



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

**Investigação das etapas limitantes durante a síntese de
Ácido Hialurônico em *Kluyveromyces lactis*.**

Antonio Milton Vieira Gomes
Orientadora: Profa. Nádia Skorupa Parachin

Brasília, Junho de 2021

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

Investigação das etapas limitantes durante a síntese de Ácido Hialurônico em *Kluyveromyces lactis*.

Antonio Milton Vieira Gomes
Orientadora: Profa. Nádia Skorupa Parachin

Tese de doutorado apresentada ao departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.
Brasília, Junho de 2021

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação da professora Nádia Skorupa Parachin e com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca Examinadora

Professora Dra. Nádia Skorupa Parachin

Universidade de Brasília

Presidente da Banca

Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha

Universidade de Brasília

Membro Efetivo

Professor Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho

Embrapa

Membro Efetivo

Professor Dr. José Gregório Cabrera Gomez

USP

Membro Efetivo

Professor Dr. Nicolau Brito da Cunha

Universidade Católica de Brasília

Membro Suplente

"A jornada é muito mais importante que o destino."

(Carol Fernandes)

Agradecimentos

Primeiramente só posso agradecer a Deus por ter me permitido chegar até aqui depois de tão grande jornada. Nos momentos mais difíceis, sempre foi a fé que me segurou no caminho.

Em seguida só posso agradecer à minha família, meu pai Miguel e minha mãe Clarice que me criaram com tanto empenho para que eu estudasse e chegasse até aqui neste momento. Também não posso esquecer da minha tia Áurea e tio Divino, com quem morei durante 10 anos em Brasília e onde fiz todo o meu crescimento acadêmico na UnB.

Meus mais sinceros agradecimentos à Professora Nádia, minha orientadora por 6 anos e que sempre esteve ali do meu lado no meu crescimento acadêmico. MUITÍSSIMO obrigado por tudo: pelos elogios, reuniões, indicações, conversas e principalmente pelas críticas construtivas, foram elas que me fizeram crescer muito. Sem seu apoio eu não seria quem sou hoje.

Obrigado também à Professora Talita Carmo, por todas as ajudas no laboratório e nas conversas que tivemos.

Muito obrigado a todos os meus amigos de laboratório, em especial Nadiele, Ana Caroline, Daniel Gusmão e minha IC Carol Orlandi, que me ajudaram em todos os sentidos, tanto na realização de experimentos como nas conversas do dia-a-dia.

Obrigado também aos amigos de laboratórios vizinhos da Biologia Molecular, principalmente aos amigos do Lab3 da professora Ildinete e Lab0 da professora Élide.

Obrigado ao professor Thomas, pelo grande auxílio com grande parte dos experimentos deste trabalho.

Obrigado a todos os professores da UnB que de alguma forma passaram pela minha vida e me ajudaram na minha formação.

Obrigado aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência para a correção deste trabalho.

Obrigado ao CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

1.	Introdução	19
1.1	Estrutura Química do Ácido Hialurônico	19
1.2	Aplicações do Ácido Hialurônico e Mercado	20
1.3	Formas de obtenção do Ácido Hialurônico.....	23
1.3.1	Extração de tecidos animais	23
1.3.2	Microrganismos Produtores Naturais.....	24
1.3.3	Microrganismos Geneticamente Modificados (OGMs).....	25
1.4	Via de síntese do Ácido Hialurônico	27
1.5	Ácido Hialurônico Sintases (HASA)	29
1.5.1	Ácido Hialurônico Sintases (HASA) de Classe I.....	32
1.5.2	Ácido Hialurônico Sintases (HASA) de Classe II.....	34
1.6	Fisiologia de <i>Kluyveromyces lactis</i>	37
1.7	Ferramentas utilizadas no melhoramento da produção de Ácido Hialurônico.....	42
2.	Objetivos	47
3.	Materiais e Métodos	48
3.1	Microrganismos.....	48
3.2	Meios de Cultura	48
3.3	Tampões e Soluções	50
3.4	Antibióticos	53
3.5	Genes e plasmídeos.....	53
3.6	Oligonucleotídeos Iniciadores	54
3.7	Enzimas	56
3.8	Crescimento das células em frasco.....	56
3.9	Purificação do ácido hialurônico do meio de cultura.....	56
3.10	Quantificação do Ácido Hialurônico	57
3.10.1	Método CTAB de quantificação do Ácido Hialurônico	57
3.10.2	Método Carbazol de quantificação do Ácido Hialurônico.....	58
3.11	Extração de RNA das células e transcrição reversa.....	58
3.12	PCR em tempo real para quantificação de transcritos	59
3.13	RNA-Seq	61
3.14	Preparação de células competentes (<i>E. coli</i> cepa XL10-Gold)	61
3.15	Transformação em células de <i>E. coli</i>	62
3.16	Reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR)	62

3.17	Clivagens com endonucleases dos plasmídeos.....	63
3.18	Purificação do DNA plasmidial e genômico	63
3.19	Reações de ligação	63
3.20	Construção dos vetores de expressão	64
3.20.1	Cassete de interrupção do gene <i>tps1</i>	64
3.20.2	Plasmídeo Integrase	64
3.21	Transformação levedura <i>K. lactis</i>	65
3.22	Seleção e armazenamento das leveduras contendo as modificações genéticas concluídas (PCR de colônia).....	66
3.23	Análise por gel dos genes, RNAs, plasmídeos e cassetes	66
3.24	Crescimento em Biorreator em Batelada para Análise de Fluxo Metabólico com glicose marcada ¹³ C ₆	67
3.25	Análise dos Metabólitos Intracelulares	68
3.25.1	Protocolo de Quenching	68
3.25.2	Extração dos metabólitos celulares	68
3.26	Análise dos Metabólitos Extracelulares	68
3.26.1	Deteção e quantificação de substratos e produtos celulares.....	68
3.27	Análise de Crescimento Celular por peso seco	69
3.28	Análise dos Constituintes Celulares.....	69
3.28.1	Liofilização	69
3.28.2	Extração e Quantificação de Carboidratos Totais	70
3.28.3	Extração e Quantificação de Proteínas Totais.....	70
3.28.4	Extração e Quantificação de Lipídeos Totais	71
3.28.5	Extração e Quantificação de DNA	71
3.28.6	Extração e Quantificação de RNA	71
3.29	Análises de Fluxo Metabólico (AFM)	72
3.29.1	Definição da Rede metabólica	72
3.29.2	Cromatografia Gasosa Acoplada A Espectrômetro de Massa (GC-MS).....	73
3.29.3	Análise de Balanço de Fluxo (ABF)	74
3.30	Cálculo das Taxas de crescimento e Análises estatísticas	75
4.	Resultados e Discussão.....	75
4.1	Análise dos níveis de transcritos da cepa BAP	75
4.2	Disrupção do gene Trealose (<i>tps1</i>) da cepa BAP.....	80
4.3	Utilização de Serina Integrase como estratégia para otimização da produção de AH85	
4.4	Análise de fluxo metabólico com carbono marcado ¹³ C ₆	91
5.	Conclusões e Perspectivas.....	97

