



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Construção de cepas recombinantes de  
*Saccharomyces cerevisiae* para a produção de  
ramnolipídeos a partir de sacarose**

**Frederico Mendonça Bahia Silva**

Brasília

2017



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Frederico Mendonça Bahia Silva**

**Construção de cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de ramnolipídeos a partir de sacarose**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nádia Skorupa Parachin**

Brasília

2017

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nádia Skorupa Parachin.

# Banca Examinadora

## **Presidente (orientadora):**

Dr.<sup>a</sup> Nádia Skorupa Parachin  
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)  
Universidade de Brasília – UnB

## **Titulares:**

Dr.<sup>a</sup> Eliane Ferreira Noronha  
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)  
Universidade de Brasília – UnB

Dr.<sup>a</sup> Talita Souza Carmo  
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)  
Universidade de Brasília – UnB

## **Suplente:**

Dr.<sup>a</sup> Ildinete Silva Pereira  
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)  
Universidade de Brasília – UnB

*“O saber deve ser como um rio, cujas águas doces, grossas, copiosas, transbordem do indivíduo, e se espraíem, estancando a sede dos outros. Sem um fim social, o saber será a maior das futilidades.”*

(Gilberto Freyre)

# Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha querida professora orientadora Nádia Parachin. Em seu primeiro semestre como professora da UnB já conheceu um aluno chato em uma de suas turmas de Bioquímica que, ao fim da disciplina, gostou tanto da professora que acabou a procurando para estagiar sob sua orientação. Cinco anos depois cá estou, fechando um período de muita aprendizagem, oportunidades e alguns puxões de orelha. Seus frequentes incentivos foram além de palavras bonitas, viabilizando muitas das minhas conquistas enquanto estudante. Muito obrigado por todo seu apoio e paciência professora, devo minha breve carreira profissional a você.

Agradeço à minha família que, mesmo receosa, apoiou minha decisão de mudar de graduação e sempre estabeleceu minha base financeira e emocional para que eu pudesse atingir os meus objetivos.

Aos meus queridos amigos, em especial David Lean, Gabriela Aguiar e Caio Catarcione, que fizeram com que minha nova vida em Brasília tomasse forma e sentido, sempre me escutando, aconselhando ou simplesmente me fazendo companhia. O apoio de vocês foi essencial para as minhas conquistas.

Um agradecimento mais que especial à Priscila Peres, minha queridíssima amiga e companheira de curso e laboratório, que agora é considerada parte da minha família. Sua amizade e cumplicidade foram cruciais em todos os aspectos da minha evolução enquanto pessoa e profissional.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, especialmente à Gabriela Carneiro, minha parceira de projeto. Sinto orgulho de como nosso grupo de trabalho é unido, amigável e prestativo. Um ambiente de trabalho saudável e colaborativo é essencial para o sucesso de cada um.

Aos meus colaboradores de projeto, em especial ao meu co-orientador Maurizio Bettiga, por toda a ajuda despendida, provendo robustez ao meu estudo e incrementando minha capacidade profissional.

Agradeço à UnB e a todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento CAPES e CNPq que viabilizaram financeiramente a execução do projeto.

## Resumo

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas com propriedades tensoativas produzidas por diversos organismos. Ramnolipídeos são biossurfactantes glicolipídicos originalmente isolados do sobrenadante de culturas da bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa* e são produzidos concomitantemente a fatores de virulência após sinalização por *quorum sensing*. São compostos de uma ou duas moléculas de ramnose (mono- ou di-ramnolipídeos, respectivamente) acoplada(s) a uma ou duas moléculas de ácido graxo, mais especificamente ácido beta-hidroxiálcanoil-beta-hidroxiálcanoico (HAA). Ramnolipídeos são alternativas ecologicamente viáveis aos surfactantes petroquímicos. Entretanto, ainda não foi atingida uma produção em escala industrial economicamente viável desses, principalmente devido a altos custos de substratos e processamento e baixos rendimentos e produtividades. Diante desse cenário, o presente trabalho objetivou a construção de cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de ramnolipídeos a partir de sacarose. Para tal, seis enzimas responsáveis pela biossíntese de mono-ramnolipídeos em *P. aeruginosa* a partir de glicose-1-fosfato (RmlA, RmlB, RmlC, RmlD, RhlA e RhlB) foram funcionalmente produzidas em *Saccharomyces cerevisiae*. Ademais, o gene SUC2 de levedura que codifica uma invertase foi interrompido e a enzima sacarose fosforilase de *Pelomonas saccharophila* foi também produzida na levedura.

Duas cepas foram construídas: a cepa produtora de mono-ramnolipídeos RLP e a cepa intermediária produtora de dTDP-L-ramnose RHP. A produção de ambas as moléculas foi confirmada por microscopia confocal e espectrometria de massa, respectivamente. As cepas engenheiradas com as vias de biossíntese de dTDP-L-ramnose e mono-ramnolipídeos mostraram, pela primeira vez como prova de conceito, a produção dessas moléculas por um microrganismo eucariótico GRAS (do inglês, *Generally Regarded As Safe*) utilizando matéria-prima de baixo custo. Essas cepas mostram o potencial de continuar melhorando a produção de ramnolipídeos em bioprocessos industriais baseados em levedura para fazer com que se tornem um produto comercialmente competitivo globalmente.

## Abstract

Biosurfactants are biological surface-active amphiphilic agents produced by many microorganisms. Rhamnolipids are glycolipid biosurfactants originally isolated from the supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* cultures and are concomitantly produced with virulence factors upon *quorum sensing* signaling. They are composed of one or two molecules of rhamnose (mono- or di-rhamnolipid, respectively) linked to one or two fatty acid molecules, more specifically beta-hydroxyalkanoyl-beta-hydroxyalkanoic acid (HAA). Rhamnolipids are green alternatives to petrochemical surfactants. However, their production has still not reached an economically feasible production in industrial scale, mainly due to high substrates and processing costs and low productivities and yields. With this in mind, this study aimed at the construction of recombinant *S. cerevisiae* strains for mono-rhamnolipids production from sucrose. Six enzymes responsible for mono-rhamnolipids biosynthesis in *P. aeruginosa* from glucose-1-phosphate (RmlA, RmlB, RmlC, RmlD, RhlA and RhlB) were functionally expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, the invertase encoding SUC2 gene from yeast was disrupted and the sucrose phosphorylase enzyme from *Pelomonas saccharophila* was also expressed in yeast.

Two strains were constructed: the mono-rhamnolipids production strain RLP and the intermediate dTDP-L-rhamnose producing strain RHP. Production of both molecules was confirmed by confocal microscopy and mass spectrometry, respectively. The engineered strains harboring biosynthesis pathways for dTDP-L-rhamnose and mono-rhamnolipids displayed, for the first time as a proof of concept, the production of these molecules by a GRAS eukaryotic microorganism using an inexpensive raw material. These constructs show the potential to further improve rhamnolipids production in a yeast-based industrial bioprocess to change rhamnolipids into a competitive global commodity.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> As quatro estruturas químicas gerais de ramnolipídeos produzidos por algumas espécies de <i>Pseudomonas</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Via metabólica de síntese de ramnolipídeos .....	20
<b>Figura 3.</b> Metabolismo de sacarose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
<b>Figura 4.</b> Estratégia para aumentar rendimento de ATP por molécula de sacarose	27
<b>Figura 5.</b> Estratégia de clonagem.....	32
<b>Figura 6.</b> Estratégia de interrupção do gene SUC2. ....	34
<b>Figura 7.</b> PCR de confirmação da interrupção do gene SUC2 .....	45
<b>Figura 8.</b> Taxas de crescimento específico máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) da cepa RH1 e sua cepa parental CEN.PK 102-3A.....	46
<b>Figura 9.</b> Atividades enzimáticas de RmlA para as cepas intermediárias RH2 e RH4 utilizando sacarose como substrato .....	47
<b>Figura 10.</b> Atividades enzimáticas de RmlA para as cepas intermediárias RH2 e RH4 utilizando glicose-1-fosfato como substrato.....	48
<b>Figura 11.</b> Taxas de crescimento específico máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) das cepas RHR e RHP crescidas em sacarose na ausência e presença de LiCL 15mM.....	50
<b>Figura 12.</b> Sobreposição dos resultados de MRM da cepa controle RHR (linha vermelha) e da cepa produtora RHP (linha preta).....	53

<b>Figura 13.</b> Análise de solução padrão de dTDP-L-ramnose (A), de extrato celular de RHP (B linha contínua) e de extrato celular de RHP adicionado de padrão de dTDP-L-ramnose (B linha pontilhada). .....	54
<b>Figura 14.</b> Microscopias de fluorescência e contraste de fase das cepas RLR (A e B, respectivamente) e RLP (C e D, respectivamente). .....	58
<b>Figura 15.</b> Quantificação de células contendo gotículas lipídicas (A) e de número de gotículas lipídicas por célula (B) das cepas RLR (referência) e RLP (produtora).....	59
<b>Figura 16.</b> Quantificação do sinal de fluorescência. ....	60

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação estrutural dos surfactantes de origem microbiana .....	18
<b>Tabela 2.</b> Empresas produtoras de Ramnolipídeos .....	22
<b>Tabela 3.</b> Nome e tamanho dos genes, cassetes de expressão e plasmídeos utilizados nesse estudo. ....	31
<b>Tabela 4.</b> Iniciadores usados na amplificação de cassetes de expressão e na confirmação de construção de plasmídeos desse estudo. ....	33
<b>Tabela 5.</b> Iniciadores usados na amplificação do cassete de interrupção e na verificação da interrupção. ....	34
<b>Tabela 6.</b> Nome, genótipo relevante e cepa parental das cepas bacterianas utilizadas e produzidas nesse estudo. ....	35
<b>Tabela 7.</b> Nome, genótipo relevante e cepa parental das cepas de levedura utilizadas e produzidas nesse estudo. ....	37
<b>Tabela 8.</b> Resultado do ensaio de orcinol para detecção de RLs. ....	56

## Lista de abreviaturas

**%:** Por cento

**°C:** Graus Celsius

**μ:** Taxa de crescimento específico

**μg:** Micrograma

**μm:** Micrômetro

**μM:** Micromolar

**3D:** Tridimensional

**Aa's:** Aminoácidos

**ADH:** Gene para álcool desidrogenase

**AGT1:** Gene para transportador alfa-glucosidase

**AmpR:** Gene que confere resistência a ampicilina

**ATP:** Adenosina trifosfato

**CMC:** Concentração micelar crítica

**Cmol:** Moles de carbono

**CSM:** Mistura de Complemento e Suplemento

**CYC:** Gene para citocromo C

**DIMS:** Espectrometria de Massa de Infusão Direta

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dTDP:** Desoxitimidina difosfato

**dTDP-Rha:** dTDP-L-ramnose

**dTTP:** Desoxitimidina trifosfato

**ESI(-)-MS:** Espectrometria de Massa de Ionização por Eletrospray operado em Modo Negativo

**EUA:** Estados Unidos da América

**FDA:** Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos

**g:** Grama

**G:** Força Centrífuga Relativa (RCF)

**G418:** Geneticina

**Gft:** Gene para sacarose fosforilase de *Pelomonas saccharophila*

**G1P:** Glicose-1-fosfato

**G6P:** Glicose-6-P

**GPD:** Gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**GRAS:** Geralmente Reconhecido Como Seguro

**h:** Hora

**HAA:** Ácidos graxos beta-hidroxil

**HCl:** Ácido clorídrico

**HPAEC:** Cromatografia de Troca-Aniônica de Alta-Performance

**HXT:** Gene para transportador de hexose

**KanMX:** Gene híbrido de aminoglicosídeo transferase sob controle do promotor TEF usado como marca de seleção

**Km:** Constante de Michaelis-Menten

**kg:** Quilograma

**L:** Litro

**LB:** Meio Luria-Bertani

**Leu:** Leucina

**LiCl:** Cloreto de lítio

**LUT:** Lookup Table

**m:** Metro

**m/z:** Relação massa/carga

**MALT:** Gene para maltose permease

**mg:** Miligrama

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de magnésio

**mL:** Mililitro

**mm:** Milímetro

**mM:** Milimolar

**mN:** Milinewton

**MOPS:** Ácido 3(N-morfolino)propanosulfônico

**MRM:** Monitoramento de Reações Múltiplas

**MS:** Espectrometria de Massa

**MS/MS:** Espectrometria de Massa em Tandem

**N:** Normal

**NaCl:** Cloreto de sódio

**NaOH:** Hidróxido de sódio

**nm:** Nanômetro

**OD:** Densidade ótica

**ORF:** Fase Aberta de Leitura

**p/v:** Relação peso/volume

**pAB:** Plasmídeo p424TEF contendo cassetes de expressão de RhIA e RhIB

**pb:** Pares de base

**pBD:** Plasmídeo p426GPD contendo cassetes de expressão de RmlB e RmlD

**PBS:** Tampão Fosfato-Salino

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**PDA:** Arranjo de fotodiodos

**pGAC:** Plasmídeo p425GPD contendo cassetes de expressão de Gft, RmlA e RmlC

**PGM:** Gene para fosfoglicomutase

**pH:** Potencial de hidrogênio

**Pi:** Fosfato inorgânico

**Q:** Quadrupolo

**QS:** *Quorum sensing*

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinação

**RL:** Ramnolipídeo

**RhIA:** Gene para subunidade A de ramnosiltransferase1

**RhIB:** Gene para subunidade B de ramnosiltransferase1

**RhIC:** Gene para ramnosiltransferase2

**RHP:** Cepa Produtora de dTDP-L-ramnose

**RHR:** Cepa Referência de dTDP-L-ramnose

**RLP:** Cepa Produtora de mono-ramnolipídeos

**RLR:** Cepa Referência de mono-ramnolipídeos

**RmlA:** Gene para glicose-1-fosfato timidiltransferase

**RmlB:** Gene para dTDP-glicose 4,6-desidratase

**RmlC:** Gene para dTDP-4-desidroramnose 3,5-epimerase

**RmlD:** Gene para dTDP-4-desidroramnose redutase

**rpm:** Rotações por minuto

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**SPE:** Extração em Fase Sólida

**SUC:** Gene para invertases intra e extracelular

**TEAA:** Acetato de trietilamônia

**TEF:** Gene para fator de alongação translacional

**Tm:** Temperatura de denaturação

**Trp:** Triptofano

**UnB:** Universidade de Brasília

**UPLC:** Cromatografia Líquida de Ultra Performance

**Ura:** Uracila

**USD:** Dólares norte-americanos

**USDA:** Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

**V:** Volts

**v/v:** Relação volume/volume

**YNB:** Meio Base de Nitrogênio para Levedura

**YPD:** Meio Extrato de Levedura Peptona Dextrose

# Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Surfactantes e biossurfactantes .....	17
1.2	Ramnolipídeos.....	19
1.3	Aplicação e mercado de ramnolipídeos.....	21
1.4	Sacarose como substrato para a produção de ramnolipídeos .....	22
1.5	Engenharia metabólica para a produção de ramnolipídeos .....	23
1.6	A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
1.7	Metabolismo de sacarose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral .....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	MÉTODOS.....	30
4.1	Genes e plasmídeos.....	30
4.2	Estratégia de clonagem.....	30
4.3	Interrupção do gene SUC2 .....	32
4.4	Cepas .....	35
4.5	Curvas de crescimento.....	38
4.6	Ensaio enzimático .....	38
4.7	Análise de dTDP-L-ramnose .....	39
4.7.1	Cromatografia de Troca-Aniônica de Alta-Performance.....	39
4.7.2	Espectrometria de Massa em Tandem .....	40
4.8	Análise de mono-ramnolipídeos .....	41
4.8.1	Ensaio de Orcinol.....	41
4.8.2	Microscopia Confocal.....	42

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5.1	Construção das cepas .....	44
5.1.1	Interrupção do gene SUC2 .....	44
5.1.2	Análise de crescimento em sacarose.....	45
5.1.3	Atividade de RmlA .....	46
5.1.4	Cepas finais .....	49
5.2	Inibição de crescimento por lítio .....	49
5.3	Detecção de dTDP-L-ramnose .....	51
5.3.1	HPAEC.....	51
5.3.2	MS/MS .....	52
5.4	Detecção de mono-ramnolipídeos.....	55
5.4.1	Ensaio de Orcinol.....	55
5.4.2	Microscopia Confocal.....	57
6	CONCLUSÃO .....	62
7	BIBLIOGRAFIA .....	63

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são uma importante classe de moléculas anfifílicas que facilitam a interação entre fases imiscíveis, reduzindo a tensão superficial ou interfacial entre elas. Com base nessa característica, a aplicação destas moléculas é extremamente ampla, já que possuem um grande poder de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão. Podem ser utilizadas em diversos segmentos industriais, variando desde indústrias de produtos de limpeza até indústrias alimentícia e farmacêutica, além do uso em biorremediação no derramamento de petróleo (Henkel *et al.*, 2012). A grande plasticidade no uso dessas moléculas em diversas frentes justifica sua demanda anual de aproximadamente 15 milhões de toneladas (Van Bogaert *et al.*, 2007). Estimou-se que o mercado de surfactantes atingiria um valor de 30,64 bilhões USD em 2016, podendo chegar a atingir um valor de 39,86 bilhões USD em 2021. Esses valores se traduzem em um crescimento de 5,4% ao ano, sendo a indústria de produtos de higiene pessoal e beleza a que mais impulsiona esse crescimento (Marketsandmarkets, 2016).

