

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Engenharia genética de *Saccharomyces cerevisiae*
para aumento de síntese de ácidos graxos visando
produção de biossurfactante**

Otávio Bravim da Silva

Brasília

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Otávio Bravim da Silva

Engenharia genética de *Saccharomyces cerevisiae* para
aumento de síntese de ácidos graxos visando produção de
biossurfactante

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito à
obtenção do Título de Doutor em Biologia
Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nádia Skorupa

Parachin

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

BANCA EXAMINADORA

Presidente (orientadora):

Dr.^a Nádia Skorupa Parachin

Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Universidade de Brasília – UnB

Titulares:

Dr.^a Eliane Ferreira Noronha

Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Universidade de Brasília – UnB

Dr.^a Andrea Queiroz Maranhão

Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Universidade de Brasília – UnB

Dr.^a Juliana Davies de Oliveira

Departamento de Ciências Genômicas e Biotecnologia

Universidade Católica de Brasília – UCB

Suplente:

Dr.^a Isabel Garcia Sousa

Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Universidade de Brasília – UnB

A verdadeira maravilha do DNA é sua capacidade de errar ligeiramente. Sem essa característica ainda seríamos seres microscópicos e não haveria música.

Lewis Thomas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha orientadora Prof.^a Dra. Nádia Skorupa por ter me aceitado em seu laboratório, bem como por sua paciência e orientação em toda minha trajetória. Muito obrigado.

Aos membros da banca Prof.^a Dra. Andrea Maranhão, Prof.^a Dra. Eliane Noronha, Prof.^a Dra. Juliana Davies e Prof.^a Dra. Isabel Garcia por terem aceitado meu convite. Obrigado pela participação e contribuição em meu crescimento.

Aos meus amigos de todas as horas, Rodrigo, Andrei, Victor, Fernanda, Marcus, Paulo, Welington, Fred, Mariela, Tatiana e Herbert por todas as vezes que compreenderam que simplesmente não podia vê-los, que estava ocupado e que sim, eu trabalho domingo quando preciso. A vocês, todo meu afeto.

Aos meus amigos de laboratório, André, Lucas, Milton, Enzo, João, Nadielle, Ana, Carol, Daniel, Gabriel, Kelly e Gabriela. É um prazer trabalhar com vocês

Ao meu pai, Sérgio, pelo amor desmedido, por ser ouvinte de todas as horas, pelo interesse em meu trabalho e principalmente por ser a pessoa maravilhosa que é, todo meu amor.

À minha mãe, Alba, pelo afeto, pelos olhares amorosos quando não estou olhando e por apoiar desmedidamente minhas decisões. Tenho orgulho de ser seu filho.

Às minhas irmãs Virginia e Ludmila, pelas risadas diárias, pelo apoio emocional e psicológico que ajudou em muito meu crescimento pessoal. Obrigado pelos elogios transparentes, e aos velados também. Amo vocês.

À Thais, pelo número indescritível de vezes que me ajudou em uma quantidade de coisas que nem consigo descrever, meu mais sincero amor.

Ao meu sobrinho Theo, por me mostrar o que é o amor dentro de uma família que já era completa, e agora ficou mais completa ainda com sua presença.

Agradeço a minha enorme família, a todos os tios, tias, primos e primas que de alguma forma se interessaram pelo meu trabalho e me deram forças. Meu muito obrigado.

À Universidade Tecnológica de Chalmers por ter sediado parte da minha pesquisa, e ao Prof. Dr. Maurizio Bettiga, que tornou essa etapa possível.

À Universidade Católica de Brasília, pela equipe profissional que me auxiliou e pela permissão de uso de suas instalações e equipamentos.

A Embrapa Agroenergia, especialmente à pesquisadora Dra. Patrícia Abdelnur e pós doc Dra. Christiane Campos, pelo auxílio importante no desenvolvimento deste trabalho.

A Capes pela bolsa de estudos.

Ao departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, pela oportunidade de cursar o doutorado.

Enfim, a todos que de uma maneira ou de outra estiveram presentes e contribuíram para a realização dessa etapa, e que sem os quais, esta não seria possível, meu mais sincero obrigado.

SUMÁRIO

Sumário	viii
Lista de abreviaturas	xii
listas de Figuras	xiv
LISTA DE TABELAS	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biossurfactantes	1
1.1.1 Classificação dos biossurfactantes	2
1.1.3 Rhamnolipídeos	3
1.2 Engenharia metabólica de micro-organismos para a produção heteróloga de rhamnolipídeos	2
1.2 Metabolismo de carboidrato em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3 metabolismo de Ácido graxo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.3.3 Produção de ácidos graxos	6
1.3.4 Via de beta oxidação	9
1.4 Estratégias de modificação GENÉTICA PARA aumento de precursores para aumento da produção de ácidos graxos.....	10
1.4.1 Acetil-CoA.....	10
1.4.2 Malonil-CoA.....	13
1.4.3 Cadeias de acil-CoA	14
1.5 Estratégias de maximização de precursores da síntese de ácidos graxos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.5.3 Estratégia <i>PDH-bypass</i> para maximização de acetil-CoA citosólico.....	15
1.5.4 Estratégia Acetil-CoA carboxilase para aumento de malonil-CoA.....	18
1.5.5 Enzimas da Biossíntese de Ácidos Graxos para aumento das cadeias acil-CoA	

1.6	Resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa	20
2.	Objetivos	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Estratégias utilizadas neste trabalho para maximização de precursores da via de ácidos graxos	23
3.	MATERIAIS.....	25
3.1	Meios de Cultura	25
3.2	Tampões e Soluções	25
3.2.3	Soluções para bactéria competente	25
3.2.4	Soluções para gel de DNA	26
3.3	Antibióticos	26
3.4	Transformação de <i>E. coli</i>	27
3.5	Kits utilizados para extração de ácidos nucléicos.....	27
3.6	Transformação de leveduras.....	27
3.7	Enzimas utilizadas	28
3.8	Vetores.....	28
3.9	Oligo nucleotídeos iniciadores de reação em cadeia de polimerase	28
3.10	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	31
4.	Métodos	32
4.1	Genes e plasmídeos.....	32
4.2	Estratégia para síntese dos cromossomos.....	35
4.3	Clonagem em <i>Escherichia coli</i>	38
4.3.1	<i>Escherichia coli</i>	38
4.3.2	Preparo de células competentes.....	38
4.3.3	Transformação (<i>E. coli</i>)	38
4.3.4	Extração de DNA plasmidial de células de <i>E. coli</i>	39
4.4	Reações de tratamento do material genético.....	39

4.4.1	Purificação de fragmentos de DNA a partir do gel	39
4.4.2	Tratamento com endonucleases	40
4.4.3	Tratamento com Fragmento Klenow de polimerase I	40
4.4.4	Ligação do plasmídeo pYAC ₄ PDH-trp	40
4.4.5	Análise em gel de agarose.....	40
4.5	Linhagens de levedura <i>S. cerevisiae</i>	41
4.5.1	Transformação e obtenção de linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	41
4.5.2	Análise dos transcritos por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase.....	43
4.5.3	Perfil de crescimento em através de fermentação em modo batelada.....	45
4.5.4	Determinação de ácidos orgânicos totais por cromatografia líquida de alta performance	45
4.5.5	Análise dos parâmetros cinéticos das linhagens	46
4.5.6	Determinação de ácidos graxos totais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	47
4.5.7	Análise, quantificação e estatística dos ácidos graxos nas linhagens analisadas	48
4.5.8	Quantificação de Acetil-CoA e malonil-Coa por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPHLC-MS).....	48
4.5.9	Detecção de ramnolipídeos através de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.....	51
5.	Resultados	54
5.1	Construção das linhagens recombinantes	54
5.1.1	Transformação dos plasmídeos em <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2 1-113	54
5.1.2	Construção da linhagem EMB54.....	55
5.1.3	Confirmação dos transcritos por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	56

5.1.4	Quantificação de Acetil-CoA e Malonil-CoA em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).....	57
5.1.5	Rendimento das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 em crescimento no modo batelada	58
5.1.6	Análise de ácidos graxos totais por cromatografia gasosa-acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	61
5.1.7	Análise de produção de ramnolípido pela linhagem EMB54 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)	68
6.	Discussão	70
6.1	Linhagens, crescimento e produção total de ácidos graxos	70
6.1.3	Linhagem EMB51.....	70
6.1.4	Linhagem EMB52	72
6.1.5	Linhagem EMB53	73
6.1.6	Linhagem EMB54.....	74
6.2	Produção de ramnolípídeos.....	75
7.	Conclusão.....	76
8.	Produções.....	78
9.	Bibliografia	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- %: Por cento
- °C: Graus Celsius
- μ : Taxa de crescimento específico
- μg : Micrograma
- μm : Micrômetro
- μM : Micromolar
- 3D: Tridimensional
- Aa's: Aminoácidos
- ACCc: Complexo acetil-CoA carboxilase
- ADH: Gene para álcool desidrogenase
- AmpR: Gene que confere resistência a ampicilina
- ATP: Adenosina trifosfato
- CMC: Concentração micelar crítica
- Cmol: Moles de carbono
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- dTDP: Desoxitimidina difosfato
- ESI(-)-MS: Espectrometria de Massa de Ionização por Eletrospray operado em Modo Negativo
- g: Grama
- Fab: Cluster da Biossíntese de lipídeos
- G: Força Centrífuga Relativa (RCF)
- 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
- 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
- MgCl₂: Cloreto de magnésio
- mL: Mililitro
- mm: Milímetro
- mM: Milimolar
- MOPS: Ácido 3(N-morfolino)propanosulfônico
- MRM: Monitoramento de Reações Múltiplas
- MS: Espectrometria de Massa

- **MS/MS:** Espectrometria de Massa em Tandem
- **NaCl:** Cloreto de sódio
- **NaOH:** Hidróxido de sódio
- **nm:** Nanômetro
- **OD:** Densidade ótica
- **ORF:** Fase Aberta de Leitura
- **p/v:** Relação peso/volume
- **pb:** Pares de base
- **PBS:** Tampão Fosfato-Salino
- **PCR:** Reação em cadeia da polimerase
- **PDHc:** Complexo piruvato desidrogenase
- **pH:** Potencial de hidrogênio
- **Pi:** Fosfato inorgânico
- **RL:** Ramnolipídeo
- **RhIA:** Gene para subunidade A de ramnosiltransferase1
- **RhIB:** Gene para subunidade B de ramnosiltransferase1
- **RhIC:** Gene para ramnosiltransferase2
- **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
- **TEAA:** Acetato de trietilamônia
- **TEF:** Gene para fator de alongação translacional
- **TRP:** Triptofano
- **UnB:** Universidade de Brasília
- **UPLC:** Cromatografia Líquida de Ultra Performance
- **Ura:** Uracila
- **USD:** Dólares norte-americanos
- **V: Volts**
- **v/v:** Relação volume/volume
- **YNB:** Meio Base de Nitrogênio para Levedura
- **YPD:** Meio Extrato de Levedura Peptona Dextrose

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Via metabólica de produção de ramnolipídeos pelo procarioto *Pseudomonas aeruginosa*. Nesta via, a glicose é internalizada e convertida em glicose-1-fosfato pela enzima AlgC para a entrada na via de biossíntese de ramnose. A partir desta conversão, as enzimas RmlA, RmlB, RmlC e RmlD fazem a conversão dessa glicose em dtp-L-ramnose. Paralelamente, a glicose-6-fosfato é catalisada através das enzimas da via glicolítica gerando piruvato. Este piruvato segue para dois destinos: O ciclo do ácido cítrico, sendo utilizado na respiração celular, ou sua conversão em acetil-CoA citoplasmático. O acetil-CoA citoplasmático é convertido em malonil-CoA e é direcionado para a biossíntese dos ácidos graxos. Dentro dessa via anabólica, o intermediário β -hidroxiacil-ACP, em especial o β -hidroxidecanoil-ACP (C₁₀) é utilizado pela enzima ligada à membrana RhlA para a síntese de 3-(hidroxialcanoiloxi)alcanóico (HAA), que terá adicionado à sua cadeia uma molécula de dTP-L-ramnose pela enzima RhlB formando mono-ramnolipídeo e outra molécula desse mesmo açúcar pela enzima RhlC, formando di-ramnolipídeo. 1

Figura 2. Metabolismo do carboidrato glicose em *Saccharomyces cerevisiae* mostrando todo o caminho da glicólise até a formação do piruvato. Esta molécula tem destinos distintos dentro da célula, podendo ser transportada para dentro da mitocôndria e convertida em acetil-CoA por essa organela, seguindo para a via de respiração celular (via do ácido cítrico, TCA). Essa molécula também pode seguir para a via de metabolismo de glicina, treonina e serina, bem como ser convertida em etanol pelas enzimas acetaldeído desidrogenase e álcool desidrogenase citoplasmático pela via da piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase. O acetaldeído produzido pela piruvato descarboxilase também pode ser convertido em acetil-CoA pelas enzimas acetaldeído desidrogenase e acetil-CoA sintetase. A glicose também pode ser convertida em glicose-1-fosfato pela ação da enzima fosfoglucomutase, sendo então envolvida na via do metabolismo do açúcar aminado e no ciclo dos açúcares nucleotídicos. 6

Figura 3. Etapas em detalhe da síntese de ácidos graxos em levedura. Primeiramente o composto acetil-CoA citosólico advindo da glicólise é convertido em malonil-CoA pelo complexo acetil-CoA carboxilase. Esse composto é então convertido pela atividade enzimática da malonil-CoA transacilase, que converte esse composto em malonil-ACP. Em seguida, utilizando um acetil-CoA e um malonil-ACP como substrato, a enzima ACP-S-malonil transferase sintetiza o composto acetoacetil-ACP que será utilizado pela enzima β -

cetoacil redutase, juntamente com o composto β -cetoacil-ACP para sintetizar um β -hidroxiacil-ACP. Continuando o ciclo, a enzima, 3-hidroxiacil desidratase utilizará o β -hidroxiacil-ACP e o converterá em trans-2-enoil-ACP, que em seguida gerará uma cadeia acil-ACP através da ação da enzima enoil-acil-redutase. 8

Figura 4. Via metabólica da β -oxidação em *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando o ciclo de oxidação, hidratação, desidrogenação e clivagem dos ácidos graxos, bem como saída do acetil-CoA para o citosol. 10

Figura 5. Visão geral do metabolismo da acetil-CoA em *Saccharomyces cerevisiae*. A glicose é convertida em piruvato na glicólise e entra na mitocôndria para o ciclo do ácido cítrico. Dentro dela o piruvato é convertido em acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase. No citosol, o piruvato pode ser convertido em acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase (PDC), e o acetaldeído pode ainda ser convertido em etanol pela enzima álcool desidrogenase, ou em acetato pela enzima aldeído desidrogenase. O acetato citoplasmático pode ser importado ao núcleo e ao peroxissomo e, em ambos os compartimentos, assim como no citosol, pode ser convertido em acetil-CoA pela acetil-CoA sintetase. No núcleo, o acetil-CoA é usado para a acetilação de histonas, enquanto no peroxissomo, pode ser catabolizado pelo no ciclo do glioxilato ou exportado ao citoplasma após a β -oxidação. O acetil-CoA citosólico é utilizado para a biossíntese de lipídios e aminoácidos e muitos produtos biotecnológicos valiosos podem ser derivados desse precursor. 12

Figura 6. Mecanismo do complexo piruvato desidrogenase (PDH_c), que converte piruvato em acetil-CoA liberando um $NADH + H^+$. Mais especificamente, E_1 é uma enzima dependente de tiamina difosfato (ThDP) e catalisa dois passos consecutivos: (i) a descarboxilação de piruvato em CO_2 com a formação de intermediário $C_2\alpha$ -hidroxietylideno-ThDP (enamino) e (ii) a acetilação redutiva dos grupos lipoil ligados covalentemente ao E_2 . A subunidade E_2 então catalisa a transferência de uma porção acetil para CoA, formando acetil-CoA. A transferência de elétrons das porções di-hidrolipoil de E_2 para primeiramente FAD e depois para NAD é realizada por E_3 . Estas etapas, apesar de consumirem cofatores, não tem gasto energético, não utilizando ATP e conseqüentemente tendo menor impacto na homeostasia celular. 16

Figura 7. Mecanismo citoplasmático do *PDH-bypass* e seu direcionamento do piruvato para a produção de acetil-CoA citosólico. Este mecanismo permite o direcionamento do carbono do piruvato diretamente para a produção de acetil-CoA citoplasmático sem a

necessidade de este piruvato ser metabolizado pela via piruvato-acetaldeído-acetato para incorrer nessa molécula, reduzindo assim o gasto de ATP pela levedura e aumentando a quantidade de acetil-CoA citosólico na célula de *S. cerevisiae*. 17

Figura 8. Mecanismo de conversão de acetil-CoA para malonil-CoA catalisado pelo complexo enzimático acetil-CoA carboxilase. Esta estratégia permite a conversão de acetil-CoA citosólico em malonil-CoA concomitantemente com a enzima acetil-CoA carboxilase nativa. Isto permite o acúmulo dessa molécula que irá ser utilizada na via de biossíntese de ácidos graxos..... 19

Figura 9. Via de síntese de ácidos graxos iniciando em acetil-CoA e mostrando as reações das enzimas de biossíntese de ácidos graxos utilizadas para acumular o intermediário β -hidroxiacil-ACP. Essas enzimas utilizam o malonil-CoA disponível no citoplasma da levedura e através de uma reação de condensação e uma de redução com a utilização de NADPH para síntese dessa molécula..... 20

Figura 10. Representação das estratégias utilizadas neste trabalho para maior produção de ácidos graxos com o objetivo de produção de ramnolipídeo onde (I) representa a estratégia de redirecionamento do piruvato para a síntese de acetil-CoA, (II) representa a estratégia da enzima acetil-CoA carboxilase, que envolve a produção de malonil-CoA, (III) representa a estratégia de expressão de enzimas da biossíntese de ácidos graxos com redirecionamento específico para o intermediário hidroxiacil-ACP e IV representa estratégia desenhada por BAHIA *et al.*, 2018 para produção de ramnose e ramnolipídeo em *S. cerevisiae*. 24

Figura 11. Cassetes inseridos nos plasmídeos com seus respectivos promotores e terminadores. O cassete PDH (A), carrega os genes, *aceE*, *aceF*, *lpdG*, codificantes das subunidades do complexo enzimático piruvato desidrogenase. O cassete ACC (B), carrega os genes, *accB*, *accC*, *accD*, *pao494*, codificantes das subunidades do complexo enzimático acetil-CoA carboxilase e por fim, o cassete Fab (C) carrega os genes, *fabD*, *fabH*, *fabB* e *fabG*, codificantes das enzimas da biossíntese de ácidos graxos que direcionam a síntese ao intermediário hidroxiacil-ACP..... 36

Figura 12. Plasmídeo pYAC4m, usado neste trabalho como controle. Outras características do plasmídeo envolvem a origem de replicação (ORI), o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (AmpR), bem como as marcas prototróficas para os aminoácidos triptofano (TRP1) e histidina (HIS3). O plasmídeo pYAC4mPDH é derivado deste plasmídeo, tendo a sequência genes codificadores das subunidades E1, E2 e E3 da enzima piruvato

desidrogenase de *Pseudomonas aeruginosa* posicionado entre os sítios das endonucleases de restrição Age I e Sal I, o plasmídeo pYAC4mACC derivado de pYAC4m tem os genes codificadores das subunidades ACCA, ACCB, ACCC, ACCD e PA0494 da enzima acetil-CoA carboxilase de *Pseudomonas aeruginosa* entre os sítios das endonucleases de restrição Sal I e Asc I, enquanto o plasmídeo pYAC4mFab tem os genes codificadores das subunidades FabD, FabH, FabB e FabG da síntese de ácidos graxos de *Pseudomonas aeruginosa* entre os sítios das endonucleases de restrição Asc I e Not I. O plasmídeo pYAC4mPDH-trp, derivado de pYAC4mPDH teve sua sequência da marca auxotrófica TRP truncada pelas enzimas de restrição Aat II e Xba I, removendo assim a funcionalidade da marca prototrófica relacionada à produção do aminoácido triptofano.37

Figura 13. Ilustração mostrando o anelamento dos primers da RT-PCR nos transcritos dos genes *aceE*, *aceF*, *lpdG* no cDNA da linhagem EMB51, *accA*, *accB*, *accC*, *accD* e *pao494* no cDNA da linhagem EMB52, *fabH*, *fabG*, *fabB* e *fabD* no cDNA da linhagem EMB53 e *rhlA*, *rhlB*, *rmLA*, *rmLC*, *Gft*, *rmLB* e *rmLD* no cDNA da linhagem EMB54..... 44

Figura 14. Picos de absorção de acetil-CoA e malonil-CoA referentes aos padrões utilizados para aferência das quantificações feitas nas linhagens..... 49

Figura 15. Análise eletroforética de plasmídeos linearizados utilizando a endonuclease de restrição BamH I para transformação em *S. cerevisiae*..... 54

Figura 17. Linearização do plasmídeo pYAC4mPDH com as endonucleases Aat II e Xba I mostrando fragmento de 262pb liberado do pYAC4mPDH. Este fragmento é ausente em pYAC4mPDH-trp, mostrado ao lado do pYAC4mPDH com linearização pela endonuclease de restrição Age I..... 56

Figura 18. Análises eletroforéticas da transcrição dos genes *aceE*, *aceF* e *lpdG*, do plasmídeo pYAC4mPDH (A), *accA*, *accB*, *accC*, *accD* e *pao494* do plasmídeo pYAC4mACC (B), *fabH*, *fabG*, *fabD* e *fabB* do plasmídeo pYAC4mFab (C), e *rhlA*, *rhlB*, *rmLA*, *rmLC*, *Gft*, *rmLB* e *rmLD* dos plasmídeos p424TEF, p425GPD e p426GPD (D), através de RT-PCR do RNA extraído das linhagens EMB50, EMB51, EMB52 EMB53 e EMB54. 57

Figura 19. Perfis fermentativos das linhagens EMB50 (A), EMB51 (B), EMB52 (C), EMB53 (D) e EMB54 (E). As linhagens EMB52, EMB53 e EMB54 foram crescidas em biorreator de 1.2 L com volume de trabalho de 500 mL. As células tiveram sem crescimento feito a uma temperatura de 30 °C, com agitação em cascata e pH 5.5. O meio utilizado foi YNB com adição de aminoácidos quando necessário. 60

Figura 20. Análise de GC-MS mostrando o perfil de ácidos graxos das linhagens EMB50 (A), EMB51 (B), EMB52 (C) e EMB53 (D) com crescimento em frascos cônicos de 50 mL do tipo Falcon em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de cada molécula pelo peso seco celular extraído para análise e a significância em relação à linhagem controle pode ser observada através do (*). 62

Figura 21. Comparação entre os perfis de ácidos graxos das linhagens EMB50, EMB51, EMB52 e EMB53 com crescimento em frascos cônicos de 50 mL do tipo Falcon em triplicata biológica..... 63

Figura 22. Porcentagem total de ácidos graxos por peso seco celular das linhagens EMB50, EMB51, EMB52 e EMB53 com crescimento em frascos cônicos de 50 mL do tipo Falcon em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de moléculas extraídas pelo peso seco celular extraído para análise. A significância em relação à linhagem controle pode ser observada através do (*). 63

Figura 23. Perfil de ácidos graxos das linhagens EMB52 (A), EMB53 (B) e EMB54 (C) crescidas em fermentador. O resultado foi calculado através da porcentagem de cada molécula pelo peso seco celular extraído para análise. 64

Figura 24. Porcentagem de ácidos graxos por peso seco celular das linhagens EMB52, EMB53 e EMB54 crescidas em fermentador..... 65

Figura 25. Análise de GC-MS mostrando o perfil de ácidos graxos das linhagens EMB50 (A), EMB51 (B), EMB52 (C), EMB53 (D) e EMB54 (E) com crescimento em Erlenmeyer em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de cada molécula pelo peso seco celular extraído para análise, e a significância de cada cadeia em relação à linhagem controle pode ser observada pelo (*) 67

Figura 26. Comparação entre os perfis de ácidos graxos das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 crescidas em frascos do tipo Erlenmeyer em triplicata biológica 68

Figura 27. Porcentagem de ácidos graxos por peso seco celular das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 crescidas em frascos Erlenmeyer em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de moléculas extraídas pelo peso seco celular extraído para análise. A significância em relação à linhagem controle pode ser observada através do (*). 68

Figura 28. Cromatograma do padrão de mono-ramnolípídeo, mostrando o pico relativo à essa molécula (A), Cromatograma da linhagem controle EMB50, onde é possível observar

a ausência do pico relativo à produção de mono-ramnolípídeo (B) e Cromatograma da linhagem EMB54, onde é possível observar a ausência do pico relativo à produção de mono-ramnolípídeo (C).F 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Organismos heterologamente modificados para produção de ramnolipídeos.	3
Tabela 2. Oligo nucleotídeos iniciadores de reação em cadeia de polimerase utilizados neste trabalho onde T_m (°C) é a temperatura de desnaturação utilizada na reação em cadeia de polimerase.	28
Tabela 3. Genes, cassetes e plasmídeos utilizados e produzidas nesse estudo	32
Tabela 4. Nome, plasmídeo inserido e linhagem parental das bactérias utilizadas e produzidas nesse estudo	39
Tabela 5. Linhagens, plasmídeos e linhagens parentais de <i>S. cerevisiae</i> desenvolvidas nesse trabalho	42
Tabela 6. Dados obtidos utilizados para configurar os canais do método MRM	49
Tabela 7. Gradiente cromatográfico usado na separação dos compostos pelo modo IPC, fase móvel A: Tributilamina 5 mM + Ácido Acético 10 mM + 5% MeOH e B: MeOH, a 45 °C.	51
Tabela 8. Configuração dos canais do método de detecção de ramnolipídeo em UHPLC-MS	52
Tabela 9. Fluxo e porcentagem dos eluentes utilizados na análise de ramnolipídeo por LC-MS.	53
Tabela 10. Dados de quantificação de acetil-CoA ($\mu\text{g/mL}$) nas leveduras EMB50 e EMB51 e EMB52	58
Tabela 11. Taxa de crescimento máximo específico ($\mu\text{Máx}$) e rendimentos dos metabólitos das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54, onde “y” representa rendimento (Cmol/Cmol), “s” representa o substrato glicose, “x” representa biomassa, “gli” representa glicerol, “ac” representa acetato, “et” representa etanol e “CO ₂ ” representa dióxido de carbono.	59
Tabela 12. Produtividades específicas das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54, onde “q” representa produtividade específica(g/g.h^{-1}), “s” representa o substrato glicose, “gli” representa glicerol, “ac” representa acetato, “et” representa etanol e “C” representa dióxido de carbono (CO ₂).	59

*“Ponham sua confiança em Deus,
meus garotos, mas mantenham
sua pólvora seca.”*

Oliver Cromwell

Resumo

A substituição de dispersantes de origem petroquímica por biossurfactantes é vantajosa por serem moléculas biodegradáveis e não tóxicas. Dentre os biossurfactantes, o ramnolipídeo é atualmente a molécula mais estudada. Estes são produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno oportunista com resistência natural a um grande número de antibióticos. Sendo assim o escalonamento da produção de ramnolipídeos em *P. aeruginosa* é oneroso por requerer inúmeras etapas de purificação. Dessa forma, o desenvolvimento de um organismo a partir de engenharia metabólica pode conduzir ao desenvolvimento de uma tecnologia livre de toxinas e com reduzidas etapas de purificação tornando o processo mais economicamente viável. Para tal, a levedura *S. cerevisiae* se destaca, pois tem sido amplamente utilizada na indústria alimentar, química e médica, por possuir *status* GRAS (do inglês *Generally Regarded As Safe*) e ferramentas genéticas disponíveis. Para produzir uma molécula de ramnolipídeo é necessário produzir o ácido graxo 3-(hidroxialcanoiloxi) ácido alcanóico (HAA) e o açúcar ramnose. Para cumprimento da etapa de produção de HAA, três linhagens de *S. cerevisiae* foram construídas visando aumentar a síntese de ácidos graxos. A primeira linhagem construída, denominada EMB51 contém os genes do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDHc), a segunda, denominada EMB52, os genes do complexo enzimático acetil-CoA Carboxilase (ACC), e a terceira, denominada EMB53, os genes das enzimas ACP-S-malonil transferase, β -cetoacil-ACP sintase, e β -cetoacil redutase (Fab), que constituem metade da via de síntese *de novo* de ácidos graxos. Também foi construída uma linhagem controle com o plasmídeo vazio denominada EMB50. Estas linhagens tiveram confirmação da transcrição de seus genes, foram analisadas em processo fermentativo do tipo batelada e analisadas quantitativa e qualitativamente em relação à produção de ácidos graxos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). As linhagens também tiveram quantificados seus compostos acetil-CoA e malonil-CoA pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). A linhagem EMB51 foi a que mais produziu ácidos graxos, com um aumento de 16% do total. Sua velocidade de crescimento também foi alterada em 25%. A linhagem EMB52 teve a velocidade de crescimento aumentada em 35%, além de um aumento de 6% no total de ácidos graxos. A levedura EMB53 também teve uma velocidade de crescimento 50% maior, mas sem alteração no perfil produtivo de ácidos graxos. Em relação à produção qualitativa de ácidos graxos, a linhagem EMB51 produziu uma quantidade maior de ácidos graxos de cadeia curta (C₁₀-C₁₂), enquanto as linhagens EMB52 e EMB53 tiveram anulação de sua produção no qual foram similares à linhagem controle. Após constatação de que a linhagem EMB51 produzia mais ácidos graxos, especialmente C₁₀ e C₁₂, uma quarta linhagem foi construída pela inserção dos genes do complexo enzimático piruvato desidrogenase, juntamente com os genes de produção de ramnose e ramnolipídeo. Essa levedura teve seu perfil cinético analisado, não tendo uma velocidade de crescimento estatisticamente diferente, mas com sua quantificação de ácidos graxos diminuída em 20% em relação à linhagem controle. Ademais, ao aferir a produção de ramnolipídeos dessa linhagem através da técnica de LC-MS, não foi possível constatar a produção desta molécula. Sendo assim, a maximização da produção de ácidos graxos se mostrou eficiente nas estratégias das linhagens EMB51 e EMB52, porém ao utilizar a expressão de genes codificantes de PDHc juntamente com os de produção de ramnolipídeo não mostraram eficiência para a produção e detecção desta molécula em *S. cerevisiae*.