6. Publicações Relevantes	99
7. Referências.....	100
8. Anexos.....	106

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do Ácido Glicurônico (GlcUA), N-Acetil Glicosamina (GlcNAc) e do Ácido Hialurônico .	19
Figura 2. Capacidade de penetração do Ácido Hialurônico na pele humana de acordo com a sua massa molecular.	21
Figura 3. Mapa metabólico da síntese de Ácido Hialurônico na cepa BAP de <i>K. lactis</i> .	27
Figura 4. Representação da enzima Ácido Hialurônico Sintase e sua atividade durante a síntese de Ácido Hialurônico.	29
Figura 5. Predição do número de domínios transmembrânicos das enzimas HAS de classe I presentes em vertebrados e bactérias e classe II presente em <i>P. multocida</i> .	32
Figura 6. Mecanismos de incorporação dos substratos do AH em cadeias utilizado pelas enzimas HASA de Classe I.	33
Figura 7. Localização celular e atividades dos domínios transferases da enzima HASA de <i>P. multocida</i> a partir da utilização de diferentes versões truncadas da enzima.	35
Figura 8. Mecanismos associados com a metabolização de lactose e sua regulação em células de <i>K. lactis</i> na ausência e presença de lactose.	38
Figura 9. Integração genômica do cassete de expressão contendo o gene <i>hasA</i> no cromossomo de <i>K. lactis</i> .	41
Figura 10. Mecanismo de ação da enzima Integrase para integração do genoma do bacteriófago no genoma de uma bactéria hospedeira.	44
Figura 11. Ilustração da utilização de Integrases para a mudança do sentido de uma sequência genética.	45
Figura 12. Estratégia utilizada neste estudo para a construção do cassete de interrupção do gene <i>tps1</i> .	64
Figura 13. Mapa metabólico da síntese de AH com os valores obtidos dos níveis dos 20 transcritos selecionados como alvo neste estudo.	77
Figura 14. Estrutura química da Trealose.	81
Figura 15. Perfil de crescimento das cepas BAP (●) e BAP Δ tps1 (▼) por 24 horas em meio YPD contendo (A) Glicose, (B) Galactose e (C) Frutose.	82
Figura 16. (A) Análise por HPLC de uma solução padrão contendo Trealose (1 g/L) diluída em água. O pico em 8.9 minutos representa o pico da trealose e o pico negativo representa o pico da água. (B) Análise sobreposta por HPLC da extração dos metabólitos intracelulares das cepas BAP BAP Δ tps1.	83
Figura 17. Representação do DNA genômico da cepa BAP-Int13 contendo os genes <i>hasA</i> e <i>hasB</i> antes e após indução por galactose do promotor LAC4.	88
Figura 18. Perfil de crescimento das cepas BAP (■) e BAP-Int13 (●) após crescimento de 24 horas em frasco contendo 2% de glicose.	88
Figura 19. Análise em gel de agarose da direcionalidade do gene <i>hasA</i> na cepa BAP-Int13.	90
Figura 20. Perfil de crescimento da cepa BAP após crescimento em Bioreator em batelada em meio YNB. ● representa Biomassa; ■ representa glicose; ▼ representa glicerol; ▲ representa acetato e ◆ representa etanol.	91
Figura 21. Composição elementar da cepa BAP de <i>K. lactis</i> .	92
Figura 22. Análise de fluxo metabólico dos metabólitos intracelulares da cepa BAP após 24 horas de crescimento em meio YNB em fermentação em batelada determinados por GC-MS.	93
Figura 23. Impacto das mudanças do fluxo da glicólise (gly) no fluxo da síntese de ácido hialurônico, ambos os fluxos estão mmol·gDw ⁻¹ ·h ⁻¹ .	95

Figura 24. Impacto das mudanças do fluxo da via das pentoses fosfato (ppp) no fluxo da síntese de ácido hialurônico, ambos os fluxos estão $\text{mmol}\cdot\text{gDw}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.-----	96
Figura 25. Mapa do Plasmídeo pUG6.-----	106
Figura 26. Mapa do plasmídeo pGEM-tps1. -----	107
Figura 27. Mapa do plasmídeo pKlac2.-----	108
Figura 28. Mapa do plasmídeo pKlac-AB-Int13-----	109
Figura 29. Expressão relativa dos transcritos dos 20 genes analisados neste estudo em relação à actina.-----	111

Lista de Tabelas

Tabela 1 . Principais patentes brasileiras relacionadas com a síntese de Ácido Hialurônico.	22
Tabela 2. Produção de Ácido Hialurônico por cepas de <i>Streptococcus sp.</i>	24
Tabela 3. Microrganismos modificados geneticamente para a síntese de Ácido Hialurônico. Para comparação, foram escolhidos para esta tabela cepas contendo as mesmas modificações genéticas (inserção dos genes <i>hasA</i> e <i>hasB</i>).	25
Tabela 4. Diferenças entre as Ácido Hialurônico Sintases de bactérias e mamíferos em termos de tamanho e domínios transmembrânicos.	30
Tabela 5. Níveis de similaridade entre as Ácido Hialurônico Sintases de algumas bactérias e mamíferos.	31
Tabela 6. Atividade da enzima HAS de <i>Streptococcus pyogenes</i> em função da proporção dos 2 precursores. Dados retirados de (Tlapak-Simmons et al. 1999).	35
Tabela 7. V_{MAX} da enzima HAS de <i>P. multocida</i> em relação à concentração dos 2 precursores. Ensaio realizado com 20 µg de enzima HAS. A máxima incorporação dos substratos na cadeia de AH definida como 780 dpm (desintegrações por minuto)/h foi normalizada como 100% V_{MAX} . Dados retirados de (DeAngelis 1996).	36
Tabela 8. Lista de microrganismos utilizados e criados neste estudo.	48
Tabela 9. Lista dos genes e plasmídeos utilizados neste estudo.	53
Tabela 10. Lista dos Oligonucleotídeos Iniciadores utilizados neste estudo.	54
Tabela 11. Enzimas de restrição utilizadas neste estudo.	56
Tabela 12. Concentração das amostras usada para Curva Padrão em HPLC.	60
Tabela 13. Quantidade total de células liofilizadas utilizadas nos diferentes protocolos de análise dos constituintes celulares.	69
Tabela 14. Vias metabólicas utilizadas para a realização das análises de fluxo metabólico feitas neste estudo.	72
Tabela 15. Lista das enzimas relacionadas com os 20 transcritos da cepa BAP de <i>K. lactis</i> analisados neste estudo.	72
Tabela 16. Taxa de crescimento (μ_{MAX}) e OD_{600} final obtidas pelas cepas BAP e BAP $\Delta tps1$ durante crescimento em frasco em meio YPD contendo diferentes fontes de carbono. Dados calculados a partir de média de triplicata biológica.	82
Tabela 17. Taxa de crescimento (μ_{MAX}), OD_{600} final obtida e produção de AH pelas cepas BAP e BAP-Int13 após crescimento em frasco.	89
Tabela 18. Dados de taxa de crescimento máxima (μ_{MAX}), Biomassa final (g/L); Ácido Hialurônico produzido (g/L), além dos rendimentos de glicerol, acetato e biomassa obtidos da fermentação em batelada em meio YNB pela cepa BAP de <i>K. lactis</i>	91
Tabela 19. Sequências attB e attP reconhecidas pela Integrase utilizadas neste estudo. Em vermelho estão destacados os sítios de clivagem. Sequência originária de <i>Bacillus cytotoxicus</i> cepa NVH 391-98. Número NCBI: YP_001376196.	110

Lista de Abreviaturas e Símbolos

μF	Microfaraday
ABF	Análise de Balanço de Fluxo
AFM	Análise de Fluxo Metabólico
AH	Ácido Hialurônico
<i>amdS</i> acetamida	Gene codificante da enzima acetamidase responsável por hidrolisar acetamida
AMP	Monofosfato de Adenosina
AmpR a ampicilina	Gene codificante da enzima responsável por tornar a célula resistente a ampicilina
ATP	Trifosfato de Adenosina
BSA	Albumina de Soro Bovino
cDNA	DNA complementar
C_T	Ciclo de quantificação da RT-qPCR
CT	Complexo Trealose
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
Da	Dalton
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESS	Elementos Sub Estruturais
EtBr	Brometo de etídio
GAG	Glicosaminoglicanos
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada A Espectrômetro de Massa
GlcNAc	Glucosamina
GST	GlicosilTransferase

