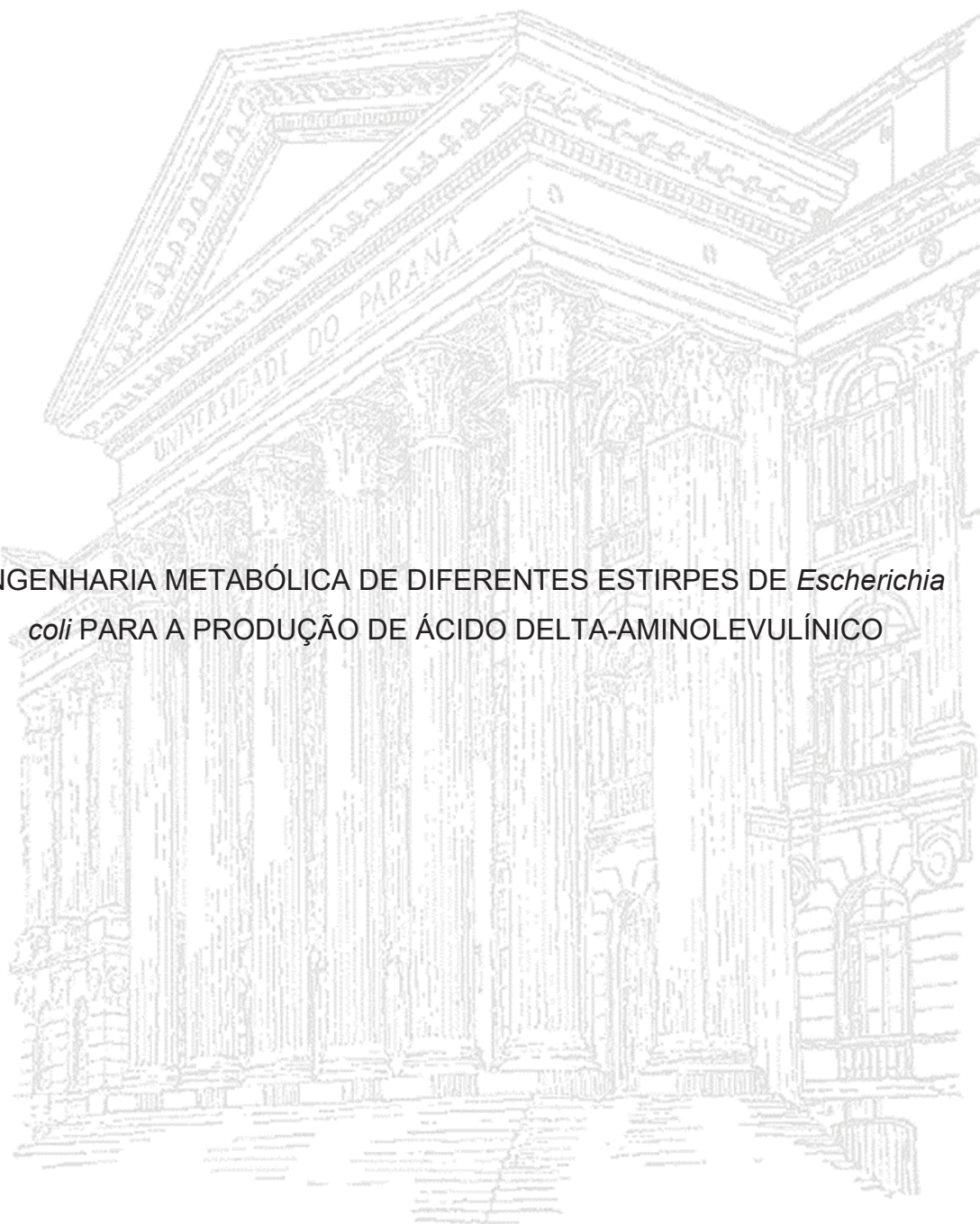


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS HENRIQUE JUNGES

ENGENHARIA METABÓLICA DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Escherichia coli* PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO DELTA-AMINOLEVULÍNICO



CURITIBA

2023

LUCAS HENRIQUE JUNGES

ENGENHARIA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA A PRODUÇÃO DE
ÁCIDO DELTA-AMINOLEVULÍNICO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Junges, Lucas Henrique.

Engenharia metabólica de diferentes estirpes de *Escherichia coli* para a produção de ácido delta-aminolevulínico. / Lucas Henrique Junges. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Marcelo Müller dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. *Escherichia coli*. 2. Aminoácidos. I. Título. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUCAS HENRIQUE JUNGES** intitulada: **ENGENHARIA METABÓLICA DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Escherichia coli* PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO DELTA-AMINOLEVULÍNICO**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO MÜLLER DOS SANTOS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

21/03/2023 09:56:55.0

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/03/2023 13:18:16.0

EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/03/2023 21:37:23.0

ADRIANA FIORINI ROSADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Marcelo Müller dos Santos, por ter me aceitado como mestrando, pela sua excepcional orientação e prontidão para me acudir em todos os momentos e por ser um exemplo de pesquisador para mim.

Ao meu querido irmão, Mateus Henrique Junges, pelo companheirismo incondicional, pela ajuda e pela compreensão em todos os momentos.

Ao Otto Sombrio, por querer morar comigo em outra cidade, por estar comigo em todos os momentos durante todo esse percurso, por enxugar minhas lágrimas e ser a causa dos meus sorrisos, por ter se dedicado tanto por mim.

Ao meu pai, Celso Ervino Junges, e a minha tia, Maria Renata Junges Hammes, por me fornecerem as condições materiais para que eu pudesse ingressar e me manter na carreira acadêmica.

A minha falecida avó, Maria Alzira Junges, por ter feito parte da minha infância.

A Ana Luiza Sprotte Mira, pelas conversas, por mais de um ano de convivência e pelas coquinhas que dividimos nos finais de semana.

Aos meus colegas do Departamento de Bioquímica e do Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela camaradagem, pela convivência e pelas conversas durante as pausas para o café.

Aos professores e técnicos pelo conhecimento, pelas sugestões e pela companhia no dia-a-dia.

Aos meus amigos de bancada do Anexo por terem me recebido, me ensinado e me introduzido às dinâmicas do laboratório. Em especial gostaria de agradecer ao Brenno Miranda, Carolina Castro, Marcos Andrei e Teles Mota por dedicarem seu tempo a responder as minhas dúvidas e me ajudar nas atividades de bancada.

A professora Ana Lúcia Bertarello Zeni, por ter acreditado em mim no começo da graduação e por ter me convidado a ingressar em seu laboratório.

Aos meus colegas do L.A.S. Bioativas, Otto Rodolfo Sasse e Natália Cavichioli, amigos que levo pra toda vida que trituraram muitas folhas de goiabeira comigo.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica).

A NATBIO Ltda. ME pelo suporte financeiro, fornecimento de reagentes, estirpes e plasmídeos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O ácido delta-aminolevulínico (ALA) é um delta aminoácido de ampla ocorrência, encontrado em animais, vegetais e bactérias. As vias descritas de síntese química de ALA possuem muitas etapas e são custosas, fazendo-se necessária a busca por novas formas mais econômicas, simples e ecológicas para a sua produção. *Escherichia coli* desponta como microrganismo de interesse para a produção de ALA devido ao vasto conhecimento acerca do seu metabolismo, das ferramentas de manipulação genética já aprimoradas e de suas conhecidas condições de cultivo. Este trabalho buscou desenvolver estirpes de *E. coli* que produzam ALA a partir de um meio de baixo custo utilizando o plasmídeo pTHR, um vetor contendo os genes *hemA* e *rhtA* com a expressão controlada pelo promotor *P_{tac}*, um promotor sintético produzido da combinação dos promotores naturais dos operons *lac* e *trp* em *E. coli*. Cinco estirpes de *E. coli* foram transformadas com pTHR: MG1655, TOP10, BL21(DE3), BW25113 e W3110. O efeito da expressão do operon *P_{tac}_hemA_rhtA* no crescimento e na produção de ALA das diferentes estirpes foi analisado. A suplementação de meio mínimo com D-glucose e L-glicina (MMALA) apontou um aumento de 514,1% na produção de ALA por TOP10_pTHR em relação ao meio com suplementação apenas de D-glucose, indicando que a L-glicina é um componente chave para a produção de ALA em estirpes portando pTHR. A estirpe BL21(DE3)_pTHR apresentou a maior produção de ALA (1,065 g/L) em meio MMALA após 48 horas de cultivo. Seu crescimento, produção de ALA e consumo de glucose foram monitorados durante 20 horas consecutivas para caracterização da estirpe. A perspectiva é que a produção de ALA por BL21(DE3)_pTHR seja maior em cultivos realizados em biorreatores contendo meio complexo suplementado com glucose, succinato e glicina. Espera-se que cultivos de BL21(DE3)_pTHR possam ser utilizados no desenvolvimento de produtos alimentícios e rações animais suplementadas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, ácido delta-aminolevulínico, BL21(DE3), engenharia metabólica.

ABSTRACT

delta-aminolevulinic acid (ALA) is a widely occurring delta amino acid found in animal, plant and bacterial cells. The described routes of chemical synthesis of ALA have many steps and are costly, making it necessary to search for new, more economical, simple and ecological ways to produce ALA. *E. coli* emerges as a microorganism of interest for producing ALA due to its vast knowledge about its metabolism, already improved synthetic biology tools and known cultivation conditions. This work sought to develop *E. coli* strains that produce ALA from a low-cost medium using the pTHR plasmid, a vector containing the *Ptac*-controlled *hemA* and *rhtA* genes. Five *E. coli* strains were transformed with pTHR: MG1655, TOP10, BL21(DE3), BW25113 and W3110. The effect of *Ptac_hemA_rhtA* operon expression on growth and ALA production of different strains was analysed. Minimal medium supplementation with glucose and glycine (MMALA) achieved a 514.1% increase in ALA production by TOP10_pTHR relative to medium supplemented with glucose alone, indicating glycine as a relevant nutrient for ALA production in strains carrying pTHR. The BL21(DE3)_pTHR strain showed the highest ALA production (1,065 g/L) in the MMALA medium after 48 hours of cultivation. Its growth, ALA production and glucose consumption were monitored for 20 consecutive hours for strain characterization. The perspective is that the production of ALA by BL21(DE3)_pTHR is greater in cultures carried out in bioreactors containing complex medium supplemented with glucose, succinate and glycine. It is expected that BL21(DE3)_pTHR cultures can be used in the development of food products and supplemented animal feeds.

Keywords: *Escherichia coli*, delta-aminolevulinic acid, BL21(DE3), metabolic engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da síntese de metaloporfirinas com seus íons relacionados.	15
Figura 2. Visão geral das vias C4 e C5.....	17
Figura 3. Estratégia para produção e efluxo de ALA.....	23
Figura 4. Representação das etapas de restrição e ligação de DNA para a construção do vetor pTHR.....	31
Figura 5. Curva de crescimento das estirpes de <i>E. coli</i> portando vetor K864400 durante 8 horas de monitoramento.	344
Figura 6. Curva de crescimento das estirpes de <i>E. coli</i> portando vetor pTHR durante 8 horas de monitoramento.	35
Figura 7. Produção de ALA de diferentes estirpes de <i>E. coli</i> portando vetor pTHR durante 8 horas de monitoramento.	37
Figura 8. Perfil de crescimento de BL21(DE3)_pTHR durante 20 horas de monitoramento.	41
Figura 9. Produção de ALA de BL21(DE3)_pTHR durante 20 horas de monitoramento.	42
Figura 10. Consumo de glucose de BL21(DE3)_pTHR durante 20 horas de monitoramento.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho	17
Tabela 2 – Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho.....	23
Tabela 3. DO ₆₀₀ e produção de ALA das estirpes de <i>E. coli</i> portando K864400 ou pTHR após 48 horas de cultivo	31
Tabela 4. DO ₆₀₀ e produção de ALA de <i>E. coli</i> TOP10_K864400 e TOP10_pTHR em meio mínimo sem adição de glicina após 48 horas de cultivo	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Ácido δ -aminolevulínico (ALA)	14
3.2 As vias C4 e C5 de biossíntese de ALA	16
3.3 Biossíntese por <i>E. coli</i> e produção industrial de ALA	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Estratégia experimental	21
4.2 Bactérias e plasmídeos	23
4.3 Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias	26
4.4 Antibióticos	26
4.5 Preparo de células competentes	26
4.6 Transformação bacteriana	27
4.7 Minipreparação plasmidial	27
4.8 Eletroforese de DNA em gel de agarose	28
4.9 Restrição de DNA por endonucleases	28
4.10 Purificação de DNA por coluna de sílica	29

4.11	Ligação de insertos de DNA em plasmídeos.....	29
4.12	Clonagem de DNA	29
4.13	Clonagem de partes biológicas (banco de dados físico - iGEM).....	32
4.14	Cultivo para a produção de ALA por diferentes estirpes de <i>E. coli</i>	32
4.15	Quantificação de ALA.....	33
4.16	Quantificação de glucose	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Construção do vetor pTHR.....	33
5.2	Caracterização do crescimento de diferentes estirpes de <i>E. coli</i> portando o vetor K864400 ou pTHR.....	34
5.3	Produção de ALA em <i>E. coli</i> portando pTHR	37
5.4	Produção de ALA em meio mínimo suplementado apenas com glucose...	39
5.5	Curva de crescimento, consumo de glucose e produção de ALA por BL21(DE3)_pTHR	40
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Os α -aminoácidos são os monômeros de uma proteína e possuem papel essencial no metabolismo de todos os seres vivos. Mas aminoácidos não-alfa, moléculas que não são utilizadas para a síntese de proteínas, possuem estrutura semelhante e também apresentam inúmeras aplicações essenciais para os seres vivos.