Abstract

Surfactants are molecules used in the dispersion of soil and water contaminants. These molecules reduce water's surface tension by allowing immiscible phases to form an emulsion, aiding oil dispersion. Most of these surfactants are chemically synthesized, however, replacing these petrochemical dispersants with biosurfactants is advantageous because they are biodegradable and non-toxic molecules. Rhamnolipid biosurfactant is currently the most studied molecule. These are produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen with natural resistance to a large number of antibiotics and antiseptics. Thus, the staggering of production of rhamnolipids in *P. aeruginosa* is expensive because it requires numerous purification steps. Thus, the development of an organism from metabolic engineering can lead to the development of a clean technology, free of toxins and with lower purification processes. Aiming this, *S. cerevisiae* yeast stands out because it already is widely used in the food, chemical and medical industry, as it has Generally Regarded as Safe (GRAS) status and a wide variety of genetic tools available. To produce a rhamnolipid molecule it is necessary to produce 3-(hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acid (HAA) fatty acid and rhamnose sugar. To fulfill the HAA production step, three *S. cerevisiae* strains were constructed by diverting respiratory metabolism to fatty acid synthesis using the pYAC4 vector in its artificial chromosome configuration. The first constructed strain, named EMB51, contains the pyruvate dehydrogenase (PDHc) enzyme complex genes, the second, named EMB52, the acetyl-CoA Carboxylase (ACC) enzyme complex genes, and the third, named EMB53, the ACP-S-malonyl enzyme genes transferase, β -ketoacyl-ACP synthase, and β -ketoacyl reductase (Fab) which constitute half of the *de novo* fatty acid synthesis pathway. An empty plasmid control strain EMB50 was also constructed. These strains were confirmed by the transcription of their genes, analyzed in batch fermentation process and analyzed quantitatively and qualitatively for fatty acid production by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The strains also had their acetyl-CoA and malonyl-CoA compounds quantified by the mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC-MS) technique. These methodologies allowed the characterization of the strains. The EMB51 strain produced the most fatty acids, with an increase of 16% of the total. Its growth rate has also been altered by 25%. The EMB52 strain had its growth speed increased by 35%, in addition to a 6% increase in total fatty acids. The yeast EMB53 also had a growth speed 50% higher, but without alteration in the productive profile of fatty acids. Regarding the qualitative production of fatty acids, the EMB51 strain produced a greater amount of short-chain fatty acids (C₁₀-C₁₂), while the EMB52 and EMB53 strains had their production similar to the control strain. After finding that the EMB51 strain produced more fatty acids, especially C₁₀ and C₁₂, a fourth strain was constructed by inserting the enzyme pyruvate dehydrogenase complex genes, together with the rhamnose and rhamnolipid production genes. This yeast had its kinetic profile analyzed, not having a statistically different growth rate, but with its quantification of fatty acids decreased by 20% in relation to the control strain. Furthermore, when assessing the production of rhamnolipids from this strain using the LC-MS technique, it was not possible to verify the production of this molecule. Thus, the maximization of fatty acid production proved to be efficient for the strategies of the EMB51 and EMB52 strains, however, when using the expression of PDHc coding genes together with those of rhamnolipid production, they did not show efficiency for the production and detection of this molecule in *S. cerevisiae*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biossurfactantes

Biossurfactantes são uma classe de surfactantes produzidos por micro-organismos e plantas. Este grupo é muito diversificado, sendo formado de lipídeos ligados a domínios hidrofílicos. Como consequência de sua estrutura anfifílica, estes compostos tem as mesmas características gerais dos surfactantes químicos, reduzindo a tensão interfacial das substâncias, permitindo, por exemplo, a solubilização de substâncias hidrofóbicas em água (KUBICKI *et al.*, 2019). Na natureza, a biossíntese de substâncias anfifílicas como estas abre nichos ecológicos para micro-organismos explorarem diferentes habitats, por exemplo, podendo explorar substratos hidrofóbicos, possibilitando a motilidade, ou evitando competidores (RAAIJMAKERS *et al.*, 2010).

Biossurfactantes têm inúmeras vantagens em relação aos surfactantes de origem petroquímica, tais como serem produzidas através de fontes renováveis, possuírem alta degradabilidade no ambiente, terem tolerância à altas concentrações salinas, baixa toxicidade além de sua ação ser conservada em ampla faixa de temperatura e pH (MARCHANT; BANAT, 2012). Mais de 2000 estruturas distintas de biossurfactantes são atualmente conhecidas, abrangendo famílias quimicamente diferentes de compostos (lipídeos, proteínas e carboidratos), mas também grupos de congêneres, isto é, compostos estreitamente relacionados estruturalmente (HAUSMANN; SYLDATK, 2014). Esta diversidade estrutural de biossurfactantes implica uma grande variedade de propriedades biológicas e físico-químicas. As propriedades frequentemente destacadas dos biossurfactantes incluem baixas concentrações críticas de micelas (CMC), forte redução da tensão superficial, complexação de íons metálicos, bioatividades proeminentes e baixa eco toxicidade. Nesse sentido, um CMC baixo implica que tais biossurfactantes exerçam sua função em concentrações muito mais baixas do que muitos surfactantes produzidos quimicamente (BHADORIYA; MADORIYA, 2016).

Os biossurfactantes são potenciais substitutos dos surfactantes sintéticos em vários processos industriais. Estes processos podem envolver lubrificação, fixação de corantes, emulsões, estabilizações de dispersões, formação de espuma, indústria biomédica e farmacêutica e biorremediação de locais contaminados por produtos orgânicos e inorgânicos (REIS *et al.*, 2013). Outras atividades intrínsecas dessas moléculas envolvem

efeitos bactericidas, fungicidas (RANDHAWA; RAHMAN; SIEMANN-HERZBERG, 2014) e antitumorais (KUMAR; DAS, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo, aspectos ecológicos são considerados importantes, pois os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de recursos renováveis e exibem baixa eco toxicidade que, em conexão com sua degradabilidade biológica, previne o acúmulo ambiental (JOHANN *et al.*, 2016; POREMBA; GUNKEL, 2000)

Estas propriedades constituem a base do interesse pronunciado nesta classe de metabolitos para aplicações biotecnológicas, por exemplo, como detergentes, agentes de limpeza e emulsificantes. Até o momento, as pesquisas relacionadas ao acesso biotecnológico aos biossurfactantes têm se concentrado principalmente em micro-organismos isolados do solo, predominantemente de *Bacillus*, *Pseudomonas* ou leveduras, como *Candida antarctica* e *Pseudozyma rugulosa* (AMARAL *et al.*, 2010; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

1.1.1 Classificação dos biossurfactantes

Biossurfactantes produzidos por micro-organismos podem ser classificados em duas categorias: Baixo peso molecular (LMW) e alto peso molecular (HMW) (RON; ROSENBERG, 2002). Dentro destas categorias, podemos diferenciar cinco grupos de acordo com sua natureza bioquímica sendo eles:

(1) Glicolipídios, são carboidratos ligados a ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxialifáticos por um grupo éster. Entre os glicolipídios, os mais conhecidos estão ramnolipídeos, trealolipídeos e soporolipídeos (MNIF; GHRIBI, 2016). Estes biossurfactantes LMW são reconhecidos por serem produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, *Torulopsis bombicol*, *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium sp* (SILVA *et al.*, 2014);

(2) Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídios, constituídos somente de ácidos graxos, ou formados de uma parte lipídica ligadas a grupos fosfato. Este grupo está presente na membrana celular, servindo também em funções biológicas como vesículas e lipossomas e enquadra, entre outros, ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídios (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006). Várias bactérias e leveduras produzem grandes quantidades de ácidos graxos e surfactantes fosfolipídicos durante o crescimento em alcanos e estes biossurfactantes são de grande interesse em aplicações médicas (GAUTAM; TYAGI, 2006). Relata-se, por exemplo, que a deficiência do complexo proteico fosfolipídico é a principal causa da falha respiratória em crianças prematuras sendo então o isolamento e clonagem

dos genes responsáveis por esse surfactante potenciais de serem estudados e empregados em sua produção fermentativa. Estas moléculas LMW são notoriamente produzidas pelos organismos *Corynebacterium lepus*, *Nocardia erythropolis*, *Thiobacillus thiooxidans* (SILVA et al., 2014);

(3) lipopeptídeos e lipoproteínas, consistem em um lipídeo ligado a uma cadeia polipeptídica, podendo ser HMW e LMW (ROSENBERG; RON, 1999). Vários biossurfactantes desse tipo, como Viscosina, Serrawetina, Surfactina, Subtilisina, Gramicidina, e a Polimixina mostram ação antimicrobiana contra várias bactérias, algas, fungos e vírus, bem como propriedades antifúngicas (BESSON et al., 1976; SINGH; CAMEOTRA, 2004), sendo produzidos por *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus polymyxa* (SILVA et al., 2014);

(4) surfactantes poliméricos são cadeias de HMW constituídas de diversos tipos de cadeias químicas proteicas-sacarídicas-lipídicas, como Biodispersan e Liposan. Estes biossurfactantes tem ação eficaz na remoção de na água, mesmo em concentrações baixas (0,001-0,01%) (SARAVANAN, 2015) e são produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus* e *Candida lipolytica*

Os grupos apresentados acima têm diferentes características de interação biológica, com propriedades distintas devido às diferentes composições bioquímicas das partes hidrofóbicas e hidrofílicas de suas cadeias.

1.1.3 Ramnolipídeos

Dentre os biossurfactantes de maior interesse comercial, os ramnolipídeo se destacam pois tem atividade semelhante aos surfactantes petroquímicos comerciais, mas com reduzida toxicidade e maior biodegradabilidade. (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Essas moléculas são surfactantes do tipo glicolipídio e foram primeiramente descritas em 1949 (JARVIS; JOHNSON, 1949). Os ramnolipídeos foram nativamente detectados na bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (DOBLER et al., 2017) mas pesquisas posteriores mostraram que esse organismo não é o único a produzir essas moléculas. Os ramnolipídeos são produzidos por vários gêneros e espécies de procariotos, como *P. fluorescens* (EL-AMINE BENDAHA et al., 2012), *P. putida* (TULEVA; IVANOV; CHRISTOVA, 2002), *Serratia rubideae* (NALINI; PARTHASARATHI, 2014), *P. Chlororaphis* (GUNTHER IV et al., 2005), *Bacillus Pseudomallei* (DUBEAU et al., 2009), *Bacillus kururiensis* (TAVARES et al., 2013) e *Acinetobacter calcoaceticus* (PRIJI et al., 2017). Não obstante, a *P. aeruginosa* é considerada

um organismo modelo para a produção de ramnolipídeos, tendo seu genoma sequenciado e enzimas bem estudadas (CHONG; LI, 2017).

Estas moléculas são formadas pelo desoxiaçúcar ramnose (dTP-L-Rha), de caráter polar, e pelo ácido 3-(hidroxialcanoiloxi)alcanóico (3-HAs), de caráter apolar. . Em termos de variedade de moléculas produzidas, o composto produzido por essas vias contendo uma cadeia de ramnose e ligada à um HAA é denominada mono-ramnolipídeo, enquanto a versão do composto contendo duas cadeias de ramnose e um HAA é denominada di-ramnolipídeo. A via de produção das moléculas de ramnolipídeo em *P. aeruginosa* pode ser visualizada **Figura 1**.

A via biossintética do dTP-L-ramnose consiste na conversão do composto glicose-1-fosfato em dTDP-L-ramnose através do operon *rmLBDAC*, que codifica quatro enzimas que atuam em sequência. A primeira enzima *RmLA* catalisa a reação de conversão da glicose-1-fosfato em dTP-D-glicose, seguida da ação de *RmLB*, que converte a dTP-D-glicose em dTP-4oxo-6-deoxi-D-glicose. Essas reações enzimáticas são seguidas da ação de *RmLC*, que usa dTP-4oxo-6-deoxi-D-glicose e a converte em dTP-4-oxo-6-deoxi-D-manose. Finalmente, esse composto é convertido em dTP-L-ramnose pela enzima *RmLD* (**Figura 1**) (RIKALOVIC; VRVIC; KARADZIC, 2015).

Uma vez sintetizada a dTP-L-ramnose, essa é transferida para o 3-HAs, reação catalisada por uma ramnosiltransferase específica, provindas do operon *rhlAB* (CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006). Neste operon estão os genes codificantes das enzimas que atuam na síntese da porção lipídica da molécula. A enzima *RhlA*, codificada pelo gene *rhlA* deste operon, é uma enzima ligada à membrana e sintetiza o componente 3-(3-hidroxialcanoiloxi)-alcanoato (HAA). Esse componente lipídico é gerado utilizando intermediários β -hidroxiacil-ACP, desviado diretamente da síntese de ácidos graxos (ZHU; ROCK, 2008). O gene *rhlB*, codifica a enzima *RhlB*, uma unidade que catalisa a ligação de uma molécula de dTP-L-ramnose ao HAA por uma ligação O-glicosídica. Esta reação gera uma molécula de mono-ramnolipídeo (OCHSNER *et al.*, 1995; ZHU; ROCK, 2008). Uma segunda ramnosiltransferase é codificada pelo gene *rhlC* e converte moléculas de mono-ramnolipídeo em di-ramnolipídeo por meio da adição de outra unidade do açúcar dTP-L-ramnose, por uma ligação α -1,2-glicosídica (OCHSNER *et al.*, 1995).

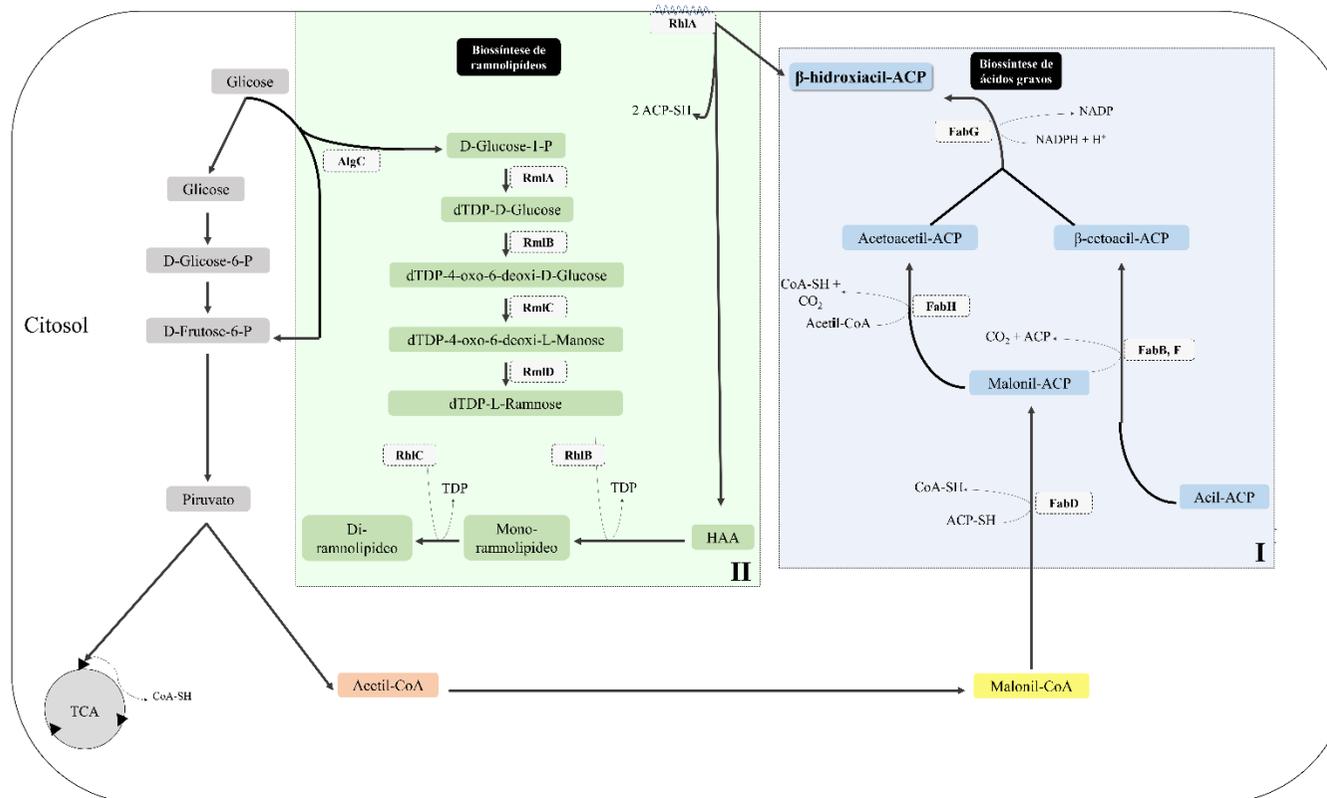


Figura 1. Via metabólica de produção de ramnolipídeos pelo procaríoto *Pseudomonas aeruginosa*. Nesta via, a glicose é internalizada e convertida em glicose-1-fosfato pela enzima AlgC para a entrada na via de biossíntese de ramnose. A partir desta conversão, as enzimas RmlA, RmlB, RmlC e RmlD fazem a conversão dessa glicose em dTDP-L-ramnose. Paralelamente, a glicose-6-fosfato é catalisada através das enzimas da via glicolítica gerando piruvato. Este piruvato segue para dois destinos: O ciclo do ácido cítrico, sendo utilizado na respiração celular, ou sua conversão em acetil-CoA citoplasmático. O acetil-CoA citoplasmático é convertido em malonil-CoA e é direcionado para a biossíntese dos ácidos graxos. Dentro dessa via anabólica, o intermediário β-hidroxiacil-ACP, em especial o β-hidroxidecanoil-ACP (C₁₀) é utilizado pela enzima ligada à membrana RhlA para a síntese de 3-(hidroxialcanoiloxi)alcanóico (HAA), que terá adicionado à sua cadeia uma molécula de dTDP-L-ramnose pela enzima RhlB formando mono-ramnolipídeo e outra molécula desse mesmo açúcar pela enzima RhlC, formando di-ramnolipídeo.

O tamanho da cadeia lipídica ligada à ramnose em uma molécula de ramnolípido é determinada pela afinidade da enzima RhlA. No organismo *Pseudomonas aeruginosa*, modelo de produção dessas moléculas, essa enzima tem maior afinidade pela cadeia de β -hidroxidecanoil-ACP, convertendo-a e sintetizando através dela a molécula β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato. Isto gera uma predominância no perfil de produção de ramnolípido de moléculas com configuração de 10 carbonos em sua parte apolar. Outras cadeias também podem ser sintetizadas através da reação desta enzima, porém em menor quantidade (PERFUMO *et al.*, 2006).

Dentro de seu aspecto de utilização, os ramnolípidos, são moléculas aprovadas pela Agência Americana de regulamentação de alimentos e medicações (FDA) e, sendo assim, já possuem aplicações na indústria alimentícia. Esta regulamentação se deve principalmente às suas proeminentes atividades antimicrobianas, antiadesivas e emulsificantes, bem como por satisfazerem muitas necessidades industriais, como por não se ligarem ou desnaturarem algumas das principais enzimas utilizadas em processos (MADSEN *et al.*, 2015; WITTEGENS *et al.*, 2011a).

A principal preocupação para a aplicação comercial e a produção em larga escala de ramnolípidos são seus baixos rendimentos e altos custos de produção, que são devidos aos tipos metodológicos de bioprocessamento disponíveis, a necessidade de usar substratos caros e a ineficientes linhagens não-patogênicas produtoras desta molécula (CHONG; LI, 2017).

Não obstante, apesar dessas aparentes condições desfavoráveis, o mercado global de ramnolípidos vem crescendo. Em setembro de 2014, a *AGAE Technologies LLC*[®] (EUA) lançou sua linha de produtos ramnolípídicos com 98%, 95% e 90% de pureza na composição. Também em 2014, a *Logos Technologies* lançou seu biossurfactante baseado em ramnolípidos sob a marca *NatSurFact*[®] destinada à aplicação em indústrias, além de cuidados domésticos e pessoais. Estima-se que o mercado de ramnolípidos atualmente seja de USD2.2 bilhões (dados de 2018 da empresa *Grand View Research*)

Visto a crescente aplicação de glicolípídios em produtos de cuidados pessoais, outros mercados também têm mostrado crescente interesse nessas moléculas devida à suas propriedades de saponificação. Dentro deles, temos por exemplo, o aumento da implantação de surfactantes ambientalmente seguros na indústria de limpeza, a crescente aplicação de produtos químicos baseados em ramnolípidos na indústria de processamento de alimentos,

além do interesse em seu uso na biorremediação de áreas afetadas por derramamentos de óleo (RANDHAWA; RAHMAN; SIEMANN-HERZBERG, 2014).

Assim, atualmente as pesquisas científicas estão focadas em diminuir custos de substrato, aumentar parâmetros fermentativos (ex., rendimento e produtividade) na produção heteróloga de ramnolipídeos e ser capaz de produzir este composto de forma mais sustentável e competitiva (BAHIA *et al.*, 2018; CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006; CHRISTOVA *et al.*, 2016; EL-AMINE BENDAHA *et al.*, 2012; GUNTHER IV *et al.*, 2005).

1.2 ENGENHARIA METABÓLICA DE MICRO-ORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE RAMNOLIPÍDEOS

Quando se trata da produção de um composto de interesse, dificilmente é encontrado um micro-organismo que reúna todas as características essenciais para uma produção economicamente viável. Em alguns casos, é determinante o uso de engenharia metabólica, visando modificar ou adicionar vias metabólicas totalmente novas em um organismo alvo com o objetivo de maximização ou de obtenção de determinado produto (ZHANG; RODRIGUEZ; KEASLING, 2011).

Diversos micro-organismos já tiveram seu metabolismo modificado para a produção de ramnolipídeos (CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006; DOBLER *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2014; NORDIN *et al.*, 2013; OCHSNER *et al.*, 1995) sendo a transferência dos genes para outros micro-organismos é uma estratégia com potencial de auxiliar no escalonamento da produção de ramnolipídeos. Alguns exemplos de micro-organismos modificados para produção de ramnolipídeos são: *Pseudomonas putida*, expressando genes de *P. aeruginosa* (WITTGENS *et al.*, 2011b), *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* superexpressando genes nativos de produção destas moléculas (HOŠKOVÁ *et al.*, 2013) e *Burkholderia thailandensis* com enzimas nativas de *P. aeruginosa* (DÍAZ DE RIENZO; KAMALANATHAN; MARTIN, 2016). O maior rendimento reportado até o momento para linhagens recombinantes é de 0,23 Cmol ramnolipídeos/Cmol substrato (onde Cmol é o número de mols de carbono por mols da molécula em questão) por *Pseudomonas putida* utilizando glicose como substrato, abaixo do rendimento de 0,33 Cmol ramnolipídeos/Cmol substrato atingido por *P. aeruginosa* (WITTGENS *et al.*, 2011a). A **Tabela 1**. Organismos heterologicamente modificados para produção de ramnolipídeos. lista os principais organismos modificados geneticamente para a produção de ramnolipídeos, seu rendimento

em Cmol/Cmol e produção obtido em gramas de ramnolipídeos por litro de meio de cultura (gRhl/L).

Tabela 1. Organismos heterologamente modificados para produção de ramnolipídeos.

Organismo	Modificações genéticas	Rendimento por carbono (Cmol/Cmol)	Produção (gRhl/L)	Referência
<i>P. putida</i> KT2440	Introdução do operon RhlAB de <i>P. aeruginosa</i>	0.23	1.50	(WITTGENS <i>et al.</i> , 2011b)
<i>E. coli</i> TnERAB	Introdução do operon RhlAB e RmLBCAD de <i>P. aeruginosa</i>	0.07	0.18	(WANG <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. fluorescens</i>	Introdução do operon RhlAB de <i>P. aeruginosa</i>	0.02	0.25	(OCHSNER <i>et al.</i> , 1995)
<i>E. coli</i> DH5 alfa	Introdução do operon RhlAB de <i>P. aeruginosa</i>	0.01	0.02	(OCHSNER <i>et al.</i> , 1995)
<i>P. oleovorans</i>	Introdução do operon RhlAB de <i>P. aeruginosa</i>	0	0	(OCHSNER <i>et al.</i> , 1995)

Neste sentido, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* aparece como uma alternativa para a produção de ramnolipídeos, uma vez que sempre foi amplamente utilizada pelo homem na produção de diversos compostos de valor agregado, sendo um organismo modelo neste quesito. Frente às linhagens bacterianas utilizadas para produção de compostos, esta levedura tem as vantagens de: (i) Possuir status GRAS sendo reconhecida por ser segura de se trabalhar, além de ter o processo de descarte de seus resíduos mais simplificado, bem como aprovação de produtos e processos.; (ii) resistência a baixo pH e (iii) tolerância a inibidores fermentativos, como em biomassa hidrolisada (VALLE-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Além disso, a *S. cerevisiae* tem sua genética bem estudada, ferramentas de modificações genéticas estabelecidas e processos industriais bem protocolados, o que leva a uma grande aceitação dessa levedura no estabelecimento de novos bioprocessos.

1.2 METABOLISMO DE CARBOIDRATO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A glicose é o carboidrato de principal fonte de energia da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Embora as células de levedura possam utilizar uma ampla gama de fontes de carbono, a presença de glicose suprime as atividades moleculares envolvidas no uso de fontes alternativas de carbono, além de reprimir a respiração, reação denominada Efeito Crabtree (KAYIKCI; NIELSEN, 2015).

O metabolismo de hidrólise da glicose (glicólise) se dá em etapas, e se dispõe em dez reações enzimáticas, como descrito a seguir (NELSON; COX; LEHNINGER, 2017).

1. fosforilação da glicose na posição 6 pela enzima hexoquinase (E.C. 2.7.1.1,2.7.1.2)
2. a conversão da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato pela enzima fosfohexose isomerase (E.C. 5.3.1.9),
3. fosforilação da frutose-6-fosfato em 1,6-bifosfato pela enzima fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11),
4. a clivagem da frutose-1,6-bifosfato pela enzima aldolase (E.C. 4.1.2.13). Isso produz dois produtos diferentes, fosfato de di-hidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato,
5. a isomerização do fosfato de di-hidroxiacetona a uma segunda molécula de gliceraldeído-3-fosfato pela enzima fosfato triose isomerase (E.C. 5.3.1.1),
6. desidrogenação e fosforilação concomitante do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bis-fosfoglicerato pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (E.C. 1.2.1.9),
7. a transferência do grupo 1-fosfato do 1,3-bi-fosfoglicerato para um ADP pela enzima fosfoglicerato-quinase, produzindo ATP e 3-fosfoglicerato,
8. isomerização do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato pela enzima fosfoglicerato mutase (E.C. 5.4.2.1),
9. a desidratação do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato pela enzima enolase (E.C. 4.2.1.11) e, finalmente,
10. a transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP pela enzima piruvato quinase (E.C. 2.7.1.1), a fim de produzir uma segunda molécula de ATP.

O piruvato formado através deste processo tem diferentes destinos celulares, primeiramente, no citosol, o mesmo pode ser convertido em etanol através da enzima piruvato descarboxilase (E.C. 4.1.1.1) e álcool desidrogenase (E.C. 1.1.1.1). Este é um dos destinos mais utilizados pela levedura no catabolismo dessa molécula (DE JONG *et al.*, 2014).

O piruvato também pode ser convertida em acetato pela ação da enzima piruvato descarboxilase e da enzima aldeído desidrogenase (E.C. 1.2.1.5). O acetato gerado pode ainda ser convertido em acetil-CoA pela enzima acetil-CoA sintetase, indo a partir daí para a via de biossíntese de ácidos graxos.

Outro destino celular dessa molécula é a via do ácido cítrico dentro da mitocôndria, sendo então catabolizado no processo de respiração celular. Para esta finalidade, o piruvato é importado para dentro da matriz mitocondrial através das enzimas transmembrana mitocondriais carreadoras de piruvato MPC1, MPC2 e MPC3, codificadas pelos genes *mpc1*, *mpc2* e *mpc3* (BENDER; PENA; MARTINO, 2015). Finalmente, este piruvato pode ser desviado para a via de síntese de glicina, treonina e serina, participando da síntese dessas moléculas (NELSON; COX; LEHNINGER, 2017).

Paralelamente a glicólise, pode ser biossintetizado o composto glicose-1-fosfato a partir da glicose-6-fosfato e da β -D-glicose. Isso se dá por intermédio da ação da enzima fosfoglucomutase (E.C. 5.4.2.2) e essa molécula pode ser convertida em glicose difosfato de uridina, gerando uma molécula de UDP (Uridine diphosphate) pela enzima uridinafosfogluose pirofosforilase (E.C. 2.7.7.9). Em *S. cerevisiae*, a glicose-1-fosfato está envolvida na via do metabolismo do açúcar aminado (um monossacarídeo em que um dos grupos hidroxila é substituído por um grupo amina) e de metabolismo de açúcares nucleotídicos, como a via das pentoses (AIELLO *et al.*, 2002, Yeast Metabolome Database, acessado em 12/12/2019 [<http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00288>]). Todas as vias discutidas acima podem ser visualizadas na **Figura 2**.

derivados da via glicolítica (acetil-CoA, malonil-CoA) e energia (ATP, NADPH) para formação destas cadeias e o acúmulo dessas moléculas pela levedura depende principalmente de sua fisiologia, da limitação de nutrientes e de outras condições ambientais, tais como temperatura e pH. Este acúmulo também é afetado pela produção de metabolitos pelo micro-organismo, tais como citrato e etanol (BEOPOULOS et al., 2009).

A síntese de uma cadeia de ácido graxo a partir da glicose começa com a oxidação dessa molécula a piruvato e sua conversão à acetil-CoA, que é um composto com vários destinos e funções celulares. Este composto tem sua síntese em quatro localizações celulares: mitocôndria, núcleo, peroxissomo e citoplasma. Nestes ambientes celulares, esta molécula é utilizada em reações de oxidação, no caso da mitocôndria, acetilação de histonas no núcleo, no ciclo do glioxilato no peroxissomo e na síntese de ácidos graxos e aminoácidos (glicina, treonina e serina) no citosol (HU et al., 2019). Em se tratando de biossíntese de ácidos graxos, esta ocorre quase exclusivamente no citosol e suas fontes de acetil-CoA são a enzima piruvato descarboxilase (PDC, EC 4.1.1.1) que converte piruvato em acetaldeído e estimula seu influxo de carbono a ser convertido em acetil-CoA, e por meio da mitocôndria na forma de citrato. Este acetil-CoA é então convertido em malonil-CoA, o substrato de alongação, sintetizado a partir da carboxilação de acetil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.2) contendo biotina e um bicarbonato de sódio como cofatores (HU et al., 2019).

A cadeia nascente de ácidos graxos é prolongada por dois carbonos de cada vez pela adição de um grupo malonil-CoA. Cada ciclo de alongação na biossíntese de ácidos graxos envolve 5 reações com as seguintes atividades enzimáticas: malonil transferase (EC: 2.3.1.39), cetoacil sintase (EC: 2.3.1.41), cetoacil redutase (EC: 1.1.1.100), 3-hidroxiacil desidratase (EC : 4.2.1.58, 4.2.1.59 e 4.2.1.61) e enoil-acil-redutase (EC: 1.3.1.10). Na levedura, a biossíntese de ácidos graxos é finalizada com a liberação de acil-CoAs graxos da sintase dos ácidos graxos (FAS), o complexo enzimático que realiza a biossíntese de ácidos graxos *de novo* nesse organismo. Os acil-CoAs liberados são então convertidos em produtos, tais como FFAs (ácidos graxos livres, do inglês *free fatty acids*), álcoois graxos, e FAEEs (Ésteres etílicos de ácidos graxos) pelas enzimas correspondentes. Os ácidos graxos de cadeia C16 (ácido palmítico) e C18 (ácido oleico) são os principais produtos da levedura, enquanto cadeias com 14 carbonos e menores são produzidas apenas em pequenas quantidades (YU et al., 2018).

Em relação à FAS, fungos possuem FAS tipo I, que são proteínas multifuncionais grandes que contêm todos os domínios catalíticos ativos necessários para a biossíntese de ácidos

graxos dentro de domínios em um único polipeptídio (alfa) ou em dois polipeptídios (alfa e beta). As FAS fúngicas são heterododecâmeros alfa-6-beta-6, e as etapas de quebra do carboidrato glicose até síntese de ácidos graxos a partir da conversão de acetil-CoA em malonil-CoA podem ser visualizadas na **Figura 3**.