UDP-GlcUA	Ácido Glucurônico
HAses	Hialuronidase
HASA	Enzima Hialurônico Ácido Sintase
HASB	Enzima UDP-Glicose Desidrogenase
HASC	UDP-Glicose Pirofosforilase
HASD	UDP-GlcNAc Pirofosforilase
HASE	Fosfoglucoisomerase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
hsHAS	Enzima HAS de <i>Homo sapiens</i>
<i>kanMX</i>	Gene codificante da enzima responsável por tornar a célula resistente ao antibiótico G418
kb	Quilobase
kDA	Quilo Daltons
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kV	Quilovolts
MDa	Mega Daltons
mRNA	RNA mensageiro
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina forma oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
°C	Grau Celsius
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
p/v	Peso por volume
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG 4000	Poliétileno Glicol 4000

pGPD	Promotor Gliceraldeido-3-Fosfato Desidrogenase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pLAC4	Promotor LAC4 de <i>Kluyveromyces lactis</i>
pmHAS	Enzima HAS da bactéria <i>Pasteurella multocida</i>
RAG	Resistência a antimicina em glicose
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse A	Ribonuclease A
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de PCR
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Status GRAS	“Generally Recognized as Safe”
seHAS	Enzima HAS da bactéria <i>Streptococcus zooepidemicus</i>
spHAS	Enzima HAS da bactéria <i>Streptococcus pyogenes</i>
suHAS	Enzima HAS da bactéria <i>Streptococcus uberis</i>
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tampão tris-acetato-EDTA-Ácido Bórico
TFB	Tampão de transformação bacteriano
TPS1	Trealose 6-Fosfato Sintase
TPS2	Trealose Fosfatase
TPS3/GSS1	Componente de um sistema de sensibilidade à glicose
UDP	Difosfato de Uridina
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetil Glucosamina
UDP-GlcUA	UDP-Ácido Glucurônico

UTP	Trifosfato de Uridina
VPF	Via das Pentoses Fosfato
v/v	Volume por volume
xIHAS	Enzima HAS de <i>Xenopus laevis</i>
YCB	Meio para leveduras baseado em carbono
YNB	Meio para leveduras baseado em nitrogênio
YPD	Meio para leveduras Peptona Dextrose
Ω	Ohm

Resumo

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero composto de repetições alternadas dos monossacarídeos Ácido Glucurônico e N-Acetil glucosamina, sendo presente em todos os vertebrados. O AH possui uma vasta gama de aplicações, porém, suas qualidades como agente rejuvenescedor da derme o tornam um produto muito utilizado na indústria farmacêutica e médica. Atualmente o AH é produzido naturalmente por bactérias que são patogênicas aos animais, o que dificulta o escalonamento desta tecnologia de produção e eleva os custos de purificação. Como uma alternativa a estas bactérias, leveduras e outras bactérias foram geneticamente modificadas para síntese de AH produzindo valores de 0.1 até 74 g/L. Uma cepa da levedura *Kluyveromyces lactis*, denominada cepa BAP, foi construída visando produzir AH através da inserção dos genes *hasA* (codificante da enzima Hialuronan Sintase) e *hasB* (codificante da enzima UDP-Glicose Desidrogenase). Porém, após cultivo em biorreator foi alcançada uma produção final de 1,89 g/L, um valor ainda considerado baixo quando comparado à outras cepas de bactérias geneticamente modificadas que alcançam valores de até 74 g/L de AH. De forma a otimizar a síntese de AH na cepa BAP e torná-la mais competitiva com outras cepas para a indústria, foram realizadas uma série de estudos na cepa BAP de forma a identificar possíveis etapas limitantes para a síntese de AH. Inicialmente, foram medidos por RT-qPCR e RNA-Seq os níveis de 20 transcritos na cepa BAP, todos envolvidos com enzimas consideradas potenciais competidoras da síntese de AH. A partir destes dados foi sugerido que a síntese de trealose seria o maior competidor da síntese de AH na célula. Uma nova cepa derivada da cepa BAP contendo uma disrupção do gene *tps1* e incapaz de sintetizar trealose foi gerada, porém, não houve melhora na síntese de AH. A partir dos resultados obtidos dos níveis de transcritos do gene *hasA* na cepa BAP também foi criada uma segunda estratégia para desacoplamento da síntese de AH com a síntese de biomassa em *K. lactis* através da utilização de um circuito genético guiado por uma enzima Serina Integrase 13. Porém, esta estratégia também não apresentou efeitos no melhoramento da síntese de AH devido a uma ativação inesperada da transcrição do gene da Integrase ocasionada pelo promotor LAC4. Por fim, foi realizada uma Análise de Fluxo Metabólico (AFM) na cepa BAP onde foi observado que a principal limitação da síntese de AH está em um fluxo insuficiente próximo de 0 da via do precursor UDP-GlcNAc, sendo necessárias estratégias envolvendo um aumento do fluxo desta via. Embora a síntese de AH pela cepa BAP não tenha sido melhorada, este estudo foi um dos primeiros a realizar uma AFM em células de *K. lactis* e o primeiro a realizar uma AFM em uma cepa produtora de AH visando avaliar como a síntese do AH é afetada pelas vias síntese dos seus 2 precursores.

Palavras-chave: Ácido Hialurônico; *Kluyveromyces lactis*; Bioprocesso; Análise de Fluxo Metabólico; Fermentação com carbono C¹³.

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a biopolymer composed of alternating repetitions of the monosaccharides Glucuronic Acid and N-Acetyl glucosamine, present in all vertebrates. HA has a wide range of applications, however, its uses as a dermis rejuvenating agent make it a product widely used in the pharmaceutical and medical industry. Currently, HA is naturally produced by bacteria that are pathogenic to animals, which makes it difficult to scale up this production technology and raises purification costs. As an alternative to these bacteria, yeasts and other bacteria were genetically modified for HA synthesis, producing values from 0.1 to 74 g/L. A strain of the yeast *Kluyveromyces lactis*, called the BAP strain, was constructed with the aim of producing HA through the insertion of the genes *hasA* (codifying the Hyaluronan Synthase enzyme) and *hasB* (codifying the UDP-Glucose Dehydrogenase enzyme). However, after cultivation in a bioreactor, a final production of 1.89 g/L was reached, a value still considered low when compared to other strains of genetically modified bacteria that reach values of up to 74 g/L of HA. In order to optimize the synthesis of HA in the BAP strain and make it more competitive with other strains for the industry, a series of studies were carried out in the BAP strain in order to identify possible limiting steps for the synthesis of HA. Initially, the levels of 20 transcripts in the BAP strain were measured by RT-qPCR and RNA-Seq, all involved with enzymes considered potential competitors of HA synthesis. From these data it was suggested that trehalose synthesis would be the major competitor of HA synthesis in the cell. A new strain derived from the BAP strain containing a disruption of the *tps1* gene and incapable of synthesizing trehalose was generated, however, there was no improvement in HA synthesis. Based on the results obtained from the transcript levels of the *hasA* gene in the BAP strain, a second strategy was also created for uncoupling the HA synthesis with the biomass synthesis in *K. lactis* through the use of a genetic circuit guided by an enzyme Serine Integrase 13. However, this strategy also did not show effects in improving HA synthesis due to an unexpected activation of the Integrase gene transcription caused by the LAC4 promoter. Finally, a Metabolic Flux Analysis (MFA) was performed in the BAP strain where it was observed that the main limitation of HA synthesis is in an insufficient flux close to 0 of the precursor UDP-GlcNAc pathway, requiring strategies involving an increase in flow of this pathway. Although HA synthesis by the BAP strain has not been improved, this study was one of the first to perform a MFA in *K. lactis* cells and the first to perform a MFA in an HA-producing strain to assess how HA synthesis is affected by the synthesis pathways of its 2 precursors.