O ácido delta-aminolevulínico (ALA) é um delta aminoácido de ampla ocorrência, encontrado em células animais, vegetais e de bactérias. O ALA tem um papel essencial como precursor na biossíntese de compostos tetrapirrólicos, tais como heme, porfirinas, clorofila e cobalamina. Como diversos organismos necessitam dos compostos tetrapirrólicos para realizar os processos de respiração oxidativa, fotossíntese e crescimento celular, o ALA tem chamado cada vez mais a atenção de pesquisadores nas áreas de medicina, agricultura e pecuária por interferir no metabolismo destes compostos, elevando ou diminuindo a sua síntese. Em 2019, o mercado global de ALA chegou aos US \$86 milhões e estima-se que até 2024 este valor chegue aos US \$110 milhões (360RESEARCHREPORTS, 2019).

Para suprir esse mercado, almeja-se a produção de ALA por microrganismos em alto rendimento utilizando fontes renováveis de carbono, que é um processo mais limpo e econômico do que as seis rotas de síntese química de ALA descritas atualmente que envolvem muitas etapas, resultando em um baixo rendimento e custos elevados (KANG et al., 2012). A biossíntese de ALA por bactérias seria uma tecnologia de produção preferível por ser ecológica, econômica, eficiente energeticamente e sustentável (LIU et al., 2014).

Este trabalho, desenvolvido dentro do Programa de Mestrado para Inovação – MAI em parceria com a empresa NATBIO Ltda. ME, busca aprimorar uma estirpe de *Escherichia coli* para a produção de ALA a fim de desenvolver um produto utilizado como alimento ou suplemento alimentar para animais do meio agropecuário e/ou de estimação, rico em ALA e outros nutrientes (Processo de patente BR 10 2018 009145 0).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As vias descritas de síntese química de ALA possuem muitas etapas e são custosas, esse fato associado ao aumento da demanda pelo ALA pelo setor industrial e por grupos de pesquisa nos anos recentes (KANG et al., 2012) demonstra a necessidade de novas formas mais econômicas, simples e ecológicas para a produção de ALA. A bactéria *E. coli* desponta como microrganismo de interesse para a produção de ALA devido ao vasto conhecimento acerca do seu metabolismo, das ferramentas de manipulação genética já aprimoradas e de suas conhecidas condições de cultivo (CHO et al., 2016).

Este trabalho tem por objetivo desenvolver, através de estratégias de biologia sintética, uma estirpe de *E. coli* capaz de produzir ALA a partir de glucose e glicina (estirpes de *E. coli* anteriormente desenvolvidas por outros grupos de pesquisa para produção de ALA em escala industrial não são acessíveis devido a restrições do sistema de patentes). Para alcançar isso, um vetor de alto número de cópias contendo genes para produção e efluxo de ALA será expresso em diferentes estirpes de *E. coli* a fim de demarcar qual estirpe possui maior capacidade de produção de ALA. Esta estirpe poderá ser aplicada no desenvolvimento de um produto utilizado com alimento ou suplemento alimentar animal (Processo de patente BR 10 2018 009145 0).

2.1 Objetivo geral

- Obter estirpes de *E. coli* que produzam ALA a partir de um meio de baixo custo.

2.2 Objetivos específicos

- Construir o vetor pTHR, um vetor contendo propriedades modulatórias da biblioteca iGEM e capaz de expressar um operon que contenha os genes *hemA*, de *Rhodobacter capsulatus* e *rhtA*, de *E. coli*, responsivos ao promotor *P_{tac}*;

- Transformar cinco estirpes de *E. coli* com os vetores pSB1C3_*pTac* (BBa_K864400) e pTHR: MG1655, TOP10, BL21(DE3), BW25113 e W3110;
- Caracterizar a produção de ALA em meio mínimo suplementado com glucose e glicina de cada estirpe de *E. coli* contendo ou não o operon *pTac_HemA_rhtA*;
- Selecionar a estirpe de *E. coli* com maior produção de ALA e caracterizar sua curva de crescimento, produção de ALA e consumo de glucose.

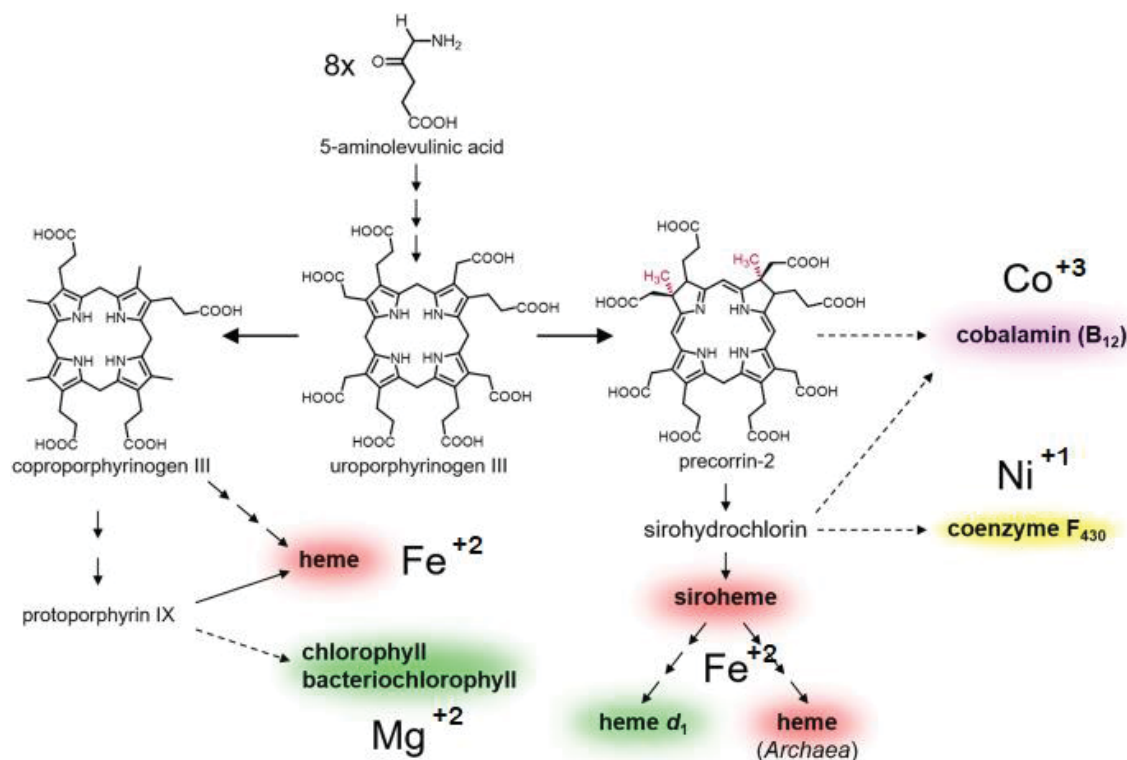
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ácido δ-aminolevulínico (ALA)

O ALA é um δ-aminoácido não-proteico de fórmula $C_5H_9NO_3$ que é encontrado extensivamente em bactérias, algas, plantas terrestres e animais. É descrito como a molécula de início da síntese dos compostos tetrapirrólicos, moléculas orgânicas formadas por quatro anéis pirrólicos (LIU et al., 2014).

As protoporfirinas, compostos tetrapirrólicos sintetizados a partir do ALA, são a base para a biossíntese de diversos compostos de importância biológica por causa da sua capacidade de complexar íons metálicos em seu anel e formar metaloporfirinas (Figura 1) (SACHAR et al., 2015). Quando um íon Fe^{2+} é inserido no anel da protoporfirina forma-se uma molécula de Fe^{2+} -protoporfirina, ou heme. O grupo prostético heme é essencial para proteínas como a hemoglobina e os citocromos pois, devido as suas características estruturais, é capaz de alternar o estado de oxidação do íon férrico de acordo com as condições ambientais e assim ser capaz de transportar elétrons e oxigênio. A metaloporfirina Mg^{2+} -protoporfirina, oriunda da inserção de um íon Mg^{2+} no anel da protoporfirina, é utilizada por organismos fotossintetizantes para produzir, numa série de etapas, clorofila e bacterioclorofila (SENGE et al., 2014; WU et al., 2018). A cobalamina é uma metaloporfirina complexada a cobalto (Co^{3+}) que pode ser sintetizada a partir do ALA por certas espécies de bactérias e arqueias. É considerada uma vitamina no metabolismo humano, atuando como um cofator das enzimas envolvidas em processos de metilação (GREEN, 2005).

Figura 1. Esquema simplificado da síntese de metaloporfirinas com seus íons relacionados.



Fonte: modificado de LAYER, G. (2021).

Além de sua importância no metabolismo de diversos organismos, o ALA atrai atenção por ser um composto químico fotodinâmico de baixo peso molecular, características que o fizeram ser amplamente utilizado. Na área agrícola, pode ser utilizado para promover a síntese de clorofila, elevando a produtividade da plantação, bem como inibi-la de acordo com a dose aplicada, tornando-se um herbicida natural (HOTTA et al., 1997). Além disso, a aplicação de ALA demonstrou potencial como inseticida biodegradável por causar a morte de larvas de mariposas pragas de lavouras, que apresentaram acúmulo de protoporfirina IX nos seus tecidos (REBEIZ et al., 1988).

A aplicação do ALA na área médica é devido ao seu potencial como agente fotossensibilizador, sendo aplicado no diagnóstico fotodinâmico e terapia para diversos tipos de câncer, como pele, oral, esofágico, cólon, duodenal, pancreático e de bexiga (KENNEDY et al., 1990). Sua aplicação para a identificação de gliomas é devido a elevação de concentração de compostos

fotossensíveis nas células tumorais, como a protoporfirina IX, facilitando assim a identificação e remoção do tecido tumoral durante procedimentos cirúrgicos (BECK et al., 2007).

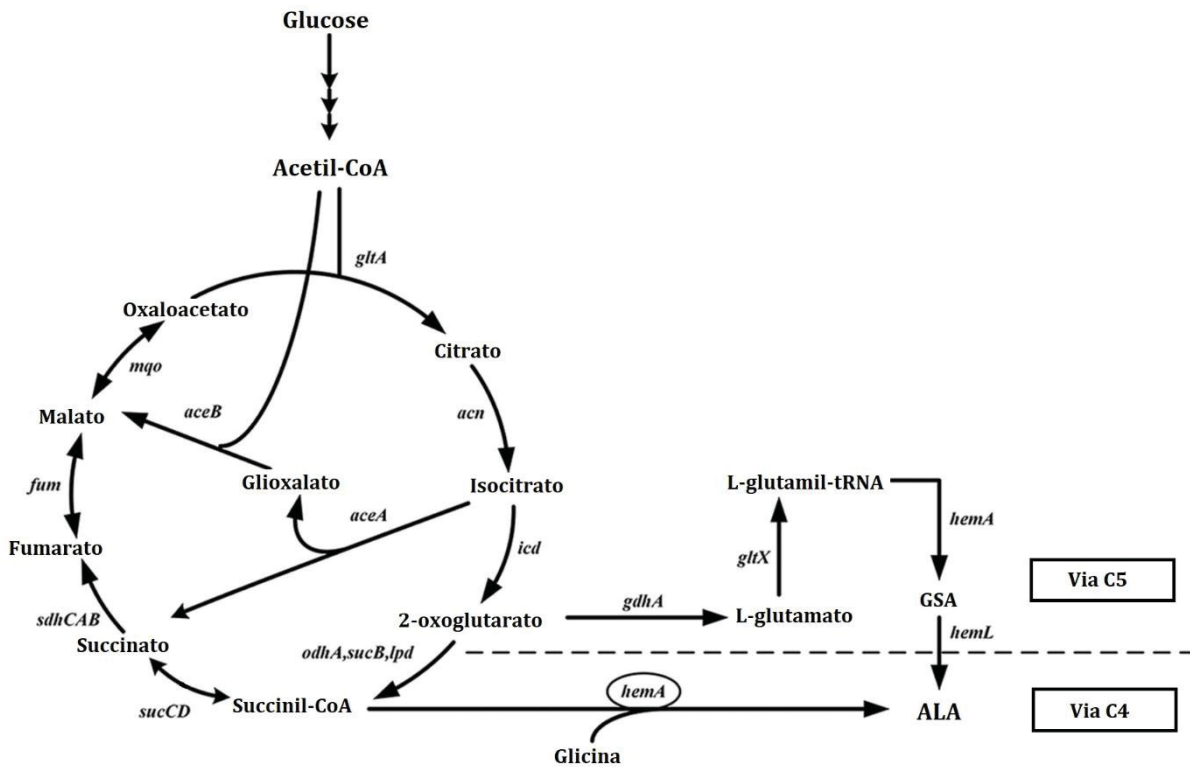
3.2 As vias C4 e C5 de biossíntese de ALA

Existem duas vias possíveis de biossíntese de ALA conhecidas, denominadas C4 e C5 (Figura 2) (AVISSAR et al., 1989). A via C4 é presente entre diversos grupos de eucariontes, com exceção das plantas, além disso está presente em alguns microrganismos quimiotróficos e em bactérias fotossintetizantes não-sulfurosas (FENG et al. 2015). Esta via possui apenas uma etapa para a formação de ALA, sendo realizada pela enzima ALA sintase (ALAS) que catalisa a condensação de succinil-CoA, um intermediário do ciclo do ácido cítrico de quatro carbonos, com glicina, liberando CoA-SH, CO₂ e ALA. Alguns microrganismos, como *Rhodobacter sphaeroides*, apresentam isoformas da ALAS, codificadas pelos genes *hemA* e *hemT*, sendo que a ALAS sintetizada a partir de *hemT* apresenta baixa solubilidade *ex vivo* e não apresenta atividade catalítica em extratos celulares (BOLT et al., 1999). Genes codificadores da ALAS já foram descritos em diversas bactérias, como *Agrobacterium radiobacter*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhizobium meliloti*, *R. sphaeroides* e *R. capsulatus* (LIU et al., 2014).