Surfactantes são classificados em dois principais grupos: surfactantes sintéticos e biossurfactantes. Surfactantes sintéticos são quimicamente produzidos e classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar (Pornsunthorntawee *et al.*, 2010). Apesar de serem os mais utilizados em escala industrial, são, em sua maioria, de origem petroquímica, uma fonte não renovável de recursos, e de difícil degradação, fato que os torna poluentes pelo longo tempo de residência em ambientes contaminados (Henkel *et al.*, 2012).

Biossurfactantes, assim como os surfactantes sintéticos, são moléculas tensoativas, mas que, em contrapartida, são oriundas de fontes renováveis por meio do cultivo celular de microrganismos produtores, como bactérias e fungos (Müller *et al.*, 2012; Pornsunthorntawee *et al.*, 2010). Tais moléculas são muito diversas estruturalmente e são classificadas de acordo com o microrganismo produtor ou de

acordo com sua natureza química estrutural (Tabela 1). Normalmente, o módulo hidrofóbico da molécula é composto por cadeias de ácidos graxos e o módulo polar é composto por moléculas de natureza diversa, e.g. carboidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos e até peptídeos cíclicos (Mulligan *et al.*, 2001).

Tabela 1. Classificação estrutural dos surfactantes de origem microbiana (Müller *et al.*, 2012).

<b>Classe estrutural</b>	<b>Exemplos</b>
Glicolipídeos	Soforolipídeos, ramnolipídeos, lipídeos de trealose
Lipopeptídeos/lipoaminoácidos	Surfactina
Polímeros	Proteínas
Óleos/membranas	Fosfolipídeos

Biossurfactantes de origem microbiana possuem relevantes vantagens quando comparados aos surfactantes de origem petroquímica, ao passo que apresentam ação emulsificante comparável, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e, alguns deles, atividade antimicrobiana que pode ser explorada para o desenvolvimento de novos medicamentos (Banat *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2006). Ademais, biossurfactantes atuam melhor que surfactantes petroquímicos em condições atípicas de temperatura, salinidade e pH (Banat, 1995; Mulligan, 2005). Por conseguinte, essas moléculas possuem maior potencial de uso industrial, principalmente nas indústrias de fármacos, cosméticos e alimentos (Pornsunthorntaweewee *et al.*, 2010). Porém, o alto custo de produção dessas moléculas ainda não permitiu que atingissem maior participação no mercado global. Novas estimativas mostram que a demanda mundial de biossurfactantes em 2013 foi de aproximadamente 344 mil toneladas, podendo chegar a quase 462 mil toneladas em 2020, atingindo uma movimentação financeira de 2,8 milhões USD em 2023 (Sekhon Randhawa e Rahman, 2014). Dentre todas as moléculas conhecidas de biossurfactantes, os ramnolipídeos (RLs), que pertencem à classe dos glicolipídeos, são as mais estudadas (Müller, 2012).

## 1.2 RAMNOLIPÍDEOS

Ramnolipídeos são moléculas de biossurfactantes produzidas por algumas espécies de *Pseudomonas* (Cameotra e Makkar, 2004). Suas estruturas moleculares consistem em uma ou duas moléculas de dTDP-L-ramnose (dTDP-Rha), porção hidrofílica da molécula, ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo  $\beta$ -hidroxil (HAA), porção hidrofóbica da molécula, sendo o número de carbonos da cadeia lipídica variável de 8 até 16 (Figura 1) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011).

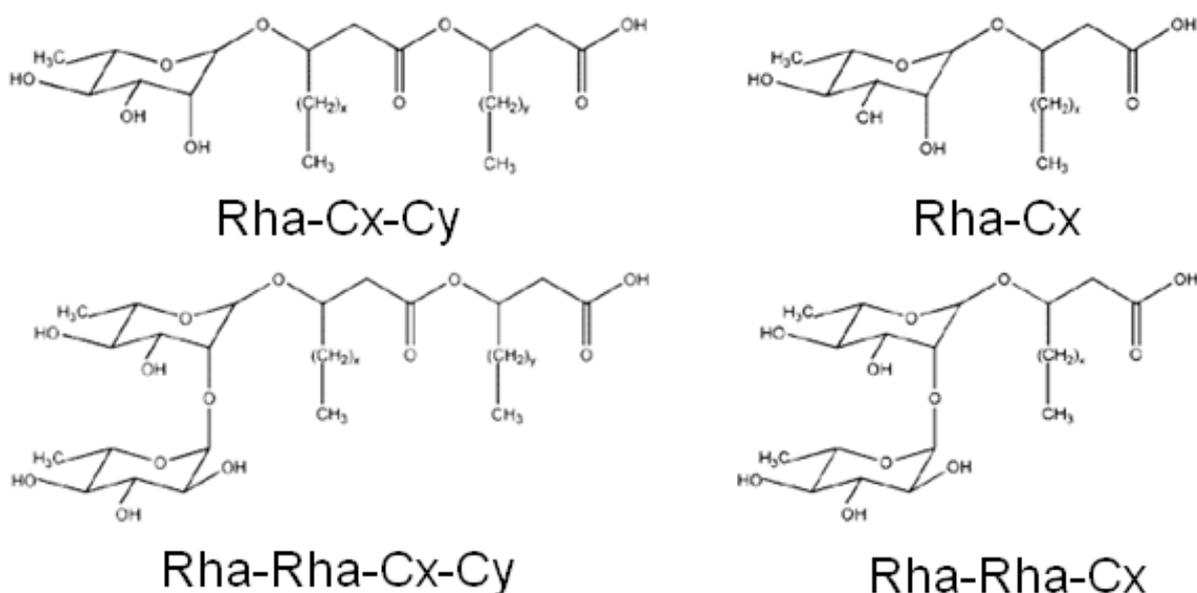


Figura 1. As quatro estruturas químicas gerais de ramnolipídeos produzidos por algumas espécies de *Pseudomonas*, sendo elas uma ou duas moléculas de dTDP-L-ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido graxo de cadeia carbônica de tamanhos variados (Modificada de Pornsunthorntawee *et al.*, 2010).

Geralmente, ramnolipídeos são secretados como uma mistura heterogênea de moléculas (Pornsunthorntawee *et al.*, 2010) e a síntese desses em *P. aeruginosa* se dá pela convergência de duas vias metabólicas, sendo a parte hidrofóbica proveniente da via de síntese *de novo* de ácidos graxos e a parte hidrofílica do operon RmlABCD (Figura 2) (Reis *et al.*, 2011). Em maiores detalhes, a primeira via para produção de RLs se dá pela conversão do metabólito central D-glicose-1-fosfato em dTDP-Rha, feita pelas enzimas RmlA (Glicose-1-fosfato timidiltransferase), RmlB (dTDP-glicose 4,6-desidratase), RmlC (dTDP-4-desidroramnose 3,5-epimerase) e RmlD (dTDP-4-

desidroramnose redutase). As subunidades RhIA e RhIB formam a enzima ramnosil-transferase 1, responsável por desviar o intermediário beta-hidroxiacil-ACP da via de biossíntese de ácidos graxos *de novo* para sintetizar HAAs e então ligá-los a uma molécula de dTDP-Rha, resultando em mono-RLs. A enzima RhIC (ramnosil-transferase 2) é responsável por ligar mais uma molécula de dTDP-Rha a mono-RLs previamente sintetizados, resultando em di-RLs. (Reis *et al.*, 2013).

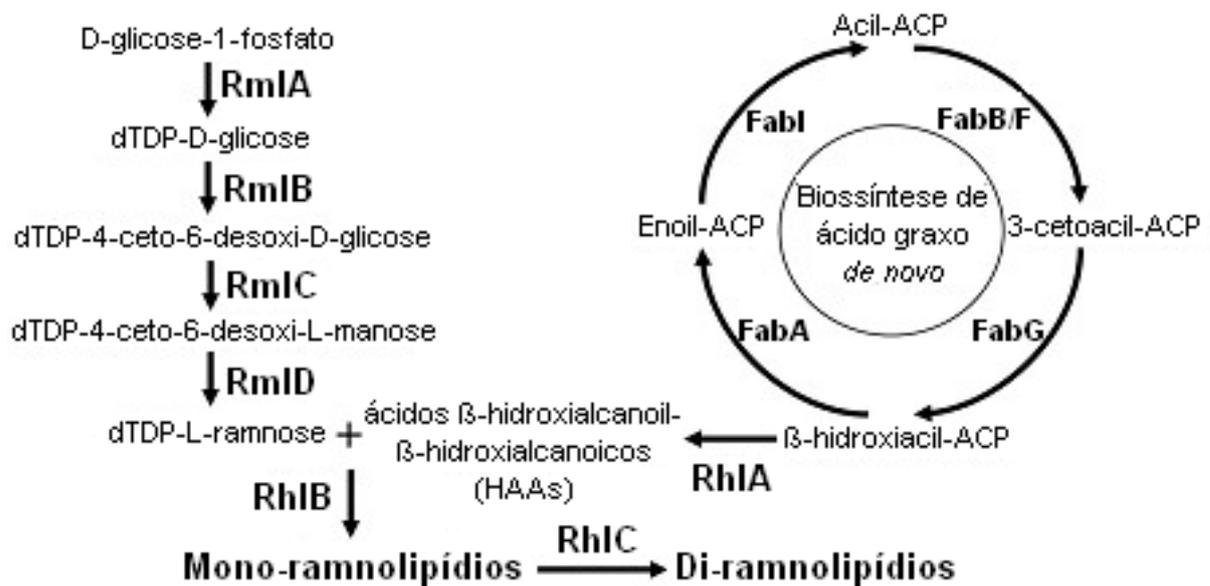


Figura 2. Via metabólica de síntese de ramnolipídeos (modificada de Gutierrez *et al.*, 2013). As enzimas RmlA, RmlB, RmlC e RmlD compõem a via de síntese de dTDP-L-ramnose à partir de D-glicose-1-fosfato. A subunidade enzimática RhIA desvia o intermediário beta-hidroxiacil-ACP da via de biossíntese de ácidos graxos *de novo* para sintetizar HAAs, que são então ligados à dTDP-L-ramnose pelas subunidade enzimática RhIB e pela enzima RhIC, resultando em mono- e di-ramnolipídeos, respectivamente.

### 1.3 APLICAÇÃO E MERCADO DE RAMNOLIPÍDEOS

Em comparação a outros biossurfactantes, os ramnolipídeos apresentam maior potencial de uso devido a propriedades comparáveis ou superiores às de surfactantes presentes no mercado. RLs e o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) possuem valores de atividade tensoativa e concentração micelar crítica (CMC) similares. Entretanto, apenas os RLs não desnaturam algumas das principais enzimas de uso industrial (Madsen *et al.*, 2015; Syldatk *et al.*, 1985; Fuguet *et al.*, 2005). Além disso, são aprovados pela agência americana de regulamentação de alimentos e medicamentos (FDA) para uso na indústria alimentícia e já são comercializados, o que os torna mais competitivos dentre os biossurfactantes no mercado de surfactantes em geral (Reis *et al.*, 2011; Pornsunthorntawee, 2010).

Atualmente, o custo estimado de produção biotecnológica de ramnolipídeos, em uma escala de 20 a 100 m<sup>3</sup>, varia de 5 a 20 USD/kg, enquanto o custo da produção de surfactantes petroquímicos varia de 1 a 3 USD/kg (Reis *et al.*, 2011). Entretanto, o mercado global de biossurfactantes vem crescendo a uma taxa de 3,5% ao ano. De acordo com dados recentes, este mercado valia 1,7 bilhões USD em 2011 e espera-se que valha 2,2 bilhões USD em 2018 (Reis *et al.*, 2013). Ainda há poucas empresas que produzem biossurfactantes em uma escala comercial, dentre as quais apenas seis, em sua maior parte norte americanas, comercializam RLs (Tabela 2) (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014). O preço de mercado dessas moléculas varia de 200 USD/kg (solução a 20%) a 6000 USD/kg (98% puro) (Leitermann *et al.*, 2010).

O tímido número de empresas que produzem e comercializam RLs é resultado de processos industriais dispendiosos, principalmente devido a baixos rendimentos dos processos fermentativos aliados a altos custos de substrato e purificação (Reis *et al.*, 2013). Por serem produzidos concomitantemente a fatores de virulência, o processo de purificação deve ser minucioso a fim de evitar contaminação do produto final, o que encarece o processo como um todo. De fato, o processo de purificação é responsável por 70 a 80% do custo total de produção de RLs (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014). Assim, atualmente as pesquisas científicas estão focadas em diminuir custos de substrato, aumentar parâmetros fermentativos (e.g. rendimento e

produtividade) e na produção heteróloga de RLs para contornar a complexa rede regulatória e a virulência da *P. aeruginosa* (Reis *et al.*, 2013).

Tabela 2. Empresas produtoras de Ramnolipídeos (Sekhon Randhawa e Rahman, 2014).

<b>Empresa</b>	<b>Localização</b>	<b>Aplicação</b>
TeeGene Biotech	Reino Unido	Indústria farmacêutica, cosméticos e antimicrobianos
AGAE Technologies LLC	EUA	Indústria farmacêutica, cosméticos, cuidado pessoal e biorremediação
Jeneil Biosurfactant Co. LLC	EUA	Produtos de limpeza e biorremediação
Paradigm Biomedical Inc.	EUA	Indústria farmacêutica
Rhamnolipid Companies, Inc	EUA	Indústria farmacêutica, alimentos, cosméticos, biorremediação e agricultura
Henkel	Alemanha	Produtos de limpeza e cosméticos

## 1.4 SACAROSE COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

A utilização de substratos de baixo custo, tais como resíduos industriais ou substratos renováveis, atualmente são pré-requisitos para a implementação de um bioprocessamento economicamente viável (Reis *et al.*, 2013). Diversos substratos já foram testados como fonte de carbono, como por exemplo diesel (Noh *et al.*, 2014), glicose (Wittgens *et al.*, 2011), óleo de girassol (Müller *et al.*, 2011; Schmidberger *et al.*, 2013), ácido oleico (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006), dentre outros. Entretanto, ainda não foi estabelecida uma estratégia de produção com rendimentos e produtividades economicamente competitivos.

Levando em consideração o atual cenário mundial de crescente preocupação ambiental e redução da dependência petroquímica, as biomassas de fontes renováveis aparecem como alternativas economicamente atrativas para produção de biocombustíveis e insumos básicos para suprir as indústrias químicas. Há muitos

anos, o estudo da sacarose como matéria-prima para a produção de insumos para a indústria química e a produção de novos derivados com maior valor agregado tem despertado o interesse dos pesquisadores e de políticas específicas para este setor. Esse ramo da química é tão importante que passou a ser conhecido como sucroquímica, que é entendida como o ramo da ciência e da tecnologia cujo objetivo é acrescentar ao mercado novas utilizações da sacarose. Comparativamente, o baixo custo, a disponibilidade e a pureza fazem com que esta matéria-prima seja extensivamente vantajosa para novos processos industriais (Ferreira *et al.*, 2009). O Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) apontou, em 2015, que o Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar do mundo e que sua produção mundial é maior que o seu consumo. Isto revela a abundância deste produto no mercado, reduzindo seu custo.

Os fatos supramencionados corroboram a afirmação de que a sacarose é um potencial substrato na produção de ramnolipídeos ao visar diminuir os custos de produção.

## 1.5 ENGENHARIA METABÓLICA PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

Além do custo do substrato, outros parâmetros como rendimento e produtividade de ramnolipídeos são importantes no estabelecimento de um processo economicamente viável. Dificilmente é encontrado um microrganismo que reúna todas as características desejadas para que um determinado metabólito seja produzido. Assim, o objetivo da engenharia metabólica é modificar ou adicionar vias metabólicas com o uso de técnicas de biologia molecular para obtenção de um produto específico (Bailey, 1991).

Diversos microrganismos já foram alvo de engenharia metabólica para produção de RLs, dentre eles a própria *P. aeruginosa*. Entretanto, uma complexa rede regulatória por trás da biossíntese de RLs por esta bactéria constitui um grande obstáculo para o escalonamento da produção. Para tentar elucidar os mecanismos metabólicos e moleculares envolvidos na síntese desses compostos, Schmidberger *et al.* (2013) monitoraram a expressão do operon RhlAB durante uma fermentação em

batelada utilizando a cepa laboratorial *P. aeruginosa* PAO1 como biocatalisador. Demonstraram que esse operon tem expressão regulada durante o processo de fermentação, estando sob influência de mecanismos de *quorum sensing* (QS) e co-expressão com fatores de virulência.

Devido às complicações supracitadas, a transferência dos genes para outros microrganismos surge como uma estratégia que potencialmente auxilia no escalonamento da produção de RLs. Alguns microrganismos já foram modificados para produção de RLs, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* e *Burkholderia thailandensis* (Paulino *et al.*, 2016). O maior rendimento reportado até o momento para cepas recombinantes é de 0,23 Cmol<sub>RLs</sub>/Cmol<sub>substrato</sub> por *Pseudomonas putida* utilizando glicose como substrato, abaixo do rendimento de 0,33 Cmol<sub>RLs</sub>/Cmol<sub>substrato</sub> atingido por *P. aeruginosa* (Wittgens *et al.*, 2011).