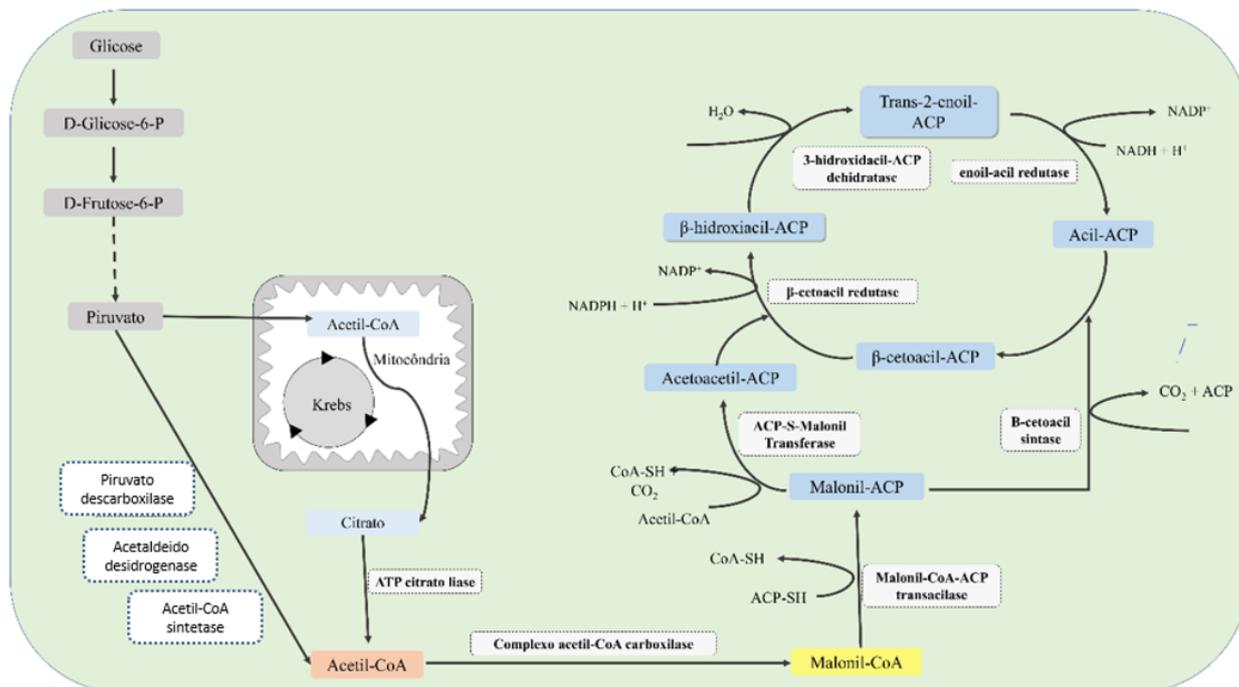


Figura 3. Etapas em detalhe da síntese de ácidos graxos em levedura. Primeiramente o composto acetil-CoA citosólico advindo da glicólise é convertido em malonil-CoA pelo complexo acetil-CoA carboxilase. Esse composto é então convertido pela atividade enzimática da malonil-CoA transacilase, que converte esse composto em malonil-ACP. Em seguida, utilizando um acetil-CoA e um malonil-ACP como substrato, a enzima ACP-S-malonil transferase sintetiza o composto acetoacetil-ACP que será utilizado pela enzima β-cetoacil redutase, juntamente com o composto β-cetoacil-ACP para sintetizar um β-hidroxiacil-ACP. Continuando o ciclo, a enzima, 3-hidroxiacil desidratase utilizará o β-hidroxiacil-ACP e o converterá em trans-2-enoil-ACP, que em seguida gerará uma cadeia acil-ACP através da ação da enzima enoil-acil-redutase.

É importante notar, no entanto, que no contexto de quantificação da produção de ácidos graxos da *S. cerevisiae*, esta não é uma levedura oleaginosa, produzindo pouco dessas moléculas, acumulando cerca de 5 a 6% do peso seco celular (DCW) dessas moléculas (NIELSEN, 2014). Dessa forma, os níveis destes compostos são muito baixos para a produção considerável de compostos derivados dessa via (LIAN *et al.*, 2014; NIELSEN, 2014).

Neste sentido, para a produção de compostos derivados de ácidos graxos, a via de biossíntese destes ácidos deve ter esforços predominantes que visem a melhoria do suprimento de precursores citosólicos, acetil-CoA, malonil-CoA, visto que os mesmos são

gargalos metabólicos para a produção de ácidos graxos (KRIVORUCHKO *et al.*, 2015; RUNGUPHAN; KEASLING, 2013).

Além disso, as cadeias de acil-CoA necessárias à síntese de ácidos graxos não é suficiente em *S. cerevisiae* para a produção de compostos derivados dessa via com rendimentos e produtividades adequados (DE JONG *et al.*, 2015), e estes compostos também devem ter seu fluxo de carbono maximizado para a produção de derivados de sua via (CHEN; SIEWERS; NIELSEN, 2012; SHI *et al.*, 2014; SHIBA *et al.*, 2007).

1.3.4 Via de beta oxidação

A via de β -oxidação para degradação de ácidos graxos em *Saccharomyces cerevisiae* ocorre nos peroxissomas e é bem documentada (CHEN *et al.*, 2014; HILTUNEN *et al.*, 2003), sendo descrita segundo os passos abaixo e podendo ser visualizada na **Figura 4**.

1. O primeiro passo para a degradação dos ácidos graxos consiste na oxidação das cadeias acil-CoA catalisada pela enzima acil-CoA oxidase (POX₁) através da utilização de uma molécula de peróxido de hidrogênio e gerando o substrato trans-2-enoil-CoA.
2. No segundo passo, uma hidratação é feita nesta molécula, catalisada pela enzima enoil-CoA hidratase (FOX₂) através da utilização de uma molécula água e gerando uma molécula de 3-hidroxiacil-CoA.
3. O terceiro passo consiste desidrogenação deste hidroxiacil-CoA pela enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (FOX₂) utilizando-se um NAD⁺.
4. O quarto passo é catalisado pela 3-cetoacil-CoA-tiolase (POT₁), liberando uma molécula de acetil-CoA e molécula de acil-CoA encurtada em 2 átomos de carbono. Esta molécula de acetil-CoA segue para fora do peroxissomo, ao passo que a molécula de acil-CoA encurtada entra em um novo ciclo de redução.

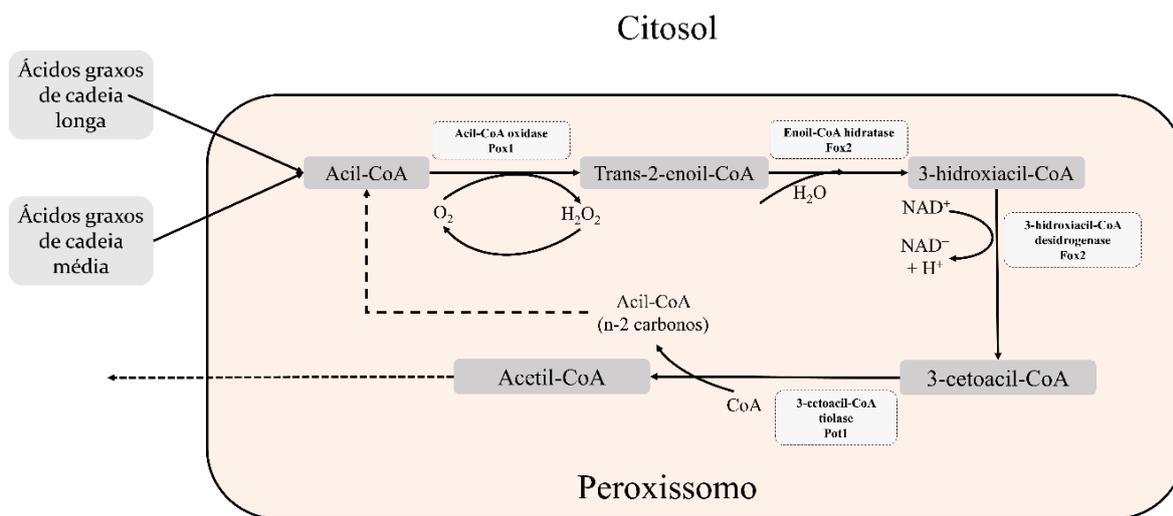


Figura 4. Via metabólica da β -oxidação em *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando o ciclo de oxidação, hidratação, desidrogenação e clivagem dos ácidos graxos, bem como saída do acetil-CoA para o citosol.

1.4 ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA PARA AUMENTO DE PRECURSORES PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

1.4.1 Acetil-CoA

Uma vez que os ácidos graxos são sintetizados em grande parte no citosol de *S. cerevisiae*, esta utiliza a via piruvato-acetaldeído-acetato para produzir o acetil-CoA citosólico utilizado em sua síntese (CHEN *et al.*, 2013; CHEN; SIEWERS; NIELSEN, 2012). Esta via utiliza ATP e a é fortemente controlada (PFEIFFER; MORLEY, 2014), limitada em condições de glicose baixa (CHEN *et al.*, 2013) no que é similar à produção de acetil-CoA em procariotos (CRONAN; WALDROP, 2002).

Nesse contexto, o acetil-CoA é um precursor particularmente importante dentro da célula, uma vez que dele pode ser derivada uma gama de diferentes produtos químicos, conforme listado abaixo.

- Poli-hidroxibutiratos; biopolímeros com diferentes aplicações,
- 1-Butanol; utilizado principalmente como biocombustível,
- Isoprenóides; que formam uma classe muito ampla de produtos, podendo ser utilizados como biocombustíveis ou mesmo fármacos. O medicamento antimalárico ácido

artemisínico, perfumes e fragrâncias como o santaleno e alguns ingredientes nutracêuticos como o caroteno e licopeno podem ser citados como exemplo de derivados dessa molécula,

- Esteróis; podem ser utilizados como suplementos dietéticos, fármacos para, por exemplo, colesterol e moléculas com potencial anticâncer,

- Polifenóis, uma outra classe muito ampla de compostos, que podem ser utilizados como antioxidantes e ingredientes nutracêuticos, por exemplo, resveratrol e uma gama de flavonóides,

- Alcanos/alcenos que podem ser utilizados como biocombustíveis avançados, por exemplo, diesel para caminhões e aviões.

A produção de acetil-CoA em suas localizações celulares distintas pode ser visualizada na **Figura 5**.

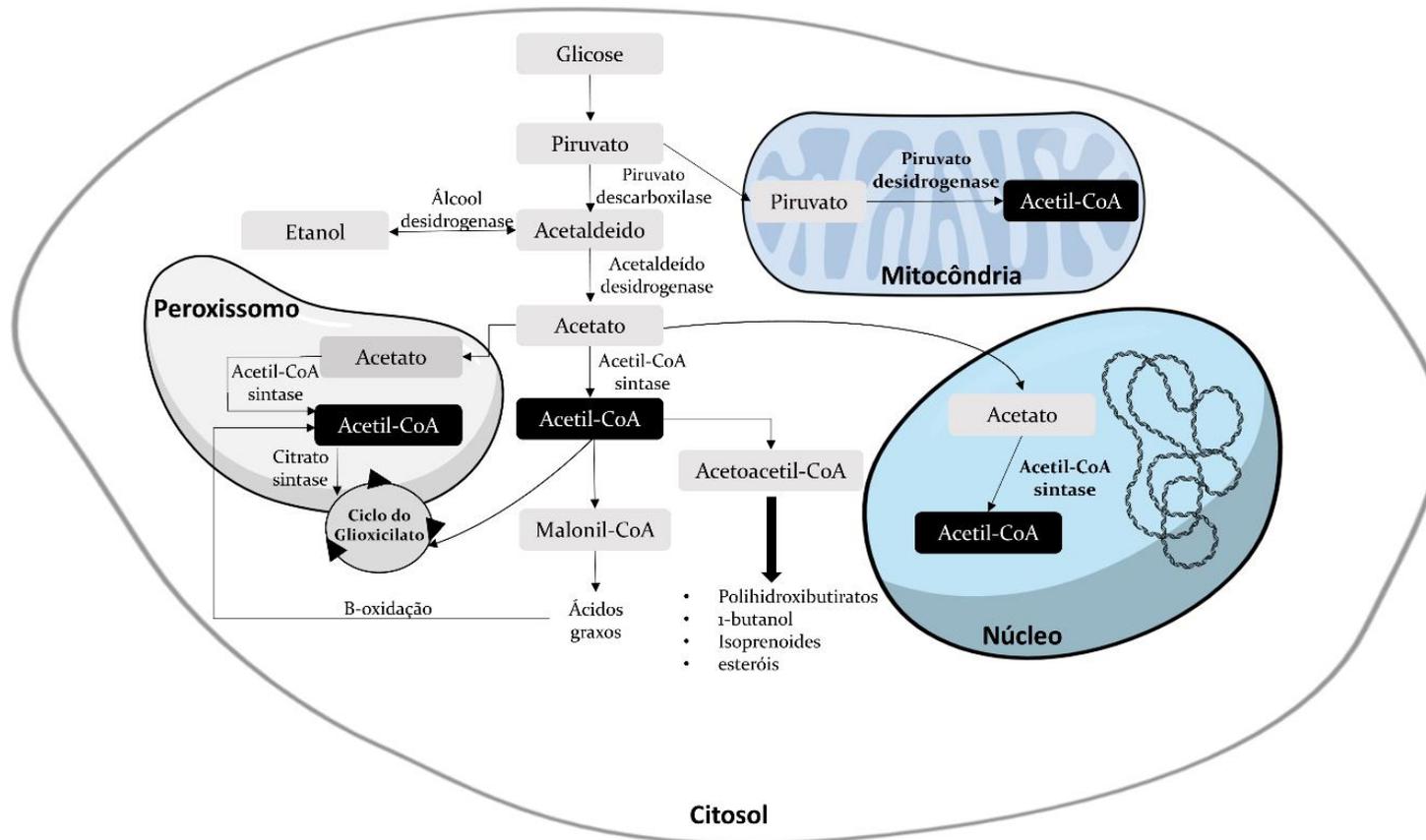


Figura 5. Visão geral do metabolismo da acetil-CoA em *Saccharomyces cerevisiae*. A glicose é convertida em piruvato na glicólise e entra na mitocôndria para o ciclo do ácido cítrico. Dentro dela o piruvato é convertido em acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase. No citosol, o piruvato pode ser convertido em acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase (PDC), e o acetaldeído pode ainda ser convertido em etanol pela enzima álcool desidrogenase, ou em acetato pela enzima aldeído desidrogenase. O acetato citoplasmático pode ser importado ao núcleo e ao peroxissomo e, em ambos os compartimentos, assim como no citosol, pode ser convertido em acetil-CoA pela acetil-CoA sintetase. No núcleo, o acetil-CoA é usado para a acetilação de histonas, enquanto no peroxissomo, pode ser catabolizado pelo no ciclo do glicoxilato ou exportado ao citoplasma após a β-oxidação. O acetil-CoA citosólico é utilizado para a biossíntese de lipídios e aminoácidos e muitos produtos biotecnológicos valiosos podem ser derivados desse precursor.

Neste sentido, em *S. cerevisiae*, a conversão do acetato para acetil-CoA é considerada um passo limitante para síntese de acetil-CoA citosólico, devido à inibição de retroalimentação na acetil-CoA sintase (*acsI*) e à exigência de entrada de ATP como fator energético nessa enzima (LIAN *et al.*, 2014), tendo esta enzima como mecanismo a entrada de acetato e ATP, com geração de acetil-CoA, AMP e dois grupos fosfato (pi) liberados. Como a quantidade de acetil-CoA citosólico é muito limitada, o metabolismo central da levedura deve ser projetado para redirecionar o fluxo metabólico para a biossíntese de acetil-CoA citosólico (KRIVORUCHKO *et al.*, 2015). Em estudos anteriores que visaram maximizar a quantidade de ácidos graxos, verificou-se que em deleções de álcool desidrogenases (ADH₁-ADH₄) em *S. cerevisiae*, o nível de acetil-CoA citosólico aumentou cerca de 2 vezes (LIAN *et al.*, 2014). Num outro estudo, foi conseguida uma melhoria de 1,9 vezes na produção de ácidos graxos por eliminação de ADH₁ neste mesmo organismo (LI *et al.*, 2014). Numerosas vias heterólogas, incluindo piruvato-formiato liase (PFL) (KOZAK *et al.*, 2014), Ferredoxina oxidoreductase (PFO), NADP⁺ oxidoreductase (PNO), ambas dependentes de piruvato (INUI *et al.*, 1987), citrato liase dependente de ATP, acetilação de aldeído desidrogenase (A-ALD) (DE JONG *et al.*, 2015; SONDEREGGER; SCHÜMPERLI; SAUER, 2004) foram introduzidos em *S. cerevisiae* para aumentar o nível de acetil-CoA no citosol, levando à melhoria da produção de ácidos graxos em 1,17 vezes, produção de n-butanol em cerca de 3 vezes e produção de ésteres etílicos de ácidos graxos (do inglês FAEEs, *fatty acyl ethyl esters*) em 5,7 vezes. Trabalhos envolvendo a expressão de um complexo piruvato desidrogenase (PDHc) heterólogo, juntamente com a deleção do gene *acsI* mostraram que os níveis de acetil-CoA aumentaram, juntamente com seus derivados (KOZAK *et al.*, 2014). Além disso, a inativação das vias de consumo de acetil-CoA e a reciclagem de CoA-SH poderiam aumentar ainda mais a atividade de biossíntese de lipídeos, desde que sem prejuízo ao metabolismo da levedura.

1.4.2 Malonil-CoA

Outro precursor chave na síntese de ácidos graxos, o malonil-CoA, é catalisado a partir de acetil-CoA via complexo enzimático da acetil-CoA carboxilase (ACCC), que em *S. cerevisiae* é codificada pelo gene ACC1. Este é o primeiro passo na biossíntese de lipídeos e é bem conhecido como o passo de limitação de velocidade (LI *et al.*, 2014; RUNGUPHAN; KEASLING, 2014a; ZHOU *et al.*, 2014). Essa enzima é inibida em *S. cerevisiae* na presença de ácidos graxos, bem como por precursores lipídicos, inositol (vitamina B) e colina, e também controlado por fatores reguladores INO₂, INO₄ e OPI₁. Os dois primeiros fatores citados são ativadores da síntese de fosfolipídios e o terceiro um repressor da mesma via.

Em estudos ao superexpressar os genes nativos dos complexos enzimáticos ACCc e FAS em *S. cerevisiae*, a produção de FFAs atingiu uma produção de aproximadamente 400 mg/L, uma produção de álcoois graxos de aproximadamente 100 mg/L e de FAEEs de aproximadamente 5 mg/L, todos vindo diretamente de açúcares simples (RUNGUPHAN; KEASLING, 2014). Além da superexpressão de ACC₁, a síntese direta de malonil-CoA a partir de malonato pela malonil-CoA sintetase (MCS) pode também conduzir a níveis maiores de malonil-CoA. A superexpressão de um gene de malonil-CoA sintetase (MCS) de planta (AAE13) em *S. cerevisiae* resultou em aumentos de 1,6 e 2,4 vezes em acúmulo de lipídeos e resveratrol simultaneamente quando malonato foi adicionado ao meio (WANG; CHEN; YU, 2014). Neste sentido, a suplementação com malonato e expressão de MCS pode ser uma maneira de melhorar o nível de malonil-CoA em levedura. Vale notar, no entanto, como os próprios autores abordam, que a fim de alcançar a produção econômica de derivados de ácidos graxos, o alto custo do malonato (aproximadamente US\$ 8000/t) deve ser levado em consideração.

1.4.3 Cadeias de acil-CoA

Além de acetil-CoA e malonil-CoA, outro precursor importante para sintetizar biocombustíveis derivados de ácidos graxos é a própria síntese de cadeias de acil-CoA. Em um estudo, para melhorar os níveis de acil-CoA, o ciclo de β -oxidação concorrente à produção de cadeias acil-CoA foi interrompido em *S. cerevisiae* por deleção da enzima chave da via PXA₂ que codifica um componente chave do transportador peroxissomal, e POX₁, que codifica a primeira enzima na via de oxidação. A interrupção do ciclo de β -oxidação não conseguiu melhorar a produção de álcoois graxos e FAEEs, tendo inclusive diminuído essa quantidade em relação à controle (RUNGUPHAN; KEASLING, 2014a). No entanto, combinando a estratégia de interromper o transporte de acil-CoA para a via de β -oxidação, evitando a biossíntese de triacilgliceróis e utilizando condições de cultura de limitação de nitrogênio para impulsionar o carbono para a produção de acil-CoA graxo, as associações de acil-CoA citosólicas aumentaram a biossíntese de FAEEs, levando a mais de 25 mg/L, uma melhoria de 40 % em relação aos relatórios anteriores (VALLE-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Outros trabalhos mostraram que é possível aumentar o conteúdo de ácidos graxos específicos com o auxílio de elongases com especificidade de tamanho de cadeia, como a enzima rELO₂ de *Mus musculus* que conferiu uma produção 3,2 vezes maior de ácido oleico (C₁₈) em *S. cerevisiae* (HISASHI YAZAWA, 2011).

1.5 ESTRATÉGIAS DE MAXIMIZAÇÃO DE PRECURSORES DA SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1.5.3 Estratégia *PDH-bypass* para maximização de acetil-CoA citosólico

O carbono utilizado para a produção de acetil-CoA em *S. cerevisiae* é derivado da glicose quando esta é convertida em piruvato pela via da glicólise tendo esta molécula destinos celulares discutidos no item 1.2.

Sendo assim, no citosol o piruvato pode ser convertido em acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase (PDC), e o acetaldeído pode ainda ser convertido em etanol pela enzima álcool desidrogenase, ou em acetato pela enzima aldeído desidrogenase. Este acetato citoplasmático pode ser importado ao núcleo e ao peroxissomo e, em ambos os compartimentos, assim como no citosol, tem sua conversão em acetil-CoA catabolizada pela enzima acetil-CoA sintetase. (HU *et al.*, 2019; NIELSEN, 2014).

Neste contexto, a via citosólica para síntese de acetil-CoA a partir do acetato requer o consumo de 2 ATPs, e o requerimento dessa molécula altamente energética em processos celulares para produção de composto de interesse pode ter impactos no rendimento de produtos (BRUINENBERG; VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1983; MINARD; MCALISTER-HENN, 2005). Como complicação adicional, quando há excesso de glicose no metabolismo da *S. cerevisiae*, há repressão da atividade do ciclo do ácido cítrico e do sistema respiratório pelo denominado efeito *Crabtree*. Nessas condições, a maioria do carbono é convertida em etanol, um subproduto indesejado para a produção dos muitos compostos derivados de acetil-CoA (DE JONG *et al.*, 2014; NIELSEN, 2014).

Dessa forma, pode parecer uma estratégia óbvia simplesmente eliminar a atividade de álcool desidrogenase para evitar a conversão de acetaldeído em etanol, mas a levedura contém um número muito grande de enzimas dessa família (6 no total, sendo duas citosólicas) e muitas das vias específicas de produtos podem também depender da atividade da ADH, por exemplo, butanol. Ademais, trabalhos que se utilizaram dessa metodologia mostraram que a levedura perde muito de sua capacidade de crescimento e metabolização (LI *et al.*, 2014). Em *S. cerevisiae*, a conversão do acetato para acetil-CoA também é considerada como uma etapa limitante na concentração de acetil-CoA citoplasmático devido à inibição de retroalimentação na enzima acetil-sintase (CHEN; SIEWERS; NIELSEN, 2012).

Neste contexto, a escolha de um método que não utilize energia, e nem seja inibido por retroalimentação, entra o complexo piruvato desidrogenase (PDH_c). Este complexo catalisa a descarboxilação oxidativa de piruvato para formar acetil-CoA sem utilização de ATP. Sua estrutura contém múltiplas cópias de três componentes enzimáticos codificados pelos genes *aceE*, *aceF* e *lpdG*, que codificam as três subunidades do complexo enzimático, sendo elas: E1 (EC 1.2.4.1) denominado piruvato desidrogenase E2 (EC 2.3.1.12), denominada dihidrolipoil-lisine-acetiltransferase e E3 (EC 1.8.1.4), denominada dihidrolipoil desidrogenase. Essas subunidades formam um heterohexâmero com simetria octaédrica com um núcleo composto de 24 subunidades E2 com subunidades E1 e E3 periféricas conectadas à sua superfície. Estes três componentes catalíticos funcionam sequencialmente, catalisando a descarboxilação oxidativa do piruvato com a formação de acetil-CoA, CO₂ e NADH (H⁺). O mecanismo de reação dessa enzima pode ser visualizado na **Figura 6**.

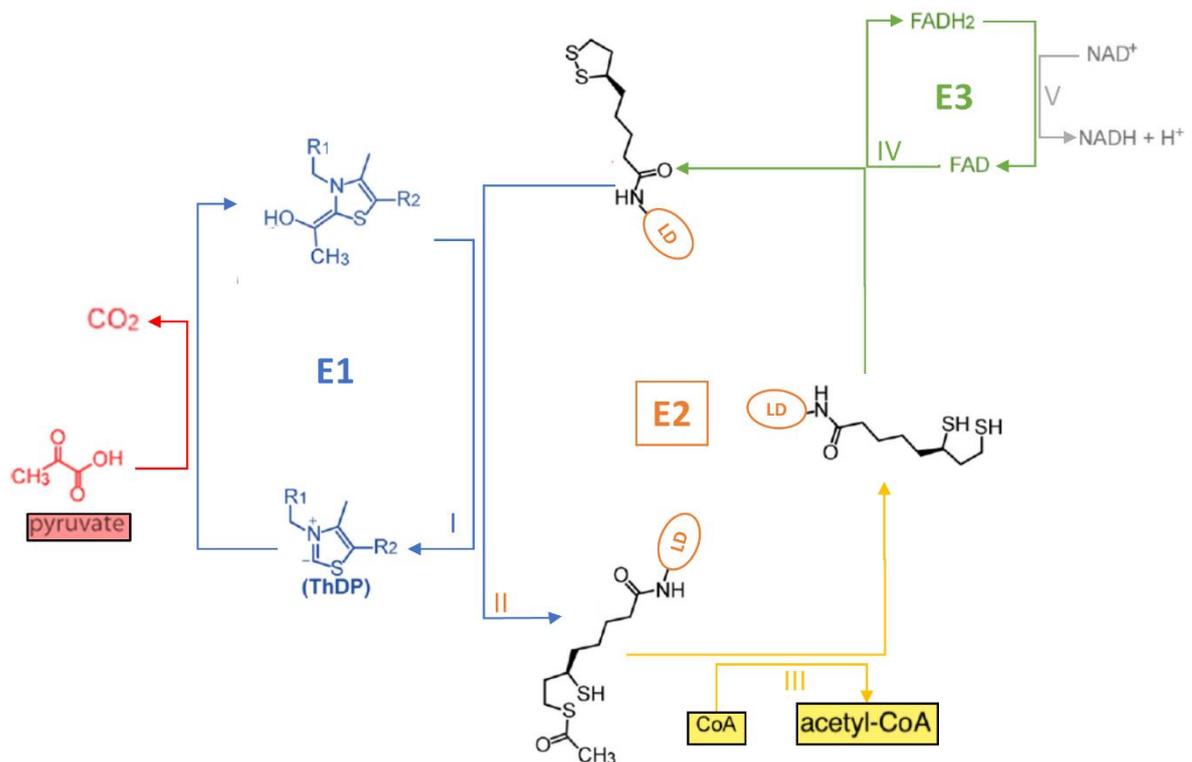


Figura 6. Mecanismo do complexo piruvato desidrogenase (PDH_c), que converte piruvato em acetil-CoA liberando um NADH + H⁺. Mais especificamente, E1 é uma enzima dependente de tiamina difosfato (ThDP) e catalisa dois passos consecutivos: (i) a descarboxilação de piruvato em CO₂ com a formação de intermediário C2α-hidroxi-etilideno-ThDP (enamina) e (ii) a acetilação reductiva dos grupos lipoil ligados covalentemente ao E2. A subunidade E2 então catalisa a transferência de uma porção acetil para CoA, formando acetil-CoA. A transferência de elétrons das porções di-hidrolipoil de E2 para primeiramente FAD e depois para NAD é realizada por E3. Estas etapas, apesar de consumirem cofatores, não tem gasto energético, não utilizando ATP e conseqüentemente tendo menor impacto na homeostasia celular.

Sendo esta classe de enzima presente em praticamente todos os organismos procarióticos, foi então selecionada como organismo modelo, a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* para a transposição das sequências. Esta escolha se deu por essa bactéria possuir seu complexo PDHc sequenciado e por ser uma notória produtora do próprio ramnolípido, sinalizando a possibilidade de essa enzima ser mais tolerante à presença de ácidos graxos e outros compostos inibitórios, como NAD^+/NADH . Este mecanismo, denominado *PDH-bypass*, desvia piruvato que seguiria para o TCA ou para a fermentação alcoólica e o transforma diretamente em acetil-CoA citosólico. Essa metodologia pode ser visualizada na **Figura 7**

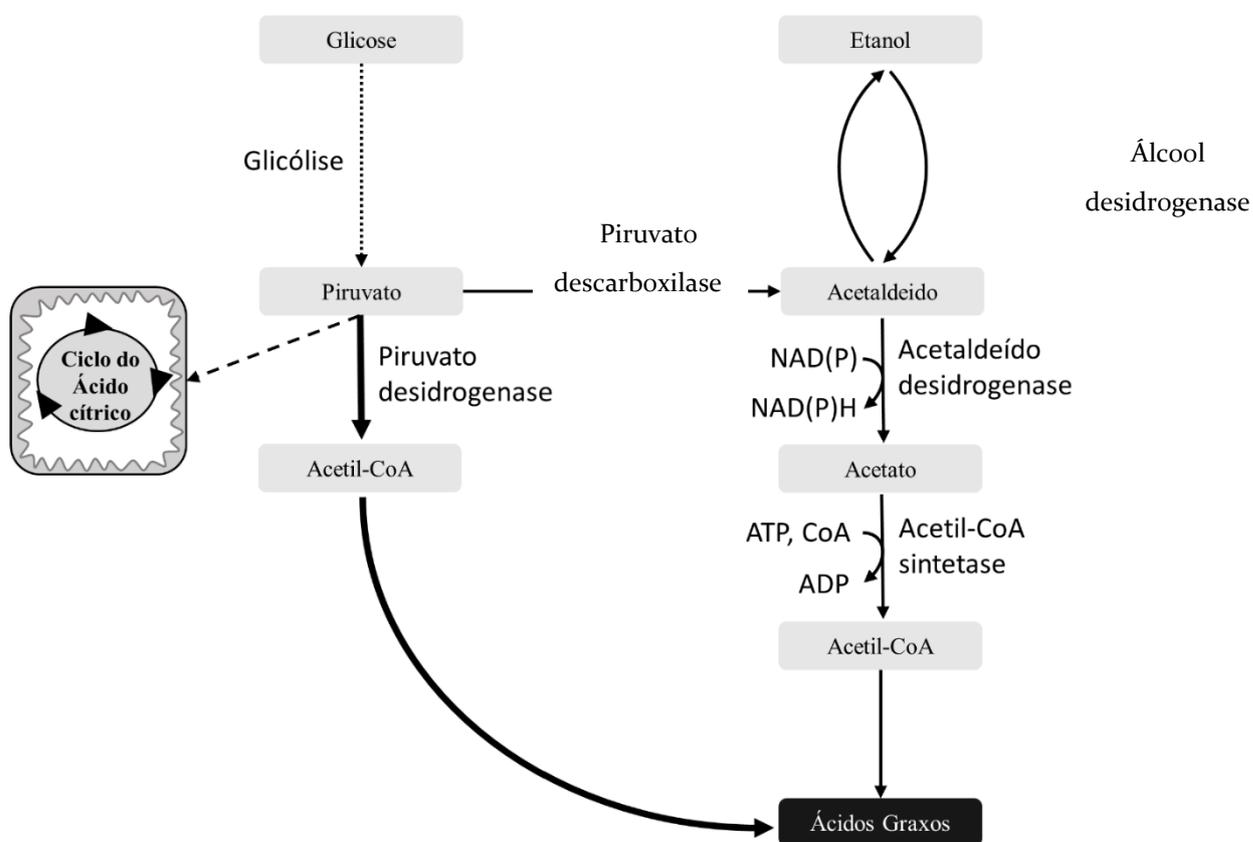


Figura 7. Mecanismo citoplasmático do *PDH-bypass* e seu direcionamento do piruvato para a produção de acetil-CoA citosólico. Este mecanismo permite o direcionamento do carbono do piruvato diretamente para a produção de acetil-CoA citoplasmático sem a necessidade de este piruvato ser metabolizado pela via piruvato-acetaldeído-acetato para incorrer nessa molécula, reduzindo assim o gasto de ATP pela levedura e aumentando a quantidade de acetil-CoA citosólico na célula de *S. cerevisiae*.