A via C5 de síntese de ALA é encontrada em plantas superiores, algas e em diversas espécies de bactérias, incluindo a *E. coli* (FENG et al. 2015). Essa via parte do glutamato para sintetizar ALA em três etapas: Primeiro, glutamato, tRNA e ATP são substratos da glutamyl-tRNA sintetase (codificada pelo gene *gltx*), que libera glutamyl-tRNA, AMP e PPI. Glutamyl-tRNA é reduzido pela enzima dependente de NADPH glutamyl-tRNA redutase (codificada pelo gene homônimo *hemA*), formando glutamato-1-semialdeído e liberando o tRNA. Por fim, glutamato-1-semialdeído é convertido em ALA pela ação da enzima glutamato-1-semialdeído aminotransferase (codificada pelo gene *hemL*) (SU et al., 2019). A glutamyl-tRNA redutase é uma enzima chave da via C5 da síntese de ALA. Sua atividade é regulada principalmente a nível pós-transcricional e da concentração da proteína (LIU et al., 2014). A produção de ALA por essa via é fortemente regulada pela presença de heme, um produto final da via de síntese

de porfirinas que, quando se encontra numa concentração relativamente alta, inibe a via C5 (FENG et al. 2015).

Figura 2. Visão geral das vias C4 e C5



Fonte: Modificado de KANG et al. (2011).

As vias C4 e C5 de síntese de ALA apresentam diferentes enzimas e tipos de regulação. Os genes que expressam as enzimas responsáveis pelas reações estão destacados em itálico: *gltA*, citrato sintase; *acn*, conitase; *icd*, isocitrato desidrogenase; *odhA*, *sucB*, *lpd*, complexo 2-oxoglutarato desidrogenase; *sucCD*, Succinil-CoA sintetase; *sdhCAB*, succinato desidrogenase; *fum*, fumarase; *mgo*, malato:quinona oxidoreductase; *aceA*, isocitrato liase; *aceB*, Malato sintase A; *gdhA*, glutamato desidrogenase NADP-especifica; *gltX*, glutamil-tRNA sintase; *hemA*, glutamil-tRNA redutase (via C5) ou ALA sintase (via C4); *hemL*, glutamato-1-semialdeído aminotransferase.

O ALA é utilizado como substrato pela enzima ALA desidrogenase (ALAD, codificada pelo gene *hemB*), que atua catalisando a condensação de duas moléculas de ALA em uma de porfobilinogênio (PBG), liberando duas moléculas de H₂O e resultando na diminuição da disponibilidade intracelular do ALA. A

atividade da ALAD é efetivamente inibida por ácido levulínico e D-glucose (LEE et al., 2003). O PGB é utilizado nas vias das porfirinas para sintetizar compostos como heme e clorofila para a célula.

3.3 Biossíntese por *E. coli* e produção industrial de ALA

O aumento da produção de ALA por *E. coli* pode se dar através da superexpressão das enzimas da via C5, ou com a introdução de genes exógenos que implementam a via C4 no microrganismo.

A inserção do gene *hemA*, codificador para a enzima ALAS é uma das formas mais simples e eficazes de elevar a síntese de ALA em *E. coli* (DING et al., 2017). A ALAS de *Rhodobacter sphaeroides* apresenta características favoráveis para esta função: apresenta alta atividade específica e baixo K_m (constante de Michaelis) para glicina e succinil-CoA (WERF et al., 1996). O vetor pALA2 contendo *hemA* de *R. sphaeroides* controlado pelo promotor *Plac* (WERF et al., 1996) foi inserido em seis estirpes de *E. coli*, sendo que as três estirpes que mais produziram ALA foram DH1 (58,95 mg/L), CJ236 (58,95 mg/L) e BL21 (DE3) (55,02 mg/L) após 24 horas em meio mínimo suplementado com 5 g/L de succinato. Extratos celulares de *E. coli* DH1/pALA2 em solução com adição de succinato, glicina, piridoxal fosfato, CoA e ATP produziram 2,9 g/L de ALA em 5 horas.

Bradyrhizobium japonicum é um microrganismo que habita o interior dos nódulos de raízes de plantas leguminosas e que sintetiza e libera para a planta que o hospeda diversos compostos derivados de protoporfirinas (CHOI et al., 1999). A sequência de nucleotídeos de *hemA* de *B. japonicum* apresenta baixa semelhança (68%) com aqueles de outras espécies de bactérias fotossintetizantes, como *R. sphaeroides*, indicando que, se seus sítios alostéricos forem diferentes das demais ALA sintases, seu modo de regulação por *feedback* pode não ser o mesmo. Quando *hemA* de *B. japonicum* foi expresso sob controle do promotor T7 em *E. coli* BL21(DE3), a bactéria produziu 1,7 g/L de ALA, sendo que em pH 7,0 se atingiu a maior produção (CHOI et al., 1999). Além disso, foi descrito que 30 mM de ácido levulínico (LA) inibia a ação da ALAD e permitia o acúmulo de maiores concentrações de ALA. Em meio

Luria-Bertani (LB) com adição de 30 mM de glicina, 90 mM de succinato, 30 mM de LA e pH 7,0, a produção de ALA obtida foi de 3,2 g/L em 14 horas.

A otimização dos códons do gene *hemA* de *R. sphaeroides* para aumentar a expressão da ALAS em *E. coli*, e conseqüentemente a produção de ALA, foi testada através da sua clonagem no vetor pET28a e inserção na estirpe *E. coli* Rosetta (DE3) (FU et al., 2008). A estirpe foi testada em cultivo de batelada alimentada contínua num fermentador contendo 3 litros de meio LB inicialmente suplementado com glicina, ácido succínico e glucose, sendo estes nutrientes adicionados de forma recorrente ao meio. O pH do cultivo foi mantido em dois estágios, onde o pH nas primeiras 6 horas foi regulado em pH 5,9, e após isso em pH 6,2. A produção de ALA por esta estirpe nestas condições alcançou 6,6 g/L em 18 horas de cultivo.

É descrito que a adição de D-glucose no meio de cultura pode atuar como um inibidor competitivo para ALAD e assim elevar o acúmulo de ALA (LEE et al., 2003). Mas altas concentrações de D-glucose também apresentam ação inibitória da ALAS de *R. sphaeroides* (XIE et al., 2003). Uma análise para otimização dos parâmetros de cultivo e meios de cultura para produção de ALA com ALAS de *R. sphaeroides* indicou que uma baixa concentração inicial de glucose (2 g/L) com posterior adição de uma maior concentração de glucose no final da fase exponencial de crescimento do inóculo se mostrou vantajosa para elevar a produção de ALA (FU et al., 2008).

O gene *hemA* da bactéria de solo *Agrobacterium radiobacter* foi clonado, e expresso sob controle do promotor T7 em *E. coli* Rosetta (DE3) (LIN et al., 2008). Fontes de carbono como D-glucose e D-xilose demonstraram não afetar a atividade da ALAS de *A. radiobacter* em *E. coli*, ao passo de que estes mesmos dois carboidratos em 20 mM apresentaram uma diminuição de cerca de 20 % na atividade de ALAD de *E. coli* Rosetta (DE3). O cultivo foi realizado em meio LB suplementado com D-xilose e D-glucose, além de glicina e ácido succínico, em cultivo de batelada alimentada. Em um fermentador contendo 3 litros de meio, a produção de ALA alcançada foi de 7,3 g/L em 30 horas.

Em *E. coli*, a biossíntese de ALA pela via C5 é rigidamente regulada pela inibição da ALAS em altas concentrações de heme, o produto final da via C5. (WOODARD et al., 1995). Embora a via C4 seja a mais utilizada para produção de ALA, ela apresenta algumas desvantagens visto que a síntese de glicina e

succinil-CoA são altamente regulados no metabolismo de *E. coli*, necessitando assim de suplementação constante de glicina e succinato no meio para que ocorra a síntese de ALA em maiores concentrações (KANG et al., 2011).

Para o desenvolvimento de uma estirpe de *E. coli* produtora de ALA através da via C5 foi expresso na estirpe *E. coli* DH5 α o gene heterólogo *hemA^M*, uma glutamil-tRNA redutase de *Salmonella arizona*, e superexpresso o gene *hemL*, a ALAS nativa de *E. coli* (KANG et al., 2011). Esta estirpe, nomeada *E. coli* DAL, produziu 2,12 g/L de ALA em 50 mL de meio mínimo suplementado com 20 g/L glucose. Além dos genes da via C5, utilizando um vetor de baixo número de cópias foi superexpresso o gene *rhtA*, que codifica um transportador de efluxo de aminoácidos capaz de excretar ALA. A estirpe *E. coli* DAL portando o vetor que aumenta a expressão de *rhtA*, nomeada *E. coli* DALA, produziu 2,96 g/L de ALA nas mesmas condições descritas anteriormente, um aumento de quase 40% na produção. A estirpe *E. coli* DALA cultivada num fermentador contendo 3,5 L de meio mínimo suplementado com 35 g/L de glucose produziu 4,13 g/L de ALA.

A enzima ALAD, codificada por *hemB* em *E. coli*, desempenha um papel essencial na via de síntese de heme. As tentativas de inativar ou mutar a ALAD na busca de aumentar a produção de ALA falharam (ZANG et al., 2013). A adição de caudas de degradação em *hemB* também não causou a elevação na produção de ALA, porém a utilização de códons iniciadores alternativos com menor capacidade de tradução (ATG substituído por GTG) se provou viável e eficaz (DING et al., 2017), mas essa alteração também causou uma diminuição significativa na DO₆₀₀ máxima alcançada pela estirpe.

Em busca de homólogos da ALAS em microrganismos, o gene *hemA* de *R. capsulatus* foi clonado em *E. coli* BLR (DE3) e sua expressão controlada por um promotor constitutivo da bactéria (KANG et al., 2004). Apesar de diversas condições de cultivo não estarem especificadas, em meio suplementado com glicina e ácido succínico a estirpe produziu 3,5 g/L em cerca de 50 horas.

Diversas propriedades enzimáticas da ALAS de *R. capsulatus* ainda eram desconhecidas. Este gene foi então clonado em *E. coli* Rosetta (DE3) através do vetor pET28a para compreender melhor as características da enzima (LOU et al., 2014). A ALAS de *R. capsulatus* apresentou uma constante de especificidade para succinil-CoA maior que as ALAS sintases presentes em *A. radiobacter* e *R.*

sphaeroides, demonstrando alta eficiência catalítica. A estirpe *E. coli* Rosetta portando *hemA* de *R. capsulatus* foi cultivada em batelada alimentada em fermentador contendo 9 litros de meio suplementado com glicerol, extrato de levedura, glicina e ácido succínico, o pH foi mantido em 7,5. Após 36 horas de cultivo em 28°C, atingiu-se 8,8 g/L de ALA.

As diferentes estirpes de *E. coli* não são muito tolerantes a elevadas quantidades de ALA devido à geração de espécies reativas de oxigênio que causam danos celulares e alterações morfológicas (ZHU et al., 2019). A superexpressão adicional de genes para catalases e superóxido desmutases em *E. coli* BW25113 portando *hemA* de *Rhodopseudomonas palustris* demonstrou aumento na tolerância à altas concentrações e na produção de ALA (ZHU et al., 2019). A estirpe desenvolvida foi cultivada em batelada alimentada com adição constante de glucose e glicina, pH constante de 6,5 e 30% de O₂ dissolvido. Após 23 horas de cultivo, a produção de ALA resultante da estirpe foi de 11,5 g/L.