## 1.6 A LEVEDURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada para produção de cerveja, pão, vinho, bioetanol, químicos e produtos nutracêuticos e farmacêuticos. As vantagens dessa levedura como hospedeira para produção heteróloga incluem: (i) possui status GRAS (do inglês Generally Regarded as Safe), o que facilita processos de descarte de resíduos e aprovação de produtos e processos; (ii) tolerância a baixo pH, o que garante baixo risco de contaminação bacteriana e elimina a necessidade de neutralizar produtos ácidos; e (iii) tolerância a inibidores fermentativos, como os presentes em hidrolisados de biomassa (Borodina & Nielsen, 2014). Outros fatores, como ferramentas genéticas e processos fermentativos industriais bem estabelecidos, levam a uma grande aceitação desta levedura no estabelecimento de novos bioprocessos.

Como exemplos de processos já estabelecidos e em escala comercial utilizando *S. cerevisiae* podem-se citar produção do precursor de droga anti-malária amorfadieno (Amyris), vanilina (Evolva), antioxidante resveratrol (Fluxome), polímero poli-ácido lático (NatureWorks), polietileno verde à partir de cana-de-açúcar via

bioetanol (Braskem) e ácido succínico (Reveredia), dentre vários outros (Borodina & Nielsen, 2014).

A *S. cerevisiae* não produz RLs e até o momento não foi documentada uma estratégia de produção heteróloga deste composto nesta levedura. Levando em consideração que a sacarose será utilizada como substrato, essa estratégia é vantajosa por permitir a utilização de um substrato de baixo custo para produção de composto de alto valor agregado por um microrganismo já adaptado a condições industriais.

## 1.7 METABOLISMO DE SACAROSE EM SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Em *S. cerevisiae*, o metabolismo de sacarose é iniciado pela hidrólise em glicose e frutose realizada pelas enzimas invertase, uma extracelular e uma intracelular. Essas enzimas são codificadas pelos genes da família SUC, sendo o gene SUC2 o mais comum estando presente em todas as linhagens de *S. cerevisiae* (Grossmann e Zimmermann, 1979; Naumov *et al.*, 1996). As duas formas pelas quais a utilização da sacarose se dá na levedura são as seguintes (Figura 3): na primeira, a invertase extracelular hidrolisa a sacarose em glicose e frutose no ambiente extracelular e a célula internaliza os monossacarídeos por meio de transportadores de hexose (HXT). Na segunda, a sacarose é internalizada ativamente por meio do transportador codificado pelo gene AGT1 ou pelo transportador MALT e depois hidrolisada no ambiente intracelular. Nesse caso, a hidrólise intracelular da sacarose pode ser feita por duas principais enzimas, a maltase ( $\alpha$ -D-glicosidase) e a invertase intracelular ( $\beta$ -D-frutosidase) (Mwesigye e Barford, 1996; Batista *et al.*, 2004; Badotti *et al.*, 2008).

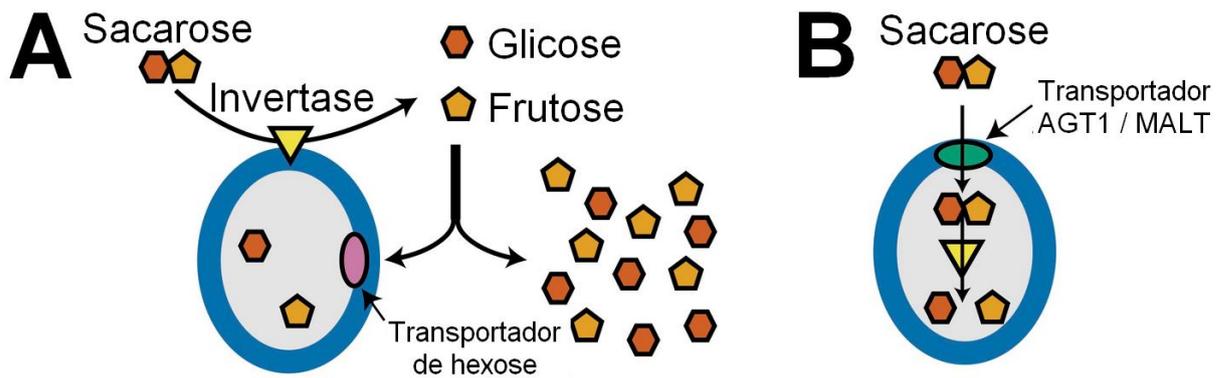


Figura 3. Metabolismo de sacarose em *Saccharomyces cerevisiae* (Modificada de Koschwanez *et al.*). Em A, a sacarose é hidrolisada pela invertase extracelular em glicose e frutose, que são absorvidas por meio de transportadores de hexose (HXT). Em B, a sacarose é absorvida por transportador AGT1 ou MALT e então hidrolisada pela invertase intracelular.

Durante o desenho experimental de pesquisa em produção heteróloga é vantajoso levar em consideração estratégias para otimizar a eficiência energética do biocatalisador, reduzindo níveis de sobrecarga metabólica pela produção das moléculas exógenas. De Kok *et al.* descreveram modificações no metabolismo de *S. cerevisiae* para aumentar o rendimento de ATP por molécula de maltose, estratégia que pode ser extrapolada para sacarose (Figura 4). Para tal, genes de enzimas invertase nativos da levedura são silenciados e essa é então transformada com um gene exógeno de sacarose fosforilase, poupando-se uma molécula de ATP para cada dissacarídeo metabolizado pelas células. Isso se deve ao fato de que, enquanto a invertase hidrolisa sacarose em glicose e frutose, que são subsequentemente fosforiladas na glicólise utilizando-se um ATP, a sacarose fosforilase catalisa a quebra da sacarose em frutose e glicose-1-fosfato utilizando um fosfato inorgânico. Ao substituir a primeira pela segunda, deixa-se de gastar uma molécula de ATP para fosforilar cada molécula de glicose, diminuindo o gasto de ATP por molécula de sacarose.

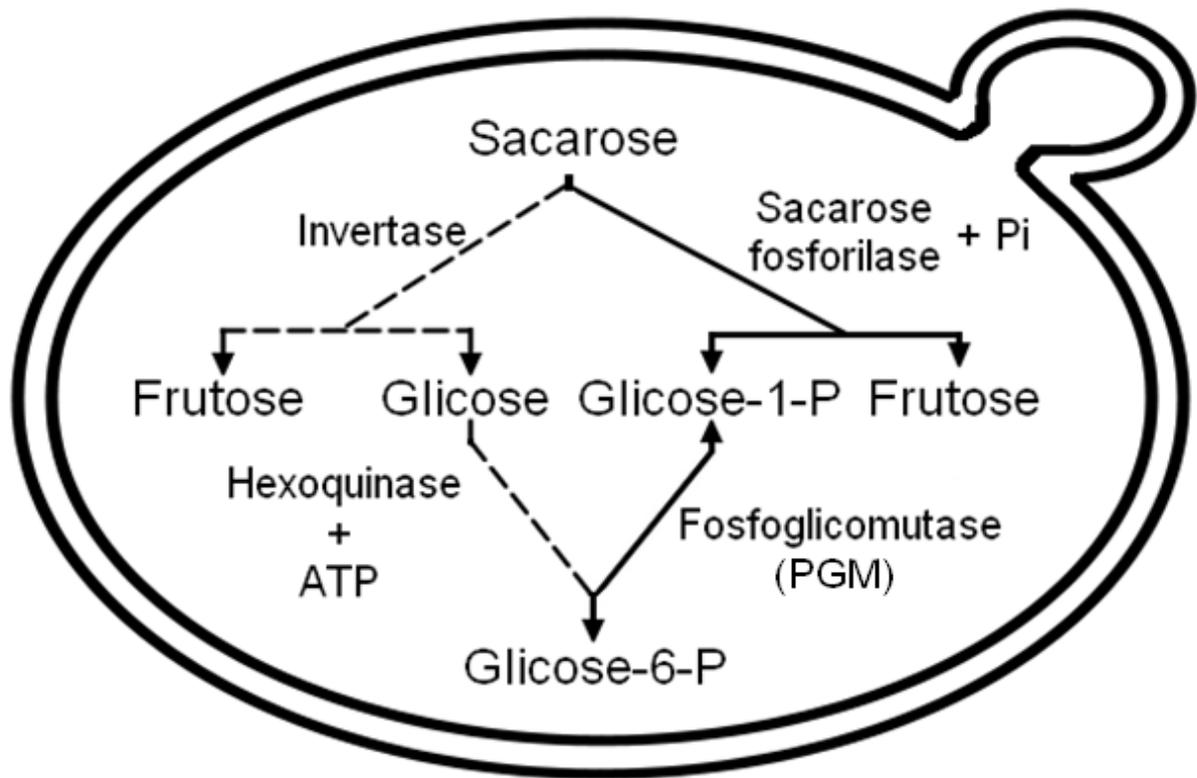


Figura 4. Estratégia para aumentar rendimento de ATP por molécula de sacarose. Linha descontinua: via desabilitada pelo silenciamento do gene para invertase. Linha contínua: via habilitada pela inserção do gene para sacarose fosforilase.

## 2 JUSTIFICATIVA

A substituição de surfactantes químicos originados da indústria petrolífera pelos biossurfactantes é vantajosa, pois auxilia na redução da dependência por combustíveis fósseis. Ainda, por serem biodegradáveis e utilizarem substratos renováveis em sua produção, os biossurfactantes contribuem na redução de impactos ao meio ambiente. O ramnolipídeo é apontado como o mais promissor desses, mas até o presente momento não há nenhum processo em escala industrial para produção dessa molécula cujos custos consigam competir com a indústria de surfactantes sintéticos. A fim de minimizar o custo de produção, o presente estudo propôs a utilização de sacarose, substrato de baixo custo altamente disponível no Brasil devido ao tamanho e força da indústria sucroalcooleira, como substrato na produção de ramnolipídeo. Ainda com o mesmo fim, o presente projeto utilizou estratégias de engenharia metabólica para burlar a patogenicidade e ambiente regulatório do microrganismo produtor original, transferindo a via metabólica de síntese de ramnolipídeo para levedura. A *S. cerevisiae* é uma excelente candidata à produção heteróloga de ramnolipídeos devido a processos fermentativos industriais bem estabelecidos e grande disponibilidade de ferramentas genéticas disponíveis para sua manipulação.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo construir cepas recombinantes de *S. cerevisiae* para a produção de mono-ramnolipídeos a partir de sacarose.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de cepa recombinante de *S. cerevisiae* com metabolismo direcionado para produção de dTDP-L-ramnose contendo interrupção do gene *Suc2* e expressão dos genes de sacarose fosforilase, *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* e *rmlD*;
- Construção de cepa recombinante de *S. cerevisiae* com metabolismo direcionado para produção de mono-ramnolipídeo contendo interrupção do gene *Suc2* e expressão dos genes de sacarose fosforilase, *rmlA*, *rmlB*, *rmlC*, *rmlD*, *rhlA* e *rhlB*;
- Desenvolvimento de métodos de detecção de dTDP-L-ramnose e mono-ramnolipídeos;
- Obtenção de pelo menos uma cepa recombinante de *S. cerevisiae* capaz de produzir mono-ramnolipídeos a partir de sacarose como prova de conceito.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 GENES E PLASMÍDEOS

Sete genes foram otimizados para expressão em levedura: Gft (sacarose fosforilase) de *Pelomonas saccharophila* e RmlA, RmlB, RmlC, RmlD, RhIA e RhIB de *P. aeruginosa*. Foram sintetizados por empresa especializada e entregues em plasmídeos pBSK (Short *et al.*, 1988). Foram então transformados em bactéria para estoque e amplificação do material genético e os vetores recuperados por kit comercial de extração de DNA plasmidial. Os genes foram transferidos para plasmídeos da coleção de Mumberg (Mumberg *et al.*, 1995) por meio de estratégia clássica de clonagem utilizando enzimas de restrição para construção dos cassetes de expressão de levedura. Alguns cassetes foram então amplificados por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores desenhados para inserir sítios de restrição específicos flanqueando-os. Foram então digeridos e clonados em três plasmídeos finais: um contendo os genes Gft, RmlA e RmlC, outro contendo RmlB e RmlD e um terceiro contendo RhIA e RhIB. A Tabela 3 mostra tamanhos dos genes, cassetes de expressão e plasmídeos utilizados nesse estudo.

### 4.2 ESTRATÉGIA DE CLONAGEM

O plasmídeo p425GPD recebeu o gene Gft entre seus promotor GPD e terminador CYC1. Nele foi inserido o cassete de expressão de RmlA contendo promotor TEF e terminador CYC1 e o cassete de expressão de RmlC contendo promotor CYC1 e terminador CYC1, resultando no plasmídeo pGAC. O plasmídeo p426GPD recebeu o gene RmlB entre seus promotor GPD e terminador CYC1. Nele foi inserido o cassete de expressão de RmlD contendo promotor TEF e terminador CYC1, resultando no plasmídeo pBD. O plasmídeo p424TEF recebeu o gene RhIA entre seus promotor TEF e terminador CYC1. Nele foi inserido o cassete de expressão de RhIB contendo promotor ADH e terminador CYC1. Essa estratégia pode ser visualizada na Figura 5 e os iniciadores utilizados nesse estudo para amplificação de

cassetes de expressão e confirmação de construção de plasmídeos por PCR podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 3. Nome e tamanho dos genes, cassetes de expressão e plasmídeos utilizados nesse estudo.

<b>Nome</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Referência</b>	<b>Nome</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Referência</b>
Gft	1505	Otimizado nesse estudo	Cassete GPDp-Gft-CYC1t	2503	Esse estudo
RmlA	893	Otimizado nesse estudo	Cassete TEFp-rmlA-CYC1t	1604	Esse estudo
RmlB	1070	Otimizado nesse estudo	Cassete GPDp-rmlB-CYC1t	2068	Esse estudo
RmlC	557	Otimizado nesse estudo	Cassete CYC1p-rmlC-CYC1t	1152	Esse estudo
RmlD	921	Otimizado nesse estudo	Cassete TEFp-rmlD-CYC1t	1620	Esse estudo
RhlA	899	Otimizado nesse estudo	Cassete TEFp-rhlA-CYC1t	1607	Esse estudo
RhlB	1292	Otimizado nesse estudo	Cassete ADHp-rhlB-CYC1t	3037	Esse estudo
pBSK	2958	Short <i>et al.</i> , 1988	P416TEF	5526	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p424ADH	7309	Mumberg <i>et al.</i> , 1995	P426CYC1	5411	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p424TEF	6246	Mumberg <i>et al.</i> , 1995	P426GPD	6637	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p425GPD	7760	Mumberg <i>et al.</i> , 1995	P426TEF	6352	Mumberg <i>et al.</i> , 1995

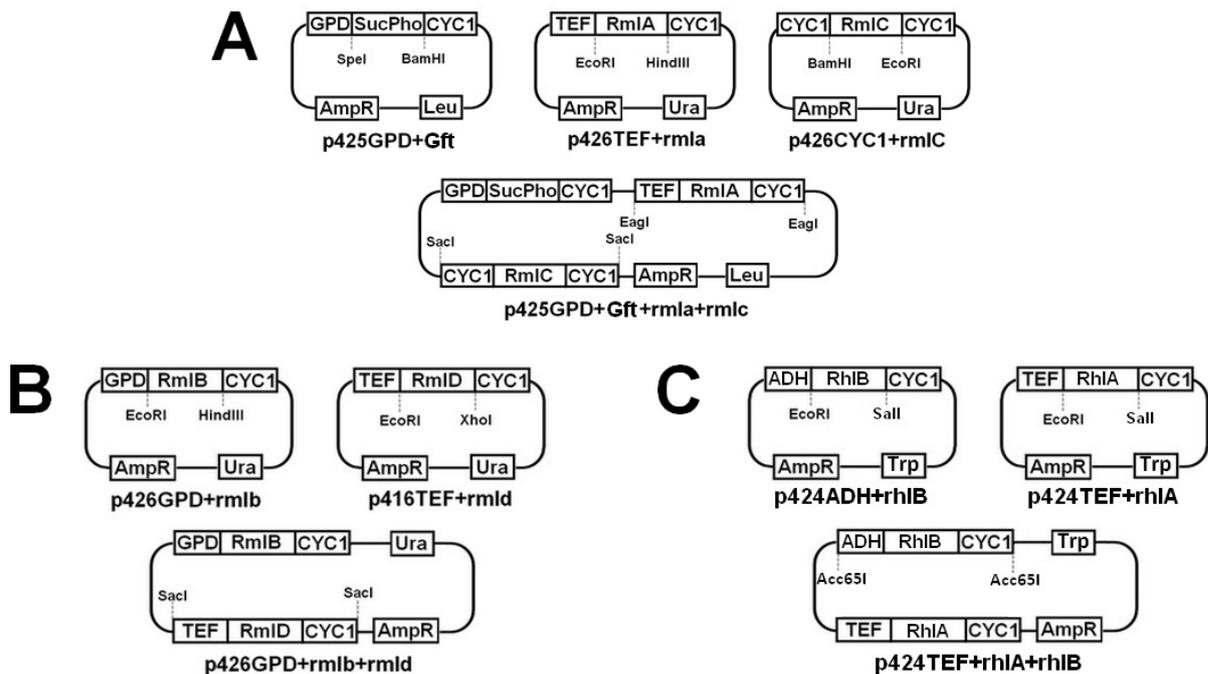


Figura 5. Estratégia de clonagem dos plasmídeos pGAC – p425GPD+Gft+RmlA+RmlC (A), pBD – p426GPD+RmlB+RmlD (B) e pAB – p424TEF+RhIA+RhIB (C).