1.5.4 Estratégia Acetil-CoA carboxilase para aumento de malonil-CoA

O complexo Acetil coenzima A carboxilase (ACC_c; EC 6.4.1.2), é reconhecido como essencial na maioria dos organismos vivos. Esse complexo é responsável pela carboxilação do acetil-CoA em malonil-CoA, objetivando aumento da concentração deste composto no citoplasma da levedura, resultando em uma maior disponibilidade desse composto para início da síntese e alongação de ácidos graxos. O ACC_c é formada pelos genes *accA*, *accB*, *accC*, *accD* e *pao494*, que codificam as cinco subunidades do complexo enzimático, sendo elas ACCA, denominada acetil-coenzima A carboxilase carboxil transferase subunidade alfa, ACCB, denominada transportadora de biotina carboxilada, ACCC, denominada biotina carboxilase I, ACCD, denominada acetil-coenzima A carboxilase carboxil transferase - subunidade beta, PA0494, denominada biotina carboxilase II, respectivamente. Essas subunidades formam um heterohexâmero que, usando biotina como cofator, catalisam a carboxilação do acetil-CoA com a formação de um malonil-CoA, um ADP e um hidrogênio livre (H⁺).

O ACC_c é uma enzima multisubunidade em procarionotos, enquanto em eucariotos é uma única enzima multidomínio e, embora as estruturas sejam diferentes entre os domínios, os mecanismos de reação são essencialmente os mesmos em todos os tipos celulares (TONG, 2005). O ACC_c desempenha um papel crítico na regulação do metabolismo de ácidos graxos, como enzima que catalisa o primeiro passo limitador de velocidade na biossíntese de ácidos graxos, representando um alvo para engenharia de organismos nos quais se quer modular a síntese de ácidos graxos. O seu produto, malonil-CoA, além de ser um componente de síntese de novo de ácidos graxos necessários ao crescimento celular (LIU; VORA; KHOSLA, 2010; SHI *et al.*, 2014; TONG, 2005), serve também como um bloco de construção principal para uma variedade de compostos relevantes em biotecnologia industrial derivados de ácidos graxos (ROESLER *et al.*, 1997). Contudo, é demonstrado que malonil-CoA é rigorosamente regulado para ser expressado em baixas concentrações, resultando numa produção limitada de compostos derivados de suas vias (LIAN; ZHAO, 2014; LU; VORA; KHOSLA, 2008; WATTANACHAISAREEKUL *et al.*, 2008; ZHA *et al.*, 2009). A equação de conversão dessa enzima pode ser visualizada na **Figura 8**.

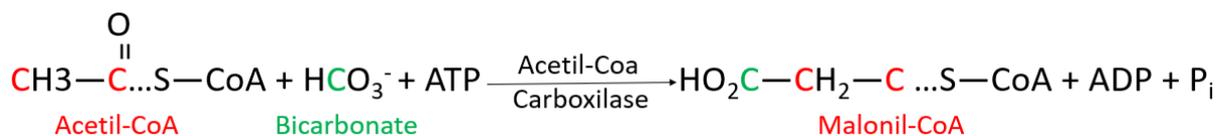


Figura 8. Mecanismo de conversão de acetil-CoA para malonil-CoA catalisado pelo complexo enzimático acetil-CoA carboxilase. Esta estratégia permite a conversão de acetil-CoA citosólico em malonil-CoA concomitantemente com a enzima acetil-CoA carboxilase nativa. Isto permite o acúmulo dessa molécula que irá ser utilizada na via de biossíntese de ácidos graxos.

Dessa forma, como essa enzima está presente em todos os procariotos, a eleição da sequência de *Pseudomonas aeruginosa* se baseou na produção de ramnolipídeo por esse organismo, o que sugere que essa enzima pode ter menor repressão na presença de ácidos graxos e cofatores derivados de seu metabolismo.

1.5.5 Enzimas da Biossíntese de Ácidos Graxos para aumento das cadeias acil-CoA

Conforme citado no tópico 1.2, embora a arquitetura do mecanismo enzimático da síntese de ácidos graxos tenha diferenças consideráveis entre organismos, a estratégia catalítica geral é semelhante. Os ácidos graxos são reunidos a dois carbonos de cada vez através de ciclos repetitivos de condensações entre o doador de malonil-ACP e o receptor que contém o ácido graxo nascente. Na via bacteriana FAS II de *Pseudomonas aeruginosa*, a condensação inicial entre malonil-ACP e acetil-CoA para formar β-acetoacetil-ACP é catalisada pela enzima iniciadora β-cetoacil-ACP sintase III (fabH). O β₃-ceto carbonil é depois reduzido a um grupo hidroxil pela β-cetoacil-ACP redutase (fabG), desidratado por β-hidroxiacil-ACP desidratase (fabZ/fabA) para formar trans-2-enoil-ACP, e depois reduzido a um acil-ACP saturado por enoil-ACP redutase dependente de NADH (fabI). O intermediário acil-ACP é condensado com malonil-ACP pela elongação de β-cetoacil ACP sintase I/II (fabB / fabF), cujo produto reentra o ciclo de redução para outra rodada de elongação (NELSON; COX; LEHNINGER, 2017), como mostrado anteriormente na **Figura 3**.

O precursor do ramnolipídeo, 3-hidroxi-decanoil-ACP não é produzido com eficácia pela levedura, devido às suas FASI e FASII serem notavelmente mais específicas na elongação de cadeias de 16 e 18 carbonos. Dessa forma, uma estratégia de expressão de enzimas da síntese de ácidos graxos com direcionamento para cadeias do tipo hidroxiacil-ACP visa então

acumular substrato para a síntese de mais ramnolípido, uma vez que a enzima *rhlA* usa este substrato para, junto com o açúcar ramnose, sintetizar moléculas de ramnolípido.

Dessa forma, visando acumular diretamente uma quantidade maior desse intermediário de produção de ramnolípido, esta seção do projeto testou a expressão das enzimas *fabD* (malonil-CoA-ACP transacilase), *fabH* (ACP-S-Malonil transferase), *fabB* (β -cetoacil-ACP sintase) e *fabG* (β -cetoacil redutase) do procarionto *Pseudomonas aeruginosa*, como pode ser visualizado na **Figura 9**.

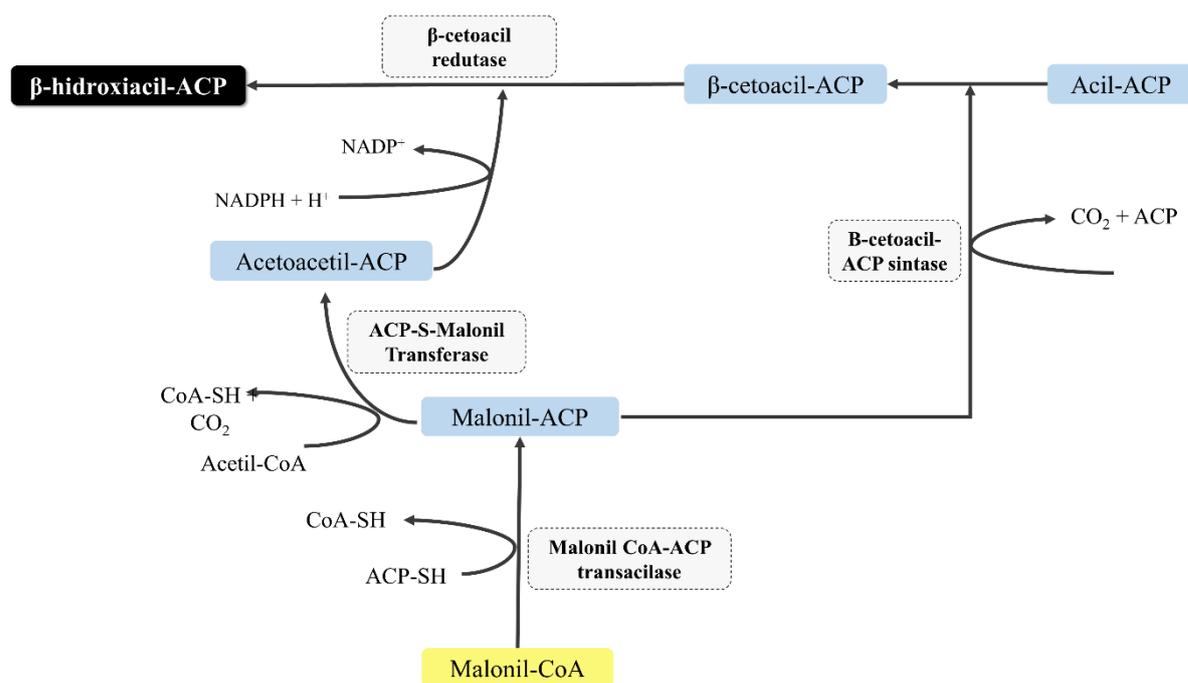


Figura 9. Via de síntese de ácidos graxos iniciando em acetil-CoA e mostrando as reações das enzimas de biossíntese de ácidos graxos utilizadas para acumular o intermediário β -hidroxiacil-ACP. Essas enzimas utilizam o malonil-CoA disponível no citoplasma da levedura e através de uma reação de condensação e uma de redução com a utilização de NADPH para síntese dessa molécula.

1.6 RESULTADOS ANTERIORES DE NOSSO GRUPO DE PESQUISA

O açúcar ramnose não é naturalmente produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, para a produção de ramnolípido, sendo este açúcar parte essencial da produção dessa molécula, é necessário que haja modificações genéticas que permita a produção desse açúcar. Neste sentido, nosso grupo já modificou geneticamente *S. cerevisiae* para produção de ramnose. Neste trabalho, através da construção de plasmídeos contendo os genes *Gft*, *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* e *rmlD* referentes à síntese de ramnose, foi possível constatar a produção e quantificar esse desóxioaçúcar na levedura. Este trabalho também produziu um

plasmídeo contendo os genes codificadores das enzimas RhlA e RhlB, conseguindo comprovar por dados de microscopia de fluorescência a menor quantidade de gotas lipídicas no citoplasma de *S. cerevisiae* e com isso inferir a produção de ramnolipídeo por essa levedura (BAHIA *et al.*, 2018.).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo a construção de uma linhagem de *S. cerevisiae* superprodutora de ácidos graxos de cadeia curta através da síntese de enzimas que aumentem o influxo de carbono na via de ácidos graxos.

Etapas metodológicas

- Construção de linhagem de *S. cerevisiae* com um cromossomo artificial expressando genes codificadores do complexo piruvato desidrogenase (PDH_c)
- Construção de linhagem de *S. cerevisiae* com um cromossomo artificial expressando genes codificadores da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCC)
- Construção de linhagem de *S. cerevisiae* com um cromossomo artificial expressando genes codificadores das enzimas malonil-CoA-ACP transacilase (fabD), ACP-S-malonil Transferase (fabH), β -cetoacil-ACP sintase I (fabB) e β -cetoacil redutase (fabG).
- Confirmação da inserção dos genes acima mencionados a partir de reação em cadeia de polimerase
- Confirmação da transcrição dos genes através de extração de RNA total e subsequente RT-PCR.
- Detecção de ácidos graxos totais através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) das linhagens construídas.
- Caracterização das linhagens recombinantes em modo batelada visando determinar os principais parâmetros cinéticos.
- Seleção da melhor linhagem para inserção de genes relacionados à expressão de enzimas para a produção de ramnolipídeos e produção de linhagem.
- Estabelecer parâmetros cinéticos da levedura produtora de ramnolipídeo,
- Detecção de ácidos graxos totais através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) da linhagem produtora de ramnolipídeo.
- Detecção de ramnolipídeo através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

2.2 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO PARA MAXIMIZAÇÃO DE PRECURSORES DA VIA DE ÁCIDOS GRAXOS

A primeira estratégia utilizada neste trabalho envolveu a expressão de genes codificadores de um complexo piruvato desidrogenase para utilizar o piruvato da glicólise para a produção de acetil-CoA. A segunda envolveu a expressão de genes codificadores da enzima acetil-CoA carboxilase e a terceira envolveu a expressão de genes da biossíntese de ácidos graxos para a produção do intermediário utilizado na produção de ramnolipídeos, β -hidroxiacil-ACP. A estratégia que apresentou a melhor síntese de lipídeos recebeu os plasmídeos previamente construídos (BAHIA, *et al.* 2018) para produção de ramnose e ramnolipídeo. As estratégias desenhadas podem ser observadas a na **Figura 10**.

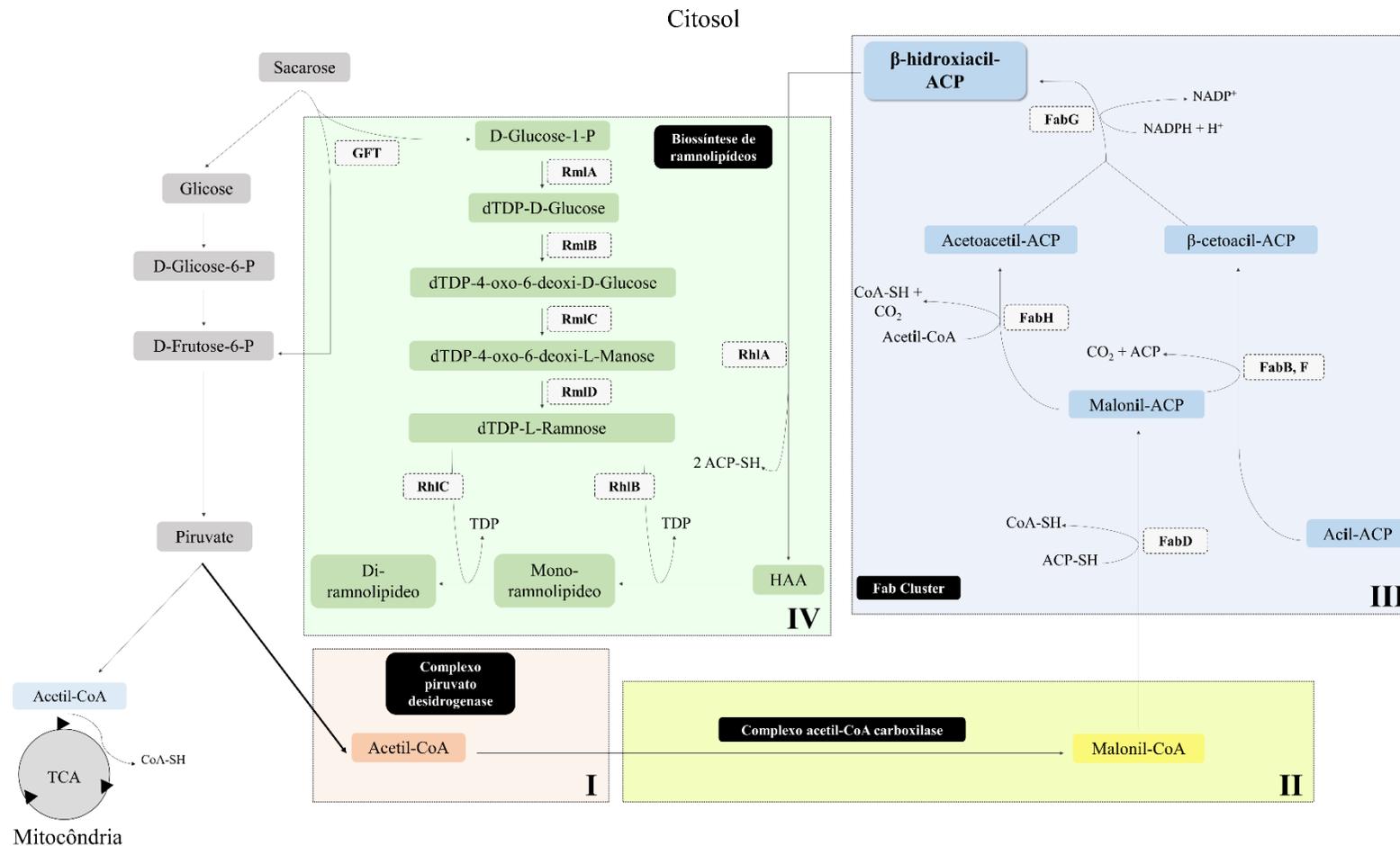


Figura 10. Representação das estratégias utilizadas neste trabalho para maior produção de ácidos graxos com o objetivo de produção de rhamnolipídeo onde (I) representa a estratégia de redirecionamento do piruvato para a síntese de acetil-CoA, (II) representa a estratégia da enzima acetil-CoA carboxilase, que envolve a produção de malonil-CoA, (III) representa a estratégia de expressão de enzimas da biossíntese de ácidos graxos com redirecionamento específico para o intermediário hidroxiaçil-ACP e IV representa estratégia desenhada por BAHIA *et al.*, 2018 para produção de rarnose e rarnolipídeo em *S. cerevisiae*.

3. MATERIAIS

3.1 MEIOS DE CULTURA

Para o cultivo de *E. coli* foram utilizados os seguintes meios, os quais foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min:

- Meio LB (1L) (SAMBROOK, 2001)
 - Triptona 10 g
 - Extrato de levedura 5 g
 - NaCl 10 g
 - pH 7.0
 - Para o meio sólido, foi adicionado ágar 1,5 % (p/v).

Para o cultivo de *S. cerevisiae* foram utilizados os seguintes meios:

- Meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) (SAMBROOK, 2001)
 - Extrato de levedura 1 % (p/v)
 - Peptona 2 % (p/v)
 - Glicose 2 % (p/v)
 - Para o meio sólido, foi adicionado ágar 1,5 % (p/v).

- Meio Mínimo com dextrose
 - YNB com sulfato de amônio 0,67 % (p/v)
 - Glicose/Maltose 2,00 % (p/v)
 - Quando necessário, foram suplementados o aminoácido (0,002 %), leucina (0,003%), além da base nitrogenada uracila (0,002 %).
 - As dextroses foram esterilizadas em autoclave separadamente. Os demais componentes do meio foram esterilizados por meio de filtração em membrana de 0,2 µm.

3.2 TAMPÕES E SOLUÇÕES

3.2.3 Soluções para bactéria competente

- Tampão de Transformação I
 - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,99 % (p/v)

- Acetato de Potássio 0,03 M
- CaCl₂·2H₂O 0,15 % (p/v)
- Glicerol 15,00 % (p/v)

3.2.4 Soluções para gel de DNA

- Tampão de corrida (TBE) 10X
 - Trizma base 53,885 g
 - Ácido bórico27,5 g
 - EDTA 14,885 g
 - Água destilada (q.s.p) 500 mL
 - pH8.4
- Tampão de amostra
 - TBE 10X 25%(v/v)
 - Glicerol 50%(v/v)
 - Azul de bromofenol 0,25%(p/v)
 - Xileno cianol.....,25%(p/v)
- Gel de Agarose
 - Agarose 0,6, 1,0 e 1,5g
 - TBE 1X..... 100,0 mL
 - Brometo de etídeo0,5 µg/mL
- Brometo de etídeo (10mg/mL)
 - Brometo de etídeo.....1 g
 - H₂O MilliQ..... 100 mL
 - Armazenar protegido da luz
- Marcadores de Massa Molecular
 - 1 kb plus DNA Ladder (Promega).
 - 1 kb DNA Ladder (Promega).

3.3 ANTIBIÓTICOS

- Ampicilina (1000X) - 100 mg/mL
 - Dissolvida em H₂O MilliQ.
 - Esterilizar por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm

- Utilizar 100 µg/mL para seleção de clones após transformação

3.4 TRANSFORMAÇÃO DE *E. COLI*

- Transformação de *E.coli* (SAMBROOK, 2001)
 - Tampão CCMBB8o (1L)
 - Acetato de Potássio 1M pH 7..... 10 mL
 - CaCl₂.2H₂O..... 11,8 g
 - MnCl₂.4H₂O..... 4 g
 - MgCl₂.6H₂O..... 2 g
 - Glicerol..... 10%(v/v)
 - H₂O MilliQ..... 100 mL
- Acetato de potássio 1M (100 mL)
 - Acetato de potássio..... 9,815 g
 - H₂O MilliQ.....100 mL
- KCl 250 mM (100 mL)
 - KCl..... 1,86 g
 - H₂O MilliQ.....100 mL
- MgCl₂.6H₂O 2 M (100 mL)
 - KCl..... 19 g
 - H₂O MilliQ.....100 mL

3.5 KITS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

- Produto de PCR: GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)
- DNA plasmidial: GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Bandas de gel de agarose: GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific)

3.6 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS

- Mix para transformação de alta eficiência (SCHIESTL; GIETZ, 1989)
 - PEG 4000 (50% (p/v)) 420 µL
 - Acetato de Lítio 2 M 36 µL
 - DNA carreador (2 mg/mL) 50 µL

3.7 ENZIMAS UTILIZADAS

- FastDigest BamH I (Thermo Fisher Scientific) para linearização do cromossomo.
- Foram utilizadas as enzimas FastDigest Aat II e FastDigest Xho I para remoção do promotor de triptofano
- Taq DNA Polimerase (Phoentria)
- Polimerase Klenow (ThermoFisher)

3.8 VETORES

Para clonagem foi utilizado o vetor comercial pYAC₄ com sítio HIS translocado, denominando-se pYAC₄m.

3.9 OLIGO NUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

Os oligo nucleotídeos selecionados para iniciação das reações em cadeia de polimerase tiveram seus possíveis alinhamentos entre as sequências e o genoma cromossomal e mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* analisados através do método *Basic Local Alignment Search Tool (B.L.A.S.T.)* (<https://www.yeastgenome.org/blast-sgd>). As sequências dos oligo nucleotídeos escolhidos e utilizados nas reações de RT-PCR deste trabalho podem ser visualizados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Oligo nucleotídeos iniciadores de reação em cadeia de polimerase utilizados neste trabalho onde T_m (°C) é a temperatura de desnaturação utilizada na reação em cadeia de polimerase.

Nome	Sequência	T _m (°C)	Uso
ACCAF	GGTAAGACGT AACTTCGGTATG	55,8	Amplificar o transcrito do gene accA
ACCAR	CCACGTTCTTC AGCATCTATT	53,7	Amplificar o transcrito do gene accA
ACCBF	TCCTATGGTG GGTACTTTCT	53,4	Amplificar o transcrito do gene accB

ACCB	ACTCACTTCAG CCTCAATATG	53.7	Amplificar o transcrito do gene <i>accB</i>
ACCCF	AGGAATGCGT GTGGTTTA	50.3	Amplificar o transcrito do gene <i>accC</i>
ACCCR	TTCAACGTGTC TTGGGTTAG	53.4	Amplificar o transcrito do gene <i>accC</i>
ACCDF	CTATGTCTGGT AAGTTGCAGG	55.6	Amplificar o transcrito do gene <i>accD</i>
ACCDR	AAGCAGAGAA GCAGATTAAGG	53.7	Amplificar o transcrito do gene <i>accD</i>
PA ₀₄₉₄ F	GATTAGCTCA GTCCTTGGGATAT AG	57.9	Amplificar o transcrito do gene <i>pao494</i>
PA ₀₄₉₄ R	GACCAAGTCG ATGCCAGTAA	55.4	Amplificar o transcrito do gene <i>pao494</i>
PDHE ₁ F	GTGCTAGGCC AGAGTTATTG	55.4	Amplificar o transcrito do gene <i>aceE</i>
PDHE ₁ R	ACTGTTGGTTG TCCCTTATG	53.4	Amplificar o transcrito do gene <i>aceE</i>
PDHE ₂ F	AGGTGGGAAC TGGAGATTTG	55.4	Amplificar o transcrito do gene <i>aceF</i>
PDHE ₂ R	TGCTGGAGTA TCTGCTTTGG	55.4	Amplificar o transcrito do gene <i>aceF</i>
PDHE ₃ F	GTAATCGGAG CTGGTGTATAG	55.8	Amplificar o transcrito do gene <i>lpdG</i>
PDHE ₃ R	CCTCCTTGGCG ATTTGTT	52.6	Amplificar o transcrito do gene <i>lpdG</i>
rhIAF	AGCAGAGGAT GCTAGACAATTC	57.9	Amplificar o transcrito do gene <i>rhlA</i>

rhLAR	GTGGTTCAGG CTGTTTCAATAAG	55.4	Amplificar o transcrito do gene <i>rhLA</i>
rhLBF	CAGAGCGTTT AGTCAGGTTAGG	62.3	Amplificar o transcrito do gene <i>rhLB</i>
rhLBR	CCCTCTCTGTG GCATCTTTC	62.1	Amplificar o transcrito do gene <i>rhLB</i>
rmLAF	GATCAACAGG TCGTGGATATAG	60.0	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLA</i>
rmLAR	GCCTTGCCTGT TCTCTAAA	60.0	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLA</i>
rmLCF	CTTTGGACAAT GGGTAGGAG	60.0	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLC</i>
rmLCR	AGATAATAAG GGTGCGTCTTG	60.0	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLC</i>
gftF	AGGGCTATTC AGTTCTTCTTAC	60.2	Amplificar o transcrito do gene <i>gft</i>
gftR	GCGGGATGTC TGTTTCTT	60.1	Amplificar o transcrito do gene <i>gft</i>
rmLBF	GCCAGGCATA CCTTTGTT	59.9	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLB</i>
rmLBR	CCCAATAGGC TCTAACTTCTTC	59.8	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLB</i>
rmLDF	GTTGGCACTT ATACGCTAGAT	60.0	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLD</i>
rmLDR	GTGGTATCTCC AATCTGGTAAG	60.0	Amplificar o transcrito do gene <i>rmLD</i>

3.10 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

- Para extração
 - MetOH/Clorofórmio (1:2, v/v)
 - HCl 5 % em MetOH
 - Hexano 100 %
- Para análise
 - C₁₃ TAG
 - Hexano 100 %

4. MÉTODOS

4.1 GENES E PLASMÍDEOS

Os genes envolvidos, *aceE*, *aceF*, *lpdG*, *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *pao494*, *fabD*, *fabH*, *fabB* e *fabG*, todos nativos de *Pseudomonas aeruginosa*, foram sintetizados já em seu formato otimizado para expressão em *S. cerevisiae*. Juntamente com as sequências codantes, foram sintetizadas as regiões promotoras e terminadoras de acordo com as sequências dos plasmídeos de Mumberg (MUMBERG; MÜLLER; FUNK, 1995) e de acordo com as necessidades de cada gene. Os dados relacionados aos genes, cassetes e plasmídeos utilizados neste trabalho podem ser visualizados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Genes, cassetes e plasmídeos utilizados e produzidas nesse estudo

		Tamanho (pb)	Referência
Gene	<i>aceE</i>	2.649	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>aceF</i>	1.644	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>lpdG</i>	1070	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>accA</i>	951	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>accB</i>	921	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>accC</i>	1350	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>accD</i>	873	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>pao494</i>	1.377	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>fabD</i>	939	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>fabH</i>	993	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>fabB</i>	1218	Otimizado nesse estudo

Gene	<i>fabG</i>	744	Otimizado nesse estudo
Gene	<i>rmlA</i>	881	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Gene	<i>rmlB</i>	1059	Bahia <i>et al.</i>
Gene	<i>rmlC</i>	546	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Gene	<i>rmlD</i>	928	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Gene	<i>rhlA</i>	888	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Gene	<i>rhlB</i>	1281	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Cassete	<i>Cassete GPDp-PDH subunidade E1-CYcT</i>	3.603	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete PGKp-PDH subunidade E2-TEFt</i>	2.529	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete GPDp-PDH subunidade E3-CYcT</i>	2.134	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete ADHp-ACC alfa-CYcT</i>	2.692	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete PGKp-ACC carboxilase beta-CYcT</i>	1.335	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete TEFp- Biotina carboxilase-CYcT</i>	2.014	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete ADHp-ACCC-CYcT</i>	1.737	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete ADHp-ACCD carboxil transferase-CYcT</i>	3.118	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete CYCp- Malonil CoA-ACP transacilase-CYC</i>	1.501	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete TEFp- ACP-S-Malonil Transferase-CYcT</i>	1.657	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete PGKp- Beta-cetoacil-ACP sintase I -CYcT</i>	2.082	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete TEFp- Beta-cetoacil Redutase-CYcT</i>	1420	Esse estudo
Cassete	<i>Cassete TEFp-rmLA-CYcT</i>	1358	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Cassete	<i>Cassete GPDp-rmLB-CYcT</i>	1108	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Cassete	<i>Cassete CYCp RmLC-CYcT</i>	1141	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Cassete	<i>Cassete TEFp-rmLD-CYC</i>	1257	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Cassete	<i>Cassete TEF-rhlA-CYcT</i>	1311	BAHIA <i>et al.</i> , 2018

Cassete	<i>Cassete ADHp-rhlb-CYct</i>	1028	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Plasmídeo	pYAC4	11454	KUHN; LUDWIG, 1994
Plasmídeo	pYAC4m	12167	Otimizado nesse estudo
Plasmídeo	pYAC4mPDH	18380	Otimizado nesse estudo
Plasmídeo	pYACmACC	21351	Otimizado nesse estudo
Plasmídeo	pYACmFab	17121	Otimizado nesse estudo
Plasmídeo	pYAC4mPDH-trp	18108	Otimizado nesse estudo
Plasmídeo	p424TEF	6246	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Plasmídeo	p425GPD	7730	BAHIA <i>et al.</i> , 2018
Plasmídeo	p426GPD	6607	BAHIA <i>et al.</i> , 2018

As sequências foram sintetizadas diretamente no plasmídeo em três blocos gênicos previamente planejados dentro do vetor comercial pYAC4, que teve sua sequência HIS3 removida para fins de clonagem, dando origem ao plasmídeo pYAC4m. Dessa forma, os plasmídeos trabalhados inicialmente foram denominados pYAC4m (plasmídeo vazio, usa como controle), pYAC4mPDH (contendo *aceE*, *aceF*, *lpdG*), pYAC4mACC (*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *pao494*) e pYAC4mFab (*fabD*, *fabH*, *fabB* e *fabG*). Para a produção de ramnolipídeos, a estratégia do plasmídeo pYAC4PDH se mostrou mais eficiente para a super expressão de lipídeos e, dessa forma, este plasmídeo foi modificado truncando-se a marca TRP, gerando o plasmídeo pYAC4mPDH-trp, que foi utilizando concomitantemente com os plasmídeos p424TEF, contendo os genes *rhlA+rhlB*, p425GPD carregando os genes *Gft+rmlA+rmlC* e p426GPD com os genes *rmlB+rmlD*, estes plasmídeos foram construídos em um trabalho prévio (BAHIA *et al.*, 2018) e estão relacionados à produção de ramnose e conversão final dos metabólitos em ramnolipídeos.