Keywords: Hyaluronic Acid; *Kluyveromyces lactis*; Bioprocess; Metabolic Flux Analysis; C¹³ Fermentation.

1. Introdução

1.1 Estrutura Química do Ácido Hialurônico

O Ácido Hialurônico (AH) é um polímero pertencente à classe dos Glicosaminoglicanos composto de repetições alternadas do Ácido Glicurônico (GlcUA) ($C_6H_{10}O_7$) e N-Acetil Glicosamina (GlcNAc) ($C_8H_{15}NO_6$). O GlcUA é unido em GlcNAc através de ligações $\beta(1-3)$ e GlcNAc é unido em GlcUA através de ligações $\beta(1-4)$ (Figura 1).

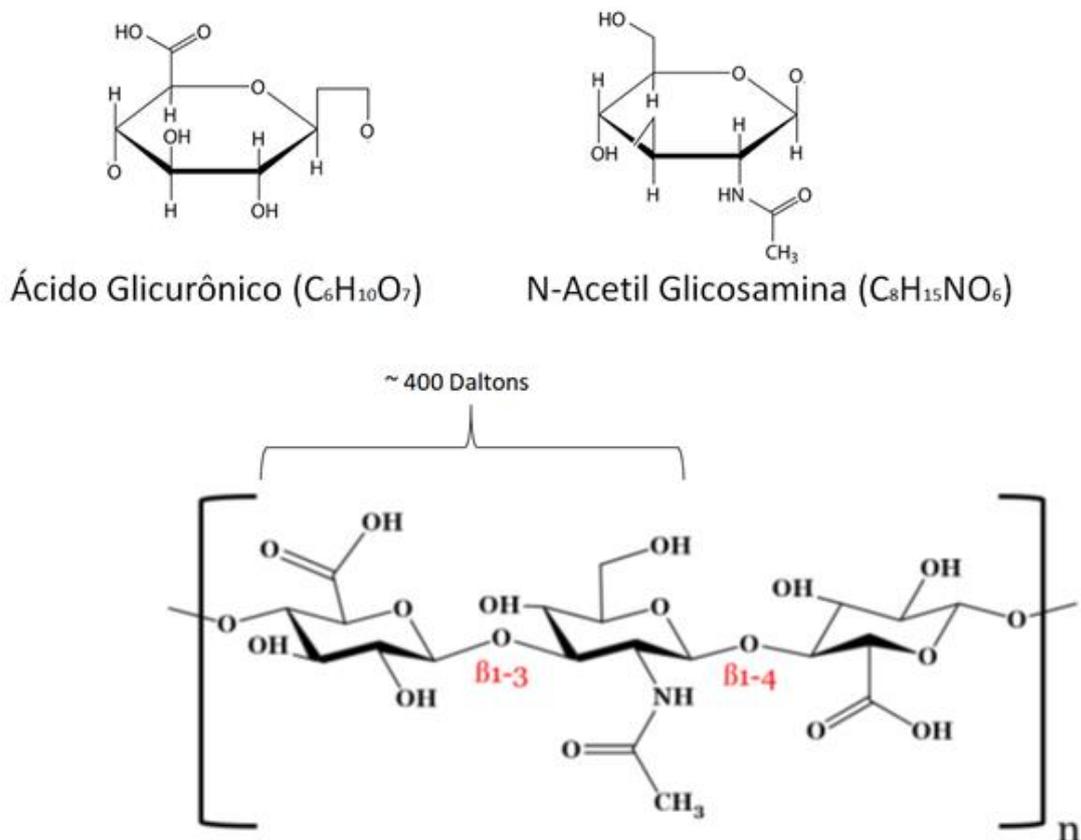


Figura 1. Estrutura química do Ácido Glicurônico (GlcUA), N-Acetil Glicosamina (GlcNAc) e do Ácido Hialurônico .

Cada dímero de AH contém aproximadamente 400 Daltons (Da) de massa e 1 nm (Figura 1). Dependendo da enzima e célula em que é sintetizado a massa molecular é variada (Agarwal *et al.* 2019). Certas cadeias de AH podem atingir até 10^4 repetições de cada dissacarídeo resultando em cadeias com massa de 4 Mega Daltons (MDa) e comprimento de 10 μ m. Ainda hoje, diferentes classificações de tamanho de cadeia do AH são fornecidas em diversos estudos científicos e não há consenso na literatura sobre a classificação do AH em relação à sua massa. Porém, em classificações baseadas na capacidade de absorção do AH pela pele humana (Ghazi *et al.* 2012), cadeias de AH contendo entre 0,4 e 1 MDa são classificadas como baixa massa molecular, cadeias contendo entre 1 e 1,8 MDa são classificadas como cadeias de média massa molecular e cadeias contendo valores acima de 1,8 MDa são classificadas como de alta massa

molecular. Cada tipo de cadeia de AH possui aplicações distintas que serão detalhadas no tópico a seguir.

1.2 Aplicações do Ácido Hialurônico e Mercado

O Ácido Hialurônico está presente naturalmente na pele de todos os vertebrados e encontrado na pele de humanos em diferentes concentrações dependendo da idade. A molécula de AH é altamente higroscópica: 1 grama de AH é capaz de se ligar a até 6 litros de água (T. C and J. R. E 1992). Esta alta capacidade de ligação à água tornam o AH uma molécula associada com funções celulares de proteção contra choques célula-célula, lubrificação e preenchimento de espaços intracelulares. Na indústria de cosméticos, inúmeros produtos atualmente utilizam o AH em suas formulações como um agente estético.

O AH é o principal composto relacionado com a hidratação da pele em humanos devido às suas capacidades intrínsecas de reter água e funcionar como um hidrogel (Papakonstantinou, Roth and Karakiulakis 2012). Cerca de 50% de todo o AH presente em mamíferos está na pele (Reed, Lilja and Laurent 1988). Embora dependa do estilo de vida e genética de cada pessoa, estudos já mostraram que o AH sofre uma progressiva redução na sua quantidade devido à presença no organismo de enzimas responsáveis por degradar o AH, conhecidas como Hialuronidases (HAses) (Longas, Russell and He 1987). A perda do AH pela pele em conjunto com a perda de outros constituintes, como o colágeno por exemplo, podem resultar no surgimento de algumas deformidades na pele, como o aparecimento de marcas de expressão. Devido a isto e de forma a minimizar as perdas do AH na pele, inúmeros cosméticos utilizam este polímero em sua formulação, que vão desde cremes hidratantes, loções, colírios até batons.

Normalmente, soluções de AH com massa molecular mais alta que 1 MDa permanecem na superfície da pele e não são capazes de penetrar na camada mais externa da epiderme, o estrato córneo. Por outro lado, soluções contendo baixa massa molecular (até 300 kDa) são capazes de penetrar no estrato córneo (Essendoubi *et al.* 2016). As propriedades do AH como potenciador da umidade na pele humana está cada vez mais em foco na pesquisa científica.