### 4.3 INTERRUPTÃO DO GENE SUC2

A interrupção do gene SUC2 nas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foi feita a partir da transformação da levedura com um cassete de interrupção KanMX contendo a marca de seleção ao antibiótico geneticina G418, como já descrito anteriormente (Güldener *et al.*, 1996). Dois iniciadores de interrupção foram desenhados de modo a adicionar regiões homólogas ao gene SUC2 nas extremidades do cassete de KanMX. O cassete foi amplificado por PCR com os iniciadores supracitados tendo o plasmídeo pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) como molde e transformado em levedura por protocolo de transformação previamente descrito (Hill *et al.*, 1991). Cepas recombinantes foram selecionadas em placa de YPD suplementadas com geneticina (0,02g/ml de peptona, 0,01g/ml de extrato de levedura, 0,02g/ml de ágar e 5mg/ml de geneticina). Três iniciadores de verificação foram desenhados de modo a se alinharem em regiões a montante e a jusante dos sítios de recombinação onde o cassete de KanMX interrompeu o gene SUC2 e também no meio de KanMX. Verificação da interrupção de SUC2 nas cepas foi realizada por meio de PCR de colônia com os iniciadores supracitados. Informações sobre os iniciadores

podem ser visualizadas na Tabela 5 e a estratégia de interrupção pode ser visualizada na Figura 6.

Tabela 4. Iniciadores usados na amplificação de cassetes de expressão e na confirmação de construção de plasmídeos desse estudo.

<b>Nome</b>	<b>Sequência (Sítio de restrição, quando aplicável)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
rmlAF_cassette	AATG <u>CGGCCG</u> CAAATTAAGCCTTCGAG (EagI)	65.2
rmlAR_cassette	ATTG <u>CGGCCG</u> CAAATGTTTCTACTCCTT (EagI)	62.7
rmlCF_cassette	GTAG <u>AGCTCG</u> CTCATTGGCGAGCGTTG (SacI)	65.8
rmlCR_cassette	GTAG <u>AGCTCG</u> GGCGAATTGGGTACCGGC (SacI)	67.3
rmlDF_cassette	GTAG <u>AGCTCG</u> TACCGGCCGCAAATTTAA (SacI)	62.4
rmlDR_cassette	GTAG <u>AGCTCC</u> CATAGCTTCAAATGTTTCT (SacI)	59.7
rhIBF_cassette	ATAG <u>GTACCG</u> CGCAATTAACCCTCAC (Acc65I)	52.9
rhIBR_cassette	<u>GGTACCCA</u> ATTCGCCTATA (Acc65I)	52.7
GftF_confirm	TCACATACGTAGATAGGTTGG	51.9
GftR_confirm	GAGAATGCAAAGGCTCTATC	52.2
rmlAF_confirm	GAGGAAAGGTATCATATTGGC	51.9
rmlAR_confirm	AGTAGACAGTTTCAGTCAACA	51.5
rmlBF_confirm	GACTATATTGGTTACAGGTTTCAG	51.3
rmlBR_confirm	CATGCATACTGTTTACCTACC	51.5
rmlCF_confirm	AGCTACTAGATTGGCTATCC	51.9
rmlCR_confirm	TTATGGGAAACAATCAGCATC	51.7
rmlDF_confirm	GAATCTTATTATTGGGAGCCAA	51.4
rmlDR_confirm	TCACAATGGTCCCTGTT	51.4
rhIAF_confirm	ATGAGAAGGGAAAGTTTATTGG	51.2
rhIAR_confirm	GGCATAGCCGATAGC	51.1
rhIBF_confirm	GCACGCCATCTTGATAG	51.8
rhIBR_confirm	TTAAGAAGCAGCCTTCAAC	51.4

Tabela 5. Iniciadores usados na amplificação do cassete de interrupção e na verificação da interrupção.

	Nome	Sequência
Iniciadores de interrupção	SUC2-fwd	TCTCTCAGAGAAACAAGCAAAACAAAAAGCTTTTCTT TTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
	SUC2-rev	GCTAAAGCCCTTTAGAATGGCTTTTGAAAAAATAAA AAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
	CH-fwd	GTTTAGGAAATTATCCGGGGGC
	CH-rev	GCTTGGTATCCATTTCCCTCAC
Iniciadores de verificação	MidK-rev	CGCGATCGCTGTAAAAGGAC

## Cromossomo IX

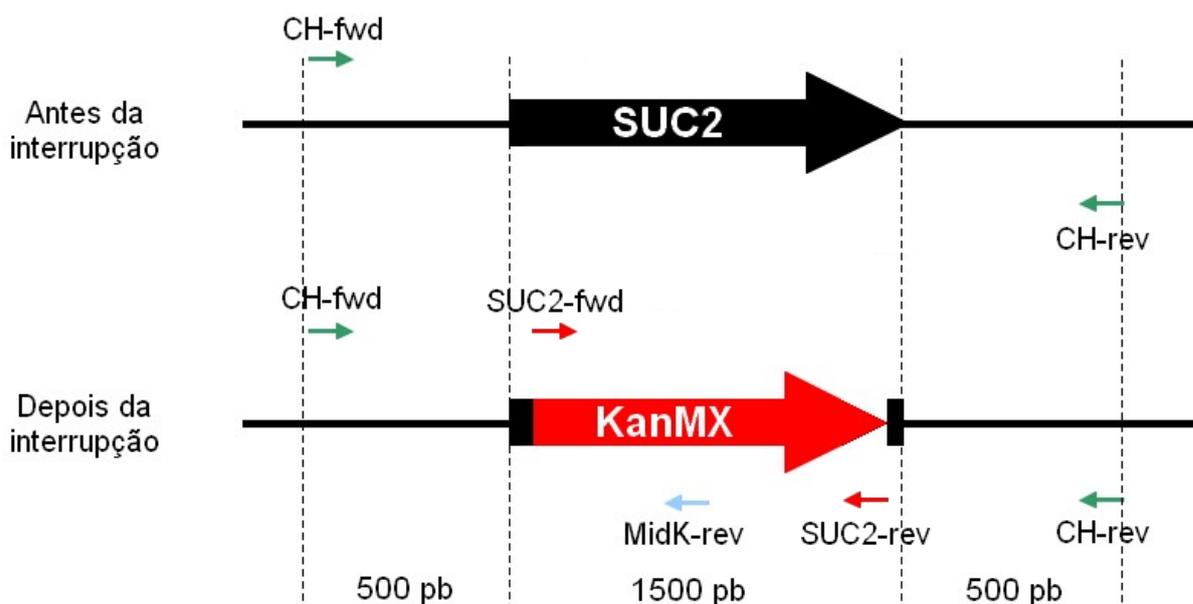


Figura 6. Estratégia de interrupção do gene SUC2. As setas pequenas indicam os iniciadores utilizados no estudo. Em vermelho, iniciadores de interrupção. Em verde, iniciadores de verificação que anelam 500 pares de base a jusante e a montante do locus de SUC2 no cromossomo IX da levedura. Em azul, iniciador de verificação que anela dentro do cassete KanMX, a 1300 pares de base de distância do sítio de anelamento de CH-fwd.

## 4.4 CEPAS

*E. coli* DH5- $\alpha$  foi utilizada para propagação e manipulação de DNA recombinante durante construção dos plasmídeos. Transformações foram realizadas seguindo protocolo de eletroporação descrito em manual do eletroporador da empresa BioRad (Hercules, EUA). Transformantes foram crescidos a 37°C em meio LB (5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl e 10 g/L triptona) contendo ampicilina a 0,1 g/L. As cepas bacterianas utilizadas e produzidas nesse estudo podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6. Nome, genótipo relevante e cepa parental das cepas bacterianas utilizadas e produzidas nesse estudo.

<b>Nome</b>	<b>Genótipo relevante</b>	<b>Cepa parental</b>
DH5- $\alpha$	-	-
Ec-G	pBSK Gft	DH5- $\alpha$
Ec-A	pBSK RmlA	DH5- $\alpha$
Ec-B	pBSK RmlB	DH5- $\alpha$
Ec-C	pBSK RmlC	DH5- $\alpha$
Ec-D	pBSK RmlD	DH5- $\alpha$
Ec-HA	pBSK RhIA	DH5- $\alpha$
Ec-HB	pBSK RhIB	DH5- $\alpha$
Ec-CasG	p425GPD Gft	DH5- $\alpha$
Ec-CasA	p426TEF RmlA	DH5- $\alpha$
Ec-CasB	p426GPD RmlB	DH5- $\alpha$
Ec-CasC	p426CYC1 RmlC	DH5- $\alpha$
Ec-CasD	p416TEF RmlD	DH5- $\alpha$
Ec-CasHA	p424TEF RhIA	DH5- $\alpha$
Ec-CasHB	p424ADH RhIB	DH5- $\alpha$
Ec-CasGA	p425GPD Gft RmlA	DH5- $\alpha$
Ec-CasGAC	p425GPD Gft RmlA RmlC	DH5- $\alpha$
Ec-CasBD	p426GPD RmlB RmlD	DH5- $\alpha$
Ec-CasHAB	p424TEF RhIA RhIB	DH5- $\alpha$

Duas cepas de *S. cerevisiae* foram utilizadas: CEN.PK 102-3A para construção de cepa produtora de dTDP-L-ramnose (RHP) e sua cepa referência (RHR); CEN.PK 113-6B para construção de cepa produtora de mono-ramnolipídio (RLP) e sua cepa referência (RLR) (Tabela 7). Transformações foram realizadas seguindo protocolo descrito por Hill *et al.* (1991). Ambas as cepas tiveram o gene SUC2 interrompido utilizando cassete de interrupção KanMX proveniente do plasmídeo pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) que confere resistência a G418 (geneticina). Transformantes foram selecionados a 30°C em meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona e 20 g/L D-glicose) contendo G418 a 0,2 g/L. As cepas resultantes da interrupção foram então transformadas com os plasmídeos necessários para a produção de dTDP-L-ramnose (pGAC e pBD) ou mono-ramnolipídeo (pGAC, pBD e pAB), assim como com os plasmídeos vazios (p425GPD, p426GPD, p424TEF) para criação de cepas prototróficas de referência. Transformantes foram selecionados a 30°C em meio YNB contendo glicose 20 g/L e complementado com aminoácidos/nucleotídeos necessários para seleção de recombinantes. Recombinantes foram confirmados por meio de PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para cada gene (Tabela 4). As cepas de levedura utilizadas e produzidas nesse estudo podem ser visualizadas na Tabela 7. Essas cepas encontram-se depositadas na coleção do grupo de Engenharia de Biocatalisadores do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Tabela 7. Nome, genótipo relevante e cepa parental das cepas de levedura utilizadas e produzidas nesse estudo.

<b>Nome</b>	<b>Genótipo relevante</b>	<b>Cepa parental</b>
CEN.PK 102-3A	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52	-
RH1	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 suc2::KanMX	CEN.PK 102-3A
RH2	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 suc2::KanMX p425GPD	RH1
RH3 (RHR)	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 suc2::KanMX p425GPD p426GPD	RH2
RH4	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 suc2::KanMX p425GPD Gft rmlA rmlC	RH1
RH5 (RHP)	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 suc2::KanMX p425GPD p426GPD GFT RMLA RMLC RMLB RMLD	RH4
CEN.PK 113-6B	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1	-
RL1	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1 suc::KanMX	CEN.PK 113-6B
RL2	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1 suc::KanMX p426GPD	RL1
RL3	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1 suc::KanMX p426GPD p425GPD	RL2
RL4 (RLR)	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1 suc::KanMX p426GPD p425GPD p424TEF	RL3
RL5	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1 suc::KanMX p426GPD rmlB rmlD	RL1
RL6	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1 suc::KanMX p426GPD p425GPD rmlB rmlD Gft rmlA rmlC	RL5
RL7 (RLP)	MAT $\alpha$ SUC2 MAL2-8c LEU2 URA3-52 TRP1 suc::KanMX p426GPD p425GPD p424TEF rmlB rmlD Gft rmlA rmlC rhlA rhlB	RL6

## 4.5 CURVAS DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento das cepas de levedura foram realizadas a 30°C e 200 rpm em meio YNB (Base de Nitrogênio para Levedura) sem aminoácidos (aa's) contendo fonte de nitrogênio adicionado de glicose ou sacarose a 2% e CSM (Mistura Completa de Suplementos) deficiente especificamente nas necessidades auxotróficas das cepas que estão sendo supridas pelo(s) plasmídeo(s) que carregam, quando carregam, podendo ser leucina, uracila, triptofano ou combinação desses. Quando aplicável, o meio era adicionado de solução de LiCl (Cloreto de lítio) para 15mM. Os experimentos foram realizados em triplicatas de 25mL do meio supracitado. Amostragens foram realizadas de duas em duas horas e a OD (densidade ótica) a 620nm medida para cada amostra. Os dados de OD e tempo de fermentação foram então digitalizados em tabela. Calculou-se o logaritmo natural para os valores de OD, que foram então transformados em gráfico de linha, um para cada triplicata. Escolheu-se arbitrariamente o conjunto de dados que representava a região com crescimento linear na tabela, representando a fase de crescimento exponencial das cepas. Calculando-se o coeficiente angular das retas, obtém-se o valor da taxa de crescimento específico máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para cada triplicata. Calculou-se então a média e o desvio padrão de  $\mu_{\text{máx}}$  para cada cepa. Quando aplicável, teste t foi usado para avaliar se diferentes  $\mu_{\text{máx}}$  apresentavam diferença estatística significativa.

## 4.6 ENSAIO ENZIMÁTICO

As extrações de proteínas totais foram realizadas com o Reagente de Extração de Proteínas para Leveduras Y-PER™ da empresa Thermo Scientific® como especificado pelo manual do fabricante. As extrações eram feitas e imediatamente levadas para análise de atividade enzimática.

O ensaio colorimétrico acoplado para detecção da atividade enzimática de RmlA foi realizado como descrito por Sha *et al.* (2012). A reação enzimática continha 50mM Tris (pH 7,5), 1mM ditiotretol, 10% de glicerol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dTTP, 1mM D-Gli-1-P e 0,04 unidades de pirofosfatase. Uma unidade de pirofosfatase foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar o aparecimento de 1,0  $\mu\text{mol}$  de

Pi por minuto a pH 7,2 e 25°C. A reação foi iniciada pela adição do extrato celular. Depois de incubação da reação a 37°C por 5 minutos, a reação foi terminada com adição de uma solução contendo 0,03% (p/v) do reagente malachite green, 0,2% (p/v) de molibdato de amônio e 0,05% (v/v) Triton X-100 em 0,7 N HCl a 37°C por mais 5 minutos. A absorvância das amostras foi medida a 630nm (OD630nm). Os ensaios foram feitos em triplicatas biológicas.

## 4.7 ANÁLISE DE DTDP-L-RAMNOSE

### 4.7.1 Cromatografia de Troca-Aniônica de Alta-Performance

Método previamente descrito (Räbinä *et al.*, 2001) para preparação e extração de amostras de açúcares-nucleotídeos foi utilizado nesse estudo com algumas modificações. **Rompimento celular.** Para a preparação de lisados de células de levedura, as cepas RHR e RHP (Tabela 7) foram crescidas em meio YNB com sacarose 2% e CSM-Leu-Ura (Mistura Completa de Suplementos sem leucina e uracila) por 48 horas, coletadas por centrifugação a 5000g por 5 minutos e ressuspendidas em Tampão de Lise composto por MOPS-NaOH (pH 7,5) 50mM, Triton X-100 1% e glicerol 10%. Então, microesferas de vidro foram adicionadas às amostras na proporção em volume 1:3 e agitadas intensamente em equipamento FastPrep® (MP Biomedicals, Santa Ana, EUA) com 6 ciclos de 30 segundos em velocidade 6 e 5 minutos descansando em gelo. Após a lise mecânica, os lisados celulares foram centrifugados por 10 minutos a 20000g e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C para análises subsequentes. **Extração de dTDP-Rha.** A Extração em Fase Sólida (SPE) de dTDP-Rha foi realizada com colunas de carbono grafitizado poroso ENVI-Carb™ Supelclean™ (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e é dividida em quatro etapas: Condicionamento da coluna: aplicar 3mL de solução de acetonitrila 80% (v/v) e ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) seguidos de 2mL de água; Adição de amostra: diluir amostras com bicarbonato de amônia 10mM para volume final de 1mL e aplicar na coluna; Procedimento de Lavagem: aplicar 2mL de água seguidos de 2mL de acetonitrila 25% (v/v) e 2mL de tampão TEAA (acetato de trietilamônia) 50mM (pH 7,0); Eluição: aplicar 1mL de tampão TEAA 50mM (pH 7,0)

contendo acetonitrila 25% (v/v). As etapas foram realizadas de modo que a coluna de carbono nunca secasse, mantendo um fluxo contínuo das consecutivas soluções. As amostras foram coletadas, concentradas a vácuo e armazenadas a -20°C até análise.

Método previamente descrito (Köplin *et al.*, 1997) para análise de açúcares-nucleotídeos por Cromatografia de Troca-Aniônica de Alta-Performance (HPAEC) foi utilizado nesse estudo com algumas modificações. Coluna CarboPac™ PA1 Dionex™ (Thermo Scientific, Waltham, EUA) foi utilizada com os seguintes parâmetros de equipamento: Fase móvel: gradiente de acetato de sódio 200mM-500mM (pH 7,0); Temperatura: 26°C; Taxa de fluxo: 0,6 mL/min; Tempo de corrida: 50 minutos; Detecção: PDA a 262nm.