4.2 ESTRATÉGIA PARA SÍNTESE DOS CROMOSSOMOS

O plasmídeo pYAC₄mPDH, contendo os três genes responsáveis pela montagem do complexo piruvato desidrogenase, *aceE*, *aceF*, *lpdG*, foi sintetizado pela empresa GenOne na ordem descrita entre os sítios das endonucleases de restrição Age I e Sal I, sendo cada um dos genes flanqueado pelos promotores GPD, PGK e TEF respectivamente. O plasmídeo pYAC₄mACC, contendo os genes responsáveis pela acetil-CoA carboxilase, *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *pao494* foi sintetizado na ordem descrita entre os sítios das endonucleases de restrição Sal I e Asc I e flanqueado pelos promotores ADH, PGK, TEF, PGK e ADH. Por fim, o plasmídeo pYAC₄mFab, contendo *fabD*, *fabH*, *fabB* e *fabG* foi sintetizado na ordem descrita entre os sítios das endonucleases de restrição Asc I e Not I e seus genes receberam os promotores CYC, TEF, PGK e TEF.

Todos os terminadores utilizados são CYC. A **Figura 11** ilustra os cassetes e seus promotores em seu sentido de disposição construtiva. A **Figura 12**, mostra o mapa do plasmídeo pYAC₄m, utilizado como controle neste trabalho, onde foram sintetizados os genes o cassete PDH, posicionado entre os sítios das endonucleases de restrição Age I e Sal I e o cassete ACC entre os sítios das endonucleases de restrição Sal I e Asc I, e o cassete Fab entre os sítios das endonucleases de restrição Asc I e Not I. O plasmídeo pYAC₄mPDH-trp, derivado de pYAC₄mPDH teve sua sequência da marca auxotrófica TRP truncada pela remoção de fragmento entre as enzimas Aat II e Xba I, removendo assim a prototrofia relacionada ao aminoácido triptofano.

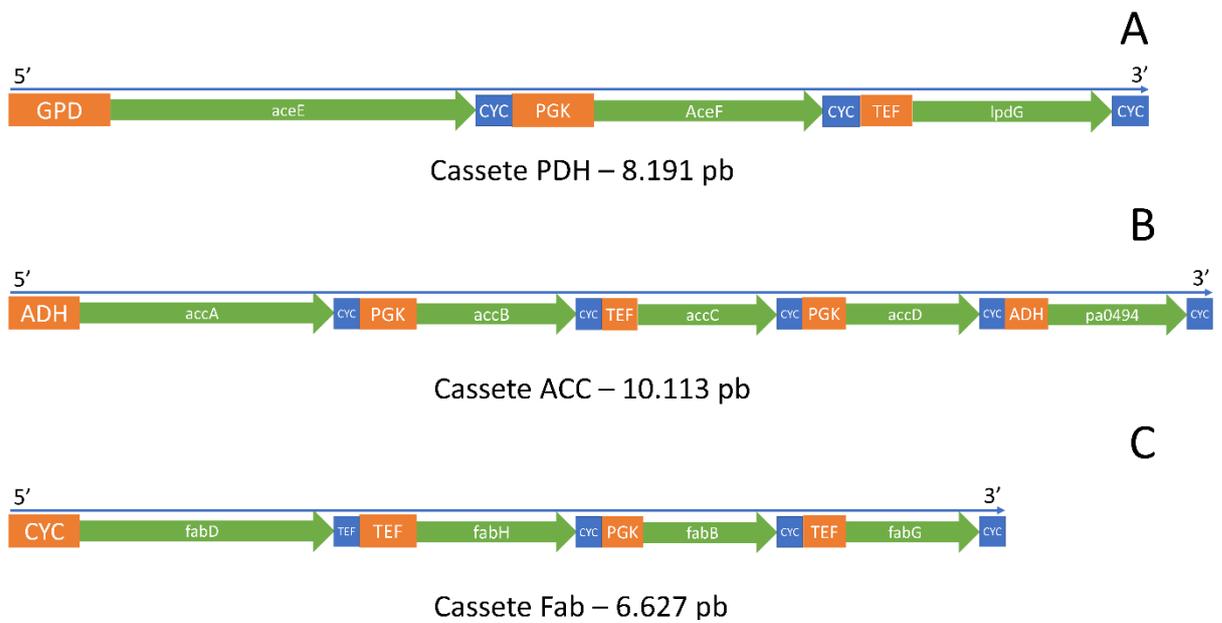


Figura 11. Cassetes inseridos nos plasmídeos com seus respectivos promotores e terminadores. O cassete PDH (A), carrega os genes, *aceE*, *aceF*, *lpdG*, codificantes das subunidades do complexo enzimático piruvato desidrogenase. O cassete ACC (B), carrega os genes, *accB*, *accC*, *accD*, *pao494*, codificantes das subunidades do complexo enzimático acetil-CoA carboxilase e por fim, o cassete Fab (C) carrega os genes, *fabD*, *fabH*, *fabB* e *fabG*, codificantes das enzimas da biossíntese de ácidos graxos que direcionam a síntese ao intermediário hidroxiaçil-ACP.

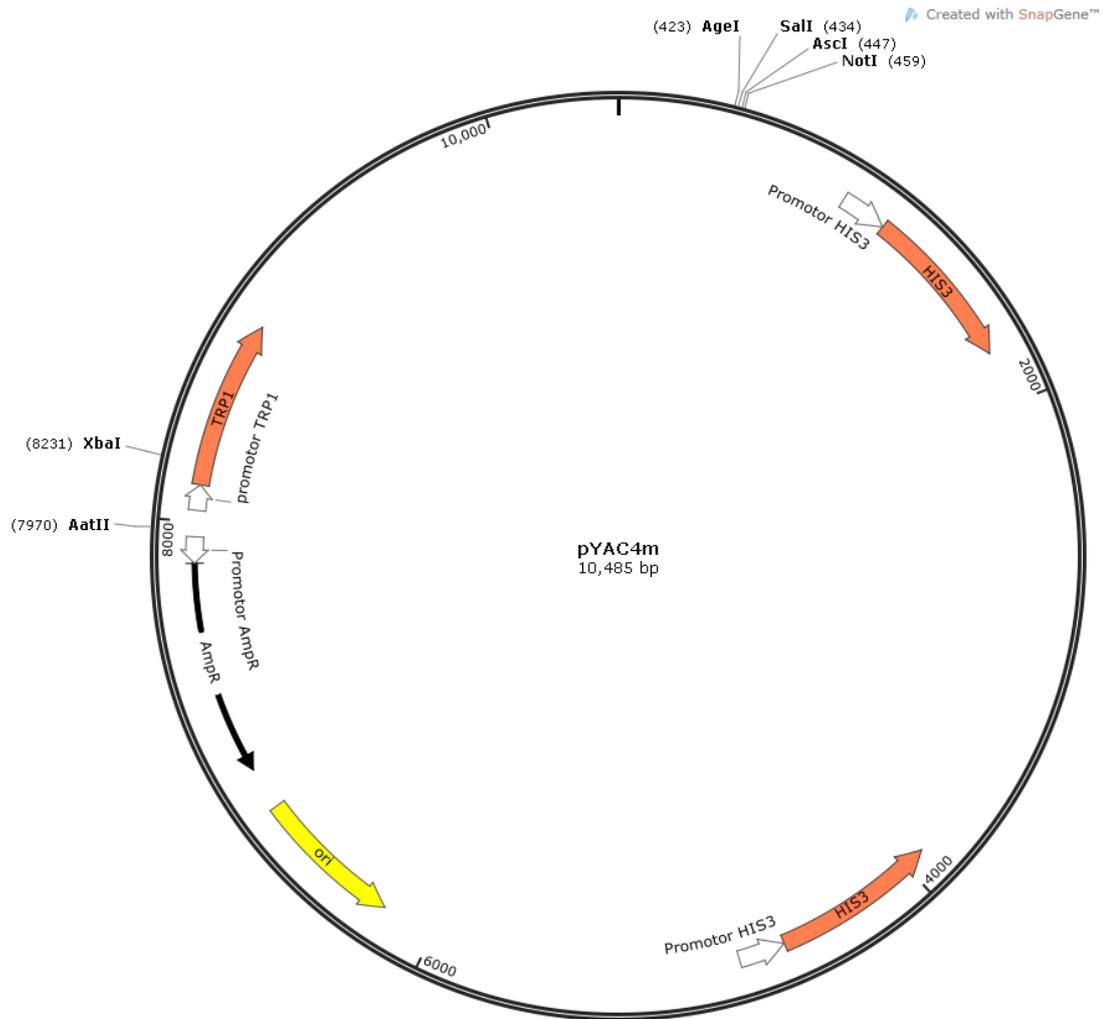


Figura 12. Plasmídeo pYAC_{4m}, usado neste trabalho como controle. Outras características do plasmídeo envolvem a origem de replicação (ORI), o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Amp^R), bem como as marcas prototróficas para os aminoácidos triptofano (TRP₁) e histidina (HIS₃). O plasmídeo pYAC_{4m}PDH é derivado deste plasmídeo, tendo a sequência genes codificadores das subunidades E₁, E₂ e E₃ da enzima piruvato desidrogenase de *Pseudomonas aeruginosa* posicionado entre os sítios das endonucleases de restrição Age I e Sal I, o plasmídeo pYAC_{4m}ACC derivado de pYAC_{4m} tem os genes codificadores das subunidades ACCA, ACCB, ACCC, ACCD e PA₀₄₉₄ da enzima acetil-CoA carboxilase de *Pseudomonas aeruginosa* entre os sítios das endonucleases de restrição Sal I e Asc I, enquanto o plasmídeo pYAC_{4m}Fab tem os genes codificadores das subunidades FabD, FabH, FabB e FabG da síntese de ácidos graxos de *Pseudomonas aeruginosa* entre os sítios das endonucleases de restrição Asc I e Not I. O plasmídeo pYAC_{4m}PDH-trp, derivado de pYAC_{4m}PDH teve sua sequência da marca auxotrófica TRP truncada pelas enzimas de restrição Aat II e Xba I, removendo assim a funcionalidade da marca prototrófica relacionada à produção do aminoácido triptofano.

4.3 CLONAGEM EM *ESCHERICHIA COLI*

4.3.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* DH10B (DURFEE *et al.*, 2008) foi escolhida para propagação e manipulação de DNA recombinante durante construção dos plasmídeos. A escolha se deu pelo seu genótipo (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL*(*StrR*) *nupG*), que a torna:

- Deficiente em Recombinase A,
- Capacitada de síntese constitutiva de desoxirribose para melhorar a clonagem de grandes plasmídeos
- Adequada para clonagem de DNA contendo citosina ou adenina metilada.

4.3.2 Preparo de células competentes

As células de *Escherichia coli* DH10B foram transformadas segundo SAMBROOK, 2001, sendo retiradas de um estoque a -80 °C e semeadas em placas de meio LB com o antibiótico adequado, sendo então incubadas a 37°C por um período de 16 a 18 h. Após o crescimento, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB com antibiótico, seguindo-se incubação sob agitação (250 rpm) a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB sem antibiótico, seguindo-se crescimento a 37 °C sob agitação até atingir a OD600 de aproximadamente 0,6. Após a incubação, as células foram mantidas em gelo por 15 min, seguindo-se centrifugação a 5000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e incubadas em gelo por 15 min. A suspensão foi então centrifugada sob as mesmas condições e o sedimento ressuspensado em 1 mL de CaCl₂ contendo 15% de glicerol. A amostra foi dividida em alíquotas de 200 μ L, sendo estas estocadas em freezer a -80 °C.

4.3.3 Transformação (*E. coli*)

Todos os plasmídeos foram replicados em células de *Escherichia coli* segundo SAMBROOK, 2001, utilizando a linhagem DH10- β ® congelada a -80° C em tubos de 1,5 mL são descongeladas por 10 minutos em banho de gelo, na qual após descongelamento, o DNA é misturado à célula. O tubo contendo células e DNA é incubado por 30 minutos em gelo, e após, as células são retiradas do gelo e imediatamente incubadas em banho de água à 42 °C por 90 segundos e então recolocadas imediatamente novamente em banho de gelo por 2 minutos. Após isto são inseridos no tubo 900 μ L de meio SOC (Tripton 2%; Extrato de

Levedura 0,5%; NaCl 0,05%; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; Glicose 20 mM) e as células são incubadas a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação 200 µL de células são plaqueadas em meio LB ágar seletivo contendo ampicilina (Triptona 2 %; Extrato de Levedura 0,5 %; NaCl 0,05 %; Ágar 1,5 %, Ampicilina 100 µL/mL) e as placas são colocadas em incubadora à 37 °C por 16 horas. O restante de células é repassado a um tubo criogênico, misturado com glicerol até concentração final de 15 % e armazenado à -80 °C indefinidamente. Todos os processos descritos são feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril. Os nomes das linhagens, plasmídeos que carregam e linhagens parentais utilizadas e produzidas nesse estudo podem ser visualizadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Nome, plasmídeo inserido e linhagem parental das bactérias utilizadas e produzidas nesse estudo

Nome da linhagem	Plasmídeo	Linhagem parental
DH10B	-	-
EcpYAC ₄	pYAC ₄	DH10B
EcpYAC ₄ PDH	pYAC ₄ PDH	DH10B
EcpYAC ₄ ACC	pYAC ₄ ACC	DH10B
EcpYAC ₄ PDH	pYAC ₄ Fab	DH10B
EcpYAC ₄ PDH-trp	pYAC ₄ PDH-trp	DH10B

4.3.4 Extração de DNA plasmidial de células de *E. coli*

As colônias de bactérias crescidas em placa com antibióticos foram inoculadas em 5 mL de LB com antibiótico em tubos de centrífuga de 15 mL por 12-16 horas para extração de DNA plasmidial. Após este tempo, os plasmídeos foram purificados da cultura utilizando o kit “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Fisher Scientific®) seguindo as recomendações do manual do fabricante

4.4 REAÇÕES DE TRATAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO

4.4.1 Purificação de fragmentos de DNA a partir do gel

Os tratamentos com endonuclease de restrição, contendo 1 µg de DNA e volume de 20 µL cada, são limpas e purificadas de tampões, sais e restos de enzimas inativadas através da utilização do produto “GeneJET PCR Purification Kit” (Thermo Fisher Scientific®). Ao final

do processo, são obtidos aproximadamente 100 µg de cada DNA digerido e puro em um volume final de 30 µL.

4.4.2 Tratamento com endonucleases

Todas as reações de clivagem com endonuclease foram realizadas em microtubos de 0,2 mL contendo (a) 1 µg de DNA plasmidial, (b) 2 µL de solução tamponante 10x, (c) 1 µL de enzima de restrição, e (d) água ultra-purificada deionizada até o volume final de 20 µL de. Nos casos em que a reação de clivagem do DNA foi feita com 2 enzimas de restrição, 1 µL da segunda enzima também é adicionada ao sistema de tratamento com endonuclease de restrição, totalizando a ação. Após preparada a reação de 20 µL, o microtubo é incubado por 2 horas em incubadora à 37°C e após este tempo o microtubo é aquecido a 80°C por 15 minutos para a inativação da enzima.

4.4.3 Tratamento com Fragmento Klenow de polimerase I

As reações em cadeia com o Fragmento Klenow de polimerase I foram feitas utilizando-se (a) 1 µg de DNA, (b) 2 µL de solução tampão de T4 DNA ligase, (c) 0.1 µL de enzimas (1 unidade), (d) 33 µM de dNTPs e (e) água ultrapura deionizada até o volume total de reação de 20 µL. A reação foi incubada por 15 minutos à 37 °C e interrompida aquecendo-se a reação à 75 °C por 10 minutos para inativação da enzima.

4.4.4 Ligação do plasmídeo pYAC4PDH-trp

Para ligação do plasmídeo pYAC4PDH-trp tratado com o Fragmento Klenow de polimerase I, 2 µL da enzima T4 DNA Ligase foi adicionado ao frasco da reação e o volume foi corrigido com água ultrapura deionizada para 25 µL. Essa reação foi incubada a 4 °C durante o período noturno. Ao final desse período, o produto dessa reação foi utilizado para transformação da *E. coli* DH10B.

4.4.5 Análise em gel de agarose

Para a análise dos fragmentos de DNA, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (MANIATIS, 1989), com modificações. O gel foi preparado com agarose na concentração de 0,6, 1 e 1,5 % (p/v), a qual foi dissolvida em tampão TBE 1X. O brometo de etídio foi adicionado na concentração de 0,5 µg/mL. O DNA foi diluído em tampão de amostra 6X e aplicado no gel. Este foi submetido a um campo elétrico para a migração e

separação dos fragmentos de DNA. Estes foram visualizados expondo-se o gel à luz ultravioleta.

4.5 LINHAGENS DE LEVEDURA *S. CEREVISIAE*

4.5.1 Transformação e obtenção de linhagens de *S. cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* de linhagem CEN.PK 2 1-113 foi utilizada como alvo de estudo para a superprodução de ácido graxo, sendo a escolha baseada em suas marcas auxotróficas. Os plasmídeos foram purificados das linhagens de *E. coli* e digeridas com a endonuclease de restrição BamH I com finalidade de remoção da sequência intertelomérica. Transformações foram realizadas seguindo protocolo descrito por (HILL *et al.*, 1991). Para tal, os plasmídeos linearizados foram transformados por choque térmico em células de *S. cerevisiae* através de protocolo de choque térmico (SCHIELTL; GIETZ, 1989). Células selvagens de *S. cerevisiae* desta linhagem foram crescidas em 5 mL de meio YPD (Extrato de levedura 1%; Peptona 2%; Glicose 2%) em tubo Falcon de 50 mL dentro de shaker a 30 °C com agitação de 200 RPM por 24 horas. Após o crescimento, a densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) da cultura celular é lida e a partir dessa leitura é calculada a quantidade necessária para a realização de um inóculo iniciando em OD 0.1 em 50 mL de meio YPD (Extrato de levedura 1%; Peptona 2%; Glicose 2%) de modo que o crescimento celular inicie com OD₆₀₀ de 0,1. Este inóculo é realizado em erlenmeyer aletado de capacidade 250 mL e colocado em shaker a 30 °C com agitação de 200 RPM. Após 4-6 horas, a OD₆₀₀ é novamente monitorada e espera-se o alcance de um valor entre 0,9 - 1. As células são então repassadas à um tubo falcon de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 3000g em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante é descartado, as células são lavadas com 5 mL de tampão TE (EDTA 0,5 M 0,2% v/v; Tris-HCl pH 8,0 1% v/v) e centrifugadas novamente por 3 minutos a 3000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante é novamente descartado, as células são lavadas com 5 mL de solução de Acetato de Lítio (Acetato de Lítio 0,1 M dissolvido em tampão TE) e centrifugadas por 5 minutos a 3000g em temperatura ambiente. O sobrenadante é novamente descartado e as células são ressuspensas em 0,5 mL de solução de Acetato de Lítio. Após a completa dissolução com a pipeta são repassados para um tubo eppendorf de 1,5 mL: (a) 1 µg de plasmídeo linearizado em 20 µL de água deionizada; (b) 10 µL de DNA de esperma de salmão (10 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific®) e (c) 100 µL da suspensão celular. Em seguida é adicionado ao tubo eppendorf 700 µL de solução Polietilenoglicol (PEG 4000

40%; Acetato de lítio 0,1 M dissolvido em tampão TE), a mistura é homogeneizada e colocada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo é adicionado ao tubo eppendorf 48 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido), misturado, e imediatamente é aplicado um choque térmico nas células por 15 minutos à 42 °C em banho de água. Após o choque, as células são centrifugadas por 2 minutos à 3300g em temperatura ambiente e lavadas 2 vezes seguidas com 1 mL de água deionizada. Uma terceira ressuspensão é realizada com 1 mL de água deionizada pura e desta suspensão celular são plaqueados volumes de 20, 50 e 100 µL em meio seletivo YNB ágar contendo Glicose 2%, e aminoácidos para seleção (Meio YNB 1,17% (BD Difco™) w/v; Glicose 2%; Tampão Fosfato de Sódio 30 mM; Ágar 2% w/v, Uracila 0,08% e Leucina 1%). As placas são incubadas à 30 °C por 3-4 dias. Todos os processos descritos são feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril. Todas as leituras de densidade óptica descritas aqui são realizadas em equipamento SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices®) pela utilização de cubetas de plástico transparente de 12,5 mm x 12,5 mm com leituras à 600 nm em temperatura ambiente e utilizando água destilada como branco e líquido de diluições. com a adição de uma etapa de estabilização do cromossomo em meio não seletivo YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona e 20 g/L D-glicose) durante 4 horas antes do plaqueamento em meio seletivo YNB (Base de Nitrogênio para Levedura) com adição do aminoácido leucina 1% e da base nitrogenada uracila 0,08%, tornado assim, deficiente especificamente nas necessidades auxotróficas dessa linhagem e complementado com aminoácidos/nucleotídeos necessários para seleção de recombinantes. Como fonte de nitrogênio sulfato de amônia foi utilizado, tendo adicionado como fonte de carbono glicose à 2%. Os recombinantes foram confirmados dada à expressão das duas marcas auxotróficas, sendo cada uma localizada em um braço do cromossomo inserido, mantendo seu conteúdo preservado. A **Tabela 5** mostra as linhagens de *S. cerevisiae* desenvolvidas neste trabalho.

Tabela 5. Linhagens, plasmídeos e linhagens parentais de *S. cerevisiae* desenvolvidas nesse trabalho

Nome	Plasmídeo	Linhagem parental
CEN.PK2 1-113	-	-
EMB50	pYAC4	CEN.PK2 1-113
EMB51	pYAC4PDH	CEN.PK2 1-113
EMB52	pYAC4ACC	CEN.PK2 1-113
EMB53	pYAC4Fab	CEN.PK2 1-113
EMB54	pYAC4PDH-trp, p424, p425 e p426	CEN.PK2 1-113

4.5.2 Análise dos transcritos por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

Os transcritos dos genes *aceE*, *aceF*, *lpdG*, *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *pao494*, *fabH*, *fabD*, *fabG* e *fabB* após inseridos em levedura, foram analisados em relação à sua transcrição. Para tal, colônias de *S. cerevisiae* crescidas em meio seletivo e contendo os genes em seu genoma foram inoculadas em 10 mL de meio YNB (Meio YNB 1,17% (BD Difco™) w/v; Glicose 2%; Tampão Fosfato de Sódio 30 mM; Uracila 0.08% e Leucina 1%) e crescidas a 30°C com agitação de 200 RPM durante 16 horas. Após o crescimento, o RNA total de cada linhagem foi extraído das culturas celulares utilizando reagente TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies Inc., USA). Após a extração, o RNA foi analisado por visualização em gel. A transcrição reversa do RNA foi realizada com a utilização de Omniscript® Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH, Alemanha) utilizando 1 µg de RNA total. A RT-PCR para os genes é realizada em seguida seguindo o protocolo regular de PCR, e o resultado é visualizado em gel de agarose. Os locais de anelamento dos primers nos transcritos de cada gene pode ser observado na **Figura 13**.

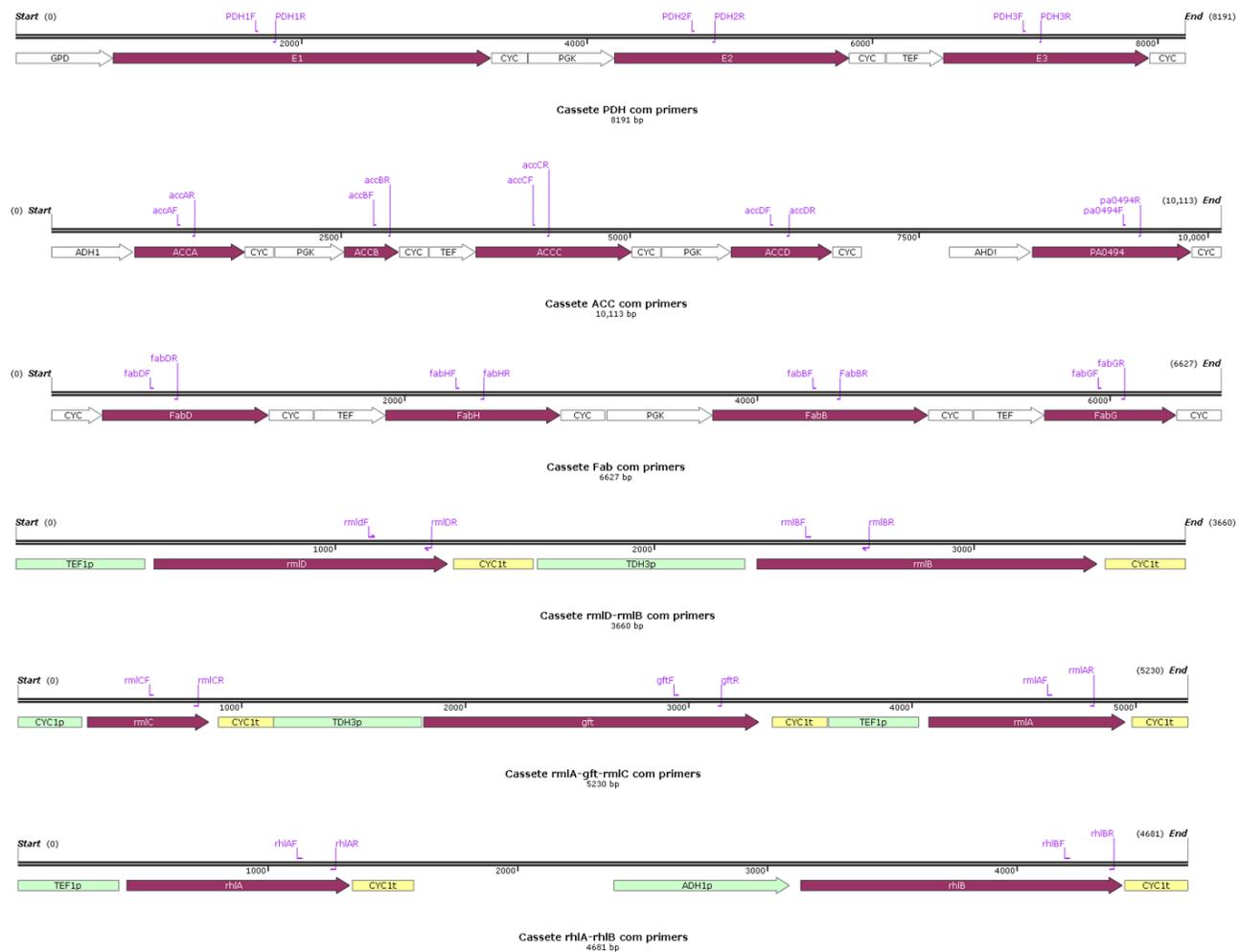


Figura 13. Ilustração mostrando o anelamento dos primers da RT-PCR nos transcritos dos genes *aceE*, *aceF*, *lpdG* no cDNA da linhagem EMB51, *accA*, *accB*, *accC*, *accD* e *pao494* no cDNA da linhagem EMB52, *fabH*, *fabG*, *fabB* e *fabD* no cDNA da linhagem EMB53 e *rhlA*, *rhlB*, *rmlA*, *rmlC*, *Gft*, *rmlB* e *rmlD* no cDNA da linhagem EMB54

4.5.3 Perfil de crescimento em através de fermentação em modo batelada

A linhagem a ser fermentada é repassada para 50 mL de meio YNB (Meio YNB 1,17 % w/v; Glicose 2 %; Uracila 0,08 % e Leucina 1 %) em um Erlenmeyer de 500mL e incubadas por 24 horas a 30 °C com agitação de 200 RPM. Após o tempo de crescimento da suspensão celular, é feito o cálculo para retirada de uma quantidade de células suficientes para uma fermentação com OD₆₀₀ inicial de 0,1, sendo feita a inoculação em seguida, utilizando-se uma seringa estéril. As leveduras EMB50 e EMB51 utilizaram biorreatores de 3L Labfors (Infors HT, Suíça) com um volume de trabalho de 1,5L na Universidade Tecnológica de Chalmers (Gotemburgo, Suécia), e as leveduras EMB52, EMB53 e EMB54 utilizaram biorreatores de 1,2L New Brunswick BioFlo[®] 115 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) com uma capacidade de 1,3 l. com um volume de trabalho de 500 mL na Universidade Católica de Brasília (Brasília, Brasil). A fermentação foi realizada por um período de 24-28 horas, com aeração a 1 volume por volume por minuto (1 VVM) agitação em cascata (O₂ dissolvido 90-100%) à 30 °C com fonte de carbono. Curvas de crescimento das diferentes células são realizadas retirando-se amostras a cada 120 minutos, alíquotas de 1 mL para leitura em comprimento de onda de 600 nm e 1 mL para análise de ácidos orgânicos e cálculo do balanço redox. Todos os processos foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril. Todas as leituras de densidade óptica descritas aqui foram realizadas em equipamento SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices[®]) pela utilização de cubetas de plástico transparente de 12,5 mm x 12,5 mm com leituras à 600 nm em temperatura ambiente e utilizando água destilada como branco e líquido de diluições. Para a detecção de CO₂ foi utilizado um detector acoplado à saída de gases do reator.

4.5.4 Determinação de ácidos orgânicos totais por cromatografia líquida de alta performance

As amostras obtidas durante a fermentação em batelada foram filtradas através de filtros de seringa de nylon de 0,2 µm e armazenadas a -20 °C. Os ácidos orgânicos glicerol, ácido acético, etanol e consumo de glicose foram quantificados utilizando-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com UV (210 nm) e detectores de índice de refração. Uma pré-coluna SRC (50 mm X 4 mm) como fase estacionária foi utilizada resina copolimérica de estireno-divinilbenzeno sulfonado. A taxa de fluxo usada foi de 0,6 mL/min com um volume de injeção de 20 µL, usando uma coluna Shim-pack SCR-101H (Shimadzu) (300 mm 7,9 mm) equilibrada a 60°C com 5 mM H₂SO₄

como fase móvel (MELO *et al.*, 2018). Para determinação de biomassa, determinou-se o peso seco de células pipetando-se uma quantidade fixa de cultura celular em frascos do tipo eppendorf de 2 mL pré-pesados. As células foram então centrifugadas e o pellet foi lavado com água deionizada duas vezes. Depois disso, os eppendorfs contendo as células foram liofilizados durante a noite e pesados para determinação do peso seco celular.