E. coli BL21 (DE3) expressando *hemA* de *R. capsulatus* alcançou a maior produção de ALA registrada até o momento (YU et al., 2022). Além disso, foram expressos genes para catalases, superóxido dismutases e para a chaperona GroELS. A estirpe foi inoculada em 300 mL de meio mínimo M9 modificado suplementado com glucose, glicerol, glicina e succinato em um biorreator de 1 litro com adição de glicina e glucose em 12 e 24 horas, respectivamente. A adição de íon férrico após 3 horas do inóculo demonstrou elevar a atividade e capacidade de acúmulo de ALA no meio pela estirpe, que alcançou 15,6 g/L em 30 horas de produção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia experimental

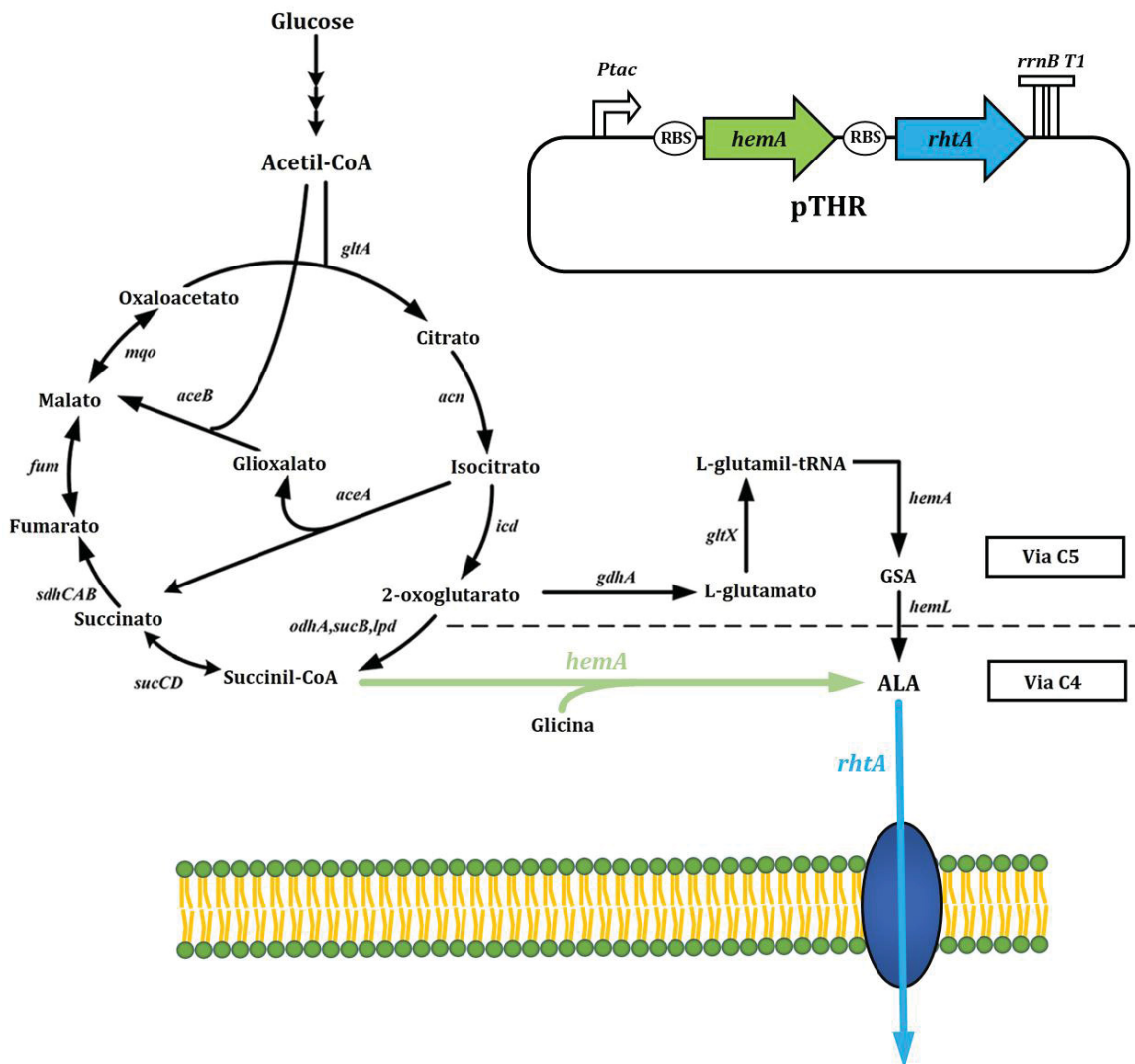
Neste trabalho, buscou-se desenvolver uma estirpe de *E. coli* capaz de produzir ALA através da via C4 e realizar o efluxo para o meio de cultura. A estratégia experimental consistiu em construir um operon contendo os genes *hemA*, de *R. capsulatus*, e *rhtA* de *E. coli*, com expressão controlada pelo promotor *P_{tac}*. Estes genes já foram utilizados anteriormente para a produção e

efluxo de ALA (KANG et al., 2011), mas não em vetor único de alto número de cópias com as propriedades modulatórias das partes presentes na biblioteca do iGEM. Para se obter isso, os genes *hemA* e *rhtA* presente no plasmídeo pLHJ (GenScript Biotech) devem ser clonados no plasmídeo K864400 (obtido através do sistema iGEM), um vetor baseado em pSB1C3 contendo o promotor *Ptac*. Ambos os genes devem ser inseridos à jusante do promotor para que sejam responsivos a ele, formando assim o vetor pTHR contendo o operon *Ptac_hemA_rhtA* (Figura 3).

Para aferir diferentes estirpes de *E. coli* quanto à produção de ALA através do vetor pTHR, cinco estirpes de *E. coli* (MG1655, TOP10, BL21(DE3), BW25113 e W3110) devem ser transformadas com o vetor K864400 ou com o vetor pTHR, totalizando dez estirpes. A fim de aferir a produção de ALA e os efeitos dos vetores no crescimento das estirpes, as dez estirpes devem ser inoculadas em meio MMALA e seu crescimento e produção de ALA serão verificadas em pontos de 30 minutos durante 8 horas, para então uma leitura final após 48 horas do inóculo ser realizada.

A estirpe com maior produção de ALA terá seu crescimento mensurado por 20 horas consecutivas em intervalos de 2 horas em condições de crescimento semelhantes aos da triagem.

Figura 3. Estratégia para produção e efluxo de ALA



Fonte: Modificado de KANG et al. (2011)

Espera-se que diferentes estirpes de *E. coli* contendo o vetor pTHR sejam capazes de produzir e exportar ALA. Setas coloridas indicam os genes inseridos e sua ação no fluxo metabólico de ALA na célula. A seta curvada no vetor representa o promotor *Ptac*. Elipses a esquerda de cada seta no vetor representam sítios RBS. A estrutura vermelha em forma de T a direita dos genes no vetor representa o terminador *rrnB T1*.

4.2 Bactérias e plasmídeos

As estirpes de *E. coli* utilizadas e desenvolvidas neste trabalho estão listadas na Tabela 1, bem como os vetores plasmidiais utilizados e construídos estão listados na Tabela 2.

Tabela 1. Estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho.

Estirpe	Características	Fonte/Referência
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-crBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA
<i>E. coli</i> MG1655	F-, λ -, <i>rph-1</i>	Coli Genetic Stock Center strain+ (CGSC) #6300
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F-, <i>lon-11</i> , Δ (<i>ompT-nfrA</i>)885, Δ (<i>galM-ybhJ</i>)884, λ DE3 [<i>lacI</i> , <i>lacUV5-T7</i> gene 1, <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i>], Δ 46, [<i>mal+</i>] K-12(λ S), <i>hsdS10</i>	Coli Genetic Stock Center strain (CGSC) #12504
<i>E. coli</i> BW25113	F-, Δ (<i>araD-araB</i>) 567, Δ <i>lacZ4787</i> (::rrnB-3), λ -, <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Coli Genetic Stock Center strain (CGSC) #7636
<i>E. coli</i> W3110	F-, λ -, IN(<i>rrnD-rrnE</i>), <i>rph-1</i>	Coli Genetic Stock Center strain (CGSC) #4474
TOP10_K864400	<i>E. coli</i> TOP10 portando vetor K864400	Este estudo
MG1655_K864400	<i>E. coli</i> MG1655 portando vetor K864400	Este estudo
BL21_K864400	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) portando vetor K864400	Este estudo

BW25113_K864400	<i>E. coli</i> BW25113 portando vetor K864400	Este estudo
W3110_K864400	<i>E. coli</i> W3110 portando vetor K864400	Este estudo
TOP10_pTHR	<i>E. coli</i> TOP10 portando vetor pTHR	Este estudo
MG1655_pTHR	<i>E. coli</i> MG1655 portando vetor pTHR	Este estudo
BL21_pTHR	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) portando vetor pTHR	Este estudo
BW25113_pTHR	<i>E. coli</i> BW25113 portando vetor pTHR	Este estudo
W3110_pTHR	<i>E. coli</i> W3110 portando vetor pTHR	Este estudo

Tabela 2 – Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho.

Plasmídeo	Característica	Fonte/Referência
pLHJ	pUC57 contendo os genes <i>hemA</i> e <i>rhtA</i> , além dos sítios RBS e terminadores. Km ^R .	GenScript Biotech
K864400	pSB1C3 contendo promotor <i>Ptac</i> . Cm ^R .	iGEM
pTHR	Derivado de K864400 contendo os genes <i>hemA</i> e <i>rhtA</i> regulados pelo promotor <i>Ptac</i> . Cm ^R .	Este estudo

4.3 Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias

Para a realização dos protocolos de clonagem, quimicompetência e estoque, o cultivo das estirpes de *E. coli* em meio líquido realizou-se em meio LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2000). Frascos de capacidade de 15 mL contendo 3 mL de LB foram inoculados com as estirpes e disposto numa incubadora com agitação rotatória a 180 rpm e 37°C. Para o cultivo em meio sólido foi utilizado 25 mL de LA (meio LB contendo 15 g/L de ágar bacteriológico) em placas de Petri descartáveis de 90 mm x 14,2 mm. As placas de LA foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C. Um litro de LB contém: 10 g de triptona, 10 g de NaCl e 5 g de extrato de levedura.

Para os experimentos de produção de ALA pelas estirpes foi utilizado o meio MMALA, um meio mínimo modificado de Kang et al. (2011). Um litro de MMALA contém: 16 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g de KH_2PO_4 , 16 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de extrato de levedura, 18 g de D-glucose e 7,5 g de L-glicina. Além disso foi adicionado Cm (30 µg/mL) e IPTG (0,1 mM) ao meio no início do cultivo. O crescimento das estirpes se deu em 37°C com agitação rotatória de 220 rpm durante 48 horas.

4.4 Antibióticos

Para o crescimento das estirpes com resistência à antibióticos, foram utilizados cloranfenicol (Cm) a 30 µg/mL e canamicina (Km) a 100 µg/mL nos meios de cultura.

4.5 Preparo de células competentes

Para o preparo das células de *E. coli* quimicompetentes para posterior transformação por choque térmico, foi cultivado um pré-inóculo de 5 mL em LB por aproximadamente 16 horas a 180 rpm e 37°C. Um mL deste cultivo crescido foi utilizado para inocular 100 mL de meio LB em frascos Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, o cultivo se deu a 180 rpm a 37°C. Este inóculo foi cultivado até a densidade óptica de 600 nm (DO_{600}) se encontrasse entre 0,3 e 0,4. O meio de cultivo foi dividido entre dois tubos plásticos de 50 mL que foram

centrifugados a 4000 rpm, 4°C por 10 minutos em uma centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). O sobrenadante foi descartado do tubo e o precipitado de células foi ressuspensionado em 20 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M gelada e estéril, estas células foram então incubadas em banho de gelo por 1 hora. As células ressuspensionadas foram novamente centrifugadas a 4.000 rpm, 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Ao final, as bactérias foram ressuspensionadas em 2 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M com 20% de glicerol gelada e estéril. Foram pipetadas alíquotas de 200 µL desta solução de células quimiocompetentes em tubos plásticos de 1,5 mL para serem estocadas a -80°C para uso posterior.

4.6 Transformação bacteriana

A transformação bacteriana foi realizada unindo, em um tubo plástico de 1,5 mL, 100 µL de células quimiocompetentes com 10 µL das reações de ligação de DNA, ou então de 0,5 µL da solução contendo o plasmídeo obtida durante a minipreparação plasmidial.

A mistura foi mantida em banho de gelo por 15 minutos e então foi submetida ao choque térmico em banho-maria por 40 segundos a 42 °C. As células foram imediatamente devolvidas ao banho de gelo por 5 minutos em repouso, sendo então adicionado 800 µL de meio LB e incubadas para recuperação em estufas por 1 hora a 37°C. Após o período de recuperação, 200 µL da suspensão celular foram semeados em placas de LA contendo os respectivos antibióticos.

4.7 Minipreparação plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial das diferentes estirpes de *E. coli* foi utilizado o método de miniprep por lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001). Para este método, 1,5 mL de um cultivo de 5 mL de LB incubado por 12 a 16 horas foi separado em microtubos plásticos, estes microtubos foram centrifugados por 60 segundos a 14.500 rpm (centrífuga Minispin, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensionadas em 150 µL de solução de GET (50 mM de glucose, 10 mM de EDTA e 25 mM de Tris-HCl pH 8,0) adicionado

de 2 μ L de RNase e incubadas por 5 minutos na bancada. Adicionou-se 150 μ L de solução de lise (0,18 M de NaOH e 1% de SDS (m/v)), sendo homogeneizado através da lenta inversão dos tubos de forma manual. A solução foi neutralizada pela adição de 150 μ L de solução Kacf (3 M de acetato de sódio e 11,5% de ácido acético (v/v)) com nova inversão manual dos tubos, seguida pela adição de 100 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) com vórtex por 3 segundos. Os tubos foram centrifugados a 14.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos novos etiquetados. Ao sobrenadante, foram adicionados 250 μ L de isopropanol, a solução foi homogeneizada e deixada em banho de gelo por 20 minutos. Os tubos então foram centrifugados a 14.500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de etanol 70% (v/v). Novamente centrifugados a 14.500 rpm por 5 minutos sendo o sobrenadante descartado e o pellet seco a 60°C por 2 minutos. O precipitado de DNA plasmidial seco foi solubilizado em 30 μ L de água ultrapura estéril. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente.

