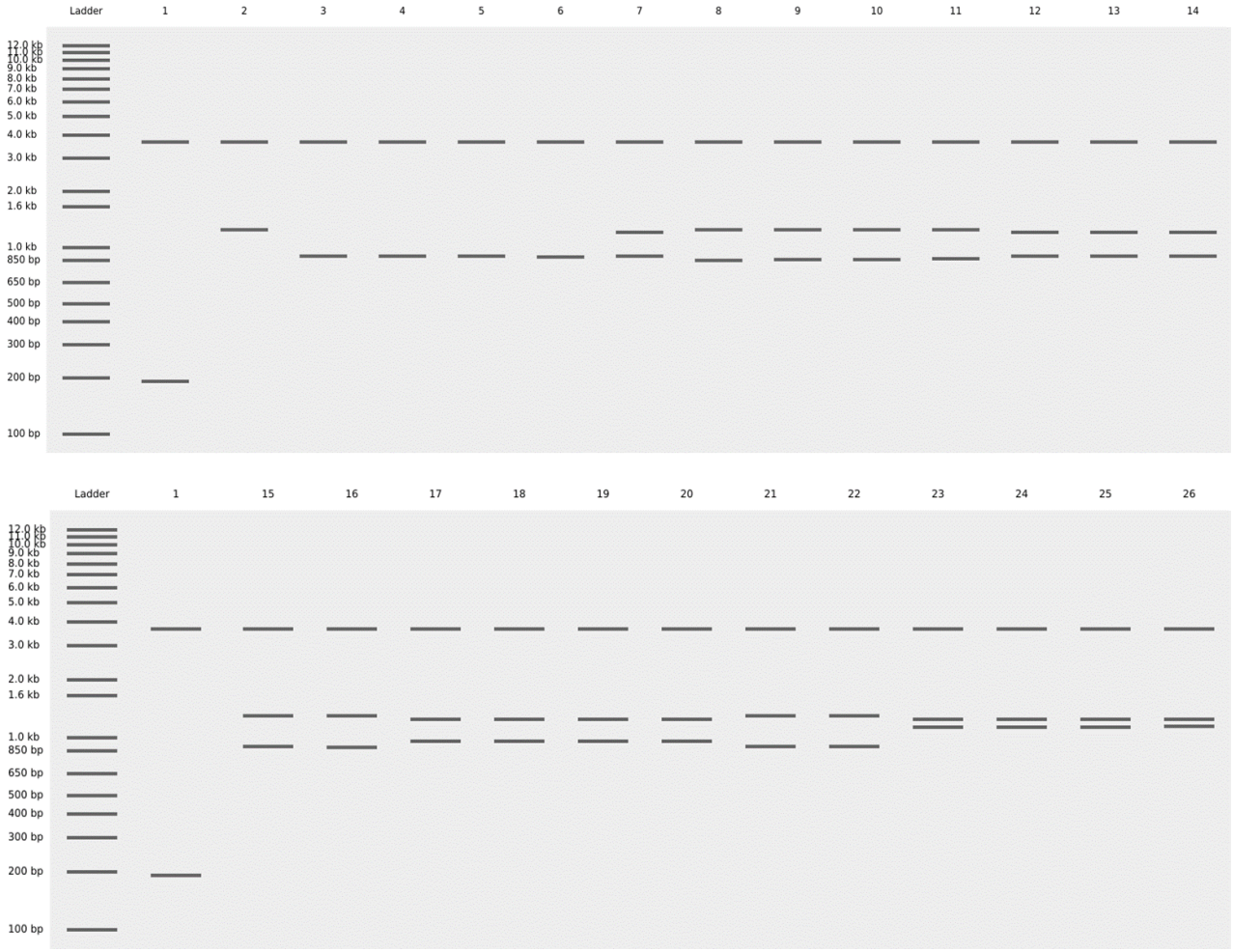
Figura 13 – Gel de eletroforese com confirmação e re-confirmação das construções.



Na parte superior do gel temos as construções amplificadas por PCR; na parte inferior a re-confirmação por digestão com as enzimas *Xba*I e *Xho*I; com vetor vazio sendo o controle negativo. Para PCR, tamanho esperados de 2-5 entre 1200 e 1500 pb; de 7-26 aproximadamente 2400 pb; Vetor: 450 pb. As digestões têm com referência a figura 10 (abaixo). **Fonte:** O Autor, 2024.

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55

Figura 14 – Representação virtual da digestão para re-confirmação.



Fonte: Adaptado de Benchling, [2024].

Versão Final Homologada
03/02/2025 19:55