4.5.5 Análise dos parâmetros cinéticos das linhagens

Os dados de biomassa (x), etanol (et), acetato (ac), glicerol (gli), substrato (s) e gás carbônico (C), tempo de fermentação foram plotados em uma tabela. Calculou-se o logaritmo natural para os valores de biomassa, que foram então transformados em gráfico de linha em relação ao tempo, um para cada duplicata. Escolheu-se o conjunto de dados que representava a região com crescimento linear no gráfico, cuja representação refere-se à fase de crescimento exponencial das cepas. Calculou-se então o coeficiente angular das retas, obtendo-se o valor da taxa de crescimento específico máxima ($\mu_{\text{máx}}$) para cada linhagem. Calculou-se então a média e o desvio padrão de $\mu_{\text{máx}}$ para cada linhagem e o teste t foi aplicado através do programa GraphPad Prims para avaliar se diferentes $\mu_{\text{máx}}$ apresentavam diferença estatística significativa.

Para cálculo de rendimento de biomassa ($Y_{x/s}$) etanol ($Y_{\text{et}/s}$), e acetato ($Y_{\text{ac}/s}$), as quantificações em g/L analisadas pelo HPLC foram convertidas em Cmol de acordo com a quantidade de átomos de carbono em cada metabólito e para cálculo foi utilizada a equação abaixo:

$$Y \frac{P}{S} = \frac{Pf - Pi}{Si - Sf}$$

Onde Pf se refere a quantidade de produto final, Pi se refere a quantidade de produto inicial, Sf se refere a quantidade de substrato final e Si se refere a quantidade de substrato inicial, sendo que o produto pode ser acetato, etanol, glicerol ou gás carbônico. No caso do gás carbônico ($Y_{C/s}$), este é medido pelo equipamento em % por gás ejetado do equipamento, e deve ser convertido em Cmol. Isto se faz através da conversão desta porcentagem em litros por minuto (L/min), depois em litros por hora (L/hora), calculando-se então o CO₂ acumulado no intervalo e convertendo-o em mols através da equação de Clapeyron, descrita abaixo:

$$PV = nRT$$

Onde P é a pressão (1 ATM), V é o volume calculado da % do analisador de gás, n é o número de mols do gás, R é a constante universal do gás e T é a temperatura do gás em Kelvin. A análise de gás carbônico emitido pelo processo foi analisada em sensor de *off gases* apenas nas linhagens EMB50 e EMB51, sendo que nas fermentações em batelada das linhagens EMB52, EMB53 e EMB54 o CO₂ foi estimado para fins de fechamento do balanço redox com base na produção dos outros componentes pela levedura.

Dessa forma, os rendimentos em Cmol/Cmol foram calculados, a média e o desvio padrão foram retirados e o teste T foi realizado para analisar a relevância estatística das linhagens EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 frente à linhagem controle EMB50.

4.5.6 Determinação de ácidos graxos totais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas (IB) - Universidade de Brasília (UnB) com supervisão do professor Dr. Thomas C. R. Williams e feitas a fim de se analisar os ácidos graxos totais das linhagens de levedura. A quantificação de ácidos graxos foi realizada nas linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54. O crescimento das linhagens foi realizado em meio YNB, adicionando aminoácidos quando necessário e 2% (p/v) de glicose foi usada como fonte de carbono. Três análises foram feitas. A primeira com células crescidas em tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL em OD baixa, a segunda com EMB52, EMB53 e EMB54 crescidas em fermentador e, devido à resultados diferentes, um terceiro crescimento de todas as linhagens em Erlenmeyer em um volume de 1200 mL até o final da fase logaritmica foi feito. As linhagens foram centrifugadas a 3000 x g e lavadas com água destilada estéril cinco vezes. Os *pellets* celulares foram então congelados e secos em liofilizador. Para extração, foram colocadas amostras de biomassa seca (\cong 7mg) em tubos Eppendorf contendo 0,2 mL de metanol/clorofórmio (1: 2, v/v), 0,3 mL de MeOH contendo HCl (5%, v/v) e 25 μ g de metil-tridecanoato como padrão interno. Os lipídios foram transesterificados *in situ* (LAURENS *et al.*, 2012) a 85 °C por uma hora. As amostras foram então deixadas esfriando à temperatura ambiente (25 °C). Foi adicionado 1 mL de hexano para extrair FAMES e as amostras foram agitadas suavemente por 1 h sem inversão do tubo e a fase superior (não polar) foi transferida para outro frasco para análise usando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa de impacto eletrônico

(Agilent Technologies 7890-5975) equipado com uma coluna HP-INNOWAX (30 m (l) x 0,25 mm (ID) x 0,5 µm (espessura do filme), Agilent USA). As amostras foram injetadas a 260 °C usando injeção dividida. O fluxo de gás portador de hélio foi mantido a um fluxo constante de 1 mL.min⁻¹ e os ácidos graxos foram separados usando um gradiente de temperatura de 70 °C/1min, aumentando 20 °C por minuto para 130 °C. Após 130 °C, a temperatura foi aumentada para 270 °C a 10 °C por minuto, reduzida para 260 °C e mantida a esta temperatura por 10 minutos. A quantificação das FAMES foi realizada usando uma curva padrão construída usando o software Agilent ChemStation e uma mistura certificada de FAMES (do inglês, *fatty acyl methyl esters*, ésteres metílicos de ácidos graxos) (padrão Grain FAME, Sigma-Aldrich).

4.5.7 Análise, quantificação e estatística dos ácidos graxos nas linhagens analisadas

Para calcular a quantidade de ácidos graxos das triplicatas biológicas das linhagens analisadas por GC-MS, o resultado gerado pelo software mostra a quantidade em µg/mL de amostra extraída dissolvida em hexano. Estes resultados foram então transformados em µg total de ácidos graxos extraídos e transformados em porcentagem por peso seco de amostra (%/DCW) através do cálculo pelo peso de material celular seco pesado para análise.

Destes dados foi então retirada a média e calculado o desvio padrão. Para análise de relevância estatística, as linhagens EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 tiveram o teste T múltiplo aplicado em cada tipo de cadeia de ácido graxo produzida em relação à linhagem EMB50 através do software GraphPad Prism. Com isso foi possível analisar a quantidade de ácidos graxos totais das amostras, bem como a abundância relativa de tipos de cadeias de ácidos graxos dentro de cada um dos perfis das linhagens e sua relevância em relação à linhagem controle.

4.5.8 Quantificação de Acetil-CoA e malonil-Coa por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPHLC-MS)

4.5.8.1 Espectrometria de massas (MS)

A análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi feita na Embrapa Agroenergia, no Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis, pela pesquisadora Dra. Patrícia Abdelnur e pela pós doc. Dra. Christiane Campos.

A técnica de infusão direta por espectrometria de massas (DIMS – Direct Infusion Mass Spectrometry) foi utilizada para otimizar as condições de análise por MRM (Multiple Reaction Monitoring) utilizando os padrões Acetil-CoA e Malonil-CoA. O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização negativo ESI(-)-MS. Os parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas utilizados estão descritos a seguir: vazão: 0,4 mL/min, voltagem do capilar: + 3500 V, voltagem do cone: 60V, temperatura de solvatação: 450°C, temperatura da fonte: 130°, fluxo do gás do cone: 20 L/h e fluxo do gás de solvatação: 700 L/h. Após a identificação do íon precursor mais intenso referente ao composto de interesse, este íon foi submetido ao experimento de espectrometria de massas tandem (MS/MS). O valor da energia de colisão utilizada foi de 50 V. Os dados obtidos nesta etapa foram utilizados para configurar os canais do método MRM (**Tabela 6**)

Tabela 6. Dados obtidos utilizados para configurar os canais do método MRM

Composto	MRM (m/z)	Cone	EC
Acetil-CoA	807.9 > 407.8	60 V	50 V
Malonil-CoA	851.9 > 407.9	60 V	50 V

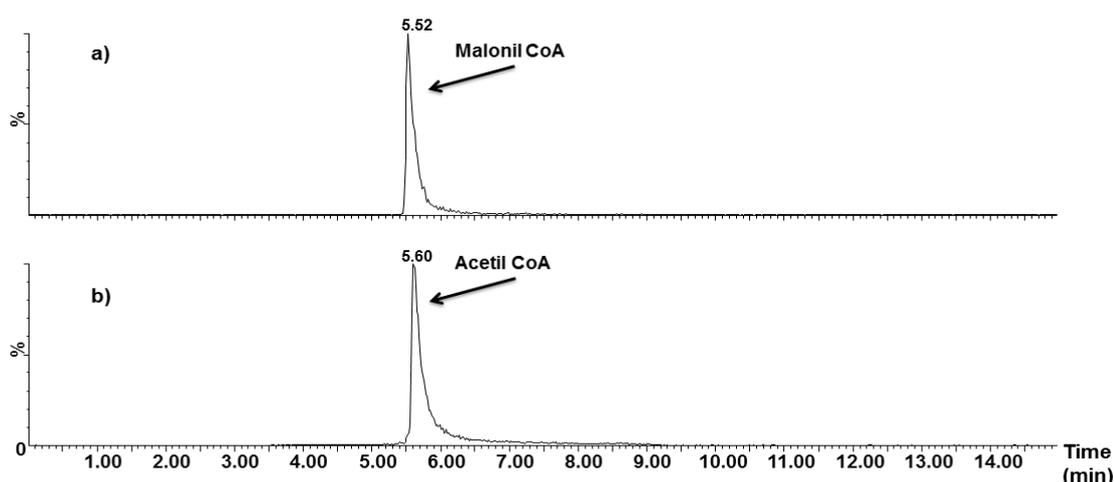


Figura 14. Picos de absorção de acetil-CoA e malonil-CoA referentes aos padrões utilizados para aferência das quantificações feitas nas linhagens.

As amostras foram analisadas em triplicata, o desvio padrão foi calculado e o teste T foi utilizado para verificar a relevância dos resultados das linhagens EMB₄₁ e EMB₅₂ frente aos resultados de EMB₅₀.

4.5.8.2 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (LC)

A análise foi realizada através da cromatografia líquida de ultra alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS) (Acquity Xevo TQD, Waters). A coluna utilizada foi a HSS-T₃ com dimensões 2,1 x 150 mm x 1,8 µm (Waters) do tipo C₁₈ com grupo polar embutido. O método de separação utilizado foi a cromatografia por pareamento iônico (IPC), com fase móvel (A: Tributílamina 5 mM + Ácido Acético 10 mM + 5% MeOH e B: MeOH). A fase móvel A (tributílamina 5 mM + Ácido Acético 10 mM + 5% de MeOH), foi preparada utilizando 950 mL de H₂O Milli-Q, 50 mL de metanol contendo 560 µL de ácido acético (Sigma- aldrich) e 1190 µL de tributílamina (Sigma-aldrich). O pH da solução medido foi de 4,83. A fase móvel B, predominantemente orgânica é constituída por metanol da marca JBaker. O gradiente utilizado é descrito na **Tabela 7**, a temperatura do forno de coluna foi de 45 °C e o tempo de análise de cada amostra foi de 15 minutos.

Tabela 7. Gradiente cromatográfico usado na separação dos compostos pelo modo IPC, fase móvel A: Tributilamina 5 mM + Ácido Acético 10 mM + 5% MeOH e B: MeOH, a 45 °C.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Eluente A (vol. %)	Eluente B (vol. %)
0.0	0.4	89.5	10.5
3.0	0.4	47.4	52.6
13.0	0.4	47.4	52.6
14.0	0.4	89.5	10.5
14.5	0.6	89.5	10.5
15.0	0.4	89.5	10.5

4.5.9 Detecção de ramnolipídeos através de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

4.5.9.1 Crescimento e *quenching* das linhagens a serem analisadas

Linhagens EMB50 e EMB54 foram crescidas em 100 mL de meio YNB em triplicata até o final da fase logarítmica. O crescimento foi então imediatamente parado através do processo de *quenching* que consiste na pipetagem de 8 mL da cultura em 32 mL de metanol 60% (MeOH 60% / H₂O ultrapura deionizada 40%) resfriado à temperatura de -60 °C, dentro de tubos Falcon de 50 mL. Esta solução é então centrifugada à 5000 RPM por 5 minutos à -9 °C e o sobrenadante e pellet são separados e reservados para análise

4.5.9.2 Extração de material celular para análise

Para preparo das amostras para análise, inicialmente foi preparada uma solução tampão de etanol (EtOH 75%, 10mM de acetato de amônio, pH 7,4) e esta solução foi aquecida a aproximadamente 85 °C. Adicionou-se então 8 mL da solução de etanol fervente aos tubos falcon de 50 mL. Em seguida, estas amostras foram homogeneizadas em um agitador orbital tipo vortex. As amostras foram então incubadas por 3 minutos a 85°C com agitação vigorosa constante em um termoagitador (Thermoximer, Eppendorf). As células foram imediatamente resfriadas a -40 °C por aproximadamente 30 s no banho termostático e centrifugadas em uma centrífuga refrigerada (Termo Scientific, Megafuge) a 5000 rpm e 9 °C por 3 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para vials de 1,5 mL e analisados por LC-MS.

4.5.9.3 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

Para análise, a técnica de infusão direta por espectrometria de massas (DIMS – Direct Infusion Mass Spectrometry) foi utilizada para otimizar as condições de análise por MRM (Multiple Reaction Monitoring) utilizando o padrão de ramnolipídeos (monorhamnolipids 95%, Sigma Aldrich). O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização negativo ESI(-)-MS. Os parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas utilizados estão descritos a seguir: vazão: 0,4 mL/min, voltagem do capilar: + 3000 V, voltagem do cone: 30V, temperatura de solvatação: 400°C, temperatura da fonte: 150°, fluxo do gás do cone: 20 L/h e fluxo do gás de solvatação: 700 L/h. Após a identificação do íon precursor mais intenso referente ao composto de interesse, este íon foi submetido ao experimento de espectrometria de massas tandem (MS/MS). O valor da energia de colisão utilizada foi de 20 V. Os dados obtidos nesta etapa foram utilizados para configurar os canais do método MRM, como pode ser observado na **Tabela 8**.

Tabela 8. Configuração dos canais do método de detecção de ramnolipídeo em UHPLC-MS

Composto	MRM (m/z)	Cone	EC
Ramnolipídeo	503.46 > 168.97	30 V	18 V

Na análise em UHPLC-MS/MS (Acquity Xevo TQD, Waters), a coluna utilizada foi a HSS-T₃ com dimensões 2,1 x 150 mm x 1,8 µm (Waters) do tipo C₁₈ com grupo polar embutido, a temperatura do forno de coluna foi 45°C. A fase móvel consistiu nas fases móvel A: H₂O + ácido fórmico 0,1% e B: Acetonitrila + ácido fórmico 0,1% em modo gradiente. O tempo de análise de cada amostra foi de 10 minutos. O gradiente das soluções, fluxo e tempo podem ser visualizados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Fluxo e porcentagem dos eluentes utilizados na análise de ramnolípídeo por LC-MS.

Tempo (min)	Fluxo (mL//min)	%A	%B
0	0.4	80	20
5.0	0.4	5	95
7.0	0.4	5	95
10.0	0.4	80	20

5. RESULTADOS

5.1 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES

5.1.1 Transformação dos plasmídeos em *S. cerevisiae* CEN.PK2 1-113

A linhagem CEN.PK já é conhecida e apresenta altas eficiências de transformação. Uma grande vantagem é a taxa de crescimento rápido, com tempos de duplicação de haploides de até 80 min (ENTIAN; KO, 2007). A escolha específica da linhagem CEN.PK2 1-113 se deu pelas marcas auxotróficas que essa linhagem apresenta, com deficiência em triptofano, histidina, leucina e uracila. Antes da transformação os plasmídeos foram linearizados tendo removidas suas sequências interteloméricas. A **Figura 15** mostra um gel de agarose contendo os plasmídeos linearizados e a região intertelomérica excisada.

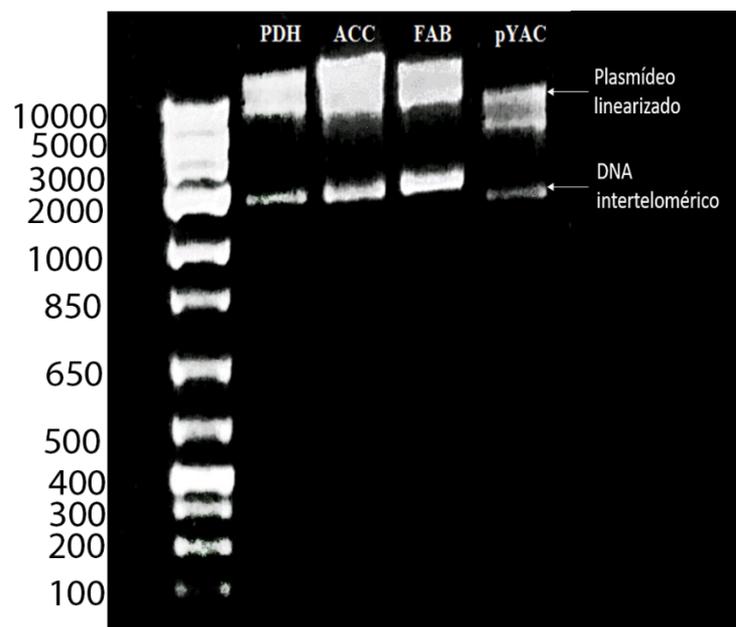


Figura 15. Análise eletroforética de plasmídeos linearizados utilizando a endonuclease de restrição BamH I para transformação em *S. cerevisiae*.

Foi observado que a transformação com plaqueamento imediato não gerava clones. Dessa forma, foi notado que, para adequada entrada no ciclo celular da levedura e consequente sobrevivência desta em meio seletivo, a transformação e plaqueamento da levedura deveriam ter, entre si, uma etapa de estabilização do plasmídeo do tipo cromossomo para decorrente sobrevivência da linhagem transformante. Isto foi conseguido com a adição de uma etapa de 6 horas em meio complexo YPD à 30 °C, ou *overnight* à 4 °C,

denominada etapa de estabilização cromossomal e foi adicionada ao protocolo. Esta etapa possibilitou imediata sobrevivência celular com expressão correta das marcas auxotróficas.

Após transformação, as leveduras foram confirmadas pela sobrevivência em meio seletivo com ausência da seleção das duas marcas auxotróficas (triptofano e histidina,) e adição de uracila e leucina. Os controles para este teste foram a introdução das linhagens crescidas em YNB (+ura +leu) em YNB (s/aa), em YNB (+ura) e YNB (+leu), resultando no não crescimento de colônias, confirmando assim que o cromossomo se encontra completo dentro da levedura.

5.1.2 Construção da linhagem EMB54

A linhagem EMB₅₄ foi construída utilizando o plasmídeo pYAC₄mPDH. Este plasmídeo foi submetido à clivagem por ação das endonucleases Aat II e Xba I que gera extremidades coesivas. Após essa reação com endonuclease, o plasmídeo digerido foi submetido à uma reação em cadeia de polimerase com o Fragmento Klenow de polimerase I para transformação das extremidades coesivas do DNA em extremidades abruptas. O Fragmento Klenow de polimerase I apresenta atividade da polimerase 5' → 3' e atividade de exonuclease 3' → 5', mas carece de atividade de exonuclease 5' → 3' da DNA polimerase I, permitindo assim o preenchimento de extremidades coesivas em abruptas e subsequente ligação do vetor em si mesmo. A excisão deste fragmento, correspondente ao promotor de TRP₁ e 97 pares de base da sequência codante do gene TRP₁, foi feita diante da necessidade de truncar a sequência da marca auxotrófica TRP₁ do cromossomo para inserção dos plasmídeos codificadores das enzimas produtoras de ramnose e ramnolipídeo. A **Figura 16** mostra o resultado obtido pela ação das endonucleases de restrição no plasmídeo pYAC₄mPDH com o fragmento de 262 pb excisado, enquanto ao seu lado é possível visualizar o plasmídeo pYAC₄mPDH-trp linearizado por Age I.

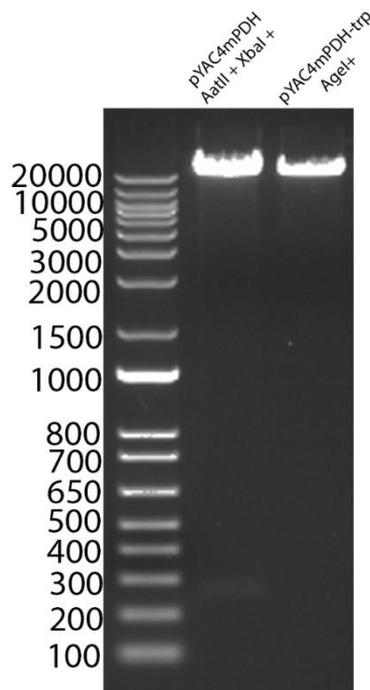


Figura 16. Linearização do plasmídeo pYAC4mPDH com as endonucleases Aat II e Xba I mostrando fragmento de 262pb liberado do pYAC4mPDH. Este fragmento é ausente em pYAC4mPDH-trp, mostrado ao lado do pYAC4mPDH com linearização pela endonuclease de restrição Age I.

Após construção do vetor, denominado pYAC4mPDH-trp, o mesmo foi transformado juntamente com os plasmídeos p424, p425 e p426.

A levedura resultante possui os genes codificantes do complexo PDHc, os genes necessários para sintetizar o açúcar ramnose, bem como os genes para utilizar o metabólito β -hidroxidecanoil-ACP e converte-lo em ramnolípido pela junção das duas vias. Essa levedura foi denominada EMB54 e possui todas as marcas auxotróficas preenchidas pelos plasmídeos inseridos e assim pode sobreviver em meio mínimo YNB sem necessidade de adição de aminoácidos.

5.1.3 Confirmação dos transcritos por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

5.1.3.1 Análise e confirmação dos transcritos

Para confirmação da transcrição dos genes *aceE*, *aceF*, *lpdG* em EMB51, *accA*, *accB*, *accC*, *accD* e *pao494* em EMB52, *fabH*, *fabG*, *fabB* e *fabD* em EMB53 e *rhlA*, *rhlB*, *rmlA*, *rmlC*, *Gft*, *rmlB* e *rmlD* EMB54, os cDNAs foram submetidos a um protocolo regular de PCR e a transcrição dos genes foi analisada. Os géis resultantes dessas análises podem ser visualizados na **Figura 17**.

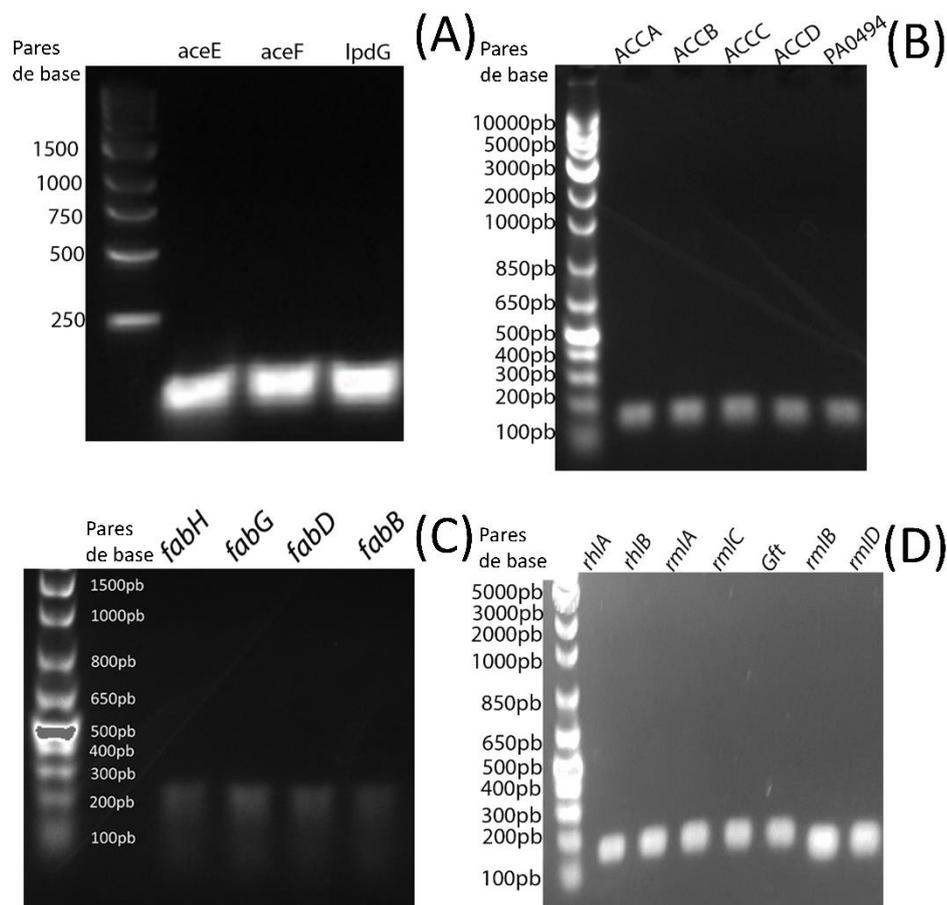


Figura 17. Análises eletroforéticas da transcrição dos genes *aceE*, *aceF* e *lpdG*, do plasmídeo pYAC4mPDH (A), *accA*, *accB*, *accC*, *accD* e *pa0494* do plasmídeo pYAC4mACC (B), *fabH*, *fabG*, *fabD* e *fabB* do plasmídeo pYAC4mFab (C), e *rhlA*, *rhlB*, *rmlA*, *rmlC*, *Gft*, *rmlB* e *rmlD* dos plasmídeos p424TEF, p425GPD e p426GPD (D), através de RT-PCR do RNA extraído das linhagens EMB50, EMB51, EMB52 EMB53 e EMB54.

5.1.4 Quantificação de Acetil-CoA e Malonil-CoA em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

Para compreender se houve alteração na quantificação de acetil-CoA e malonil-CoA nas linhagens EMB51 e EMB52, foi utilizada a técnica de LC-MS para quantificação dessas moléculas. Essa etapa testa a função das enzimas heterólogas para entender se as mesmas tem síntese e expressão funcional.

Nesta quantificação, foi possível observar a produção de 12.1473 µg de acetil-CoA por mL de material extraído na levedura EMB51, contra 10.2673 µg/mL na levedura controle, bem como um aumento em EMB52, resultando em 12.8032 µg/mL nesta linhagem.

Em relação à detecção de malonil-CoA nas amostras, esta ficou abaixo dos limites de resolução da técnica (7,5 µg/mL), não sendo possível quantificar este composto e, sendo

assim apenas os dados de acetil-CoA foram analisados, sendo dispostos na **Tabela 10**, com a média de produção em $\mu\text{g/mL}$ de cada levedura e o valor do teste de significância.

Tabela 10. Dados de quantificação de acetil-CoA ($\mu\text{g/mL}$) nas leveduras EMB50 e EMB51 e EMB52

Linhagem	Absorbância média das células	Produção média ($\mu\text{g/mL}$) de acetil-CoA	Significância
EMB50	7,4	10,2673	-
EMB51	7,6	12,1473	$P < 0,05$
EMB52	7,4	12,8032	$P < 0,05$

5.1.5 Rendimento das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 em crescimento no modo batelada

Nas fermentações conduzidas ao longo deste trabalho, a levedura EMB50 apresentou um crescimento específico médio ($\mu_{\text{Máx}}$) de $0,19 \text{ h}^{-1}$, enquanto EMB51, EMB52 e EMB53 apresentaram um crescimento específico de $0,25 \text{ h}^{-1}$, $0,27 \text{ h}^{-1}$ e $0,21 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. O rendimento de biomassa (x) e glicerol (gli) na linhagem controle foi de $0,127 \text{ Cmol/Cmol}$ e $0,025 \text{ Cmol/Cmol}$ pelo substrato glicose (s), respectivamente, enquanto em EMB51 foi de $0,225 \text{ Cmol/Cmol}$ e $0,044 \text{ Cmol/Cmol}$. Em EMB52, o rendimento destes compostos foi de $0,270 \text{ Cmol/Cmol}$ e $0,022 \text{ Cmol/Cmol}$, respectivamente. A produção de acetato (ac) e etanol (et) foi de $0,025 \text{ Cmol/Cmol}$ e $0,389 \text{ Cmol/Cmol}$ na linhagem controle, enquanto em EMB51 foi de $0,014 \text{ Cmol/Cmol}$ de acetato e $0,457 \text{ Cmol/Cmol}$ de etanol, enquanto em EMB52 foi $0,027 \text{ Cmol/Cmol}$ e $0,377 \text{ Cmol/Cmol}$, respectivamente. Em EMB54, a produção de biomassa e glicerol foi de $0,219 \text{ Cmol/Cmol}$ e $0,020 \text{ Cmol/Cmol}$, enquanto acetato e etanol foram $0,022 \text{ Cmol/Cmol}$ e $0,353 \text{ Cmol/Cmol}$, além de uma velocidade de crescimento específico de $0,21 \text{ h}^{-1}$. Em relação ao gás carbônico (CO_2) produzido por cada linhagem, foi medida uma produção de $0,416 \text{ Cmol/Cmol}$ em EMB50 e $0,301 \text{ Cmol/Cmol}$ em EMB51. Esses resultados podem ser melhor visualizados na **Tabela 11**, **Tabela 12** e na **Figura 18**.

Tabela 11. Taxa de crescimento máximo específico ($\mu_{M\acute{a}x}$) e rendimentos dos metabólitos das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54, onde “y” representa rendimento (Cmol/Cmol), “s” representa o substrato glicose, “x” representa biomassa, “gli” representa glicerol, “ac” representa acetato, e “et” representa etanol.