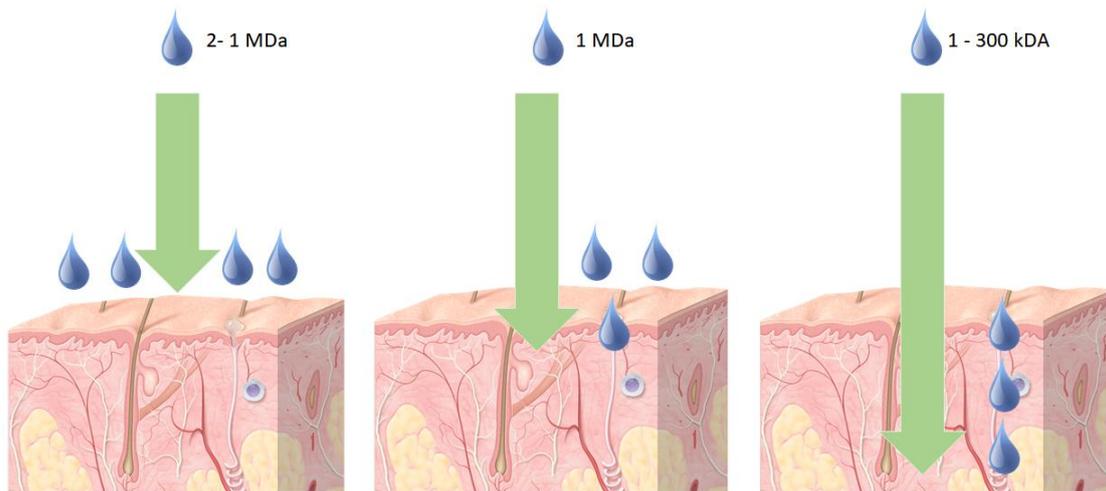


Figura 2. Capacidade de penetração do Ácido Hialurônico na pele humana de acordo com a sua massa molecular.

No campo da reumatologia, o AH é utilizado durante cirurgias como um suplemento para pacientes com artrite reumatóide (Balazs and Denlinger 1993) pois o AH funciona como um lubrificante protetor dos ossos nas articulações humanas. Depois da pele, um dos locais com as maiores concentrações de AH no corpo humano é dentro do globo ocular. Na oftalmologia, o AH é muito utilizado na formulação de colírios e como o principal agente em cirurgias do humor vítreo (Denlinger, El-Mofty and Balazs 1980). Mais recentemente, o AH também vem sendo usada como um sistema de entrega de drogas e outras substâncias. Em estudos prévios, o acoplamento de microesferas de AH em moléculas recombinantes de insulina humana foi responsável por prolongar o tempo de retenção da substância no organismo e diminuir o seu tempo de meia vida (Huang and Huang 2018). O AH é também utilizado na otorrinolaringologia auxiliando na espessura e viscosidade das cordas vocais (Chan, Gray and Titze 2001) e é um polímero promissor na redução de impulsos e sensibilidades de nervos associados à dor, funcionando como um agente analgésico em grandes concentrações (Necas *et al.* 2008).

O AH é atualmente avaliado por diferentes preços dependendo da fonte de onde é extraído. As 3 principais fontes de extração de AH são: (1) extração de tecidos animais, como crista de galo e cordão umbilical; (2) produção por cepas bacterianas do gênero *Streptococcus* (Shiedlin *et al.* 2004) e (3) síntese biológica utilizando Organismos Geneticamente Modificados (OGMs).

Ampolas para aplicação na pele por injeção subcutânea contendo 1 mL de AH a uma concentração de 24 mg/mL são comercializadas em média por R\$ 90 (China Ce Beauty Filler). O AH liofilizado contendo algo grau de pureza (>99%) é comercializado por diferentes preços dependendo de onde foi extraído. O AH obtido a partir de extração de

fontes animais é mais caro. O AH extraído de crista de galo é comercializado a preços que variam dependendo do grau de pureza da molécula. Suplementos alimentares contendo AH de baixa massa molecular (5 kDa) extraído da crista de galo são vendidos por um valor em média de 53 \$ por g de AH (Amazon.com: 120 mg Hyaluronic Acid Rooster Comb Extract, Made from Injuv Rooster Comb Extract). O AH obtido por produção em bactérias é o mais barato. Em média, 1 g de AH produzido por *Streptococcus equi* contendo entre 1,5 e 1,8 MDa é comercializado em média a R\$ 500. Segundo projeções da companhia “Grand View Research”, o mercado global de AH foi avaliado em 9,1 bilhões de dólares em 2019 e é projetado para ter uma taxa anual composta de crescimento de 8,1%, além de atingir um valor de 14,48 bilhões de dólares em 2027.

No Brasil não existe nenhuma tecnologia de produção de Ácido Hialurônico em andamento utilizando um OGM, e dentre os estudos brasileiros envolvendo a produção por bactérias do gênero *Streptococcus*, nenhum produto ainda está em processo de comercialização ou escalonamento. Dentre as patentes existentes no Brasil relacionadas com a síntese de AH por microrganismos predominam os estudos utilizando a bactéria *Streptococcus zooepidemicus* e invenções relacionadas com o processo de produção por este microrganismo. A Tabela 1 mostra as principais patentes criadas e depositadas no Brasil relacionadas com a síntese de AH. Tudo isto indica a necessidade da geração de mais tecnologias brasileiras para a síntese do AH.

Tabela 1 . Principais patentes brasileiras relacionadas com a síntese de Ácido Hialurônico.

Título da Patente	Plataforma usada para a produção de AH	Número do Pedido/ Ano do depósito
Processo biotecnológico utilizando melaço de cana-de-açúcar para produção de ácido hialurônico microbiano	<i>S. zooepidemicus</i>	BR 10 2016 017870 3 2016
Processo para produção e purificação de ácido hialurônico por via microbiana, ácido hialurônico e uso do mesmo	<i>S. zooepidemicus</i>	BR 10 2017 027243 5 2017
Cepa de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> id9103 bem como métodos de ajustar um peso	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	BR 11 2014 007081 4 2012

molecular de ácido hialurônico e de produção de ácido hialurônico		
Levedura recombinante da espécie <i>Hansenula polymorpha</i> para a produção de grandes cadeias de ácido hialurônico	<i>Hansenula polymorpha</i>	BR 10 2016 020193 4 2016
Levedura recombinante da espécie <i>Kluyveromyces lactis</i> para a produção de grandes cadeias de ácido hialurônico	<i>Kluyveromyces lactis</i>	BR 10 2016 020186 1 2016

1.3 Formas de obtenção do Ácido Hialurônico

1.3.1 Extração de tecidos animais

As primeiras formas de obtenção de AH para comercialização foram feitas a partir da extração de tecidos animais. Dentre estes, 3 tipos de tecidos se destacam por serem mais acessíveis e conter grandes quantidades de AH: cristas de galos, cordão umbilical de humanos e globo ocular de animais bovinos.

Em cristas de galos, estudos mostram que existem cerca de 14,9 µg de glicosaminoglicanos a cada 1 mg de tecido extraído da crista (Rosa *et al.* 2008). Destes glicosaminoglicanos, 90% são de cadeias de AH, ou seja, em média é possível ser extraído 13,4 mg de AH por g de crista de galo, ou um rendimento de 1.3% (Severo *et al.* 2012). Embora seja considerado um rejeito pela indústria, a extração do Ácido Hialurônico pela crista de galo é associada com um processo caro, não rentável e difícil (Liu *et al.* 2011), pois junto com o AH obtido durante a extração, diversas toxinas são carregadas, sendo necessário um processo de purificação laborioso.

A partir da utilização de cordão umbilical para a extração de AH, é possível obter rendimentos perto de 3.3% e 4.4% utilizando, respectivamente, cordão umbilical de porcos e humanos (FOLLETT 1948). Já através da utilização do globo ocular de bovinos, é possível obter rendimentos de até 55% de AH por tecido extraído (Schmut 1981). No entanto, atualmente as grandes companhias de fabricação de cosméticos, que são as principais interessadas na comercialização do AH, evitam a utilização de produtos de origem animal em suas formulações, o que impulsionou a busca pela utilização de microrganismos para a síntese do AH.