#### 4.7.2 Espectrometria de Massa em Tandem

Os experimentos a seguir foram realizados em parceria com a doutoranda Christiane Campos, supervisionada pela pesquisadora Dra. Patrícia Abdelnur, do Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis do Centro Nacional de Pesquisa de Agroenergia (CNPq) - EMBRAPA Agroenergia. Método previamente descrito (González e Franc, 1997) para extração de metabólitos geral foi utilizado nesse estudo com algumas modificações. **Rompimento celular.** Para a preparação de lisados de células de levedura, as cepas RHR e RHP (Tabela 7) foram crescidas em meio YNB com sacarose 2% e CSM-Leu-Ura (Mistura Completa de Suplementos sem leucina e uracila) por 48 horas. 1mL foi amostrado de cada cultura e adicionadas em proporção 1:1 (v/v) com solução tampão contendo etanol 75% (v/v) e acetato de amônio a 10 mM (pH 7.4, 85 °C). Então, as amostras foram homogeneizadas, incubadas com agitação vigorosa a 800rpm por 3 minutos a 85°C e resfriadas a -40 °C em banho termostático. Após o resfriamento, foi realizada uma centrifugação a 5000 rpm e -9 °C por 3 minutos para separar os restos celulares. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo e concentrados a vácuo. Todas as amostras foram estocadas a - 80 °C. **MS/MS.** As análises foram feitas usando um sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Xevo TQD – Waters, Milford, EUA) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray. Espectrometria de massa por infusão direta (do inglês Direct Infusion Mass Spectrometry – DIMS) foi usada para aperfeiçoar as condições de análise por

Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Uma solução padrão de dTDP-L-ramnose (20 µg/mL) foi aplicada e a voltagem do cone mais intensa foi 40V. Para MS/MS, a energia de colisão foi de 20V. O MS foi operado em modo de ionização negativo ESI(-)-MS. Os parâmetros instrumentais usados no espectrômetro de massa foram: voltagem capilar 3500 V, temperatura de solvatação de 450°C, temperatura da fonte: 130°C, fluxo de gás: 20 L/h e fluxo de gás de solvatação: 700 L/h. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna HSS-T3 (C18) com dimensões 2.1 x 150 mm x 1.8 µm (Waters). A fase móvel era composta por uma solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico em modo de eluição isocrática com fluxo de 0.4 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 45 °C. Cada análise durou 5 minutos.

## 4.8 ANÁLISE DE MONO-RAMNOLIPÍDEOS

### 4.8.1 Ensaio de Orcinol

Método previamente descrito (Christova *et al.*, 2003) para extração e detecção de RLS foi utilizado nesse estudo com algumas modificações. Para a obtenção de sobrenadantes e lisados de células de levedura, as cepas RLR e RLP (Tabela 7) foram crescidas em meio YNB com sacarose 2% e CSM-Leu-Ura-Trp (Mistura Completa de Suplementos sem leucina, uracila e triptofano) por 48 horas. Foram amostrados 2mL de cada cultura que foram subsequentemente centrifugados a 3000g por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e o sedimentado celular foi submetido a método de rompimento utilizando Y-PER™ (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Amostras de sobrenadante e lisado celular foram então acidificadas com HCL até atingirem pH 2,0. Então, 333µL de amostra foi adicionado de 1mL de dietil éter e agitada em homogeneizador de bancada por 5 minutos. A fração de éter foi coletada e a fração de água remanescente foi submetida novamente ao passo anterior. A fração de éter foi novamente coletada, unida com a anterior e as amostras foram então evaporadas em temperatura ambiente em tubos abertos em bancada. O sedimento remanescente foi ressuspenso em 100µL de água bidestilada e adicionado de 900µL de orcinol (1,3-dihidroxi-5-metil benzeno) 0,19% em ácido sulfúrico 53%. A solução resultante foi então aquecida por 30 minutos a 80°C, resfriada em temperatura ambiente por 15

minutos e submetida a leitura de densidade ótica a 421nm. Além das amostras das cepas de levedura, uma curva padrão utilizando dTDP-Rha foi criada com diferentes concentrações dessa submetidas à mesma metodologia acima. Ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.8.2 Microscopia Confocal**

Os experimentos a seguir foram realizados em parceria com a mestrandia Lorena Andrade, supervisionada pelo prof. Dr. José Corrêa Raiumundo, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas (IB) - Universidade de Brasília (UnB). Para ensaio alternativo de detecção de mono-RLs, as cepas foram crescidas em meio YNB com sacarose 2% e CSM-Leu-Ura-Trp (Mistura Completa de Suplementos sem leucina, uracila e triptofano) até atingirem fase estacionária de crescimento após 48 horas. Então, as cepas RLR e RLP foram submetidas a ensaio de fluorescência para detecção de acúmulo de lipídeos intracelulares descrito a seguir.

Amostras das cepas RLR e RLP ( $10^6$  células) foram coletadas por centrifugação a 5000g por 5 minutos, lavadas três vezes em PBS (do inglês Phosphate Saline Buffer), pH 7,4 e ressuspendidas em 50 $\mu$ L de solução de liticase a 35 unidades/mL. Foram então mantidas por 9 minutos a 30°C para a degradação da parede celular das leveduras. Subsequentemente, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em solução de BJI16#UnB3 a 10 $\mu$ M (moléculas marcadoras de lipídeos patenteada pela Universidade de Brasília). Novamente, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e coletadas por centrifugação a 3000g por 5 minutos para serem então ressuspendidas em PBS e adicionadas em placa de 24 poços contendo, no fundo desses, lamínulas circulares pré-tratadas com poli-L-lisina 0,1% para fixação das células. A placa foi submetida a centrifugação a 3000g por 5 minutos, o sobrenadante retirado e as lamínulas colocadas sobre lâminas utilizando ProLong® Gold antifade mountant solution (Thermo-Fisher, Waltham, USA). As amostras foram analisadas por Microscopia Confocal de Varredura a Laser, Leica TCS SP5 (New Jersey, USA) sob emissão de laser a comprimento de onda 488nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

Para a análise de fluorescência celular, foram adquiridas vinte imagens aleatoriamente de diferentes campos para cada amostra. Os campos foram selecionados e analisados baseados em aspectos morfológicos das células através de imagem de campo claro. Não foram utilizados dados de fluorescência para seleção das imagens, a fim de evitar amostragem tendenciosa. Trezentas células foram analisadas em triplicata utilizando programa ImageJ (Maryland, USA) de modo a avaliar o número médio de células a apresentarem sinal de fluorescência. Ademais, foi determinado o número médio de pontos de fluorescência para cada célula com sinal positivo para sinal de fluorescência. Os pontos de fluorescência são equivalentes a corpos lipídicos presentes no citoplasma das células. Finalmente, foi determinado o desvio padrão para o grupo de dados de cada amostra.

Para a análise de intensidade de fluorescência das imagens foi utilizado histograma gerado por *image lookup table (LUT)*. As imagens foram também utilizadas para criar uma imagem térmica baseada em valores de pixels das imagens no *LUT*. A imagem térmica foi projetada como mapeamento 3D sobre as imagens térmicas primárias das amostras, gerando uma representação em histograma 3D sobre os pontos de fluorescência celulares, os quais são gotículas lipídicas. A intensidade de fluorescência emitida está intimamente associada à quantidade de lipídios nas gotículas lipídicas. Todas as análises foram realizadas utilizando programa ImageJ (Maryland, USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONSTRUÇÃO DAS CEPAS

#### 5.1.1 Interrupção do gene SUC2

Duas cepas laboratoriais haploides de levedura foram selecionadas para abrigarem os plasmídeos contendo os genes necessários para produção de dTDP-L-ramnose e mono-ramnolipídeos: CEN.PK 102-3A e CEN.PK 113-6B, respectivamente. No entanto, antes de inserir os genes da via de síntese de dTDP-RHA, ambas as cepas tiveram o gene SUC2 interrompido, por meio de recombinação homóloga, com cassete de expressão KanMX contendo gene que confere resistência a geneticina (G418). Dessa maneira, colônias que se mostraram resistentes à geneticina após transformação com KanMX possuem, teoricamente, o gene SUC2 interrompido. Após triagem em meio de cultura sólido contendo G418, colônias positivas foram submetidas a PCR de colônia utilizando os iniciadores de verificação apresentados na Tabela 5. Como esquematizado na Figura 6, o par de iniciadores CH-fwd e CH-rev gera fragmento de aproximadamente 2500 pb em cepas com SUC2 interrompido ou não. Já o par de iniciadores CH-fwd e MidK-ver gera fragmento de 1300 pb apenas em cepa que possui KanMX interrompendo o gene SUC2. Como pode ser verificado na Figura 7, a amostra 1 (A1) de ambas as cepas mostraram padrão de bandas esperado para interrupção de SUC2, sendo então estocadas e usadas para posteriores transformações.

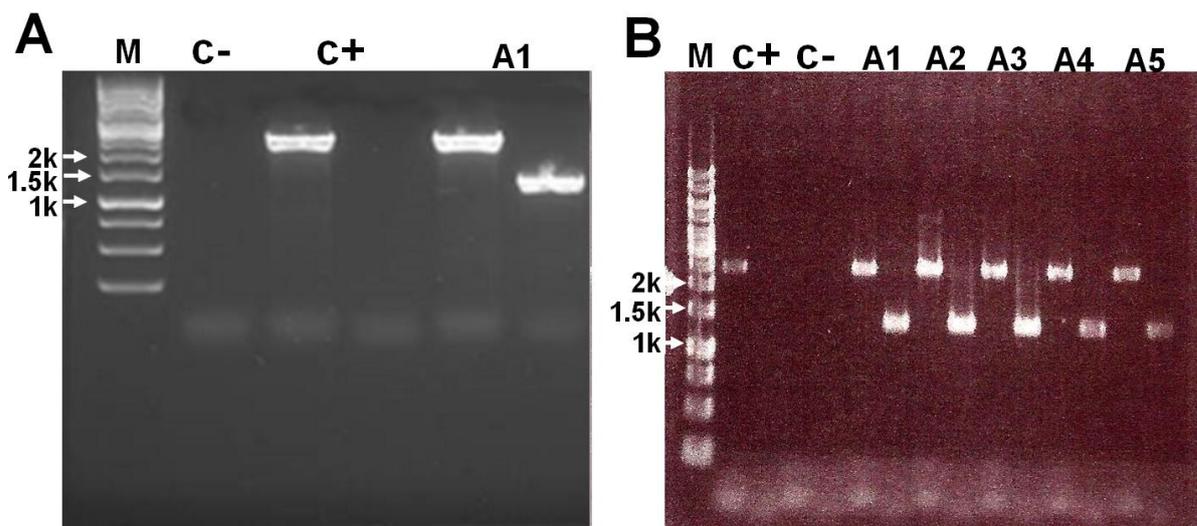


Figura 7. Eletroforese da PCR de confirmação da interrupção do gene SUC2 nas cepas CEN.PK 102-3A (A) e CEN.PK 113-6B (B). M: Marcador 1kb plus ThermoScientific; C-: Água; C+: Cepa parental; An: amostras de cepas após transformação com KanMX e seleção em meio contendo geneticina.

### 5.1.2 Análise de crescimento em sacarose

A interrupção de SUC2 foi feita para que a sacarose entre intacta na célula e sofra ação da enzima sacarose fosforilase, com o objetivo de direcionar a utilização da glicose contida nesse substrato para a via de produção de dTDP-Rha. Com o objetivo de avaliar o efeito da interrupção desse gene na taxa de crescimento das cepas, a cepa RH1 passou por testes de crescimento em sacarose. Como pode ser visto na Figura 8, RH1 mostrou uma taxa de crescimento específica mais lenta, aproximadamente 85% da taxa de sua cepa parental. Esse comportamento era esperado, visto que o principal gene de metabolização de sacarose foi silenciado. Porém, apesar de não possuir o gene SUC2 funcional, a cepa ainda é capaz de crescer em sacarose. Isso pode ser explicado devido à presença do gene constitutivo MAL2-8c nos genótipos das linhagens RH1 e RL1, que as torna capaz de hidrolisar sacarose, já que esse dissacarídeo pode ser internalizado por transportadores de maltose e ser hidrolisado pela maltase ( $\alpha$ -glucosidase) (Mwesigye *et al.*, 1996). No entanto, deve ser enfatizado que a presença de MAL2-8c pode não representar um grande problema de desvio do fluxo metabólico pela enzima maltase, pois a afinidade da sacarose fosforilase ( $K_m$  13mM) pela sacarose é bem maior que a da maltase ( $K_m$  116-191mM) (Mieyal *et al.*, 1972; Deng *et al.*, 2014). Dessa forma, a sacarose deveria

ser, em sua maior parte, convertida pela sacarose fosforilase em glicose-1-fosfato e frutose.

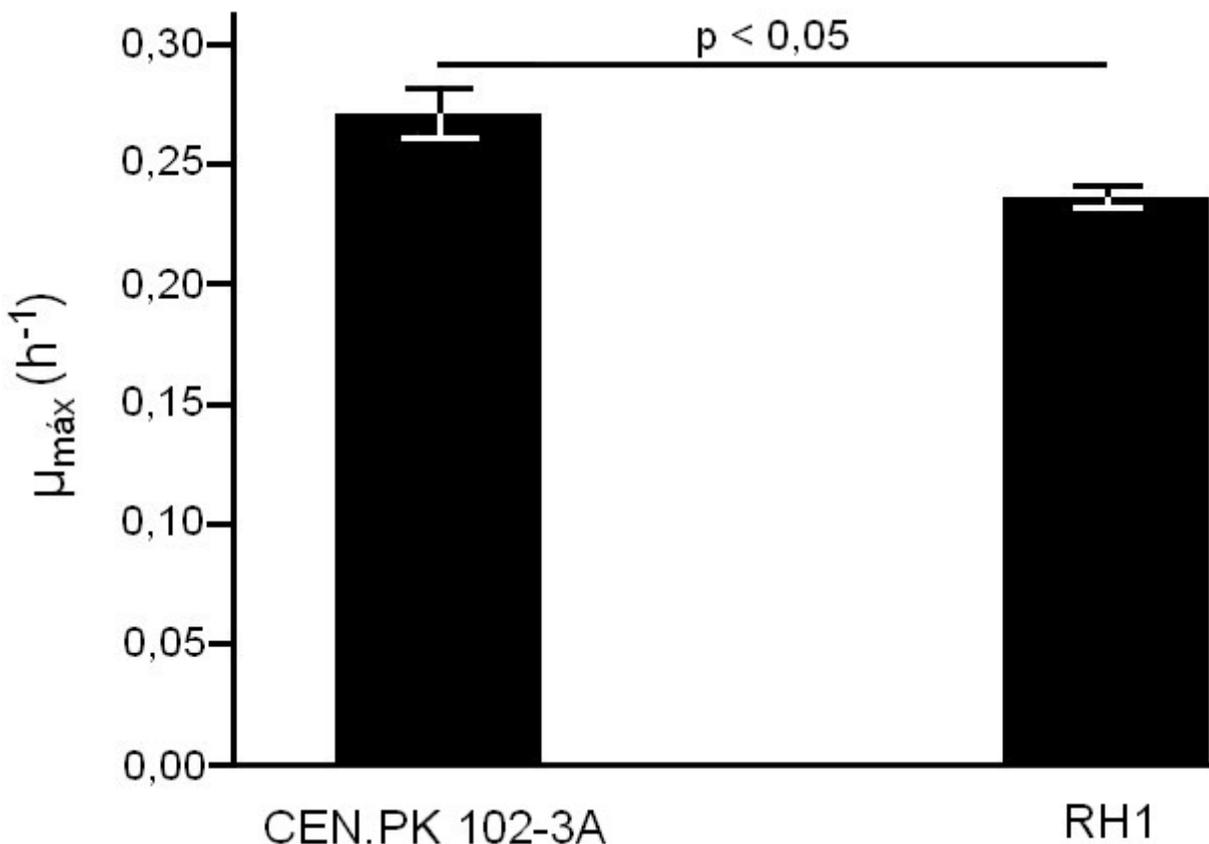


Figura 8. Taxas de crescimento específico máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) da cepa RH1 e sua cepa parental CEN.PK 102-3A. Aplicando o teste T para os valores de taxa de crescimento, obtém-se que o  $\mu$  de RH1 é menor que o  $\mu$  de CEN.PK 103-2A com uma confiança maior que 99% ( $p=0,007$ ).

### 5.1.3 Atividade de RmlA

Após a análise de crescimento acima, a cepa RH1 foi transformada com o plasmídeo pGAC, resultando na cepa intermediária RH4, ou com o plasmídeo p425GPD vazio, resultando na cepa intermediária de referência RH2 (Tabela 7). Para verificar se os genes estavam sendo expressos antes de continuar com a transformação dos outros plasmídeos, a atividade da enzima RmlA foi testada baseando-se no acúmulo de seu produto dTDP-D-glicose nos extratos das cepas RH2 e RH4 utilizando sacarose como substrato. Por possuir os genes da sacarose fosforilase e RmlA, mas não RmlB, espera-se que o extrato da cepa RH4 acumule

dTDP-D-glicose, diferentemente da cepa referência RH2 que não possui nenhum dos genes supracitados. Como esperado, a Figura 9 mostra que RH4 apresenta atividade enzimática para RmlA quase três vezes maior que RH2, indicando que os genes contidos nos plasmídeos episomais estão sendo funcionalmente expressos.