Linhagem	$\mu_{M\acute{a}x}$	Rendimento ($Y_{x/s}$) (Cmol/Cmol)	Desvio Padrão	Rendimento ($Y_{gli/s}$) (Cmol/Cmol)	Desvio Padrão	Rendimento ($Y_{ac/s}$) (Cmol/Cmol)	Desvio Padrão	Rendimento ($Y_{et/s}$) (Cmol/Cmol)	Desvio Padrão
EMB50	0,19	0,127	0,021	0,025	0,002	0,025	0,001	0,389	0,035
EMB51	0,25	0,225	0,042	0,044	0,003	0,014	0,003	0,457	0,019
EMB52	0,27	0,270	0,021	0,022	0,001	0,027	0,001	0,377	0,027
EMB53	0,21	0,462	0,004	0,057	0,004	0,019	0,001	0,305	0,003
EMB54	0,21	0,219	0,057	0,020	0,005	0,022	0,013	0,353	0,016

Tabela 12. Produtividades específicas das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54, onde “q” representa produtividade específica($g/g.h^{-1}$), “s” representa o substrato glicose, “gli” representa glicerol, “ac” representa acetato, e “et” representa etanol

Linhagem	q_s (h^{-1})	Desvio Padrão	q_{gly} (h^{-1})	Desvio Padrão	q_{Ac} (h^{-1})	Desvio Padrão	q_{Et} (h^{-1})	Desvio Padrão
EMB50	1.592	0.284	0.041	0.004	0.040	0.005	0.614	0.054
EMB51	1.140	0.246	0.050	0.014	0.016	0.004	0.523	0.134
EMB52	1.004	0.065	0.022	0.001	0.026	0.005	0.378	0.024
EMB53	0.748	0.042	0.040	0.003	0.014	0.010	0.226	0.004
EMB54	0.990	0.014	0.020	0.005	0.021	0.012	0.350	0.020

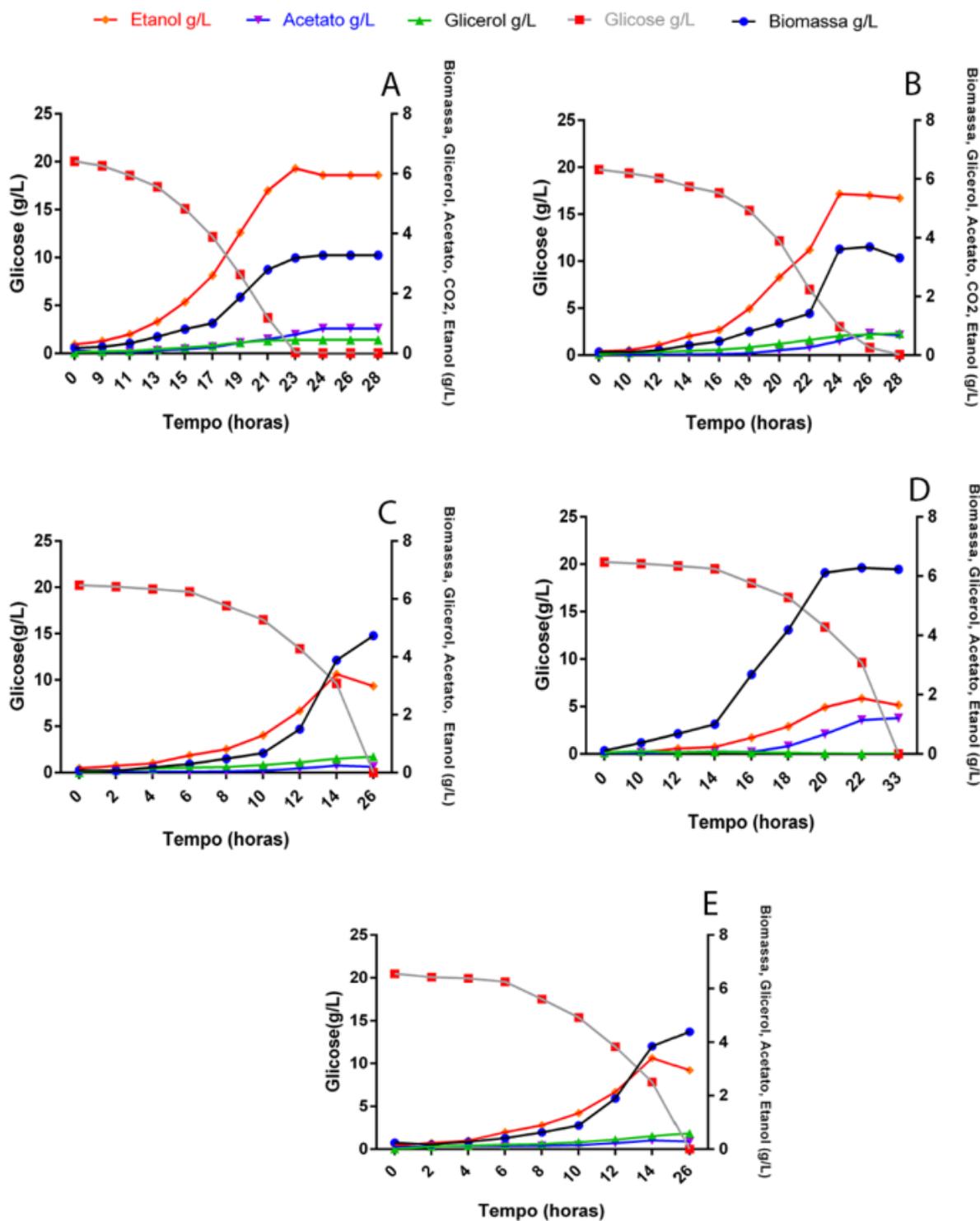


Figura 18. Perfis fermentativos das linhagens EMB50 (A), EMB51 (B), EMB52 (C), EMB53 (D) e EMB54 (E). As linhagens EMB52, EMB53 e EMB54 foram crescidas em biorreator de 1.2 L com volume de trabalho de 500 mL. As células tiveram sem crescimento feito a uma temperatura de 30 °C, com agitação em cascata e pH 5.5. O meio utilizado foi YNB com adição de aminoácidos quando necessário.

5.1.6 Análise de ácidos graxos totais por cromatografia gasosa-acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

As análises do perfil de ácidos graxos das linhagens foram feitas de três formas e em períodos distintos, conforme descrito abaixo:

- A primeira análise foi feita para avaliar o perfil de ácidos graxos das linhagens EMB50-53, no intuito de compreender as mudanças causadas pelos cassetes em cada um desses organismos e selecionar o melhor perfil para expressão dos genes relacionados à produção de ramnose e ramnolipídeos. Dessa forma, estas células foram crescidas em tubos cônicos de 50 mL, em baixa densidade celular ($OD < 0,8$) e apresentaram os seguintes resultados:
 - A linhagem EMB51 teve um aumento de 16% na produção de ácidos graxos totais quando comparado com a linhagem controle EMB50. As cadeias C10 tiveram um aumento de 14 vezes (9% do total de ácidos graxos), enquanto as cadeias C18 aumentaram em 20%. Cadeias C12 e C20:1 aumentaram em quatro vezes e cadeias C16 tiveram sua síntese diminuída em quase 50%. Na mesma linhagem, cadeias C18 insaturadas, especialmente C18:2 e C18:3, foram sintetizadas 20 vezes mais que na linhagem controle.
 - A produção total de ácidos graxos da linhagem EMB52 caiu em 43% quando comparada à linhagem controle. Em números absolutos, as cadeias C18 dobraram (C18:2 e C18:3 aumentaram em 27 vezes), C20 aumentou em 43 vezes e C12 em 2 vezes. Curiosamente, cadeias com 10 carbonos e cadeias superiores a C20:1 não foram detectadas.
 - Em EMB53, a produção total de ácidos graxos 51% menor que a controle. Cadeias C10, C12, C14 e C14:1 não foram detectadas, enquanto C16 e C18 tiveram aumentos discretos. Cadeias insaturadas C16:1 e C18:1 foram drasticamente reduzidas, ficando entre 30 e 40% do observado no controle, enquanto C18:2 e C18:3 aumentaram em 30 vezes. Notavelmente, cadeias maiores que C20 não foram detectadas. Estas análises podem ser observadas na **Figura 19**, **Figura 20** e na **Figura 21**.

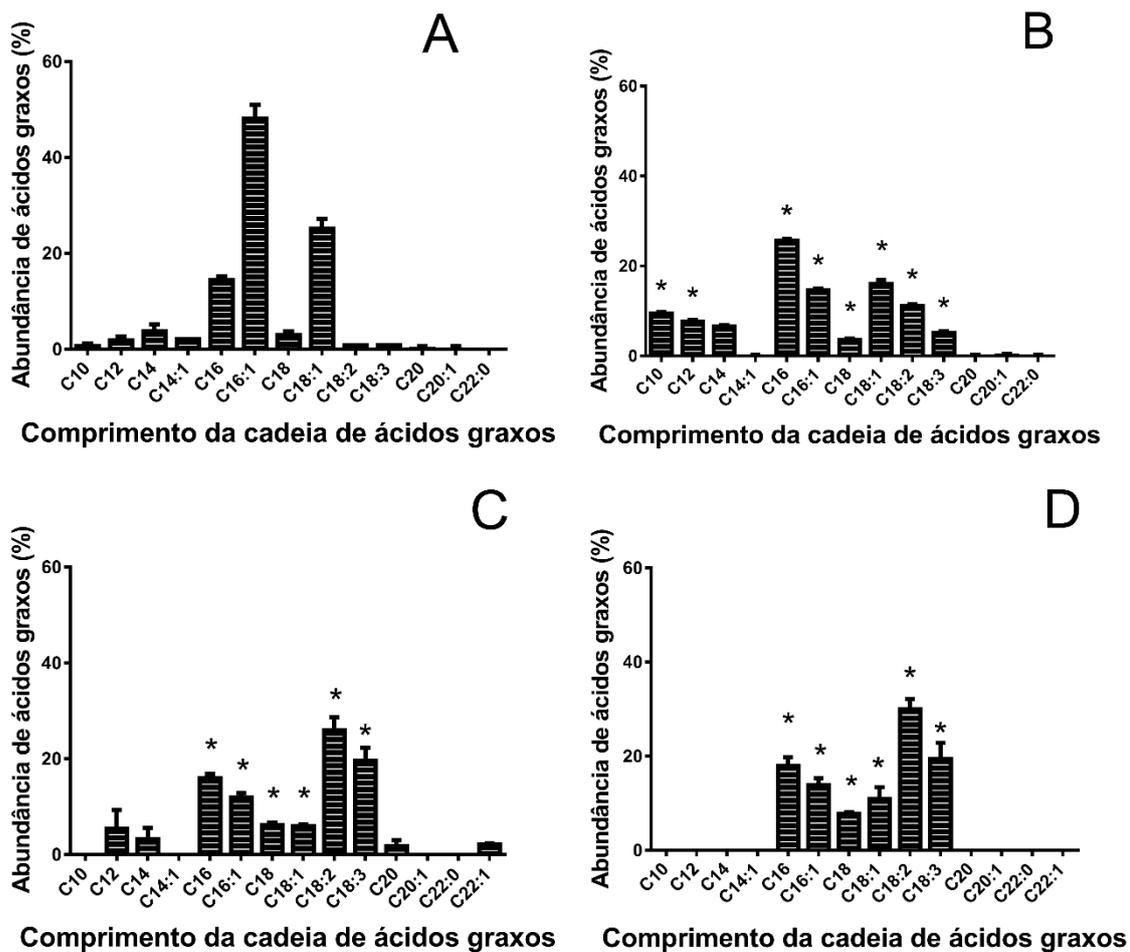


Figura 19. Análise de GC-MS mostrando o perfil de ácidos graxos das linhagens EMB50 (A), EMB51 (B), EMB52 (C) e EMB53 (D) com crescimento em frascos cônicos de 50 mL do tipo Falcon em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de cada molécula pelo peso seco celular extraído para análise e a significância em relação à linhagem controle pode ser observada através do (*).

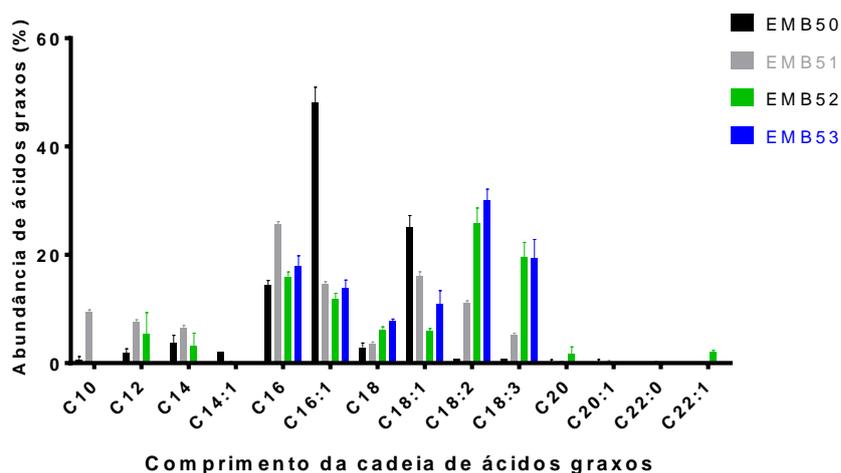


Figura 20. Comparação entre os perfis de ácidos graxos das linhagens EMB50, EMB51, EMB52 e EMB53 com crescimento em frascos cônicos de 50 mL do tipo Falcon em triplicata biológica

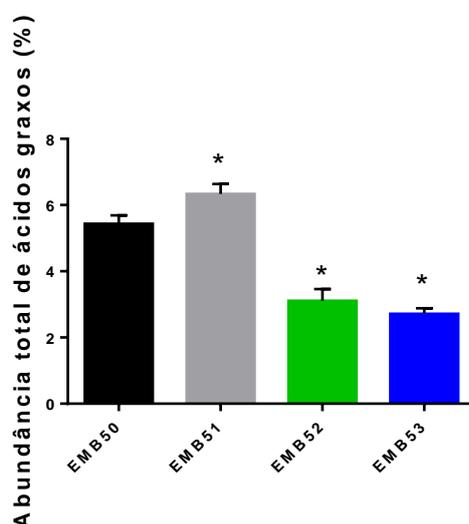


Figura 21. Porcentagem total de ácidos graxos por peso seco celular das linhagens EMB50, EMB51, EMB52 e EMB53 com crescimento em frascos cônicos de 50 mL do tipo Falcon em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de moléculas extraídas pelo peso seco celular extraído para análise. A significância em relação à linhagem controle pode ser observada através do (*).

- Após obter-se a linhagem EMB54, a mesma análise em GC-MS foi utilizada para observar-se o perfil lipídico dessa linhagem. Esta análise foi feita utilizando-se células crescidas em fermentação aeróbica, em reatores de 1.2L. Adicionalmente, decidiu-se utilizar células de EMB52 e EMB53 que também haviam passado pelo mesmo processo de crescimento.
 - Os resultados de EMB52 e 53 mostraram perfis diferentes das análises de ácidos graxos anteriores em relação à levedura controle EMB50 medida

anteriormente, além de uma quantificação total superior à essa mesma medida, enquanto EMB₅₄ mostrou uma quantificação de 80% do total da levedura controle, como pode ser observado nas **Figura 22** e **Figura 23**.

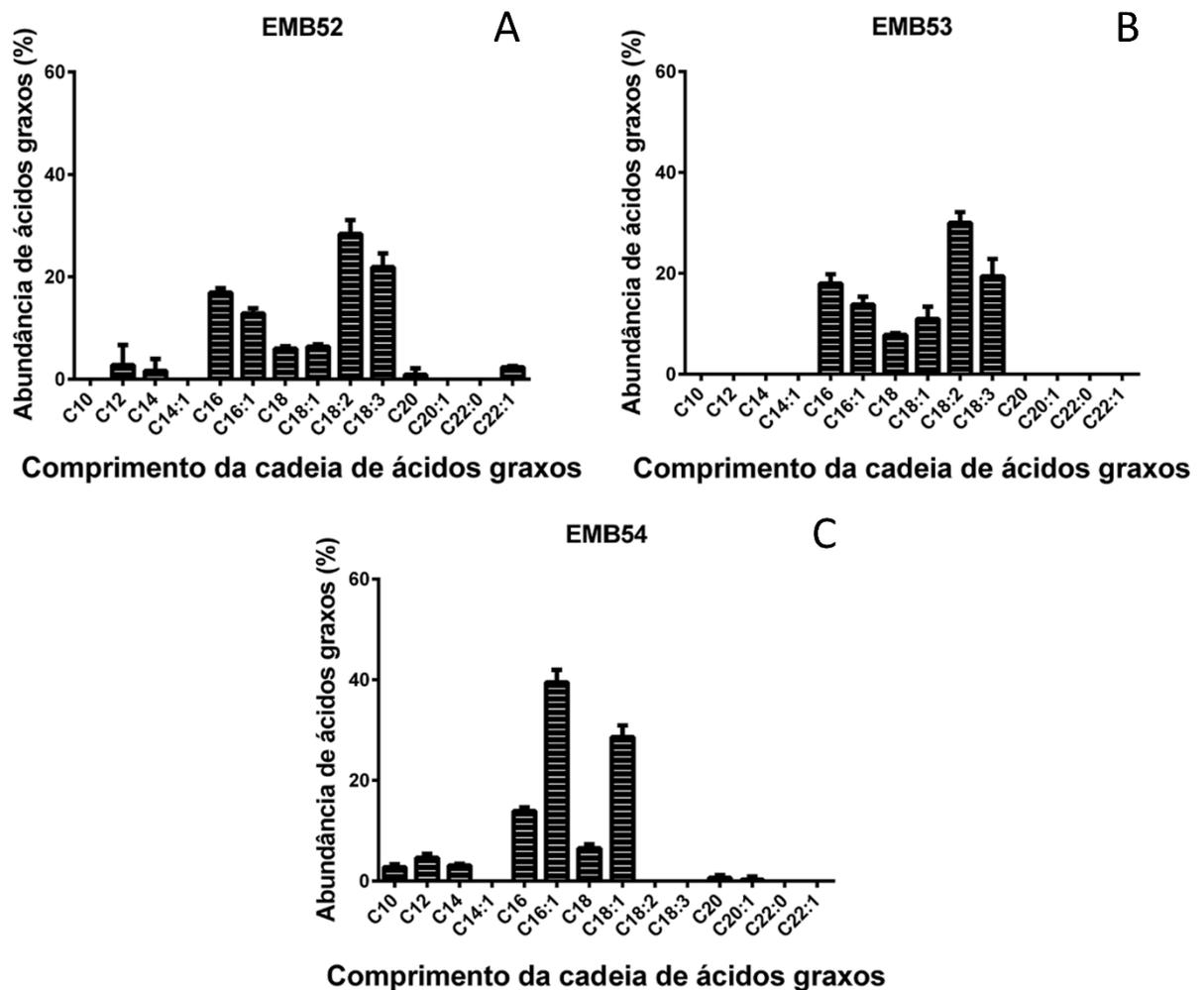


Figura 22. Perfil de ácidos graxos das linhagens EMB₅₂ (A), EMB₅₃ (B) e EMB₅₄ (C) crescidas em fermentador. O resultado foi calculado através da porcentagem de cada molécula pelo peso seco celular extraído para análise.

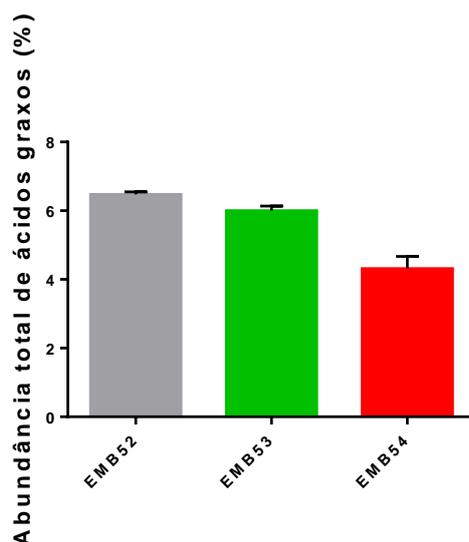


Figura 23. Porcentagem de ácidos graxos por peso seco celular das linhagens EMB52, EMB53 e EMB54 crescidas em fermentador.

Devido às diferenças observadas, e uma vez que as leveduras EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 analisadas anteriormente foram crescidas e analisadas em momentos e condições distintas, decidiu-se fazer um crescimento de todas as linhagens sob as mesmas condições, sendo então as células crescidas em frascos do tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura YNB com glicose como fonte de carbono até atingirem o final de sua fase logarítmica. Dessa forma todas as linhagens foram analisadas em crescimento feito sob as mesmas condições.

- Nas novas análises de EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54, pôde-se observar então:
 - A levedura EMB51 manteve uma quantificação total de ácidos graxos cerca de 16% maior que a quantificação do controle (6,09% DCW no controle contra 7,17% em EMB51), com uma produção de C10 e C12 de 1% e 1,42% respectivamente, enquanto esse composto não pode ser detectado na levedura controle. C14 teve sua quantificação duplicada em relação à controle, enquanto C14:1 teve uma produção de 0,32% (porcentagem por peso seco) enquanto não pode ser detectada na levedura controle. Pode ser observado um aumento de 5 vezes na quantificação de C16:1 em EMB51, e uma diminuição discreta (cerca de 10%) de C18:1.
 - Em relação à linhagem EMB52, a quantificação total de ácidos graxos subiu em cerca de 6% em relação aos níveis observados na levedura

controle (6.09% DCW no controle contra 6.48% em EMB52). Em relação à quantificação por tipo de cadeia, uma perda de 15% da quantificação de C18:3 e um aumento de 9% na produção de C18:1 foi observada em relação à controle, bem como ausência de cadeias do tipo C10 e C12, semelhantemente ao controle.

- A linhagem EMB53 apresentou uma quantificação total de ácidos graxos semelhante à linhagem controle, com um aumento de 18% na produção de cadeias do tipo C18:1, bem como ausência de cadeias C10 e C12.
- A linhagem EMB54, esta mostrou produção de aproximadamente 80% da quantificação de ácidos graxos da linhagem controle. Mais especificamente, C10 mostrou um aumento de 4 vezes a quantificação da levedura controle, C12 e C18 duplicaram e C20 e C20:1 aumentaram em 16 e 9 vezes respectivamente. As cadeias C14, C16 mostraram uma diminuição, enquanto C14:1 não pode ser detectada e C16:1 teve um aumento de 16 vezes. Essas análises podem ser observadas na **Figura 24**, **Figura 25** e **Figura 26**.

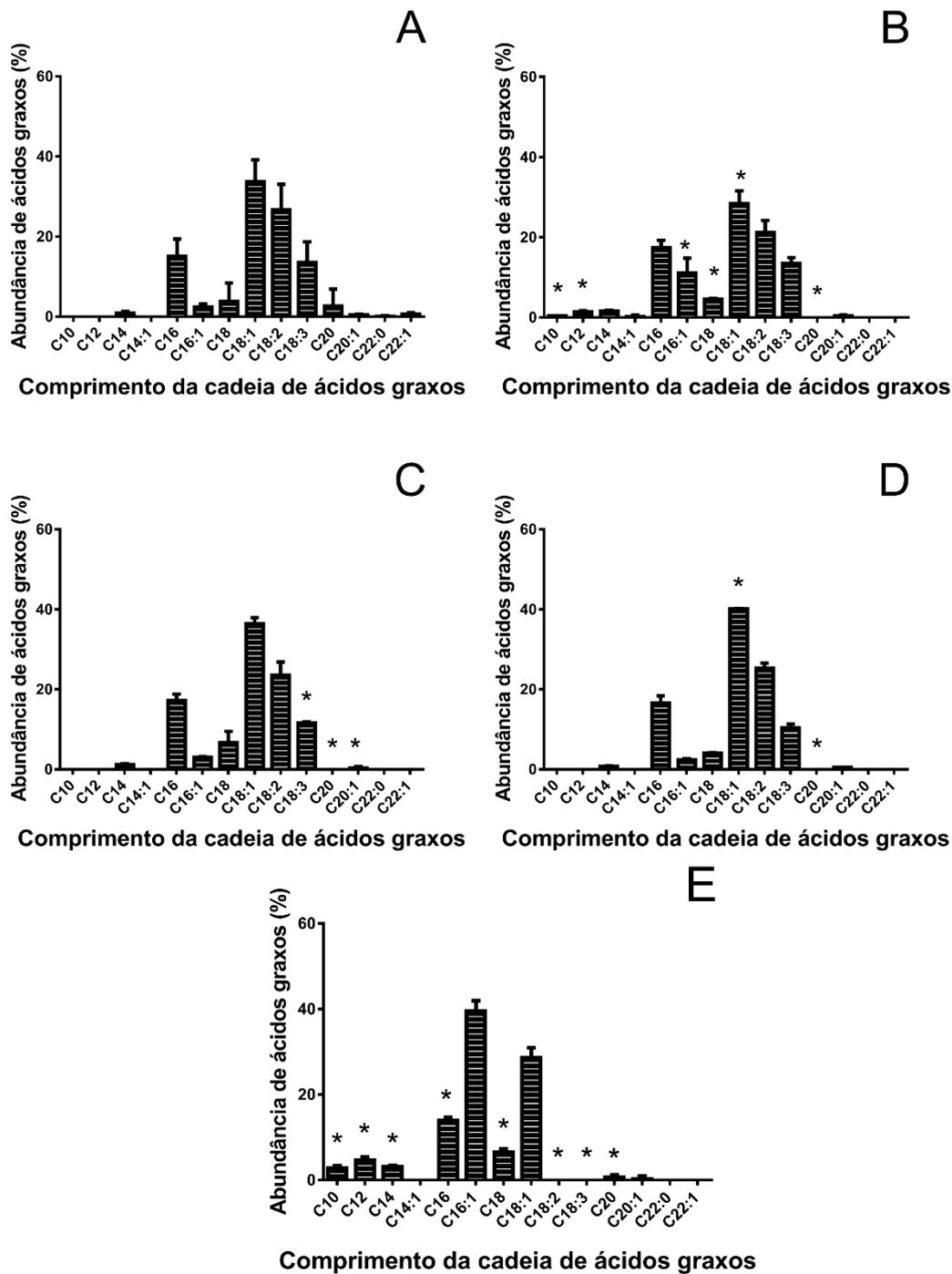


Figura 24. Análise de GC-MS mostrando o perfil de ácidos graxos das linhagens EMB50 (A), EMB51 (B), EMB52 (C), EMB53 (D) e EMB54 (E) com crescimento em Erlenmeyer em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de cada molécula pelo peso seco celular extraído para análise, e a significância de cada cadeia em relação à linhagem controle pode ser observada pelo (*)

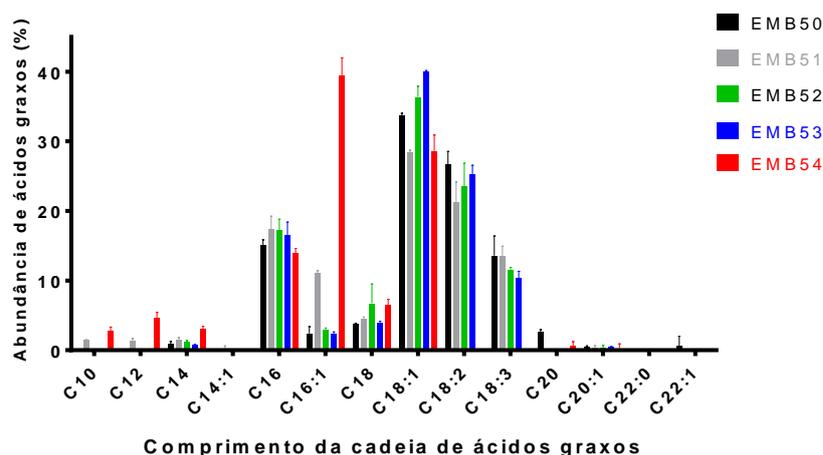


Figura 25. Comparação entre os perfis de ácidos graxos das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 crescidas em frascos do tipo Erlenmeyer em triplicata biológica

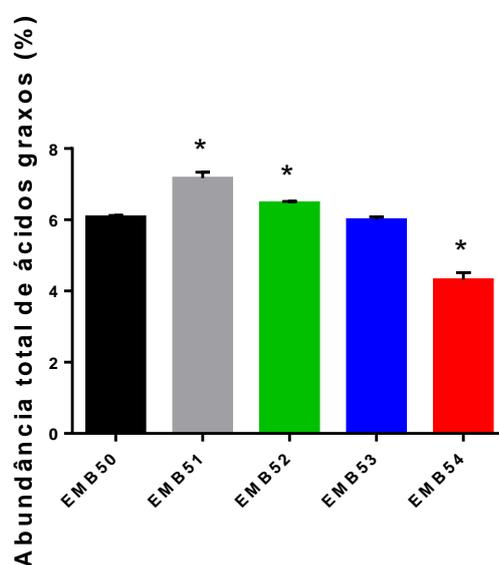


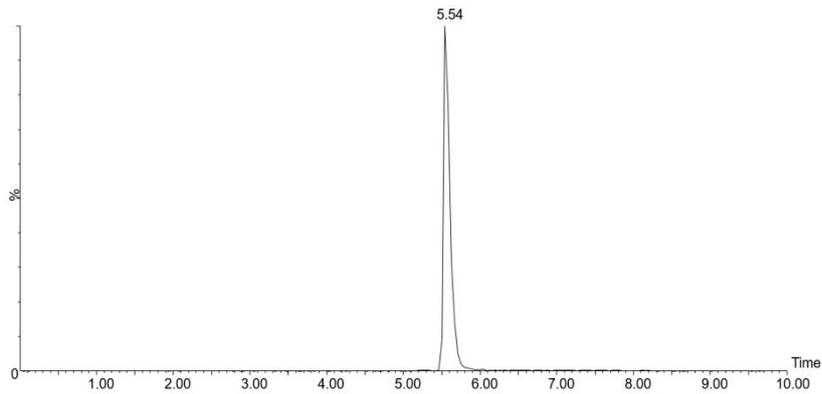
Figura 26. Porcentagem de ácidos graxos por peso seco celular das linhagens EMB50, EMB51, EMB52, EMB53 e EMB54 crescidas em frascos Erlenmeyer em triplicata biológica. O resultado foi calculado através da porcentagem de moléculas extraídas pelo peso seco celular extraído para análise. A significância em relação à linhagem controle pode ser observada através do (*).

5.1.7 Análise de produção de ramnolipídeo pela linhagem EMB54 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

As análises de produção de ramnolipídeos pela linhagem EMB54 resultaram em produção nula da molécula de ramnolipídeo pela levedura. A **Figura 27** mostra os perfis cromatográficos da detecção do padrão de mono-ramnolipídeo e das linhagens EMB50 e EMB54, onde não é possível verificar os picos relativos à produção da molécula de interesse.

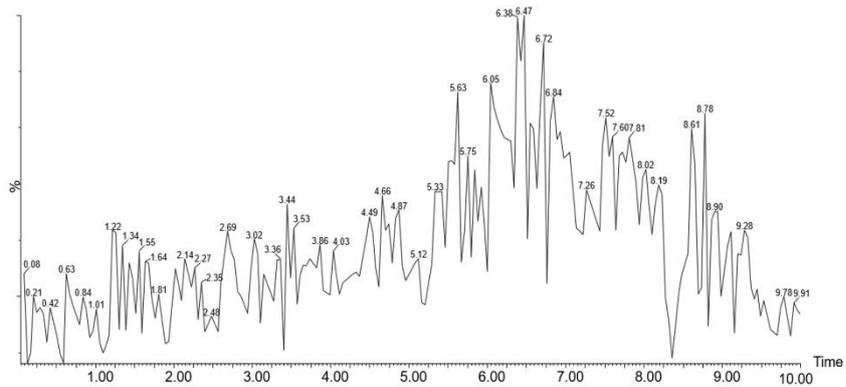
PADRÃO RAMNOLIPÍDEO [20 µg/mL]

(A)



AMOSTRAS - EMB50 (TRIPLICATA)

(B)



AMOSTRAS - EMB54 (TRIPLICATA)

(C)

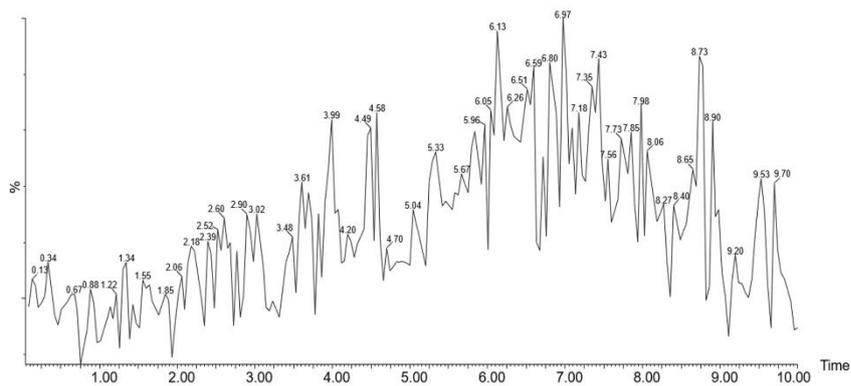


Figura 27. Cromatograma do padrão de mono-ramnolipídeo, mostrando o pico relativo à essa molécula (A), Cromatograma da linhagem controle EMB50, onde é possível observar a ausência do pico relativo à produção de mono-ramnolipídeo (B) e Cromatograma da linhagem EMB54, onde é possível observar a ausência do pico relativo à produção de mono-ramnolipídeo (C).