1.3.2 Microrganismos Produtores Naturais

Naturalmente, o AH é sintetizado por bactérias do gênero *Streptococcus* do grupo A (*Streptococcus pyogenes*), grupo C (*Streptococcus equisimilis* e *S. zooepidemicus*) (DeAngelis, Papaconstantinou and Weigel 1993a; Tlapak-Simmons *et al.* 1998; Saranraj *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012; Shah, Badle and Ramachandran 2013; Lu *et al.* 2016), na levedura *Cryptococcus neoformans* (Jong *et al.* 2007; M. *et al.* 2014), em vertebrados (Itano and Kimata 2002a), em alguns vírus (Graves *et al.* 1999) e em algas (Badour 1999). Desde a elucidação da síntese do AH nas cepas bacterianas de *Streptococcus*, alguns estudos vêm utilizando estas cepas para a produção industrial. Alguns destes resultados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Produção de Ácido Hialurônico por cepas de *Streptococcus sp.*

Microrganismo	Produção de AH (g/l)	Massa molecular (MDa)	Modo de cultura	Referência
S. <i>zooepidemicus</i> Cepa SZ042	6.7	0.4	Batelada (10 L)	(Lu <i>et al.</i> 2016)
<i>S. equisimilis</i> cepa NC2168	0.174	-- ^a	Frasco (20 mL)	(Chen <i>et al.</i> 2012)
<i>S. pyogenes</i> Cepa 442	0.00011	-- ^a	Frasco (10 mL)	(Saranraj <i>et al.</i> 2011)

a: O estudo não apresentou resultados de massa molecular

Dentre os microrganismos produtores naturais de AH, *S. zooepidemicus* é o mais estudado. Embora o processo de síntese de AH em algas e vírus seja patenteado (patente EP2914716 (A1) de 09/09/2015), o processo de síntese usando estas plataformas resultou em produções de AH de < 0.1 g/L. Como observado ainda na Tabela 2, cepas de *S. equisimilis* e *S. pyogenes* apresentam uma produção de AH muito menor do que a obtida por cepas de *S. zooepidemicus*. No entanto, *S. zooepidemicus* é uma bactéria patogênica, causando severas infecções mais frequentemente em animais domésticos e em menor frequência no trato gastrointestinal em humanos (Timoney 2004; Pelkonen *et al.* 2013). De forma semelhante ao que também ocorre na levedura patogênica *C. neoformans* (M. *et al.* 2014), células de *S. zooepidemicus* criam ao redor da parede celular uma cápsula de AH (Xu *et al.* 2016), o que auxilia estas células a se defenderem e se camuflarem do sistema imune de mamíferos, já que nestes últimos o AH é um constituinte natural também utilizado em forma de cápsula.

Por todos estes motivos, fermentações através da utilização dos produtores naturais de AH vem sendo evitadas devido à baixa produção obtida (Tabela 2) ou devido aos altos custos relacionados com a biossegurança para operação do bioreator. Em razão disto, principalmente a partir do início da década de 2000, diversos estudos foram originados utilizando os genes das bactérias *Streptococcus* para o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados produtores de AH.

1.3.3 Microrganismos Geneticamente Modificados (OGMs)

Dentre os microrganismos modificados geneticamente para a síntese de AH, destacam-se a utilização de bactérias, dentre elas *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Agrobacterium sp*, *Streptomyces albulus*, *Corynebacterium glutamicum* e *Bacillus subtilis*. Até hoje, apenas 4 leveduras foram geneticamente modificadas para a síntese de AH, *Kluyveromyces lactis* utilizada neste estudo, *Pichia pastoris* (Jeong, Shim and Kim 2014a), *Ogataea (Hansenula) polymorpha* (Manfrão-Netto *et al.* 2021) e *Saccharomyces cerevisiae* (patente JP2007174957 (A) de 12/07/2007). Todos estes microrganismos com os valores de AH produzidos e massa molecular estão sumarizados na Tabela 3 e em sua maioria previamente revisados (de Oliveira *et al.* 2016).

Tabela 3. Microrganismos modificados geneticamente para a síntese de Ácido Hialurônico. Para comparação, foram escolhidos para esta tabela cepas contendo as mesmas modificações genéticas (inserção dos genes *hasA* e *hasB*).

Microrganismos	Nome da cepa	AH (g/l)	MASSA molecular (MDa)	Concentração inicial de substrato	Referência
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>E. coli</i>	-- ^a	0,69 0,08	-- ^a	-- ^a	(DeAngelis, Papaconstantinou and Weigel 1993a)
<i>B. subtilis</i>	RB184	0,81	1,2	-- ^b	(Widner <i>et al.</i> 2005)
<i>L. lactis</i>	LL-NAB	0,65	-- ^a	10 g/L	(Chien and Lee 2007a)
<i>B. subtilis</i>	RB-AB	0,84	-- ^a	10 g/L	(Chien and Lee 2007b)
<i>Agrobacterium sp</i>	ATCC31749	0,3	0,7-2	42 g/L	(Mao and Chen 2007)
<i>E. coli</i>	sseAB spAB	0,2 0,01	1,9	16 g/L	(Yu and Stephanopoulos 2008)
<i>E. coli</i>	JM109/pHK	0,55	1,5	45 g/L	(Mao, Shin and Chen 2009)
<i>L. lactis</i>	NFHA01	0,59	0,88	20 g/L	(Sheng <i>et al.</i> 2009)

<i>L. lactis</i>	SJR2	0,11	2,8	15 g/L	(Prasad, Jayaraman and Ramachandran 2010)
<i>L. lactis</i>	VRJ2AB	0,14	4,30	10 g/L	(Hmar <i>et al.</i> 2014)
<i>P. pastoris</i>	EJ	0,2	0,25	40 g/L	(Jeong, Shim and Kim 2014a)
<i>Streptomyces albulus</i>	pJHA3	5,1	2	60 g/L	(Yoshimura <i>et al.</i> 2015)
<i>B. subtilis</i>	pP43-D	2,05	1,76	50 g/L	(Jin <i>et al.</i> 2016)
<i>C. glutamicum</i>	pXMJ19-PdapB	-- ^a 0,14	-- ^a -- ^a	40 g/L	(Cheng <i>et al.</i> 2016)
<i>C. glutamicum</i>	AB	5,4	1,28	40 g/L	(Cheng <i>et al.</i> 2017)
<i>B. subtilis</i>	AW008	0,48	1,95	20 g/L	(Westbrook <i>et al.</i> 2018)
<i>K. lactis</i>	BAP	1,89	2,09	40 g/L	(V. Gomes <i>et al.</i> 2019)
<i>C. glutamicum</i>	13032	28,7	0,21	-- ^d	(Cheng, Yu and Stephanopoulos 2019)
<i>L. lactis</i>	SJR6	1,1	-- ^a	20	(Badri, Raman and Jayaraman 2019)
<i>C. glutamicum</i>	CgspH-7	74,1	0,053	-- ^d	(Wang <i>et al.</i> 2020)
<i>Ogataea (hansenula) polymorpha</i>	EMB103	0,19	-- ^a	20	(Manfrão-Netto <i>et al.</i> 2021)

a. Informação não disponível

b. Concentração inicial de substrato durante crescimento não citada.

c. Concentração de glicose mantida a 5% através de uma bomba de alimentação.

d. Concentração de glicose mantida a 10% através de uma bomba de alimentação.