4.8 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para verificar a concentração do DNA plasmidial e da eficácia das restrições e PCR, foram realizadas eletroforeses de DNA em géis de agarose de 1% (m/v) em tampão TAE (40 mM de Tris base; 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA a pH 8,0). Foram misturados 2 μ L da amostra com 3 μ L de corante FSUDS (azul de bromofenol 0,8%, ficol 10%, xileno cianol 0,4%, SDS 1%, EDTA 1,8 mM, pH 8,0) para serem aplicadas nos poços do gel. As corridas de eletroforese foram realizadas em cubas de eletroforese com o gel imerso em tampão TAE entre 60-80 V por 60-90 min. Após a eletroforese, o gel com DNA foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) por 10-20 min. O DNA foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta a 312 nm (EC3 System - UVP BioImaging Systems UVP, Inc. Upland, CA USA) acoplado a um fotodocumentador de vídeo-imagem.

4.9 Restrição de DNA com endonucleases

As reações de clivagem de DNA foram realizadas em volume final de 10 a 30 μL utilizando endonucleases e tampões comerciais da Thermo Fisher Scientific ou SibEnzyme. O volume e concentração de DNA, enzimas e tampão, assim como o tempo e as condições de incubação foram as sugeridas pelos fabricantes.

4.10 Purificação de DNA com coluna de sílica

Os fragmentos de DNA oriundos das reações de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose e as bandas de interesse foram identificadas no transiluminador. As bandas foram cortadas do gel, pesadas e ressuspensas em 3 volumes de isotiocianato de guanidina 5 M, sendo esta solução incubada a 60°C por 10 minutos com inversão manual constante. Após a dissolução da fatia de gel, foi adicionado 1 volume de isopropanol e a solução foi carregada para uma coluna de sílica que foi centrifugada a 14.500 rpm por 1 minuto, o eluido foi descartado. Foram carregados 500 μL de etanol 70% (v/v) na coluna de sílica com nova centrifugação a 14.500 rpm por 1 minuto e o eluido foi descartado. Adicionou-se 30 μL de água ultrapura estéril na coluna, sendo então foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos para então ser centrifugada a 14.500 rpm por 3 minutos. O eluido foi armazenado a -18°C.

4.11 Ligação de insertos de DNA em plasmídeos

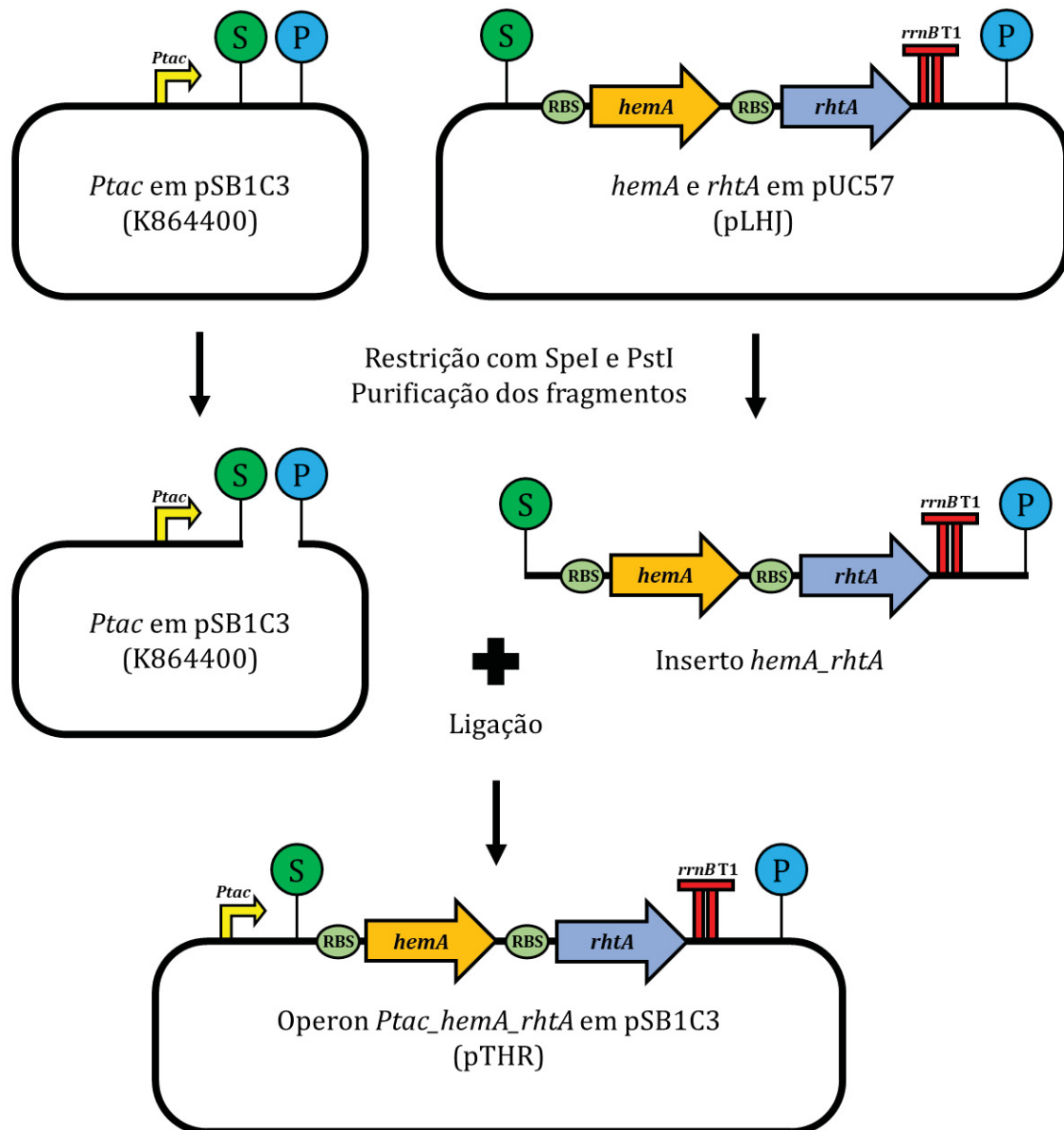
Vetores e insertos previamente digeridos e purificados foram utilizados para realizar as reações de ligação. O volume final da reação foi estabelecido em 10 μL , contendo: 1 μL de tampão T4 DNA ligase 10X, 0,2 μL de enzima T4 DNA ligase (Thermo Fischer Scientific) e inserto:plasmídeo na proporção 5:1 de acordo com a concentração. As reações foram incubadas overnight em temperatura ambiente e posteriormente foram utilizadas para transformação utilizando células quimiocompetentes.

4.12 Clonagem de DNA

Para a clonagem do operon *Ptac_hemA_rhtA*, o plasmídeo pLHJ foi digerido com as enzimas *SpeI* e *PstI* (Thermo Fisher Scientific), liberando fragmento de DNA contendo os genes *hemA* e *rhtA*, além do terminador de transcrição (*rrnB* T1) e sítios RBS R4a + espaçador (SHI et al. 2018). O vetor K864400, contendo o promotor *Ptac*, foi tratado com as mesmas enzimas. Ambos, inserto e vetor, foram purificados do gel e ligados conforme descrito em 4.10 e 4.11. A reação de ligação foi utilizada para a transformação em *E. coli* TOP10. Os clones de pTHR obtidos foram confirmados por minipreparação plasmidial e posterior restrição com as endonucleases *XbaI* e *PstI*. O processo de construção está ilustrado na Figura 4.

O vetor pTHR obtido através de minipreparação plasmidial foi utilizado para transformar as demais estirpes de *E. coli*.

Figura 4. Representação das etapas de restrição e ligação para a construção do vetor pTHR.



Fonte: o autor.

A seta curvada em amarelo representa o promotor *Ptac*. As setas representam os genes *hemA* e *rhtA* e seus sentidos de leitura. Os círculos contendo as letras S ou P simbolizam sítios de restrição para as enzimas SpeI e PstI, respectivamente. Elipses verde-clara representam sítios RBS e a estrutura vermelha à direita dos genes representa o terminador *rrnB T1*.

4.13 Clonagem de partes biológicas (banco de dados físico - iGEM)

O plasmídeo K864400 presente no repositório do iGEM foi encontrado acessando o endereço <http://parts.igem.org/Catalog>, estando nomeado como BBa_K864400 e contendo sua localização nas placas de partes biológicas liofilizadas do iGEM. O plasmídeo foi ressuspensão em 10 µL de água ultrapura estéril e 0,5 µL foram utilizados para transformação em *E. coli* TOP10.

4.14 Cultivo para a produção de ALA por diferentes estirpes de *E. coli*

Ao final da construção dos plasmídeos e transformações de *E. coli*, as estirpes obtidas foram aferidas quanto a sua produção de ALA. Colônias únicas de estirpes de *E. coli* foram pré-inoculadas em 5 mL de meio LB em frascos de 20 mL e incubadas a 37°C com agitação a 180 rpm por 14 horas para estimular o crescimento das estirpes. Um mL do cultivo crescido foi utilizado para inocular 50 mL de meio MMALA, modificado de Kang et al. (2011), contendo glicose e glicina como principais fontes de carbono. Também foram adicionados ao meio cloranfenicol e Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG, concentração final de 0,1 mM).

O crescimento das estirpes se deu em 37°C a 220 rpm durante 48 horas. Para ver a influência da expressão do operon *Ptac_hemA_rhtA* no crescimento das estirpes de *E. coli* foram realizadas leituras de DO₆₀₀ usando leitor de microplaca (Berthold Technologies TriStar LB941) e removidas alíquotas de 0,5 mL do cultivo a cada 30 minutos de todos os inóculos durante 8 horas consecutivas. Após isso, foram realizadas uma última alíquota e a leitura de DO₆₀₀ em 48 horas. A estirpe apresentando maior produção de ALA em 48 horas foi utilizada para testes posteriores.

Para verificar o consumo de glucose em relação à densidade óptica do meio e a produção de ALA, a estirpe com maior produção de ALA em 48 horas será inoculada em condições semelhantes às anteriores, porém com leituras de DO₆₀₀ e alíquotas de 0,5 mL do cultivo ocorrendo a cada 2 horas durante 20 horas consecutivas.

As alíquotas do cultivo foram centrifugadas a 14.500 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi armazenado a 4°C para realização das análises de ALA e glucose.

4.15 Quantificação de ALA

A quantificação de ALA foi realizada de acordo com o método de Mauzerall e Granick (1956). Neste protocolo, 10 µL da amostra é unido com 0,5 mL de acetato de sódio 1 M (pH 4,6), 0,5 mL de H₂O ultrapura e 50 µL de acetilacetona (2,4-pentanediona). A solução é aquecida a 100°C por 15 min e posteriormente resfriada à temperatura ambiente. Em tubos novos, 100 µL desta solução aquecida foi unida a 300 µL do reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído, 30 ml de ácido acético glacial, 8 ml de ácido perclórico a 70% (v/v) e 12 ml de ácido acético). Após incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, a absorbância foi medida usando leitor de microplaca (Berthold Technologies TriStar LB941) em 555 nm e a concentração deduzida de acordo com uma curva padrão de ALA preparada separadamente (seis pontos de leitura partindo de uma solução de 2 g/L de ALA, seguido por diluições seriadas com as concentrações de 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,05 g/L).

4.16 Quantificação de glucose

A quantificação de glucose presente no meio foi determinada por método colorimétrico através do kit Glicose PAP Liquiform da Labtest (Lagoa de Santana/MG, Brasil). As amostras foram diluídas 1:100 em água ultrapura para serem utilizadas e a execução do protocolo foi realizada de acordo com o fabricante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do vetor pTHR

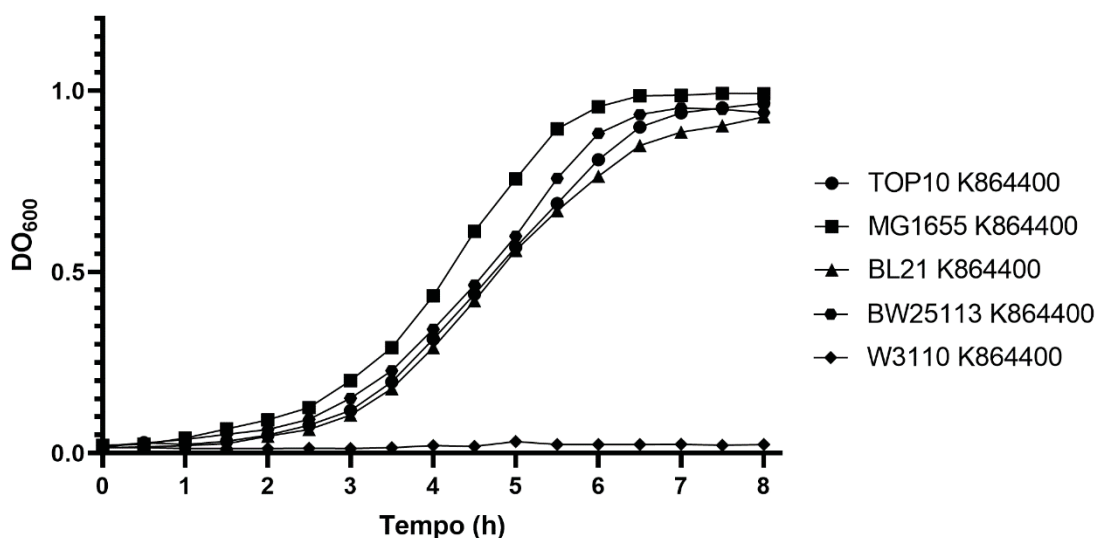
As etapas de construção do vetor pTHR contendo o operon *Ptac_hemA_rhtA* se deram conforme descrito nos tópicos 4.10 a 4.12. A

confirmação dos clones se deu através de restrição do DNA plasmidial pelas endonucleases EcoRI e PstI e posterior análise das bandas de fragmentos de DNA através de eletroforese em gel de agarose, onde foram visualizadas duas bandas de DNA, uma de 2352 e outra de 2029 pares de base, confirmando os clones do vetor pTHR.