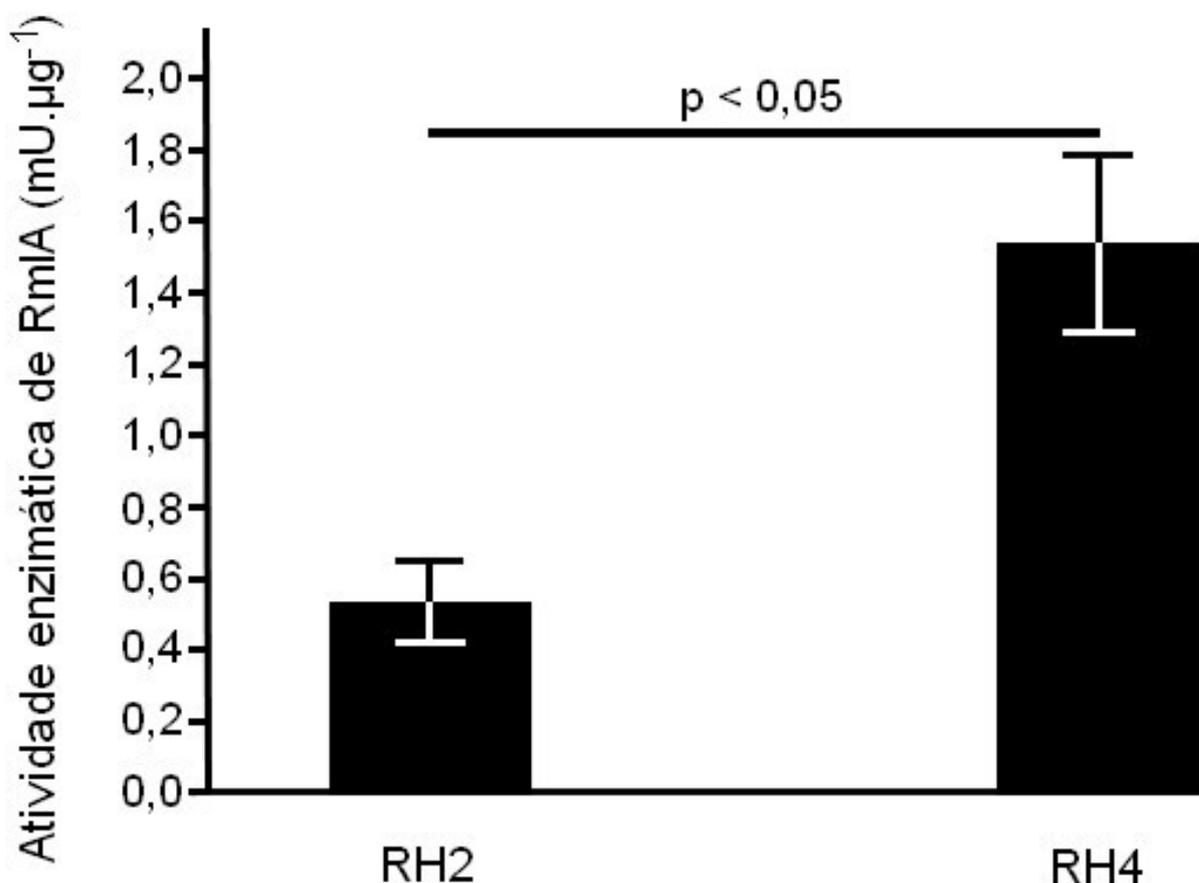


Figura 9. Atividades enzimáticas de RmlA para as cepas intermediárias RH2 e RH4 utilizando sacarose como substrato. Aplicando o teste T para os valores de atividade enzimática, obtém-se que a atividade em RH4 é maior que a atividade em RH2 com uma confiança maior que 99% ( $p=0,005$ ).

Em contrapartida, quando o mesmo experimento é realizado utilizando-se glicose-1-fosfato como substrato, as cepas não mostram diferença significativa de atividade de RmlA como pode ser visto na Figura 10.

Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, quando sacarose é utilizada como substrato, além de fornecer glicose-1-fosfato, ela também fornece frutose, que pode ser utilizada na glicólise. Quando glicose-1-fosfato é usada como substrato, é a única fonte de carbono disponível na reação, então a glicólise compete

com RmlA pelo substrato. O redirecionamento de glicose-1-fosfato para a glicólise é feito por isoenzimas fosfoglicomutases (PGMs) (Figura 4), nativas em *S. cerevisiae*. Essas enzimas são responsáveis pela interconversão de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato. A PGM2, isoenzima mais relevante responsável por 80-90% da atividade de PGM em levedura, possui alta afinidade por glicose-1-fosfato, reportada em 23,4  $\mu\text{M}$  (Daugherty *et al.*, 1975). Ainda não foi medida a afinidade da RmlA de *P. aeruginosa* pelo mesmo substrato, mas é razoável concluir que boa parte da glicose-1-fosfato está sendo consumida pelas PGMs para alimentar a via glicolítica. Assim, a atividade de RmlA em RH4 usando esse substrato é virtualmente indetectável.

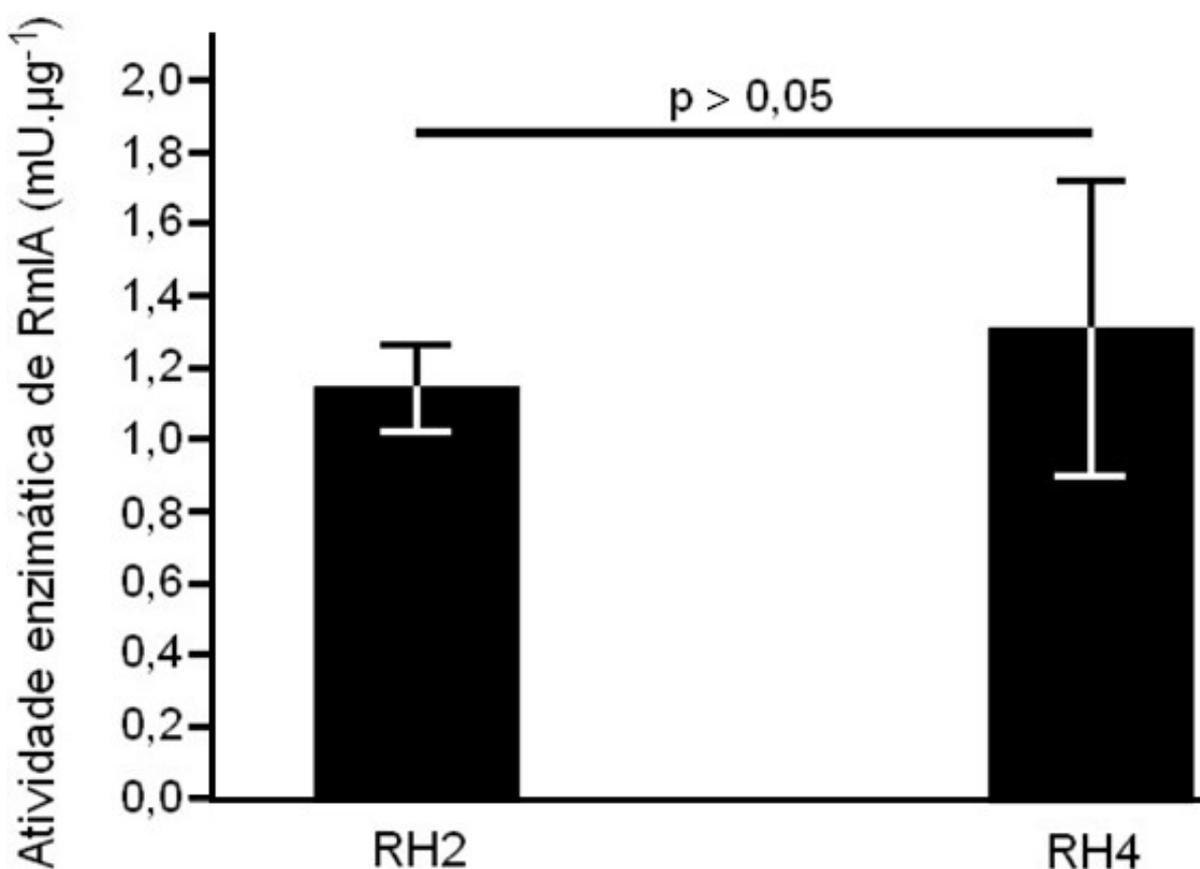


Figura 10. Atividades enzimáticas de RmlA para as cepas intermediárias RH2 e RH4 utilizando glicose-1-fosfato como substrato. Aplicando o teste T para os valores de atividade enzimática, obtém-se que a atividade em RH4 é igual à atividade em RH2 ( $p=0,3$ ).

#### 5.1.4 Cepas finais

Após a detecção da atividade enzimática de RmlA e inferência de que as outras enzimas também estão sendo expressas, seguiram-se as transformações das cepas intermediárias com os plasmídeos restantes, resultando nas cepas finais produtoras de dTDP-Rha (RHP) e mono-RLs (RLP), assim como suas cepas referências contendo os plasmídeos vazios (RHR e RLR, respectivamente) (Tabela 7). Como esperado, além de serem capazes de crescer na presença de geneticina devido a KanMX, as cepas finais são capazes de crescer em meio mínimo com sacarose sem complementação nutricional, indicando que os plasmídeos estão presentes complementando a auxotrofia das cepas.

## 5.2 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO POR LÍCIO

Como já citado anteriormente, as isoenzimas PGMs interconvertem glicose-1-P (G1P) em glicose-6-P (G6P) (Figura 4). Essas enzimas possuem alta afinidade por G1P (23,4  $\mu$ M) e equilíbrio de reação favorecendo a formação de G6P para alimentar a via glicolítica. Conseqüentemente, as PGMs competem com a enzima RmlA, primeira da via de síntese de dTDP-Rha (Figura 2), pela G1P disponível. No sentido de tentar direcionar a utilização de G1P para produção de dTDP-Rha, decidiu-se testar se a inibição de PGMs aumentava a produção dessa molécula. Estudos prévios reportam que o lítio é um inibidor de PGM de alta afinidade, apresentando um  $IC_{50}$  (metade da concentração de inibição máxima) de 0,2 mM *in vitro* (Masuda *et al.*, 2001). Ademais, em cultivo de levedura com galactose como fonte de carbono, a atividade de PGM é indispensável para o metabolismo da célula, já que esse substrato é transformado em glicose-1-P e sua única via de entrada na via glicolítica é pela atividade de PGM. Ao ser cultivada na presença de galactose e LiCl (Cloreto de lítio) 15 mM em meio líquido, a taxa fermentativa de *S. cerevisiae*, calculada pela quantidade de etanol produzido por tempo de fermentação e peso seco, decai em 90%, demonstrando a quase completa inibição de PGM por essa concentração de lítio (Masuda *et al.*, 2001). Entretanto, também se sabe que as cepas de levedura da família CEN.PK são hipersensíveis a lítio, mostrando uma diminuição de 65% na taxa

de crescimento específica quando cultivadas em meio contendo LiCl a 20mM (Daran-Lapujade *et al.*, 2009).

Por esse motivo, curvas de crescimento na presença e ausência de LiCl a 15 mM foram realizadas com as cepas RHR e RHP crescidas em sacarose para avaliar o nível de toxicidade desse composto. Como pode ser observado na Figura 11, tanto a cepa referência quanto produtora mostraram crescimento prejudicado quando da presença de lítio, reduzindo suas taxas de crescimento específico máximas para 82% e 88%, respectivamente, das taxas quando cultivadas sem lítio. Entretanto, esses valores não foram tão expressivos quanto os encontrados por Daran-Lapujade *et al.* (2009), onde a cepa reduziu sua taxa para 35% da original quando cultivada na presença de LiCl 20mM. Desse modo, tornam-se viáveis futuras análises de produção de dTDP-Rha e mono-RLs na presença e ausência de lítio, já que a presença desse não prejudica tão expressivamente o crescimento das cepas e pode, potencialmente, aumentar a produção dos compostos de interesse.

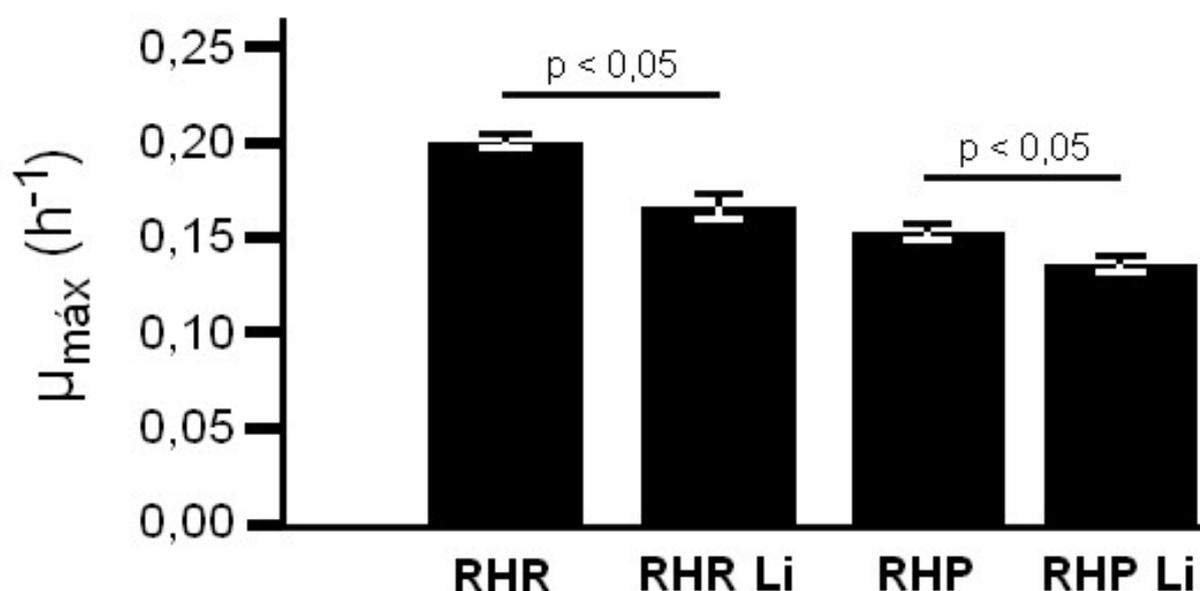


Figura 11. Taxas de crescimento específico máximas ( $\mu_{\max}$ ) das cepas RHR e RHP crescidas em sacarose na ausência e presença de LiCl 15mM. Aplicando o teste T, obtém-se que os valores de  $\mu$  tanto de RHR quanto de RHP crescidas na presença de lítio são significativamente menores quando comparados com a condição de ausência de lítio ( $p = 0,006$  e  $0,026$ , respectivamente).

## 5.3 DETECÇÃO DE DTDP-L-RAMNOSE

### 5.3.1 HPAEC

Após ensaios de crescimento com LiCl 15mM, avaliou-se a produção de dTDP-Rha pela cepa RHP, usando RHR como controle negativo, crescidas na presença e na ausência de lítio. Para tal, decidiu-se testar a sensibilidade do método de HPAEC para detecção de açúcares-nucleotídeos descrito por Köplin *et al.* (1997). Amostras puras de dTDP-Rha a 0, 5, 20, 50, 70 e 100 mg/L foram analisadas para criar uma curva padrão baseada no método descrito sem alterações, resultando em uma curva que, após regressão linear, apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 99,96%. Com este resultado promissor, pequenos ajustes na concentração da fase móvel, na temperatura da coluna e na faixa de comprimento de onda para detecção de dTDP-Rha foram realizados de modo a estender o tempo de eluição e aumentar o sinal de detecção dessa molécula.

Com o método modificado estabelecido, protocolos de extração de dTDP-Rha de lisados celulares foram testados. Inicialmente, o método de etanol fervente para extração geral de metabólitos (González e Franc, 1997) foi testado com as cepas RHR e RHP, resultando em amostras com cromatogramas complexos e com baixa resolução, gerando resultados inconclusivos (dados não mostrados). Dessa maneira, decidiu-se testar um método mais específico para purificação de açúcares-nucleotídeos, descrito por Råbinä *et al.* (2001), baseado em Extração em Fase Sólida com colunas de carbono grafitizado. Os autores afirmam que a recuperação dessas moléculas após extração é de 93 a 100%, estando elas em solução pura ou adicionadas em extrato celular de levedura, demonstrando a eficiência e seletividade do método.

Para avaliar o sucesso do método em nosso laboratório, experimentos de SPE foram delineados baseados nas seguintes amostras: C+: controle positivo – solução pura de dTDP-Rha 100 mg/L; RHR: extrato da cepa RHR; IS: padrão interno – extrato de RHR adicionado de dTDP-Rha para 100 mg/L; RHP: extrato da cepa RHP; RHPLi: extrato da cepa RHP crescida na presença de LiCl 15mM. Com essas amostras, avaliou-se a recuperação, após SPE, de dTDP-Rha em solução pura (C+) e quando

adicionada na cepa referência (IS), com a finalidade de descobrir se as moléculas presentes nos extratos celulares influenciavam na eficiência de extração de dTDP-Rha. Além disso, avaliou-se a produção de dTDP-Rha pela cepa RHP crescida na presença e ausência de lítio, utilizando RHR como referência.