Como observado na Tabela 3, *C. glutamicum* e *B. subtilis* são as melhores cepas bacterianas produtoras de AH (Wang *et al.* 2020). O valor de produção alcançado pela cepa CgspH-7 de 74,1 g/L é o mais alto registrado na literatura de OGMs até hoje (Wang *et al.* 2020). Dentre estas cepas, *B. subtilis* (Widner *et al.* 2005) é atualmente utilizada para a síntese de AH inserido na formulação de um produto oftalmológico (Hyasis® - Novozymes Biopharma).

1.4 Via de síntese do Ácido Hialurônico

Usualmente, ambos os precursores do AH são representados como UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc, já que precisam estar unidos em moléculas de UDP para serem incorporados em cadeias de AH. Ambos os precursores são sintetizados a partir de desvios diretos da Glicólise (Figura 3). UDP-GlcNAc é sintetizado a partir de 4 reações vindas da Frutose-6-P, enquanto UDP-GlcUA é sintetizado a partir de 3 reações oriundas da Glicose-6-P. Estes 2 precursores são unidos para a formação de cadeias de AH através da ação da enzima “Hialurônico Ácido Sintase”, também chamada de HASA (DeAngelis, Papaconstantinou and Weigel 1993b). Embora não tenham como produto direto o Ácido Hialurônico, algumas outras enzimas presentes nos mapas metabólicos do AH também recebem a nomenclatura “HAS”, como visto na Figura 3. As enzimas HASB, HASC, HASD e HASE, correspondem, respectivamente, às enzimas UDP-Glicose Desidrogenase, UDP-Glicose Pirofosforilase, UDP-GlcNAc Pirofosforilase e Fosfoglucoisomerase. Juntas, estas quatro enzimas catalisam cinco reações diferentes porque HASD é bifuncional catalisando 2 reações distintas, não mostrado na Figura 3.

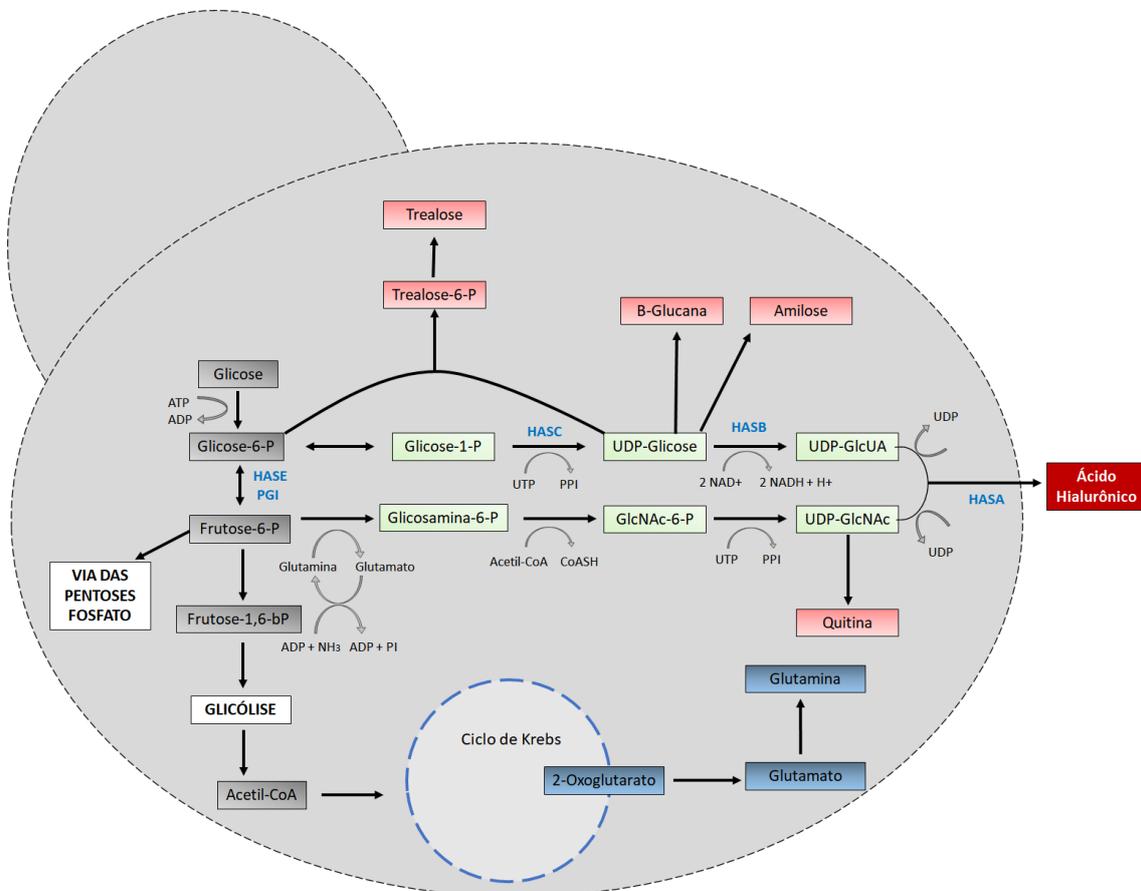


Figura 3. Mapa metabólico da síntese de Ácido Hialurônico na cepa BAP de *K. lactis*. Em cinza a via da glicólise. Em verde a via de síntese do Ácido Hialurônico. Em vermelho metabólitos relacionados com a competição da síntese de AH. Em azul Ciclo de Krebs com a ramificação responsável pela regeneração glutamina/glutamato.

Definida durante a década de 90, a nomenclatura das enzimas HAS A-B-C-D-E foi utilizada em razão de estudos da existência de operons dedicados à síntese de AH em bactérias do gênero *Streptococci*. Embora a via de síntese do AH seja bem conservada em bactérias sintetizantes de AH, existem diferenças nos números de genes presentes nestes operons AH dependendo da bactéria estudada. Em *Streptococcus uberis*, o operon AH contém os genes *hasA* e *hasB* (Ward *et al.* 2001). Em *S. pyogenis*, além dos 2 genes mencionados, o operon também contém o gene *hasC* (Dougherty and Van De Rijn 1994). Em *S. equisimilis*, o operon contém o quarto gene *hasD*. *S. zooepidemicus subs. equi* é o microrganismo que possui o operon AH descrito contendo o maior número de genes devido à presença do quinto gene *hasE* (Blank, Hugenholtz and Nielsen 2008).

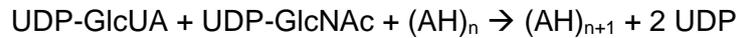
A via de síntese de ambos os 2 precursores do AH é geralmente bem conservada em diferentes microrganismos, porém, existem algumas pequenas diferenças. Em vertebrados e leveduras Glicosamina-6-P é convertido em GlcNAc-6-P (Figura 3), enquanto em bactérias é convertido em Glicosamina-1-P. Leveduras são capazes de sintetizar naturalmente o precursor UDP-GlcNAc, pois utilizam este metabólito para a síntese de parede celular como precursor da síntese de quitina (Figura 3), porém não sintetizam o segundo precursor UDP-GlcUA. Bactérias não sintetizantes de AH, como *E. coli* e *B. subtilis*, são capazes de sintetizar ambos UDP-GlcNAc e UDP-GlcUA, mas não possuem a enzima HASA responsável pela síntese de AH. É por este motivo que para a geração de cepas geneticamente modificadas produtoras de AH, é necessário serem inseridos em leveduras pelo menos os genes *hasB* e *hasA* e em bactérias apenas *hasA*.

Em termos metabólicos, a síntese de AH é considerada um processo energeticamente custoso para a célula. A síntese de 1 unidade de AH contendo UDP-GlcNAc e UDP-GlcUA exige a utilização de 2 ATP, 2 UTP, 1 Acetil-CoA, 2 NAD⁺ e 1 Glutamina. Além disto, um dos precursores do AH, a UDP-GlcNAc, é utilizado pela célula na produção de quitina (Figura 3), enquanto UDP-Glicose é utilizado como precursor da síntese de β -Glucana e Amilose, todos considerados constituinte da parede celular de leveduras. É por este motivo que a síntese de AH é um processo associado com a geração de biomassa.