5.2 Caracterização do crescimento de diferentes estirpes de *E. coli* portando o vetor K864400 ou pTHR

As dez estirpes de *E. coli* desenvolvidas neste trabalho tiveram seu crescimento em meio MMALA avaliado através do monitoramento de DO_{600} durante 8 horas com leituras a cada 30 minutos. Dentre as cinco estirpes de *E. coli* portando o vetor K864400, quase todas alcançaram a fase estacionária em cerca de 7,5 horas (Figura 5), com destaque à MG1655, que atingiu a fase estacionária em cerca de 6,5 horas. A única exceção foi a curva de crescimento da estirpe W3110_K864400, que não entrou na fase exponencial de crescimento nas primeiras 8 horas de cultivo.

Figura 5. Curva de crescimento das estirpes de *E. coli* portando vetor K864400 durante 8 horas de monitoramento.

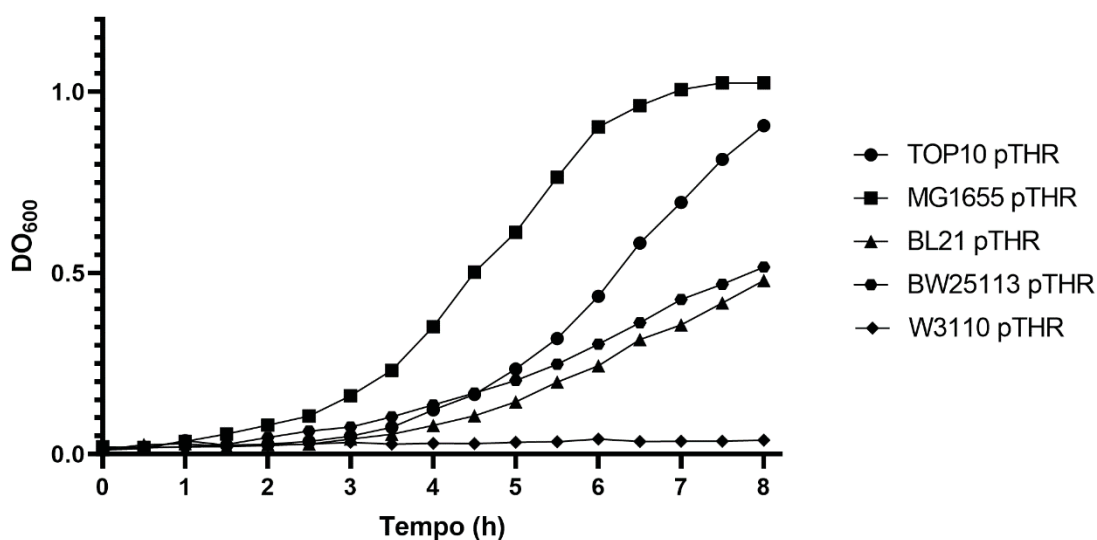


Cada estirpe foi crescida em frasco único contendo 50 mL de meio MMALA adicionado de Cm (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IPTG (0,1 mM). A legenda à direita representa as estirpes analisadas.

Apesar da estirpe W3110 continuar na fase de estacionária durante as primeiras 8 horas de cultivo, a leitura após 48 horas de inóculo demonstrou que esta estirpe atingiu $DO_{600} > 1$ (Tabela 3), semelhante à fase estacionária das demais estirpes.

A semelhança do perfil de crescimento entre as demais estirpes indica que não houve diferença de crescimento significativa entre as estirpes portando K864400 e que a elevação no fardo metabólico causada pela presença deste vetor é similar para todas elas. Além das estirpes portando K864400, as cinco estirpes de *E. coli* portando o vetor pTHR também tiveram seus perfis de crescimento mensurados por DO_{600} (Figura 6).

Figura 6. Curva de crescimento das estirpes de *E. coli* portando vetor pTHR durante 8 horas de monitoramento.



Cada estirpe foi crescida em frasco único contendo 50 mL de meio MMALA adicionado de Cm (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IPTG (0,1 mM). A legenda à direita representa as estirpes analisadas.

Da mesma forma que a estirpe W3110_K864400, o cultivo de W3110_pTHR não atingiu a fase exponencial de crescimento durante as 8 horas iniciais de cultivo, porém esta atingiu DO_{600} de 0,98 após 48 horas de cultivo (Tabela 3). Isto indica que ambas as estirpes derivadas de W3110 são capazes de crescer em MMALA, mesmo que num ritmo menor que o de outras estirpes.

As mutações descritas no cromossomo de *E. coli* W3110 (JENSEN, 1993) não permitem a formulação de uma hipótese sobre o porquê desta estirpe ter

apresentado uma fase estacionária tão longa se comparada com outras estirpes. Em especial, é atípico que seu crescimento seja tão discrepante do apresentado pelas estirpes derivadas de MG1655, pois estas possuem genótipo descrito semelhante. A única diferença descrita entre as estirpes W3110 e MG1655 é a inversão dos genes para RNA ribossomal *rrnD* e *rrnE* (HILL et al., 1981), o que por si só não é capaz de explicar a diferença no perfil de crescimento encontrada.

É possível que esta discrepância seja devido ao acúmulo de mutações aleatórias no cromossomo da W3110, o que pode ter ocorrido durante as gerações que esta estirpe passou até o momento em que foi fornecida para o presente estudo. Mutações aleatórias que impeçam ou dificultem a síntese *de novo* de determinados metabólitos podem ser a explicação para a fase estacionária estendida observada nestas estirpes em meio MMALA, visto que tais mutações não afetariam gravemente o crescimento em meios complexos, como LB. Para se verificar isso, a clonagem dos vetores K864400 e pTHR em *E. coli* W3110 cedidos do estoque de outros grupos de pesquisa será necessária.

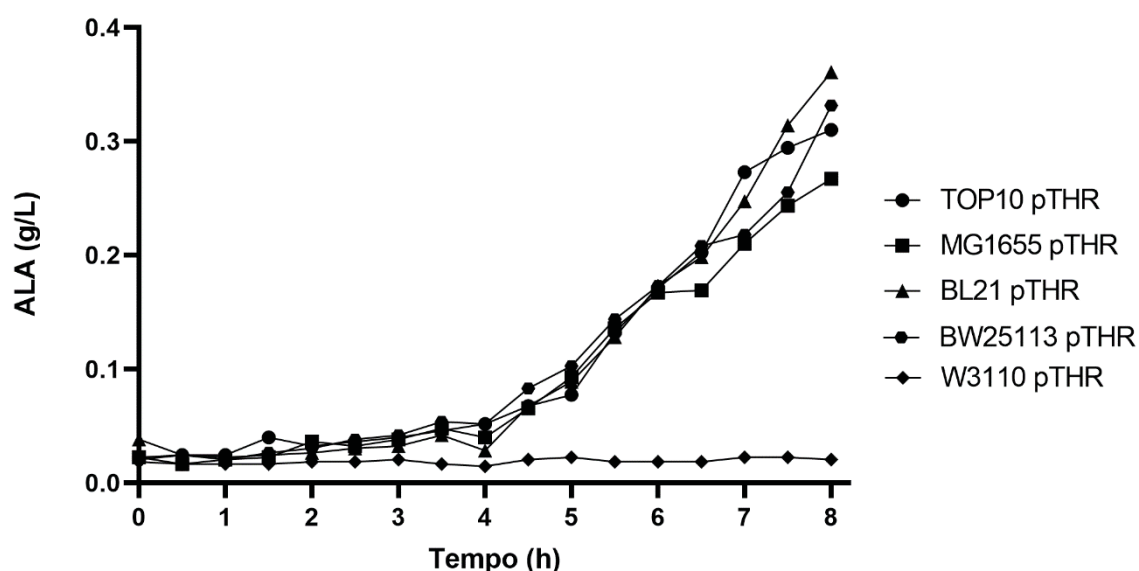
A expressão do operon *Ptac_hemA_rhtA* presente em pTHR parece ter afetado o crescimento de forma diferente em cada uma das estirpes de *E. coli*. Mesmo a estirpe MG1655_pTHR, que apresentou um perfil de crescimento semelhante ao de MG1655_K864400, demorou cerca de 1 hora a mais para atingir a fase estacionária de crescimento. As demais estirpes portando pTHR não atingiram a fase estacionária do crescimento dentro das 8 horas iniciais de cultivo, mas ao final das 48 horas de cultivo apresentaram DO₆₀₀ semelhante entre si (Tabela 3). A estirpe TOP10_pTHR necessitou de mais horas de cultivo do que TOP10_K864400 para sair da fase estacionária, estando próxima de alcançar o final da fase de crescimento exponencial após 8 horas de cultivo.

A maior diferença no perfil de crescimento entre as linhagens de *E. coli* portando K864400 ou pTHR foi de BL21(DE3) e de BW25113. Tamanha diferença no crescimento é um forte indicativo de um elevado fardo metabólico oriundo da expressão de *hemA* e *rhtA* nestas estirpes. Ressalta-se que a linhagem *E. coli* BL21(DE3) já foi amplamente utilizada para a produção de ALA por outros grupos de pesquisa (WERF et al., 1996; CHOI et al., 1999; DING et al., 2017; YU et al., 2022), demonstrando seu potencial para produção em altas concentrações do aminoácido.

5.3 Produção de ALA em *E. coli* portando pTHR

A concentração de ALA nas estirpes portando K864400 ou pTHR foram mensuradas nos mesmos intervalos de tempo descritos no tópico 5.1. O perfil de produção de ALA durante as 8 horas iniciais de cultivo das estirpes portando K864400 foi semelhante entre as cinco estirpes (dados não mostrados). Estas cinco estirpes, mesmo após 48 horas de cultivo, produziram entre 0,029 a 0,041 g/L de ALA (Tabela 3). O perfil de produção de ALA das estirpes portando pTHR nas primeiras 8 horas de cultivo é demonstrado na Figura 7.

Figura 7. Produção de ALA de diferentes estirpes de *E. coli* portando vetor pTHR durante 8 horas de monitoramento.



Cada estirpe foi crescida em frasco único contendo 50 mL de meio MMALA adicionado de Cm (30 µg/mL) e IPTG (0,1 mM). A legenda à direita representa as estirpes analisadas.

Dentre todas, a estirpe W3110_pTHR foi a única que não apresentou elevação significativa na produção de ALA durante as 8 horas iniciais de cultivo, resultado esperado de acordo com o que foi observado no seu perfil de crescimento durante este período.

Apesar dos diferentes perfis de crescimento das estirpes pTHR apresentado na Figura 6, quase todas elas apresentaram uma elevação na produção de ALA a partir das 4 horas de cultivo. Também não houve forte

discrepância da produção de ALA entre as estirpes nas primeiras 8 horas de cultivo, sendo a estirpe BL21_pTHR a que mais produziu ALA neste período (0,36 g/L), seguida por BW25113_pTHR (0,332 g/L), TOP10_pTHR (0,31 g/L), MG1655_pTHR (0,267 g/L) e W3110_pTHR (0,02 g/L).

Após 48 horas de cultivo, a concentração de ALA entre os cultivos diferenciou muito entre as estirpes (Tabela 3), sendo BL21_pTHR a estirpe com maior produção de ALA, seguida por BW25113_pTHR. Estas duas estirpes foram as que apresentaram uma mudança drástica no perfil de crescimento nas primeiras 8 horas de cultivo em relação às suas linhagens portando K864400. Isto indica que a mudança do perfil de crescimento ocorreu devido à elevação do fardo metabólico na célula causado pela expressão de *hemA* e *rhtA*, que redirecionaram parte do carbono e nitrogênio adquiridos do meio para a síntese de ALA ao invés de serem utilizados exclusivamente para a síntese dos componentes celulares.

Outro fator relevante para a alteração dos tempos de crescimento das estirpes portando pTHR é que o acúmulo de ALA na célula aumenta a quantidade de espécies reativas de oxigênio, gerando danos oxidativos na célula e assim diminuindo sua capacidade de crescimento (ZHU et al., 2019).