Após sucessivas tentativas de extração por SPE e detecção por HPAEC, a recuperação de dTDP-Rha em solução pura após extração foi menor que a descrita por Răbină *et al.* (2001), variando de 40 a 70%. Ademais, diferentemente do que foi previamente descrito, não foi possível detectar dTDP-Rha quando essa foi adicionada ao extrato da cepa RHR, demonstrando que o extrato interfere na extração dessa molécula (dados não mostrados). Ainda, também não foi detectada a presença dessa molécula nas amostras da cepa RHP. Esses resultados mostraram-se inconclusivos, já que o método de extração não foi eficiente nem para recuperar dTDP-Rha adicionada a extrato celular. Dessa maneira, não se sabe se a cepa RHP não produz dTDP-Rha ou se ela está sendo perdida durante o método de extração.

Após a falha no estabelecimento dos métodos de extração e detecção descritos acima, procurou-se uma metodologia alternativa para a detecção de dTDP-Rha.

### 5.3.2 MS/MS

Inicialmente, os experimentos de MS e MS/MS foram otimizados utilizando uma solução padrão de dTDP-L-ramnose. O melhor modo de ionização foi o negativo ESI(-)-MS e os parâmetros voltagem do cone, energia de colisão e  $m/z$  do íon precursor e fragmento foram configurados no modo MRM. O MS triplo quadrupolo operado em modo MRM é uma análise mais sensível e seletiva, uma vez que é possível escolher qual precursor iônico será fragmentado e qual fragmento será detectado. O íon precursor ( $m/z$  547.3) foi selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), colidido com gás no segundo quadrupolo para ser fragmentado (Q2) e, então, o fragmento iônico de interesse ( $m/z$  321) foi detectado no terceiro quadrupolo (Q3).

Para a análise das amostras de RHR e RHP, extratos celulares foram preparados utilizando-se método de etanol fervente em triplicata. As amostras foram ressuspensas em água e analisadas por UPLC-MS/MS. Nas análises feitas para a cepa produtora (RHP), um composto é eluído com o tempo de 3.86 minutos com transição de MRM de 547.3 > 321 que pode ser atribuído a dTDP-L-ramnose (Turnock

e Ferguson, 2007; Feng *et al.*, 2016). Para a cepa controle (RHR) as análises não mostraram nenhum composto com essa transição de MRM, nem com o peso molecular correspondente à dTDP-L-ramnose (Figura 12).

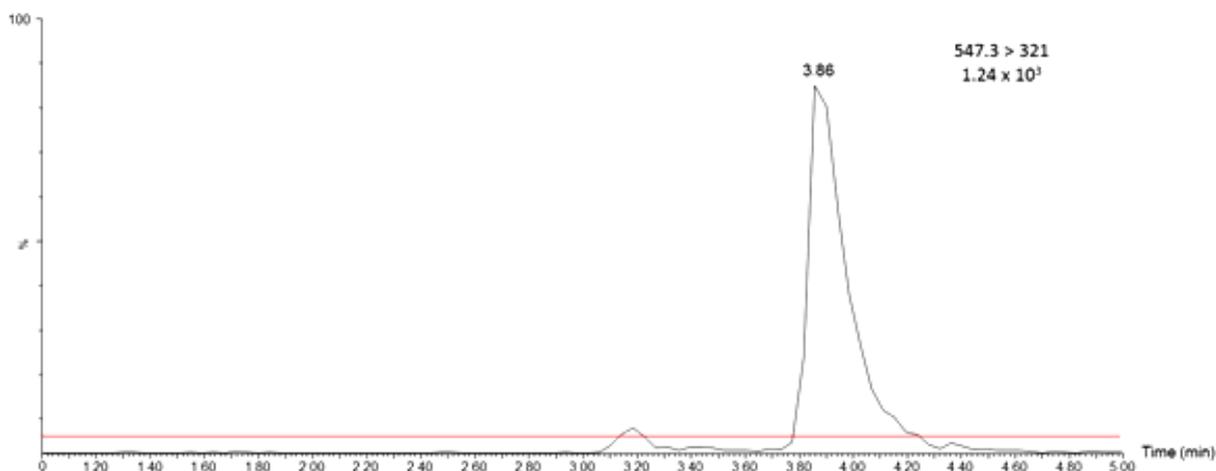


Figura 12. Sobreposição dos resultados de MRM da cepa controle RHR (linha vermelha) e da cepa produtora RHP (linha preta).

Todas as evidências apontam para que o pico de detecção em questão seja referente à dTDP-Rha, apesar de o tempo de retenção da molécula no extrato de RHP não ser igual ao do padrão usado nas análises. Como pode ser visto na Figura 13, o padrão (A) tem tempo de retenção menor que a molécula produzida por RHP (B linha contínua). Esse resultado é confirmado ao adicionar-se padrão de dTDP-Rha ao extrato celular de RHP, resultando na eluição de dois picos de mesma massa e tempo de retenção diferentes (B linha pontilhada). Isso pode ser explicado se levado em consideração que o composto utilizado como padrão nas análises pode não tratar-se do mesmo estereoisômero produzido pela cepa RHP. Ademais, além da massa dos dois picos serem a mesma, a molécula detectada nos extratos de RHP não é observada nos extratos da cepa referência RHR, já que esse composto não é naturalmente produzido em leveduras. Os resultados acima indicam fortemente a construção bem sucedida de uma cepa de levedura produtora de dTDP-L-ramnose.

Ainda que detectada, a quantidade de dTDP-Rha medida foi muito baixa, inviabilizando sua quantificação. Isso pode ser devido a dois fatores. Como mencionado anteriormente, PGM pode estar competindo com RmlA pela glicose-1-fosfato disponível, diminuindo o rendimento de produção de dTDP-Rha. Além disso,

como previamente descrito (Blankenfeldt *et al.*, 2000), dTDP-Rha apresenta efeito inibitório na atividade de RmlA quando acumulada, diminuindo o fluxo em direção à produção dela mesma. Os resultados e as informações apresentados mostram a necessidade de continuar explorando estratégias de engenharia metabólica em RHP, como deleção de PGM, para aumentar a produção de dTDP-Rha ou torná-la uma cepa produtora de L-ramnose adicionando-se mais etapas enzimáticas para desacoplar o nucleotídeo da ramnose.

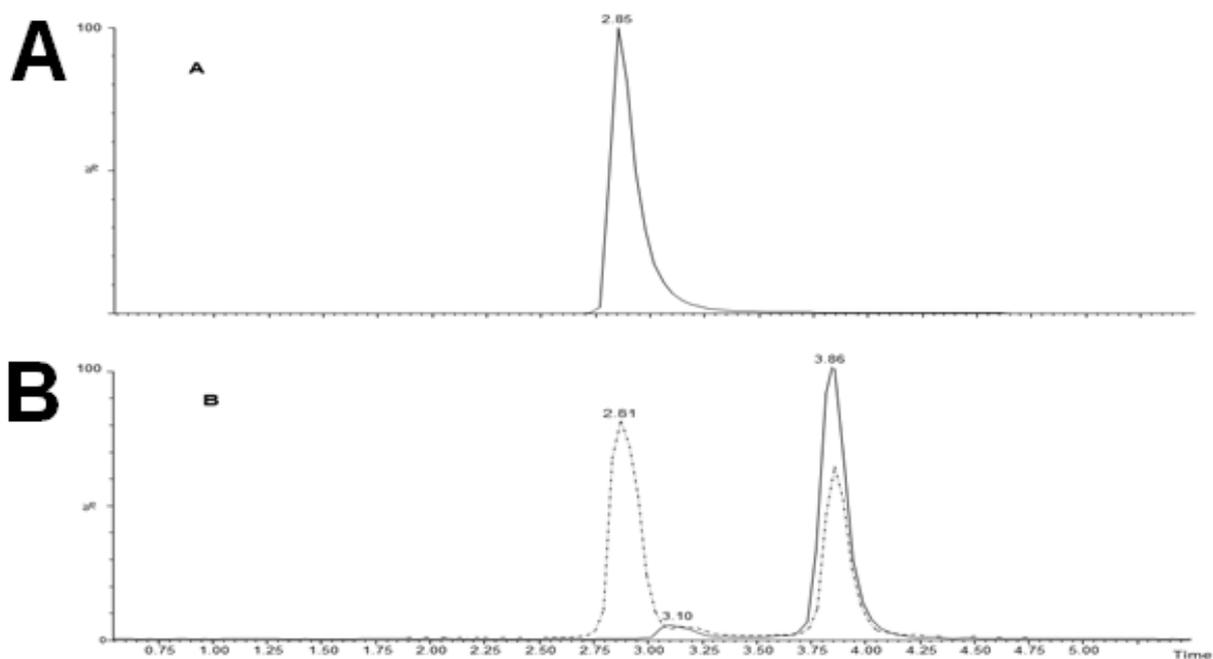


Figura 13. Análise de solução padrão de dTDP-L-ramnose (A), de extrato celular de RHP (B linha contínua) e de extrato celular de RHP adicionado de padrão de dTDP-L-ramnose (B linha pontilhada).

## 5.4 DETECÇÃO DE MONO-RAMNOLIPÍDEOS

### 5.4.1 Ensaio de Orcinol

Em paralelo com as análises de dTDP-Rha, investigou-se a produção de mono-RLs pela cepa RLP. Para tal, o método quantitativo de detecção por orcinol é um dos mais amplamente utilizados, consistindo em aquecer extratos de sobrenadante de culturas contendo RLs em conjunto com ácido sulfúrico e orcinol. Dessa forma, os grupos ramnose dos RLs são hidrolisados e transformados em metil furfural, que por sua vez reagem com orcinol produzindo uma coloração azul-esverdeada, detectada espectrofotometricamente a 421 nm (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011). Normalmente, em culturas bacterianas, os RLs são produzidos e secretados para o meio extra celular. Assim, realiza-se uma extração com solvente orgânico do sobrenadante das culturas para obter-se os RLs. No caso desse estudo, os mono-RLs são produzidos e armazenados intracelularmente. Dessa maneira, precisou-se avaliar a eficácia do método de detecção por orcinol utilizando amostras de extratos obtidos por dietil-éter a partir de extratos celulares da cepa RLP, onde espera-se que haja muito mais moléculas orgânicas quando comparados a sobrenadantes de culturas.

A princípio, foi realizada uma curva padrão utilizando soluções puras de dTDP-Rha a 0, 5, 10, 20, 50 e 80 mg/L, em triplicata, para avaliar a sensibilidade do método. Obteve-se uma curva que, após regressão linear, apresentou  $R^2$  de 99,52%, atestando a precisão do método. Em seguida, experimento foi delineado para avaliar a eficácia do método de lise química por detergente das células de levedura seguido por método de extração pelo solvente orgânico éter etílico. Para tal, as seguintes amostras foram preparadas: RL não-ex: solução pura de ramnolipídeo a 99,9 mg/L; RL ex: solução pura de ramnolipídeo a 99,9 mg/L submetida a processo de extração por solvente orgânico; RLR: extrato celular da cepa RLR submetido a processo de extração por solvente orgânico; RLR+RL: extrato celular da cepa RLR adicionado de RLs para 99,9 mg/L submetido a processo de extração por solvente orgânico; RLP: extrato celular da cepa RLP submetido a processo de extração por solvente orgânico. À partir da comparação dos dados de ensaio de orcinol gerados pelas amostras RL não-ex e RL ex, esperava-se avaliar a recuperação de RLs pelo método de extração

com éter-etílico. À partir das amostras RLR e RLR+RL, esperava-se investigar se o extrato celular da cepa referência interferia na extração de RLs. Finalmente, esperava-se obter uma quantificação de RLs produzidos pela cepa RLP pela comparação entre as amostras RLR e RLP. Após algumas tentativas e aperfeiçoamento da técnica, os dados obtidos dos experimentos de detecção de RLs por orcinol podem ser vistos na Tabela 8. A recuperação após extração de RLs em solução pura foi de 92,75%, enquanto que a recuperação de RLs em extratos celulares foi de 90,54%, indicando que a extração por éter etílico é eficiente. Entretanto, ao analisar-se os dados das amostras RLR e RLP, percebe-se que a cepa referência gerou sinal quase duas vezes maior que a cepa produtora, indicando a sensibilidade do método aos outros compostos extraídos em conjunto pelo solvente orgânico. Esse resultado é inconclusivo, pois não é possível resolver se a cepa RLP não está produzindo RLs ou se a quantidade produzida não é o suficiente para se destacar dentre os compostos extraídos em conjunto. Para fins comparativos, o barulho de fundo gerado pelos compostos extraídos do extrato de RLR é similar ao sinal gerado pelo padrão de dTDP-Rha a 50 mg/L, concentração já alta desse composto.

Tabela 8. Resultado do ensaio de orcinol para detecção de RLs. \*Calculado como (RL ex / RL não-ex)\*100. \*\*Calculado como  $\{[(RLR+RL) - RLR] / RL \text{ não-ex}\} * 100$ .

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
RL não-ex	157,34	-
RL ex	145,93	92,75% *
RLR+RL	201,46	90,54% **
RLR	59,03	-
RLP	34,85	-

Devido à falha no estabelecimento dos métodos de extração e detecção acima, procurou-se uma nova metodologia para detectar a produção de mono-RLs por RLP.

### **5.4.2 Microscopia Confocal**

Para a detecção de mono-ramnolipídeos, as cepas RLR e RLP foram submetidas a microscopia de fluorescência para detecção de acúmulo lipídico intracelular corado com BJJ16#UnB3, corante produzido e patenteado pelo grupo do Prof. Dr. José Corrêa Raimundo da Universidade de Brasília. Visualmente, é possível observar diferença significativa na quantidade de lipídeos armazenada por RLR e RLP (Figura 14-A e -C, respectivamente). A cepa referência mostrou, quando comparada com a cepa produtora, menor acúmulo de lipídeos nos corpos lipídicos, menos corpos lipídicos por célula e menor quantidade de células contendo corpos lipídicos por amostra. As Figura 14-B e -D de contraste de fase mostram o aspecto morfológico normal das células das cepas RLR e RLP, respectivamente, submetidas ao processo de coloração, além de mostrar que ambas as amostras encontram-se em concentrações similares.

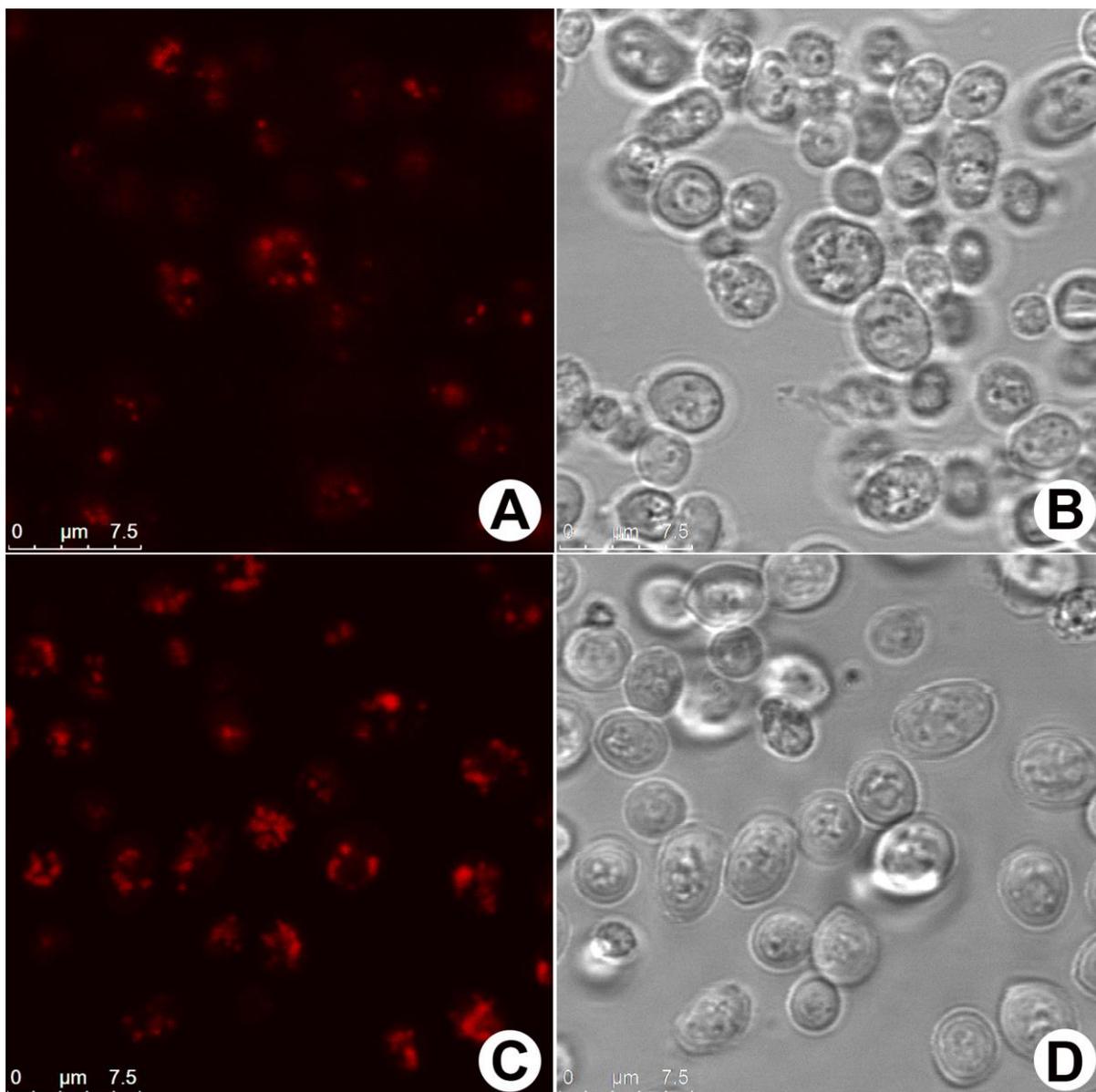


Figura 14. Microscopias de fluorescência e contraste de fase das cepas RLR (A e B, respectivamente) e RLP (C e D, respectivamente). As imagens A e C mostram gotículas lipídicas coradas acumuladas nas cepas RLR e RLP, respectivamente. As imagens B e D mostram o aspecto morfológico normal das amostras de RLR e RLP, respectivamente.