6. DISCUSSÃO

6.1 LINHAGENS, CRESCIMENTO E PRODUÇÃO TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS

6.1.3 Linhagem EMB51

Expressões de PDHc em levedura já foram testadas (KOZAK et al., 2014; NIELSEN, 2014), sendo notada que a chave do sucesso para um processo eficiente de produção de compostos dependentes de acetil-CoA citosólico é uma enzima PDHc que sofre menor repressão pelas concentrações mais altas de NADH/NAD⁺ bem como a não utilização de ATP pela enzima PDHc ao converter piruvato em acetil-CoA, minimizando a utilização de energia pela levedura neste processo (NIELSEN, 2014).

Baseado nisso, após as análises e em relação à linhagem EMB51, levando em consideração os dados de RT-PCR juntamente à maximização de 18% da produção do metabólito acetil-CoA (12,1473 µg/mL contra 10,2673 µg/mL em EMB50), sua velocidade de crescimento específica em relação à controle ($\mu_{\text{Máx}}=0,19 \text{ h}^{-1} \pm 0,014$ em EMB50 contra $\mu_{\text{Máx}}=0,25 \text{ h}^{-1} \pm 0,007$ em EMB51), pode-se inferir que a levedura teve modificações metabólicas ao expressar esse complexo.

Levando em consideração a literatura, a expressão da enzima PDHc de *Enterococcus faecalis* em *S. cerevisiae* (KOZAK et al., 2014) levou esta levedura a demonstrar prejuízos em seu crescimento, com um aumento da fase *lag* em relação à controle (não informado em quantas horas) quando utilizado um plasmídeo episomal (2µ) para a expressão de PDHc. Quando se utilizou um plasmídeo do tipo cromossômico a fase *lag* desta levedura se aproximou do comportamento da linhagem controle em relação à esta condição. Também foi observado que o crescimento específico máximo variou, ficando em $0,18 \text{ h}^{-1}$ na levedura com plasmídeo episomal e $0,36 \text{ h}^{-1}$ na levedura com plasmídeo do tipo cromossomal (KOZAK et al., 2014). Apesar de este fato não ser discutido no trabalho citado, isto provavelmente se deve ao fato de o cromossomo artificial ser um plasmídeo de baixa cópia, onde, com promotores fortes acoplados aos genes de interesse, a levedura consegue ter uma expressão considerável dos genes desejados sem sobrecarga metabólica.

Dessa forma, ao compararmos os resultados de crescimento das linhagens EMB50 e EMB51 podemos observar que o comportamento de ambas na fase *lag* é semelhante, porém o crescimento específico máximo da linhagem EMB51 é maior, corroborando com os dados (GUO et al., 2011) da literatura em relação à expressão dos genes deste complexo em um plasmídeo do tipo cromossomo. Em relação aos rendimentos em batelada, o aumento de 17% na produção de etanol por EMB51, é esperado devido aumento do acetil-CoA citosólico, que leva à repressão da enzima acetil-CoA sintase e acetaldeído desidrogenase, acumulando acetaldeído que é convertido em etanol pelas enzimas ADH I, ADH III, ADH IV e ADH V em *S. cerevisiae* (ARANDA; DEL OLMO, 2003; MAESTRE et al., 2008). A diminuição de acetato é concomitante à este processo, pois a única enzima que faz a interconversão etanol em acetaldeído é a enzima ADH II, fortemente reprimida na presença de metabólitos da via glicolítica (ARANDA; DEL OLMO, 2003)

Também pode ser inferido que a levedura teve seu metabolismo modificado em relação à concentração de acetil-CoA em seu citoplasma, pois essa molécula quando biodisponível no citosol tem vários destinos metabólicos (VAN ROSSUM et al., 2016), entre eles a síntese de aminoácidos (por exemplo, leucina, arginina, metionina e cisteína), esteróis, glutatona, N-acetilglucosamina (que participa da síntese de proteínas de membrana) e S-adenosilmetionina (usado em vias de metilação de genes, síntese de poliaminas para crescimento celular e outros processo de trans-sulfuração para síntese de compostos que utilizem sulfato) (KANEHISA et al., 2014) auxiliando assim no crescimento e desenvolvimento celular, gerando uma biomassa 52% maior nessa linhagem em relação à controle.

Estes resultados acoplados à maximização de acetil-CoA medida em LC-MS, juntamente com uma síntese média de ácidos graxos 16% maior que na levedura controle na análise final ajudam a inferir a funcionalidade do complexo multimérico PDHc de *Pseudomonas aeruginosa* em *S. cerevisiae*. Ademais, isto também mostra que um influxo de acetil-CoA citosólico provindo da expressão de uma enzima piruvato desidrogenase auxilia na produção de ácidos graxos de cadeia curta e média (C₁₀ e C₁₂), bem como auxiliam na produção de cadeias de 16 e 18 carbonos, naturais a esse organismo (TROTTER, 2001). Vale notar também, que esse acetil-CoA não é desviado para o ciclo da glicoxilato pois o mesmo é reprimido na presença de glicose (KOIVISTOINEN et al., 2013). Dessa forma, comprova-se que o influxo de carbono através desta metodologia é capaz de aumentar a síntese total de ácidos graxos em *S. cerevisiae*, tornando esta uma metodologia candidata à

6.1.4 Linhagem EMB52

A enzima acetil-CoA carboxilase selecionada foi a do procarioto *P. aeruginosa*, e a correta expressão das marcas auxotróficas confirmou a inserção do plasmídeo cromossomal. Sendo assim, essa proteína é constituída na maioria dos organismos por quatro subunidades, ACCA, ACCB, ACCC e ACCD, porém em *Pseudomonas aeruginosa*, uma quinta subunidade, PA0494 (biotina carboxilase II) é predita pelos bancos de dados (*Uniprot* e *Pseudomonas Database*) como parte do complexo, e dessa forma, foi adicionada às sequências a serem expressas, totalizando 5 subunidades do complexo heterohexamérico ACCc e a síntese dos genes foi avaliada via RT-PCR, comprova sua transcrição pela levedura.

A técnica de LC-MS, primariamente utilizada para comprovar a funcionalidade do complexo não conseguiu resolver a quantificação de malonil-CoA no citoplasma da levedura, e isso provavelmente se deve ao fato dessa molécula ser encontrada em níveis muito baixos no citoplasma desse organismo, bem como ser consumida rapidamente (CHEN *et al.*, 2017). Por outro lado, ao ser analisada em relação ao composto acetil-CoA, esta levedura também teve uma maximização dessa molécula frente à levedura controle (10,2673 µg/mL em EMB50 contra 12,8032 µg/mL em EMB52), provavelmente por mecanismos de *feedback* negativo para evitar a depleção de malonil-CoA utilizada por ambos os complexos complexos ACCc.

Quando submetida à fermentação do tipo batelada, essa levedura mostrou uma taxa de crescimento específico maior que a da linhagem controle ($\mu_{M\acute{a}x}=0,19\text{ h}^{-1} \pm 0,014$ em EMB50 contra $\mu_{M\acute{a}x}=0,27\text{ h}^{-1} \pm 0,018$ em EMB52). Isso pode ser explicado pelo efeito de *feedback* causado pela maior síntese de malonil-CoA no citoplasma da levedura, levando a produção de maior quantidade de acetil-CoA pela piruvato descarboxilase nativa (PDC, EC 4.1.1.1) acetaldeído desidrogenase (ACDH, EC 1.2.1.5 e EC 1.2.1.4) e acetil-CoA sintetase (ECS 6.2.1.1), que são ativadas para evitar a depleção de acetil-CoA pela conversão deste composto em malonil-CoA, uma vez que o gene *acs2* codificador de acetil-CoA sintetase também é regulado para ter uma maior expressão quando na presença de glicose (NIELSEN, 2014). Sendo assim, como discutido anteriormente, o acetil-CoA participa de várias produções de compostos de importância no crescimento e desenvolvimento celular (KOZAK *et al.*, 2014b), e um aumento na biomassa é esperado uma vez que essa linhagem tem uma quantidade 20% maior dessa molécula em seu citoplasma. Este aumento também pode provindo da exportação de acetil-CoA do peroxissomo no ato da degradação pela β -oxidação de ácidos

graxos de cadeia longa produzidos por essa linhagem e exportação desse composto ao citoplasma (GABRIEL et al., 2014).

Mesmo assim, uma manutenção dos níveis de acetato e etanol nesta linhagem em relação à controle sugere que não há desbalanço neste metabolismo com a introdução da enzima ACC no metabolismo da *S. cerevisiae*, não afetando o influxo de carbono provindo da via glicolítica na síntese destas moléculas.

Ademais, estes resultados acoplados a um aumento de 6 % na síntese de ácidos graxos na análise final por essa linhagem, mostram que o complexo ACC tem funcionalidade dentro da levedura. Este aumento mostra que o influxo de malonil-CoA através do complexo enzimático ACCc de *P. aeruginosa* agindo paralela e concomitantemente à enzima acetil-CoA carboxilase nativa é uma estratégia funcional. Ao escolher-se o procarioto doador das sequências sugeriu-se que a enzima utilizada apresenta maior resistência a inibição por *feedback* negativo de seus metabólitos uma vez que *P. aeruginosa* possui um perfil de ácidos graxos semelhante ao da *S. cerevisiae*, porém com uma produção mais alta de cadeias C₁₀ e C₁₂ (CHAO; WOLFAARDT; ARTS, 2010) e esse aumento de síntese de ácidos graxos pode ter sido ocasionado por essa condição.

Comparativamente, em trabalhos de superexpressão de acetil-CoA carboxilase nativa, notou-se que a quantidade de ácidos graxos não se alterava com maior quantidade de enzima nativa, mas sim quando essa enzima sofria alterações em seu sítio de fosforilação, reduzindo a supressão de atividade por fosfato (pi) (NIELSEN et al., 2014a). Neste sentido, pode-se considerar que apesar do aumento de síntese destas cadeias, outras modificações como deleções de vias de utilização do acetil-CoA citosólico, ou de enzimas da via de β-oxidação podem aumentar ainda mais essa produção na levedura.

Ademais, devido ao discreto aumento de produção de ácidos graxos em relação à linhagem controle e a não produção de ácidos graxos de cadeias curtas C₁₀ e C₁₂ levaram a desconsideração dessa linhagem para a produção de ramnolipídeos.

6.1.5 Linhagem EMB53

A linhagem EMB53 contém os genes que sintetizam enzimas da biossíntese de ácidos graxos, todas provindas do procarioto *Pseudomonas aeruginosa*. Elas são *fabD* (Malonil-CoA-ACP transacilase), *fabH* (ACP-S-Malonil Transferase), *fabB* (β-cetoacil-ACP sintase) e *fabG* (β -cetoacil redutase). A partir do composto malonil-CoA, estas enzimas direcionam a produção de ácidos graxos na direção do β-hidroxidecanoil-ACP, composto fundamental

para a produção de ramnolipídeo, desviado da síntese de ácidos graxos pela enzima RhlA. Essa linhagem também foi submetida à extração de RNA e RT-PCR para avaliação da transcrição, tendo confirmação da leitura e transcrição dos genes pela levedura.

Em batelada, essa levedura apresentou uma velocidade de crescimento específico mais alta que a levedura controle EMB50 ($\mu\text{Máx}=0,19 \text{ h}^{-1} \pm 0,014$ em EMB50 contra $\mu\text{Máx}=34 \text{ h}^{-1} \pm 0,005$ em EMB53). Isso pode ter por base o fato de estarem presentes na levedura duas vias de alongação de cadeias de ácidos graxos agindo concomitantemente (a heteróloga terminando no intermediário hidroxiaçil-ACP), e uma alongação de cadeias que estimulam a via da β -oxidação, que ao degradarem estas moléculas no peroxissomo, exportam uma grande quantidade de acetil-CoA ao citoplasma, modulando o crescimento e desenvolvimento celular (GABRIEL et al., 2014; KANEHISA et al., 2014).

Esses fatores acoplados a uma produção de ácidos graxos semelhante a controle na análise final mostram que esse tipo de estratégia com genes de *P. aeruginosa* não é adequada para a superprodução de ácidos graxos ou ramnolipídeo em *S. cerevisiae*.

6.1.6 Linhagem EMB54

A quarta e última linhagem (EMB54) contém o plasmídeo do gene piruvato desidrogenase pYAC4mPDH-trp, juntamente com os genes *rhlA*, *rhlB*, *rmlA*, *rmlC*, *rmlB* e *rmlD* dos plasmídeos p424, p425 e p426. Essas enzimas, atuando em conjunto, têm como finalidade a maior produção de ácidos graxos, especialmente de cadeia curta (C₁₀) na levedura *S. cerevisiae* e finalmente, à produção de ramnolipídeos em concentração detectável dentro dessa levedura.

Em batelada, essa linhagem mostrou uma velocidade de crescimento específica semelhante à linhagem controle ($\mu\text{Máx}=0,19 \text{ h}^{-1} \pm 0,014$ em EMB50 contra $\mu\text{Máx}=0,21 \text{ h}^{-1} \pm 0,053$ em EMB54), bem como glicerol, acetato e etanol também se mantiveram nos níveis da levedura controle.

Neste sentido, levando em consideração o perfil de ácidos graxos dessa linhagem, com produção de 80% do total de ácidos graxos da linhagem controle, pode-se inferir que há um influxo de carbono alto para a via de síntese de ramnose, desviando o carbono que iria entrar no ciclo do ácido cítrico, bem como diminuindo a formação do piruvato a ser desviado para a síntese de ácidos graxos. O perfil dessa levedura mantém a produção de cadeias C₁₀ e C₁₂, característica adicionada pelo complexo piruvato desidrogenase, porém tem perda de

cadeias longas, provavelmente pela inibição de devido ao menor teor lipídico na levedura, bem como diminuição da atividade glicolítica (Nielsen et al., 2018).

6.2 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

A produção de ramnolipídeos não pôde ser constatada pela técnica de LC-MS. A transcrição das enzimas ter sido constatada, mas o produto de sua atividade enzimática ser nulo pode ter a ver com dois fatores. O primeiro fator é explicado pelo fato de a enzima Rh1A, que converte β -hidroxidecanoil-ACP em ácido 3-(3-hidroxi)alcanoilóxi) alcanóico ser uma enzima de membrana (DÉZIEL *et al.*, 2003; RAHIM *et al.*, 2001). Dessa forma, a enzima pode estar sendo corretamente sintetizada, mas não estar sendo endereçada para a membrana e dessa forma, sem seu correto acoplamento, não apresenta atividade de síntese do ácido 3-(3-hidroxi)alcanoilóxi) alcanóico, não gerando substrato para a enzima Rh1B, resultando na não produção do composto ramnolipídeo.

Outro fator que pode influenciar na atividade enzimática de Rh1A é a utilização de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, cuja atuação sobre Rh1A é inibitória, e a literatura descreve que a troca desse substrato por nitrato pode ser a solução para reduzir o efeito inibitório (DÉZIEL *et al.*, 2003; GUNTHER IV *et al.*, 2005b). Dessa forma, uma vez que a levedura usa sulfato de amônio como substrato para sintetizar seus aminoácidos, a troca desse substrato por outro compatível que permita a sobrevivência da célula pode resultar na produção do composto de interesse.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a levedura *S. cerevisiae* pode ser geneticamente modificada para ter seus ácidos graxos com síntese aumentada das duas estratégias selecionadas, muito embora a estratégia testada para síntese do composto ramnolipídeo não tenha tido resultados de produção, conforme listado abaixo:

- Linhagem EMB51
 - Em relação à essa linhagem, caracterizada por carregar os genes necessários para sintetizar o complexo piruvato desidrogenase de *Pseudomonas aeruginosa*, pôde-se medir uma concentração de acetil-CoA citosólico 18% maior que na linhagem controle EMB50. Esse aumento na quantidade de Acetil-CoA possibilitou um aumento na síntese de ácidos graxos por essa linhagem de mais de 16% no total produzido. Estes fatores geraram em especial, cadeias curtas C10 e C12, não produzidas em quantidades significativas pela linhagem controle de *S. cerevisiae*. Esta linhagem também teve alterada sua velocidade de crescimento e biomassa, devido a rotas metabólicas do acetil-CoA citoplasmático de produção de aminoácidos e outras vias relacionadas ao crescimento. Dessa forma, esta linhagem pode ser útil na produção de compostos derivados desta molécula.
- Linhagem EMB52
 - O estudo também mostrou que o influxo de malonil-CoA através de um complexo enzimático acetil-CoA carboxilase na linhagem EMB52, em ação concomitante ao complexo de mesma função nativo da levedura, leva à uma produção 6% maior de ácidos graxos na levedura. Isso demonstra que o influxo desta molécula dentro do sistema nativo de alongação de ácidos graxos da levedura tem capacidade de auxiliar na síntese de moléculas de lipídeos. Essa linhagem também teve aumentada sua a velocidade de crescimento específico desta linhagem, gerados pelo aumento de acetil-CoA citoplasmático pela enzima *acs2* e pela via da degradação de ácidos graxos de cadeia longa β -oxidação. Desta forma, essa linhagem também se diferenciou da linhagem controle em sua produção de lipídeos,

podendo ser utilizada como *backbone* para produção de moléculas derivadas destes compostos.

- Linhagem EMB53
 - Contendo uma via paralela de alongação de cadeia de ácidos graxos, a linhagem EMB53 não mostrou diferenças no sentido de maximização dessas moléculas, mostrando que esta estratégia precisa ser melhor elaborada para ter eficácia, talvez com deleções de vias que utilizem seus precursores ou introdução de genes que permitam um controle da β -oxidação, uma vez que estas enzimas degradam os ácidos graxos de cadeia longa sintetizados por ambas as vias. Para obter ácidos graxos com cadeias específicas, a utilização de uma redutase que direcione a produção para um tipo de cadeia pode ser essencial para a produção de um composto desejado.
- Linhagem EMB54
 - Finalmente, em se tratando de uma levedura que carrega genes relacionados a produção de ramnolípido e de síntese do complexo piruvato desidrogenase, este projeto mostrou que a produção deste biodetergente em *S. cerevisiae* ainda tem entraves que necessitam de melhores estratégias diferentes de somente aumentar a produção de ácidos graxos nesse organismo. Esta linhagem mostrou uma quantificação de ácidos graxos 80% menor que a linhagem pode ter a ver com o desvio da via glicolítica para a produção do açúcar ramnose, diminuindo o fluxo de carbono em direção ao piruvato e conseqüentemente à síntese de ácidos graxos. A não detecção da produção de ramnolípido pode ser inferida na inibição da enzima RhlA, bem como na sua não ancoragem na membrana, bem como diminuição na quantidade final de ácidos graxos produzidos por esta linhagem. Para que essa produção ocorra devem ser envolvidas inserções de seqüências que permitam ancoragem de RhlA na membrana, aumento do fluxo de carbono em direção ao piruvato mesmo com o desvio para a produção de ramnose, além de não ser utilizado o composto sulfato de amônio, comprovadamente inibitório de RhlA, para redução de inibição da atividade dessa enzima.

8. PRODUÇÕES

Em relação aos desenvolvimentos dentro do laboratório de engenharia de bioprocessos, de 2015 foram obtidas duas publicações de capítulos de livros, *Biogas - Turning Waste into Clean Energy. Fermentation Processes*. 1ª ed. Rijeka: InTech (DOI: 10.5772/64262) e *Production Processes for Monoclonal Antibodies. Fermentation Processes*. 1ª ed. Rijeka: InTech (DOI: 10.5772/64263), além da apresentação de trabalho em três eventos internacionais e em quatro dos Simpósios de Biologia Molecular na UnB. O projeto também gerou dois pedidos de patentes, **BR 10 2019 023411 3** e **BR 10 2019 023405 9** relacionadas à maior produção de ácidos graxos curtos e longos nas linhagens de levedura produzidas e descritas neste trabalho em relação à linhagem controle.

9. BIBLIOGRAFIA

AIELLO, D. P. et al. Intracellular glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 45751–45758, 29 nov. 2002.

AMARAL, P. F. F. et al. Biosurfactants from yeasts: Characteristics, production and application. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 236–249, 2010.

ARANDA, A.; DEL OLMO, M. LÍ. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. **Yeast**, v. 20, n. 8, p. 747–759, 2003.

BAHIA, F. M. et al. Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018a.

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, maio 2000.

BENDER, T.; PENA, G.; MARTINO, J. Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 7, p. 911–924, abr. 2015.

BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 375–387, 1 nov. 2009.

BESSON, F. et al. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 10, p. 1043–1049, 1976.

BRUINENBERG, P. M.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts. **Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 953–964, 1 abr. 1983.

CABRERA-VALLADARES, N. et al. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 187–194, 2006.

CHAO, J.; WOLFAARDT, G. M.; ARTS, M. T. Characterization of pseudomonas aeruginosa fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1028–1039, 2010.

CHEN, L. et al. Engineering the Saccharomyces cerevisiae β -Oxidation Pathway to Increase Medium Chain Fatty Acid Production as Potential Biofuel. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e84853, 21 jan. 2014.

CHEN, X. et al. Increasing Malonyl-CoA Derived Product through Controlling the Transcription Regulators of Phospholipid Synthesis in Saccharomyces cerevisiae. **ACS Synthetic Biology**, v. 6, n. 5, p. 905–912, 2017.

CHEN, Y. et al. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 48–54, jan. 2013.

CHEN, Y.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. Profiling of Cytosolic and Peroxisomal Acetyl-CoA Metabolism in Saccharomyces cerevisiae. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42475, 2 ago. 2012.

CHONG, H.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids : opportunities , challenges and strategies. **Microbial Cell Factories**, p. 1–12, 2017.

CHRISTOVA, N. et al. Rhamnolipid biosurfactants produced by Renibacterium salmoninarum 27BN during growth on n-hexadecane. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 59, n. 1–2, p. 70–4, [s.d.].

CRONAN, J. E.; WALDROP, G. L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 5, p. 407–435, set. 2002.

DE JONG, B. W. et al. Metabolic pathway engineering for fatty acid ethyl ester production in Saccharomyces cerevisiae using stable chromosomal integration. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 477–486, 2014.

DÉZIEL, E. et al. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in Pseudomonas aeruginosa: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2005–2013, 1 ago. 2003.

DÍAZ DE RIENZO, M. A.; KAMALANATHAN, I. D.; MARTIN, P. J. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by B. thailandensis E264 and P.

aeruginosa ATCC 9027 using foam fractionation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 820–827, 2016.

DOBLER, L. et al. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing *estA* in a simple medium. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–12, 2017.

DUBEAU, D. et al. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC microbiology**, v. 9, p. 263, 2009.

DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597–606, 1 abr. 2008.

EL-AMINE BENDAHA, M. et al. Isolation and comparison of rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10. **Sci Rep**, v. 1, n. 12, p. 544, 2012.

ENTIAN, K.; KO, P. 25 Yeast Genetic Strain and Plasmid Collections. v. 36, n. 06, 2007.

GABRIEL, F. et al. A Fox2-dependent fatty acid β -oxidation pathway coexists both in peroxisomes and mitochondria of the ascomycete yeast *Candida lusitanae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–27, 2014.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. **Microbial Surfactants: A Review** **Journal of Oleo Science**, 2006.

GUNTHER IV, N. W. et al. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 71, n. 5, p. 2288–2293, 2005a.

GUO, Z. PENG et al. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 49–59, jan. 2011.

HAN, L. et al. Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 1, p. 139–150, jul. 2014.

HILL, J.; DONALD, K. A. G.; GRIFFITHS, D. E. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 23, p. 6688, 1991.

HILTUNEN, J. K. et al. The biochemistry of peroxisomal β -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 35–64, 2003.

HISASHI YAZAWA, Y. K. Efficient accumulation of oleic acid in *Saccharomyces cerevisiae* caused by expression of rat elongase 2 gene (rELO2) and its contribution to tolerance to alcohols. p. 1593–1600, 2011.

HOŠKOVÁ, M. et al. Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 510–516, 2013.

HU, Y. et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* cells for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. **Open Biology**, v. 9, n. 5, 2019.

INUI, H. et al. Purification and characterization of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase in *Euglena gracilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 19, p. 9130–9135, 5 jul. 1987.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 12, p. 4124–4126, 1 dez. 1949.

JOHANN, S. et al. Science of the Total Environment Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. **Science of the Total Environment**, v. 548–549, p. 155–163, 2016.

KANEHISA, M. et al. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D199–D205, 1 jan. 2014.

KAYIKCI, Ö.; NIELSEN, J. **Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*** **FEMS Yeast Research** Oxford University Press, , 2015.

KOIVISTOINEN, O. M. et al. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, 23 set. 2013.

KOZAK, B. U. et al. Replacement of the *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-CoA synthetases by alternative pathways for cytosolic acetyl-CoA synthesis. **Metabolic Engineering**, v. 21, p. 46–59, 2014a.

KOZAK, B. U. et al. Engineering acetyl coenzyme a supply: Functional expression of

a bacterial pyruvate dehydrogenase complex in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. **mBio**, v. 5, n. 5, p. e01696-14, 21 out. 2014d.

KRIVORUCHKO, A. et al. Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 28, p. 28–42, 2015a.

KUBICKI, S. et al. Marine Biosurfactants: Biosynthesis, Structural Diversity and Biotechnological Applications. **Marine Drugs**, v. 17, n. 7, p. 408, 2019.

KUMAR, R.; DAS, A. J. **Rhamnolipid Biosurfactant**. [s.l.: s.n.].

LAURENS, L. M. L. et al. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 1, p. 167–178, 18 abr. 2012.

LI, X. et al. Overproduction of fatty acids in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 9, p. 1841–1852, 2014a.

LIAN, J. et al. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food, Pharmaceutical and Bioengineering Division 2014 - Core Programming Area at the 2014 AIChE Annual Meeting**, v. 2, p. 750–760, 2014.

LIAN, J.; ZHAO, H. Recent advances in biosynthesis of fatty acids derived products in *Saccharomyces cerevisiae* via enhanced supply of precursor metabolites. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 437–451, 12 mar. 2014.

LIU, T.; VORA, H.; KHOSLA, C. Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in *E. coli*. **Metabolic Engineering**, v. 12, n. 4, p. 378–386, 2010.

LU, X.; VORA, H.; KHOSLA, C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: Implications for biodiesel production. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 333–339, 2008.

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

MAESTRE, O. et al. Effects of ADH₂ overexpression in *Saccharomyces bayanus* during alcoholic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 702–707, 2008.

MANIATIS, T. **Molecular cloning**. [s.l.: s.n.].

MELO, N. T. M. et al. Effect of pyruvate decarboxylase knockout on product distribution using *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) engineered for lactic acid production. **Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2018.

MINARD, K. I.; MCALISTER-HENN, L. Sources of NADPH in yeast vary with carbon source. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 39890–39896, 20 set. 2005.

MNIF, I.; GHRIBI, D. **Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry** **Journal of the science of food and agriculture**, 1 out. 2016.

MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, n. 1, p. 119–122, abr. 1995.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 231–238, dez. 2014.

NELSON, D. L. (DAVID L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. Seventh edition. ed. [s.l.: s.n.].

NIELSEN, J. Synthetic biology for engineering acetyl coenzyme A metabolism in yeast. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e02153, 4 nov. 2014a.

NORDIN, N. et al. **Isolation and screening of high efficiency biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp.** **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, 2013.

OCHSNER, U. A. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3503–3506, 1995.

PERFUMO, A. et al. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 1, p. 132–138, 2006.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 1, n. October, p. 17, 2014.

POREMBA, K.; GUNKEL, W. Toxicity Testing of Synthetic and Biogenic Surfactants

on Marine Microorganisms. v. 6, n. 1991, p. 157–163, [s.d.].

PRIJI, P. et al. *Pseudomonas* sp. BUP6, a novel isolate from Malabari goat produces an efficient rhamnolipid type biosurfactant. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 21–33, jan. 2017.

RAAIJMAKERS, J. M. et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037–1062, nov. 2010.

RAHIM, R. et al. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 708–718, 2001.

RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SIEMANN-HERZBERG, M. Rhamnolipid biosurfactants — past , present , and future scenario of global market. v. 5, n. September, p. 1–8, 2014.

REIS, R. et al. Biosurfactants: Production and Applications. In: **Biodegradation - Life of Science tion**. [s.l.] InTech, 2013. p. 31–61.

RIKALOVIC, M.; VRVIC, M.; KARADZIC, I. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*: From discovery to application in contemporary technology. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 80, n. 3, p. 279–304, 2015.

RODRIGUES, L. R. et al. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 470–480, mar. 2006.

ROESLER, K. et al. Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. **Plant physiology**, v. 113, n. 1, p. 75–81, jan. 1997.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249–252, 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. **High- and low-molecular-mass microbial surfactants** *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer Verlag, , 1999.

RUNGUPHAN, W.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. **Metabolic Engineering**, v. 21, p. 103–113, 1 jan. 2013.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning : a laboratory manual**. [s.l.] Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001, [s.d.].

SARAVANAN, S. V. AND V. Research Journal of Microbiology. **research journal of microbiology**, v. 10, n. 5, p. 181–192, 2015.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. **Current Genetics**, v. 16, n. 5–6, p. 339–346, dez. 1989.

SHI, S. et al. Improving production of malonyl coenzyme A-derived metabolites by abolishing Snfi-dependent regulation of Acc1. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–8, 2014.

SHIBA, Y. et al. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. **Metabolic Engineering**, v. 9, n. 2, p. 160–168, 2007.

SILVA, R. DE C. F. S. et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523–12542, 2014.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. **Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences** *Trends in Biotechnology* Elsevier Ltd, , 2004.

SONDEREGGER, M.; SCHÜMPERLI, M.; SAUER, U. Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2892–2897, maio 2004.

TAVARES, L. F. D. et al. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1909–1921, 10 mar. 2013.

TONG, L. **Acetyl-coenzyme A carboxylase: Crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery** *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhäuser-Verlag, , 17 ago. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5121-4>>. Acesso em: 8 abr. 2017

TROTTER, P. J. THE GENETICS OF FATTY ACID METABOLISM IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 97–119, jul. 2001.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 57, n. 3-4, p. 356-360, 2002.

VALLE-RODRÍGUEZ, J. O. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid ethyl esters, an advanced biofuel, by eliminating non-essential fatty acid utilization pathways. **Applied Energy**, v. 115, p. 226-232, 2014.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.

VAN ROSSUM, H. M. et al. Engineering cytosolic acetyl-coenzyme A supply in *Saccharomyces cerevisiae*: Pathway stoichiometry, free-energy conservation and redox-cofactor balancing. **Metabolic Engineering**, v. 36, p. 99-115, 2016.

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. 842-853, 2007.

WANG, Y.; CHEN, H.; YU, O. A plant malonyl-CoA synthetase enhances lipid content and polyketide yield in yeast cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5435-5447, 2014.

WATTANACHAISAREEKUL, S. et al. Production of the polyketide 6-MSA in yeast engineered for increased malonyl-CoA supply. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 5, p. 246-254, 2008.

WITTGENS, A. et al. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 80, 2011a.

WITTGENS, A. et al. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 80, 17 out. 2011b.

YU, T. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of very long chain fatty acid-derived chemicals (Nature Communications (2017) 8 (15587) DOI: 10.1038/ncomms15587). **Nature Communications**, v. 9, n. May, p. 1-10, 2018.

ZHA, W. et al. Improving cellular malonyl-CoA level in Escherichia coli via metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 11, n. 3, p. 192–198, 2009.

ZHANG, F.; RODRIGUEZ, S.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 775–783, 2011.

ZHU, K.; ROCK, C. O. RhIA converts ω -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the ω -hydroxydecanoyl- ω -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3147–3154, 1 maio 2008.