Tabela 3. DO₆₀₀ e Produção de ALA de estirpes de *E. coli* portando K864400 ou pTHR após 48 horas de cultivo.

Estirpes	DO₆₀₀	ALA ±DP (g/L)
<i>E. coli</i> TOP10_K864400	1,058	0,036
<i>E. coli</i> TOP10_pTHR	1,050 ±0,03	0,509 ±0,08
<i>E. coli</i> MG1655_K864400	1,083	0,036
<i>E. coli</i> MG1655_pTHR	1,041 ±0,04	0,303 ±0,06
<i>E. coli</i> BL21_K864400	1,094	0,041
<i>E. coli</i> BL21_pTHR	1,050 ±0,05	1,065 ±0,04

<i>E. coli</i> BW25113_K864400	1,032	0,039
<i>E. coli</i> BW25113_pTHR	0,960 ±0,01	0,595 ±0,06
<i>E. coli</i> W3110 K864400	1,049	0,029
<i>E. coli</i> W3110 pTHR	0,980 ±0,08	0,055 ±0,05

Estirpes portando K864400 foram crescidas em frasco único, enquanto as que portavam pTHR foram crescidas em triplicata. Todas foram cultivadas em 50 mL de meio MMALA adicionado de Cm (30 µg/mL) e IPTG (0,1 mM) durante 48 horas. Análises realizadas em triplicata apresentam desvio padrão (±DP).

A linhagem *E. coli* BL21(DE3) apresenta algumas características que fornecem explicações razoáveis para a estirpe BL21_pTHR ser a que mais produziu ALA dentre as analisadas. *E. coli* BL21(DE3) é frequentemente utilizada para expressão de proteínas por não conter a protease Lon e também é deficiente na protease de membrana externa OmpT (JEONG et al., 2015). A ausência destas duas proteases reduz a degradação de proteínas heterólogas expressas em BL21, o que pode ter permitido uma maior concentração de ALAS e RhtA atuantes em BL21_pTHR.

5.4 Produção de ALA em meio mínimo suplementado apenas com glucose

Na busca da diminuição do custo de produção de ALA, foi realizado o cultivo das estirpes TOP10_K864400 e TOP10_pTHR em meio mínimo suplementado apenas por glucose, conforme descrito por Kang et al. (2011) para verificar se os níveis de produção de ALA seriam afetados. Uma única amostra foi coletada após 48 horas de cultivo para ser analisada quanto à DO₆₀₀ e produção de ALA. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.

A concentração de ALA obtida pela estirpe TOP10_pTHR em meio de cultivo sem a suplementação de glicina foi inferior a 0,1 g/L. Isso demonstra que a adição de 7,5 g/L de glicina no meio eleva a produção de ALA pela mesma estirpe em 514,1%. Este é um indicativo que a suplementação do meio com

glicina é essencial para a produção de ALA em quantidades consideráveis pelas estirpes portadora do vetor pTHR.

Tabela 4. DO₆₀₀ e Produção de ALA de *E. coli* TOP10_K864400 e TOP10_pTHR em meio mínimo sem adição de glicina após 48 horas de cultivo.

Estirpes	DO₆₀₀	ALA (g/L)
<i>E. coli</i> TOP10_K864400	1,069	0,036
<i>E. coli</i> TOP10_pTHR	1,059	0,099

As estirpes foram crescidas por 48 horas em frasco único contendo 50 mL de meio mínimo suplementado apenas com glucose. Foram adicionados Cm (30 µg/mL) e IPTG (0,1 mM) ao meio.

5.5 Curva de crescimento, consumo de glucose e produção de ALA por BL21_pTHR

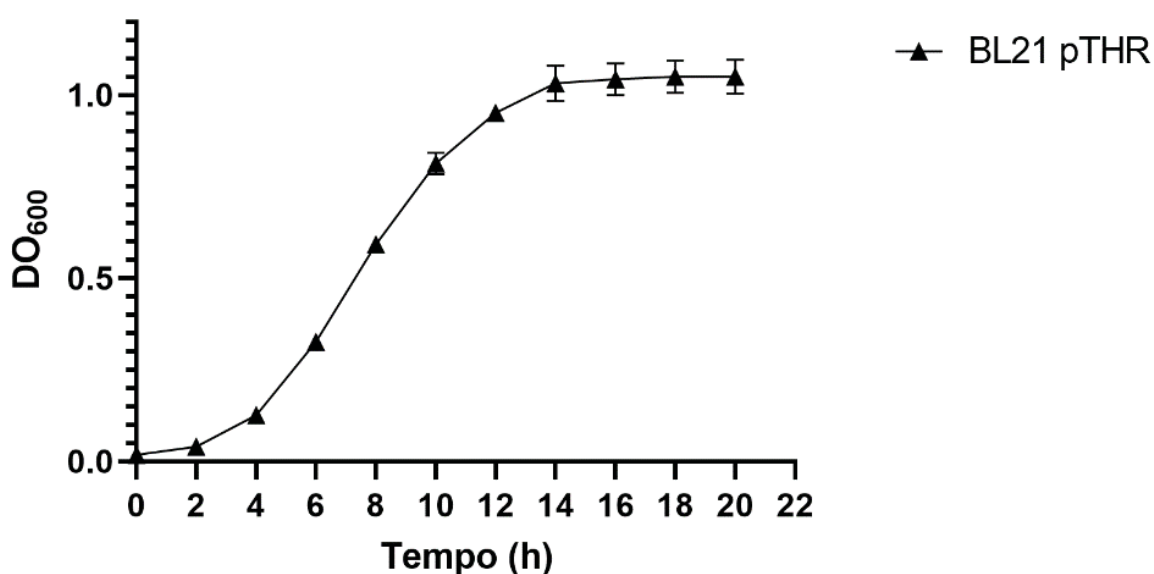
Sendo a estirpe que mais produziu ALA após 48 horas, BL21_pTHR foi inoculada novamente em 50 mL de meio MMALA sob as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente. Os pontos de coleta e de leitura de DO₆₀₀ do meio se deram a cada 2 horas durante 20 horas.

A curva de crescimento de BL21_pTHR demonstrou que esta atingiu a fase estacionária em cerca de 14 horas após o inóculo (Figura 8), diferindo de BL21_K864400 que atingiu este estágio após 8 horas de cultivo — um atraso de aproximadamente 6 horas. Após 14 horas de cultivo, a DO₆₀₀ do cultivo de BL21_pTHR se estabilizou e não apresentou diferença significativa da leitura de 48 horas de cultivo.

O perfil de produção de ALA de BL21_pTHR durante 20 horas de cultivo (Figura 9) apresenta grande semelhança com a sua curva de crescimento. A produção de ALA se estabilizou após 16 horas de cultivo, logo após ter atingido a fase estacionária de crescimento, alcançando após 20 horas a concentração

final de ALA de 1,029 g/L. A concentração alcançada em 20 horas pouco difere da concentração presente no cultivo após 48 horas (Tabela 3), indicando que não há mais capacidade de produção de ALA em níveis relevantes nestas condições de cultivo.

Figura 8. Perfil de crescimento de BL21_pTHR durante 20 horas de monitoramento.

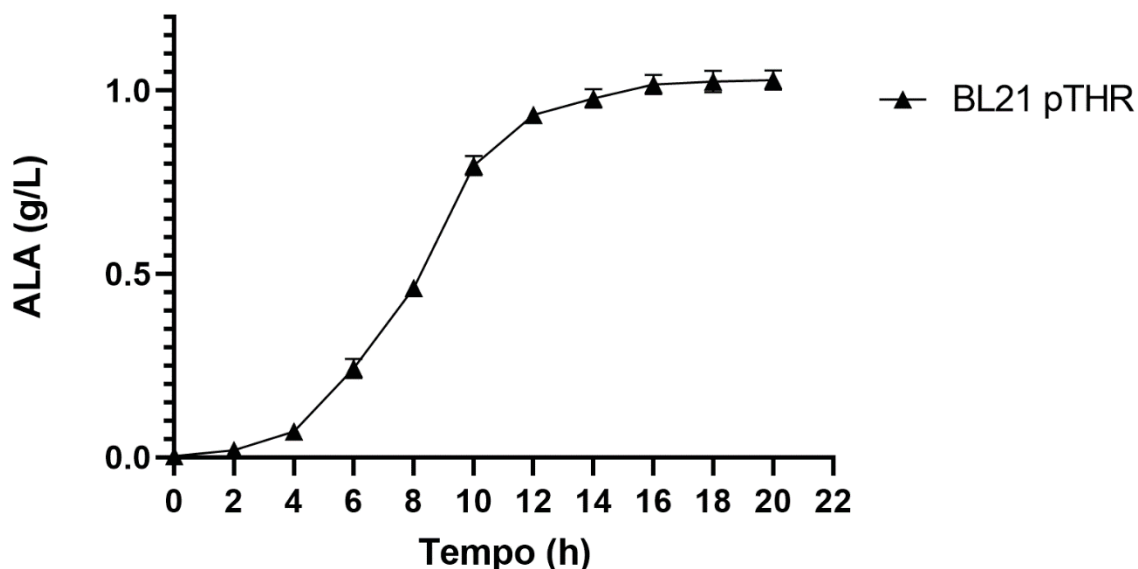


BL21_pTHR foi crescida em triplicata em frascos contendo 50 mL de meio MMALA adicionado de Cm (30 µg/mL) e IPTG (0,1 mM). Pontos representam média ± desvio padrão. A legenda à direita representa a estirpe analisada.

Como as principais fontes de carbono fornecidas pelo meio são glicose e glicina, é necessário que a célula esteja consumindo os nutrientes do meio, realizando a via da glicólise e o ciclo do ácido cítrico, para produzir succinil-CoA, um dos substratos da ALAS para síntese de ALA (BOLT et al., 1999). A fase estacionária coincidir com a estabilização da concentração de ALA no meio pode indicar uma diminuição na produção de succinil-CoA para a utilização pela ALAS, visto que a síntese deste intermediário do ciclo do ácido cítrico é altamente regulada em *E. coli* (KANG et al., 2011). Supõe-se que a adição de succinato no meio seria capaz de fornecer o substrato necessário para a síntese de ALA em BL21_pTHR, mas a adição deste componente ao meio de cultivo elevaria substancialmente seu custo. Além disso, para haver certeza de que é o succinil-

CoA, e não a glicina, o fator limitante para síntese de ALA neste experimento, faz-se necessário analisar o perfil de consumo de glicina da estirpe em cultivo.

Figura 9. Produção de ALA de BL21_pTHR durante 20 horas de monitoramento.

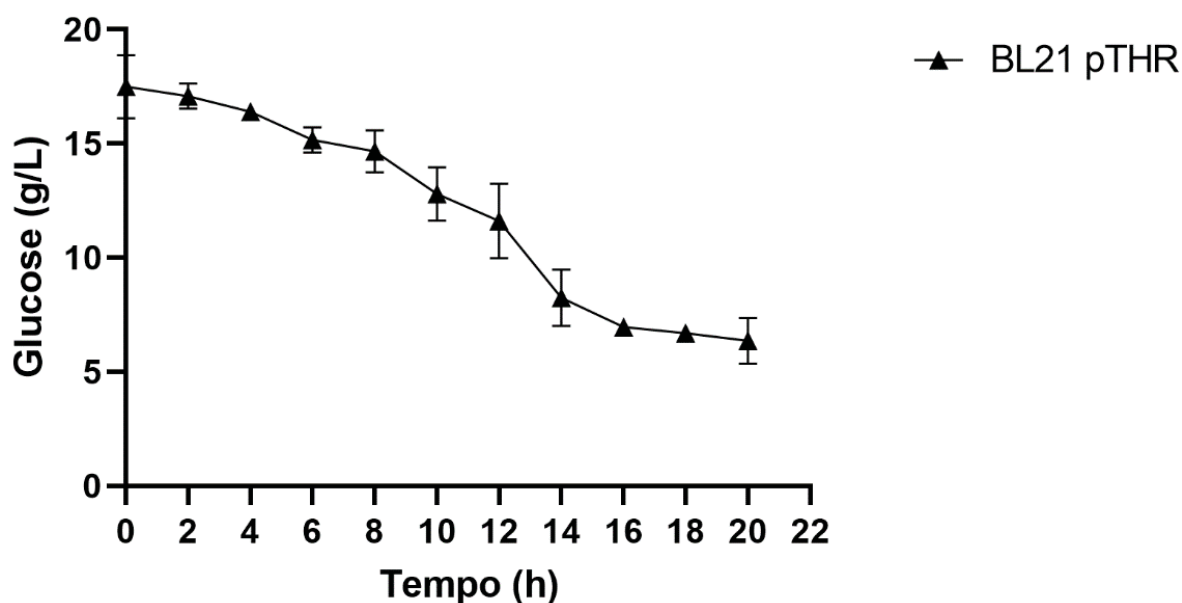


BL21_pTHR foi crescida em triplicata em frascos contendo 50 mL de meio MMALA adicionado de Cm (30 $\mu\text{g/mL}$) e IPTG (0,1 mM). Pontos representam média \pm desvio padrão. A legenda à direita representa a estirpe analisada.