Esses resultados foram confirmados por quantificação celular, que mostrou um aumento de aproximadamente 40% no número de células da cepa produtora contendo corpos lipídicos quando comparada com a cepa referência (Figura 15-A). Ademais, o número de corpos lipídicos por célula é quase duas vezes maior na cepa produtora quando (Figura 15-B).

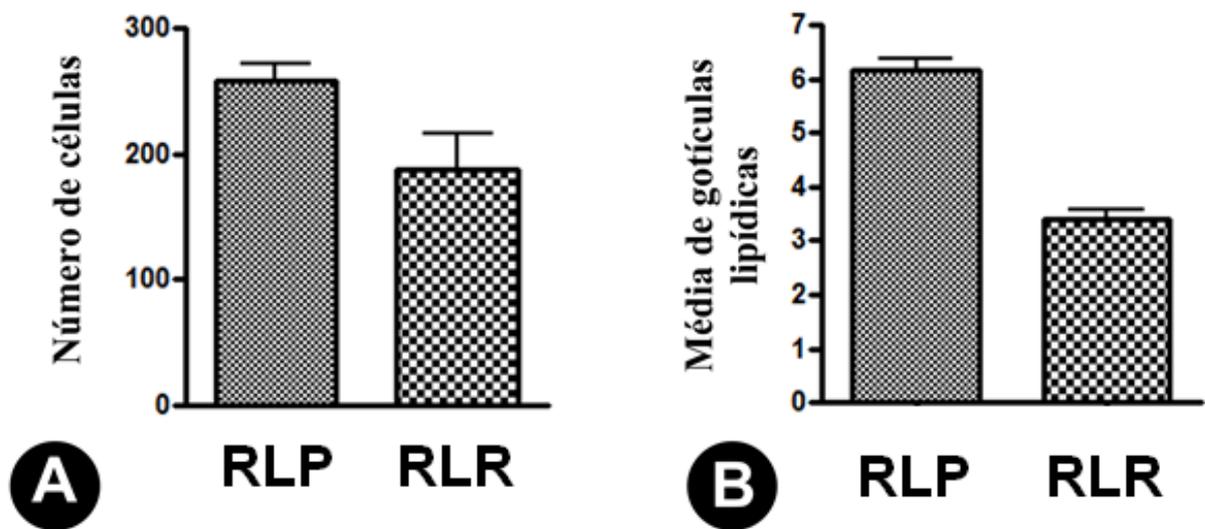


Figura 15. Quantificação de células contendo gotículas lipídicas (A) e de número de gotículas lipídicas por célula (B) das cepas RLR (referência) e RLP (produtora).

A análise de intensidade de fluorescência corroborou os resultados obtidos acima. A Figura 16 mostra os perfis de emissão de fluorescência associados às cepas RLR e RLP (A e B, respectivamente). Esses perfis estão intimamente relacionados à quantidade de lipídeos armazenada em cada cepa. As imagens térmicas claramente indicam o número elevado de corpos lipídicos e de lipídeo por corpo lipídico na cepa RLP quando comparada à RLR (C e D, respectivamente). Finalmente, os histogramas também indicam, indiretamente, uma maior acumulação lipídica na cepa produtora em comparação com a cepa referência (E e F, respectivamente).

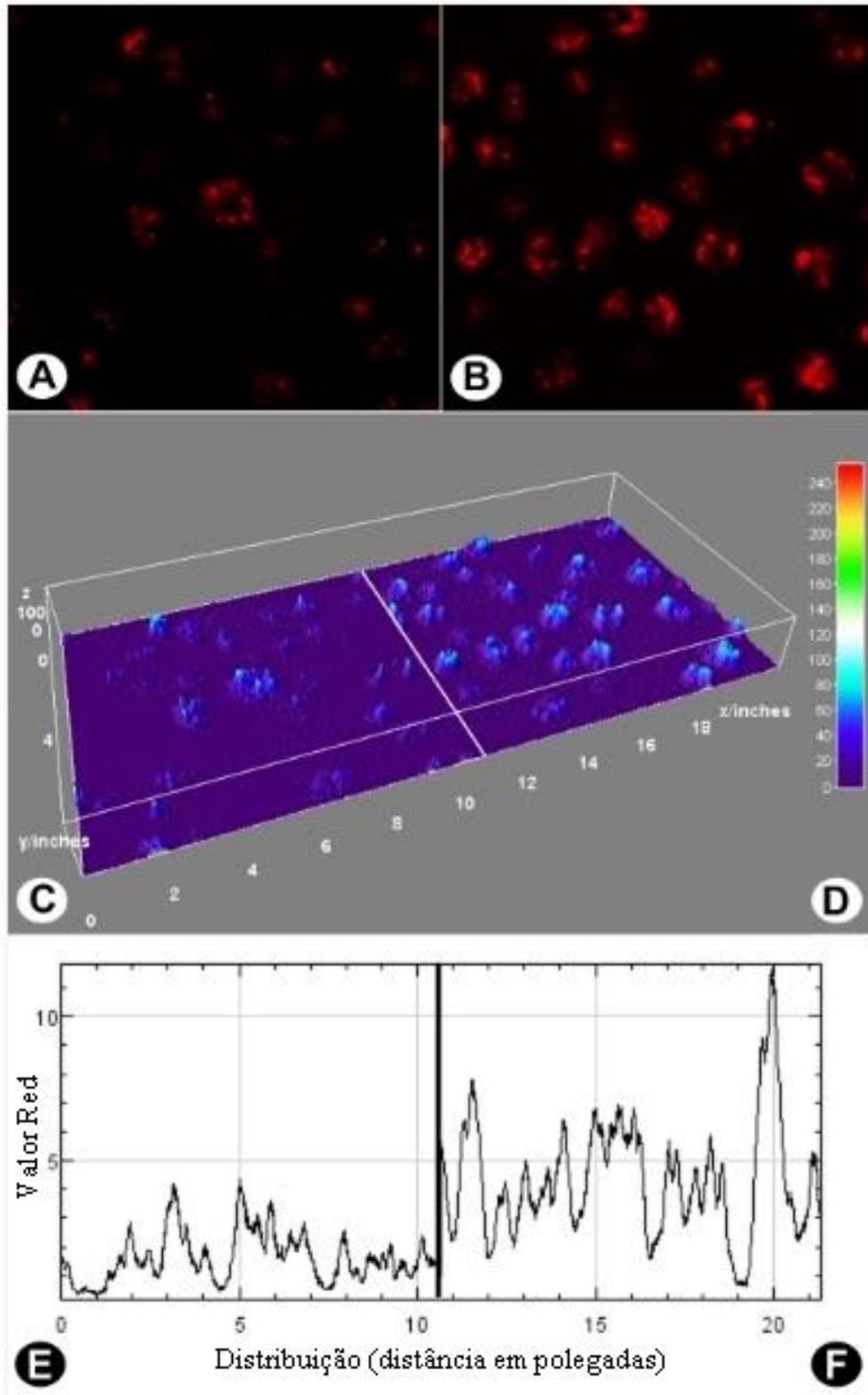


Figura 16. Quantificação do sinal de fluorescência. As imagens A e B mostram o perfil de fluorescência das cepas RLR e RLP, respectivamente. As imagens C e D mostram o perfil tridimensional da representação térmica dos valores de pixel obtidos das imagens LUT. As imagens E e F mostram o histograma relacionado ao valor de pixel obtido das imagens LUT.

Os resultados apresentados acima são apenas indicações indiretas da produção de mono-RLs, já que o que confirmam é um maior acúmulo de lipídeos intracelularmente. Técnicas específicas para detecção e quantificação de RLs devem ser exploradas para confirmar definitivamente a produção de mono-RLs por RLP.

Além de dTDP-Rha, as enzimas RhIA e B utilizam beta-hidroxiacil-ACP para a síntese de RLs (Figura 2). Beta-hidroxiacil-ACP é intermediário da via de síntese de ácidos graxos *de novo* já presente na levedura, e pode ser alvo de estratégias de engenharia metabólica para aumento de produção a fim de aumentar a produção de RLs. Nesse sentido, Tang *et al.* (2015) compilaram os recentes avanços em engenharia metabólica de *S. cerevisiae* para aumentar o fluxo metabólico na via de síntese de ácidos graxos, sendo algumas estratégias: aumentar a produção de acetil-CoA e malonil-CoA, precursores da via de síntese de ácidos graxos; inibir ou reduzir o fluxo nas vias de glicerol e etanol que competem pela fonte de carbono; atenuar regulação negativa da via por produtos dessa; bloquear beta-oxidação; aumentar concentrações intracelulares de NADPH, necessários como poder redutor na síntese de ácidos graxos. Como pode-se perceber, há diversos avanços na engenharia metabólica de *S. cerevisiae* para aumentar a produção de ácidos graxos, decorrentes principalmente da demanda de produção de biocombustíveis à partir de ácidos graxos em levedura (Tang *et al.*, 2015). Assim, o presente estudo focou primeiramente na inserção dos genes exógenos de *P. aeruginosa* em *S. cerevisiae* para adicionar a parte da via de síntese de RLs que essa ainda não possuía.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou, como prova de conceito pela primeira vez, que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser geneticamente modificada para se tornar produtora de ramnose e ramnolipídeos. O foco atual da pesquisa segue em buscar definir os parâmetros cinéticos das cepas produzidas nesse estudo, procurando quantificar rendimentos e produtividades dos compostos de interesse. Dessa maneira, é possível obter informações sobre gargalos na produção, levando a futuras estratégias para aumentar a eficiência dos biocatalisadores. As estratégias apresentadas nesse trabalho são desenvolvimentos importantes no sentido de melhorar a produção industrial de ramnolipídeos utilizando um substrato renovável pouco dispendioso e um hospedeiro não-patogênico.

Extrapolando os âmbitos da pesquisa, o presente estudo me foi de bastante enriquecimento profissional. Nele tive a oportunidade de trabalhar com técnicas diversas e relevantes no meio científico, como cromatografias variadas e espectrometria de massas. Ademais, me foi oferecida a oportunidade de trabalhar na Universidade Chalmers de Tecnologia na Suécia, em laboratório de relevância acadêmica internacional, ponto chave para aquisição de *expertise* e *networking*. Finalmente, concluo um Mestrado produtivo, com patente e manuscrito em redação, ponto importante não apenas para minha carreira científica, mas também para o Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular que me ofereceu uma ótima estrutura para que eu pudesse realizar meus estudos.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ABDEL-MAWGOUD, A. M. *et al.* Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: SOBERÓN-CHAVEZ, G. (Ed.) **Biosurfactants: From Genes to applications**. Münster: Springer, 2011. p.13-56.

BADOTTI, F. *et al.* Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 4, 2008.

BAILEY, J. E. Toward a science of metabolic engineering. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1668-75, 1991.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BASSO, T. O. *et al.* Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 694-703, 2011.

BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 26-33, 2004.

BLANKENFELDT, W. *et al.* The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA). **The EMBO Journal**, v. 19, n. 24, p. 6652-6663, 2000.

BORODINA, I.; NIELSEN, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 5, p. 609-629, 2014.

CABRERA-VALLADARES, N. *et al.* Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 187-94, 2006.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinions on Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004.

CHRISTOVA, N. *et al.* Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on n-hexadecane. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C**, v. 59, n. 1-2, p. 70-74, 2004.

DARAN-LAPUJADE, P. *et al.* An atypical PMR2 locus is responsible for hypersensitivity to sodium and lithium cations in the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 789-792, 2009.

DAUGHERTY, J. P.; KRAEMER, W. F.; JOSHI, J. G. Purification and properties of phosphoglucomutase from Fleischmann's yeast. **European Journal of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 115-26, 1975.

DE KOK, S. *et al.* Increasing free-energy (ATP) conservation in maltose-grown *Saccharomyces cerevisiae* by expression of a heterologous maltose phosphorylase. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 518-526, 2011.

DENG, X. *et al.* Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 200-12, 2014.

FENG, L.; SHOU, Q.; BUTCHER, REBECCA A. Identification of a dTDP-rhamnose biosynthetic pathway that oscillates with the molting cycle in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 11, p. 1507-1521, 2016.

FERREIRA, V. F. *et al.* Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

FUGUET, E. *et al.* Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 548, n. 1–2, p. 95-100, 2005.

GONZALEZ, B.; FRANCOIS, J.; RENAUD, M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. **Yeast**, v. 13, n. 14, p. 1347-55, 1997.

GROSSMANN, M. K.; ZIMMERMANN, F. K. The structural genes of internal invertases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 175, n. 2, p. 223-229, 1979.

GÜLDENER, U. *et al.* A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic Acid Research**. v. 24, n. 13, p. 2519-2524, 1996.

GUTIERREZ, M. *et al.* Simultaneous Inhibition of Rhamnolipid and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* by 2-Bromoalkanoic Acids: Effect of Inhibitor Alkyl-Chain-Length. **Plos One**, v.8, n. 9, 2013.

HENKEL, M. *et al.* Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207-1219, 2012.

HILL, J. *et al.* DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 20, p. 5791, 1991.

KÖPLIN, R.; BRISSON, J. R.; WHITFIELD, C. UDP-galactofuranose precursor required for formation of the lipopolysaccharide O antigen of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 is synthesized by the product of the rfbDKPO1 gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4121-4128, 1997.

KOSCHWANEZ, J. H. *et al.* Improved use of a public good selects for the evolution of undifferentiated multicellularity. **Elife**. 2013. Disponível em: <<https://elifesciences.org/content/2/e00367>>. Acesso em: 28 jan 2017.

LEITERMANN, F. *et al.* Rhamnolipids. In: TIMMIS, K.N. **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. p. 3037-3051.

MADSEN, J. K. *et al.* The anionic biosurfactant rhamnolipid does not denature industrial enzymes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 292, 2015.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558-565, 2012.

MARKETSANDMARKETS. Surfactants market by type (anionic, non-ionic, cationic, and amphoteric), substrate (synthetic, and bio- based), application (detergents, personal care, textile, elastomers and plastics, crop protection, food and beverage) – Global forecast to 2021. 2016. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactants-market-493.html>>. Acesso em: 28 jan 2017.

MASUDA, C. A. *et al.* Phosphoglucomutase is an in vivo lithium target in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 37794-37801, 2001.

MIEYAL, J. J.; SIMON, M.; ABELES, R. H. Mechanism of action of sucrose phosphorylase. 3. The reaction with water and other alcohols. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 247, n. 2, p. 532-42, 1972.

MÜLLER, M. M. *et al.* Rhamnolipids: Next generation surfactants?. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 366-380, 2012.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1–4, p. 371-380, 2001.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.

MUMBERG, D. *et al.* Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, p. 119-122, 1995.

MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, 1996.

NAUMOV, G. I. *et al.* Polymeric SUC genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 1, p. 31-5, 1996.

NOH, N. A.; SALLEH, S. M.; YAHYA, A. R. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 via fed-batch cultivation based on maximum substrate uptake rate. **Letters on Applied Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 617-623, 2014.

PAULINO, B. N. *et al.* Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 24, p.10265-10293, 2016.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; RUJIRAVANIT, R. Rhamnolipid Biosurfactants: Production and their Potential in Environmental Biotechnology. In: SEN, R. (Ed.) **Biosurfactants**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 2010. p. 211-221.

RÄBINÄ, J. *et al.* Analysis of nucleotide sugars from cell lysates by ion-pair solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 799-805, 2001.

REIS, R. S. *et al.* Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*: a review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 11, p. 6377-84, 2011.

REIS, R. S. *et al.* Biosurfactants: Production and Applications. In: CHAMY, R.; ROSENKRANZ, F. (Ed.) **Biodegradation: Life of Science**. InTech, 2013. p. 31-61.

RODRIGUES, L. *et al.* Biosurfactants: potential applications in medicine. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609-618, 2006.

SCHMIDBERGER, A. *et al.* Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 5779-91, 2013.

SEKHON RANDHAWA, K. K.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 454, 2014.

SHA, S. *et al.* Development of a colorimetric assay and kinetic analysis for *Mycobacterium tuberculosis* D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 2, p. 252-7, 2012.

SHORT, J.S. *et al.* Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. **Nucleic Acid Research**. v. 16, n. 15, p. 7583-7600, 1988.

SYLDATK, C. *et al.* Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas spec.* DSM 2874 grown on n-alkanes. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C**, v. 40, n. 1-2, p. 51-60, 1985.

TANG, X.; LEE, J.; CHEN, W. N. Engineering the fatty acid metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biofuel production. **Metabolic Engineering Communications**, v. 2, p. 58-66, 2015.

TURNOCK, D. C.; FERGUSON, M. A. Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1450-63, 2007.

VAN BOGAERT, I. N. A. *et al.* Microbial production and application of sophorolipids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23-34, 2007.

WANG, Q. *et al.* Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 842-53, 2007.

WITTGENS, A. *et al.* Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 80, 2011.