O padrão de consumo de glucose do meio da BL21_pTHR (Figura 10) acompanha sua curva de crescimento, com aumento do consumo após 4 horas de cultivo, no início da fase de crescimento exponencial, e diminuição após 16 horas de cultivo, no início da fase estacionária.

Apesar da DO_{600} e da concentração de ALA não se alterarem substancialmente entre o ponto de 20 e 48 horas, a concentração de glucose passou de 6,36 g/L para 2,49 g/L entre estes pontos de leitura. Este fator é relevante pois aponta que o cultivo da estirpe BL21_pTHR após atingir sua fase estacionária é irrelevante para a produção de ALA e que talvez seja possível atingir resultados semelhantes mesmo com a diminuição da concentração de glucose no meio. Para se otimizar a síntese de ALA tendo em perspectiva o baixo custo de produção, mais testes com a estirpe BL21_pTHR cultivada em meios contendo diferentes concentrações de glucose e glicina são necessários.

Figura 10. Consumo de glicose de BL21_pTHR durante 20 horas de monitoramento.



BL21_pTHR foi crescida em triplicata em frascos contendo 50 mL de meio MMALA adicionado de Cm (30 µg/mL) e IPTG (0,1 mM). Pontos representam média ± desvio padrão. A legenda à direita representa a estirpe analisada.

6 CONCLUSÃO

A produção de ALA por *E. coli* é vastamente estudada e este trabalho buscou complementar um pouco mais sobre seu entendimento. O vetor pTHR desenvolvido neste trabalho, com propriedades modulatórias das partes presentes na biblioteca do iGEM, demonstrou elevar a produção de ALA em diferentes estirpes de *E. coli*. O resultado das análises de cultivo apontou BL21_pTHR como a estirpe com maior capacidade produtiva de ALA dentre as demais estirpes nas condições estabelecidas neste estudo.

Além disso, a suplementação de meio mínimo com glicose e glicina apontou um aumento de 514,1% na produção de ALA por TOP10_pTHR em relação ao meio com suplementação apenas de glicose, indicando que a glicina é um nutriente de extrema relevância para a produção de ALA em estirpes portando pTHR.

A estirpe BL21_pTHR apresentou uma concentração final de 1,065 g/L de ALA em meio MMALA, um meio de baixo custo se comparado aos meios de cultivo utilizados por demais grupos de pesquisa para produção de ALA por *E. coli*. A perspectiva é que a produção de ALA por BL21_pTHR seja maior em cultivos realizados em biorreatores contendo meio complexo suplementado com D-glucose, succinato e glicina. É esperado também que a expressão de enzimas para redução do estresse oxidativo em BL21_pTHR elevem a concentração final de ALA no meio.

Os resultados encontrados neste estudo apontam que extratos de cultivo de BL21_pTHR, rico em ALA e demais nutrientes, podem ser utilizados para o desenvolvimento de produtos alimentícios e rações animais suplementadas (Processo de patente BR 10 2018 009145 0).

REFERÊNCIAS

360RESEARCHREPORTS. **Global 5-aminolevulinic acid hydrochloride market growth 2019–2024**. <https://www.360researchreports.com/global-5-aminolevulinic-acid-hydrochloride-market-13902563>. Acesso em: 15 Feb 2020.

AVISSAR, Y. J.; ORMEROD, J. G.; BEALE, S. I. Distribution of δ -aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. *Archives of Microbiology*. [S. l.]: **Springer Science and Business Media LLC**, 1989. DOI 10.1007/bf00454867.

BECK, T. J.; KRETH, F. W.; BEYER, W.; MEHRKENS, J. H.; OBERMEIER, A.; STEPP, H.; STUMMER, W.; BAUMGARTNER, R. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. **Lasers in Surgery and Medicine**. [S. l.]: Wiley, 2007. DOI 10.1002/lsm.20507.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**. 1997. 5;277(5331):1453-62.

BOLT, E. L.; KRYSZAK, L.; ZEILSTRA-RYALLS, J.; SHOOLINGIN-JORDAN, P. M.; WARREN, M. J. Characterization of the *Rhodobacter sphaeroides* 5-aminolaevulinic acid synthase isoenzymes, HemA and HemT, isolated from recombinant *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**. [S. l.]: Wiley, 1999. DOI 10.1046/j.1432-1327.1999.00730.x.

CHOI, K. R.; SHIN, J. H.; CHO, J. S.; YANG, D.; LEE, S. Y. Systems Metabolic Engineering of *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**. [S. l.]: American Society for Microbiology, 2016. DOI 10.1128/ecosalplus.esp-0010-2015.

CHOI, C.; HONG, B. S.; SUNG, H. C.; LEE, H. S.; KIM, J. H. Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biotechnology Letters**. [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 1999. DOI 10.1023/a:1005520007230.

DING, W.; WENG, H.; DU, G.; CHEN, J.; KANG, Z. 5-Aminolevulinic acid production from inexpensive glucose by engineering the C4 pathway in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. [S. I.]: Oxford University Press (OUP), 2017. DOI 10.1007/s10295-017-1940-1.

FENG, L.; ZHANG, Y.; FU, J.; MAO, Y.; CHEN, T.; ZHAO, X.; WANG, Z. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid. **Biotechnology and Bioengineering**. [S. I.]: Wiley, 2015. DOI 10.1002/bit.25886.

FU, W.; LIN, J.; CEN, P. 5-Aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**. [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 28 fev. 2007. DOI 10.1007/s00253-007-0887-y.

FU, W.; LIN, J.; CEN, P. Enhancement of 5-aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using batch and fed-batch culture system. **Bioresource Technology**. [S. I.]: Elsevier BV, jul. 2008. DOI 10.1016/j.biortech.2007.09.039.

GARCÍA-GRANADOS, R.; LERMA-ESCALERA, J. A.; MORONES-RAMÍREZ, J. R. Metabolic Engineering and Synthetic Biology: Synergies, Future, and Challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. [S. I.]: Frontiers Media SA, 4 mar. 2019. DOI 10.3389/fbioe.2019.00036.

GARNER, K. L. Principles of synthetic biology. **Essays in Biochemistry**. [S. I.]: Portland Press Ltd., nov. 2021. DOI 10.1042/ebc20200059.

GREEN, R. **COBALAMINS**. Encyclopedia of Human Nutrition. [S. l.]: Elsevier, 2005. p401-407. DOI 10.1016/b0-12-226694-3/00061-2.

GRENIER, F.; MATTEAU, D.; BABY, V.; RODRIGUE, S. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. **Genome Announcements**. [S. l.]: American Society for Microbiology, 30 out. 2014. DOI 10.1128/genomea.01038-14.

HILL, C W; HARNISH, B W. Inversions between ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. [S. l.]: Proceedings of the National Academy of Sciences, nov. 1981. DOI 10.1073/pnas.78.11.7069.

JENSEN, K. F. The *Escherichia coli* K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. **Journal of Bacteriology**. [S. l.]: American Society for Microbiology, jun. 1993. DOI 10.1128/jb.175.11.3401-3407.1993.

JEONG, H.; KIM, H. J.; LEE, S. J. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. **Genome Announcements**. [S. l.]: American Society for Microbiology, 30 abr. 2015. DOI 10.1128/genomea.00134-15.

LAYER, G. Heme biosynthesis in prokaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. [S. l.]: Elsevier BV, jan. 2021. DOI 10.1016/j.bbamcr.2020.118861.

HOTTA, Y.; TANAKA, T.; TAKAOKA, H.; TAKEUCHI, Y.; KONNAI, M. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. **Plant Growth Regulation**. [S. l.]: Springer Science and Business Media LLC, 1997. DOI 10.1023/a:1005883930727.

KANG, D. K.; KIM, S. S.; CHI, W. J., et al. Cloning and expression of the *Rhodobacter capsulatus hemA* gene in *E. coli* for the production of 5-aminolevulinic acid. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 2004. 14(6):1327-1332.

KANG, Z.; WANG, Y.; WANG, Q.; QI, Q. Metabolic engineering to improve 5-aminolevulinic acid production. **Bioengineered Bugs**. [S. l.]: Informa UK Limited, nov. 2011. DOI 10.4161/bbug.2.6.17237.

KANG, Z.; ZHANG, J.; ZHOU, J.; QI, Q.; DU, G.; CHEN, J. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B12. **Biotechnology Advances**. [S. l.]: Elsevier BV, nov. 2012. DOI 10.1016/j.biotechadv.2012.04.003.

KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H.; PROSS, D.C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. [S. l.]: Elsevier BV, jun. 1990. DOI 10.1016/1011-1344(90)85083-9.

LEE, D. H.; JUN, W. J.; KIM, K. M.; SHIN, D. H.; CHO, H. Y.; HONG, B. S. Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase in recombinant *Escherichia coli* using D-glucose. **Enzyme and Microbial Technology**. [S. l.]: Elsevier BV, jan. 2003. DOI 10.1016/s0141-0229(02)00241-7.

LIU, S.; ZHANG, G.; LI, X.; ZHANG, J. Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**. [S. l.]: Springer Science and Business Media LLC, 13 jul. 2014. DOI 10.1007/s00253-014-5925-y.

LIN, J; FU, W; CEN, P. Characterization of 5-aminolevulinate synthase from *Agrobacterium radiobacter*, screening new inhibitors for 5-aminolevulinate dehydratase from *Escherichia coli* and their potential use for high 5-aminolevulinate production. **Bioresource Technology**. [S. l.]: Elsevier BV, abr. 2009. DOI 10.1016/j.biortech.2008.11.008.

LOU, J. W.; ZHU, L.; WU, M. B.; YANG, L. R.; LIN, J. P.; CEN, P. L. High-level soluble expression of the *hemA* gene from *Rhodobacter capsulatus* and comparative study of its enzymatic properties. **Journal of Zhejiang University**

SCIENCE B. [S. I.]: Zhejiang University Press, maio 2014. DOI 10.1631/jzus.b1300283.

MAUZERALL, D.; GRANICK, S. The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine. **J Biol Chem.** 219(1):435-46. PMID: 13295297. mar. 1956

REBEIZ, C. A.; JUVIK, J. A.; REBEIZ, C. C. Porphyrin insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** [S. I.]: Elsevier BV, jan. 1988. DOI 10.1016/0048-3575(88)90055-7.

SACHAR, M.; ANDERSON, K. E.; MA, X. Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** [S. I.]: American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET), 20 nov. 2015. DOI 10.1124/jpet.115.228130.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

SENGE, M.; RYAN, A.; LETCHFORD, K.; MACGOWAN, S.; MIELKE, T. Chlorophylls, Symmetry, Chirality, and Photosynthesis. **Symmetry.** [S. I.]: MDPI AG, 10 set. 2014. DOI 10.3390/sym6030781.

SHETTY, R. P.; ENDY, D.; KNIGHT, T. F. J. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Journal of Biological Engineering.** [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 14 abr. 2008. DOI 10.1186/1754-1611-2-5.

SHI, F.; LUAN, M.; LI, Y. Ribosomal binding site sequences and promoters for expressing glutamate decarboxylase and producing γ -aminobutyrate in *Corynebacterium glutamicum*. **AMB Express.** [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 18 abr. 2018. DOI 10.1186/s13568-018-0595-2.

SU, T.; GUO, Q.; ZHENG, Y.; LIANG, Q.; WANG, Q.; QI, Q. Fine-Tuning of *hemB* Using CRISPRi for Increasing 5-Aminolevulinic Acid Production in

Escherichia coli. **Frontiers in Microbiology**. [S. I.]: Frontiers Media SA, 31 jul. 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.01731.

VAN DER WERF, M. J.; ZEIKUS, J. G. 5-Aminolevulinate production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hemA* gene. **Applied and Environmental Microbiology**. [S. I.]: American Society for Microbiology, out. 1996. DOI 10.1128/aem.62.10.3560-3566.1996.

WOODARD, S.I.; DAILEY, H.A. Regulation of Heme Biosynthesis in *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. [S. I.]: Elsevier BV, jan. 1995. DOI 10.1006/abbi.1995.1016.

WU, Y.; LIAO, W.; DAWUDA, M. M.; HU, L.; YU, J. 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. **Plant Growth Regulation**. [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 17 dez. 2018. DOI 10.1007/s10725-018-0463-8.

XIE, L.; HALL, D.; EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in *Escherichia coli* using factorial design. **Applied Microbiology and Biotechnology**. [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 1 dez. 2003. DOI 10.1007/s00253-003-1388-2.

YU, T. H.; TAN, S. I.; YI, Y. C.; XUE, C.; TING, W. W.; CHANG, J. J. New insight into the codon usage and medium optimization toward stable and high-level 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**. [S. I.]: Elsevier BV, jan. 2022. DOI 10.1016/j.bej.2021.108259.

ZHANG, L.; CHEN, J.; CHEN, N.; SUN, J.; ZHENG, P.; MA, Y. Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from *Rhodospseudomonas palustris* with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid production. **Biotechnology Letters**. [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 22 jan. 2013. DOI 10.1007/s10529-013-1143-4.

ZHU, C.; CHEN, J.; WANG, Y.; WANG, L.; GUO, X.; CHEN, N.; ZHENG, P.; SUN, J.; MA, Y. Enhancing 5-aminolevulinic acid tolerance and production by engineering the antioxidant defense system of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**. [S. l.]: Wiley, 17 abr. 2019. DOI 10.1002/bit.26981.