Finalmente, durante o processo de síntese do AH, são utilizados como cofatores tanto metabólitos associados com um metabolismo catabólico (UTP, Acetil-CoA e ATP), como com um metabolismo anabólico (NAD⁺ gerando NADH) e que precisa ser regulado ao mesmo tempo pela célula (Figura 3).

1.5 Ácido Hialurônico Sintases (HASA)

As “Ácido Hialurônico Sintases” ou “HASAs” são as enzimas responsáveis pela síntese de Ácido Hialurônico. São enzimas classificadas no grupo das β -Glicosiltransferases (GST), pois catalisam a adição de grupos glicosil em grupos aceptores. Simplificadamente, a reação catalisada pela HASA pode ser ilustrada como:



onde $n+1$ representa a quantidade de dissacarídeos presentes na cadeia de AH.

Todas as enzimas HASA são acopladas nas membranas dos microrganismos formando um poro catalítico pelo qual cadeias de AH são sintetizadas. O lado da enzima em contato com o citoplasma da célula fica em contato com os 2 precursores do AH (UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc). Enquanto é formada, a cadeia de AH permanece ligada à enzima até ser expulsada para o meio extracelular (Figura 4) por mecanismos ainda não elucidados (Kumari and Weigel 2005). Em vertebrados, o AH é sintetizado na membrana plasmática e em bactérias streptococci é sintetizado na membrana protoplasmática.

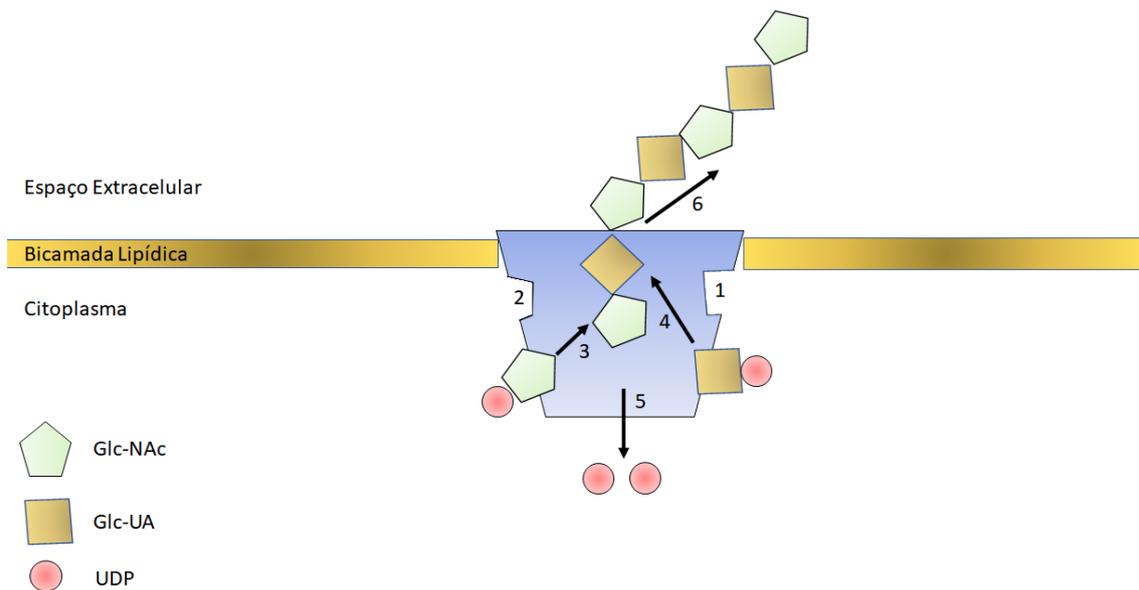


Figura 4. Representação da enzima Ácido Hialurônico Sintase e sua atividade durante a síntese de Ácido Hialurônico. 1 indica o sítio de ligação do substrato UDP-GlcUA; 2 indica o sítio de ligação do substrato UDP-GlcNAc; 3 indica o sítio da atividade transferase de GlcNAc em uma extremidade aceptora contendo GlcUA; 4 indica o sítio da atividade transferase de GlcUA em uma extremidade aceptora contendo GlcNAc; 5 indica o sítio utilizado para rompimento da ligação do UDP com os 2 precursores e 6 indica o sítio responsável pela translocação da cadeia de AH sintetizada pelo poro da enzima e consequente secreção para fora da célula.

Todas as enzimas HASA descritas necessitam de íons metálicos como cofatores para a atividade funcional. Por exemplo, estudos com as HASA da bactéria *Pasteurella multocida* (pmHAS) mostraram que a enzima foi completamente incapaz de incorporar os 2 precursores marcados $[^{14}\text{C}]\text{GlcUA}$ e $[^3\text{H}]\text{GlcNAc}$ em cadeias de AH durante

experimentos na ausência de íons metálicos e contendo EDTA (DeAngelis 1996). Embora o íon Mg^{2+} seja o mais descrito na literatura como principal cofator, enzimas como a pmHAS também funcionam adequadamente em meios contendo os íons Mn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} , embora em níveis menores quando comparados com Mg^{2+} (DeAngelis 1996).

Dentre todos os seres vivos capazes de sintetizar AH naturalmente, bactérias do gênero *Streptococcus* são as mais escolhidas para caracterização das enzimas HASA. Estudos já caracterizaram as HAS bacterianas de *S. pyogenes* (Tlapak-Simmons *et al.* 1999), *S. equisimilis* (Tlapak-Simmons *et al.* 1999) e *S. uberis* (Ward *et al.* 2001). Também há relatos de caracterização das 3 isoformas de HASA presentes em humanos (Itano and Kimata 2002a), em ratos (*Mus musculus*) (Itano and Kimata 1996) e em alguns outros vertebrados como no anfíbio *Xenopus laevis* (Müllegger and Lepperdinger 2002; Vigetti *et al.* 2006).

Geralmente, as HASA possuem cadeias peptídicas contendo entre 400 e 600 aminoácidos, bem como um número de domínios transmembrânicos entre 5 (em bactérias) e 7 (em vertebrados), como sumarizado na Tabela 4.

Tabela 4. Diferenças entre as Ácido Hialurônico Sintases de bactérias e mamíferos em termos de tamanho e domínios transmembrânicos.

	Aminoácidos	Domínios transmembrânicos	Genbank ID
<i>S. pyogenes</i>	419	5	AB741627.1
<i>S. equisimilis</i>	417	5	AF414053.1
<i>S. uberis</i>	417	5	AJ242946.2
<i>Homo sapiens</i> (isoforma 1)	578	7	NM_001523.4
<i>Homo sapiens</i> (isoforma 2)	552	7	NM_005328.3
<i>Homo sapiens</i> (isoforma 3)	553	7	NM_005329.3
<i>Xenopus laevis</i> (isoforma 1)	588	7	NM_001086227.1
<i>Pasteurella multocida</i>	972	1	AF036004

<i>Mus musculus</i> (isoforma 1)	583	7	NM_008215.2
-------------------------------------	-----	---	-------------

Análises de similaridade mostram que a porcentagem de identidade entre as sequências peptídicas das diferentes HASA de algumas bactérias e vertebrados varia dependendo do grupo em estudo, como mostrado na Tabela 5. As HASA de *S. zooepidemicus* (spHAS), *S. equisimilis* (seHAS) e *S. uberis* (suHAS) possuem valores de identidade entre si que variam entre 71 e 76% de identidade. Quando comparadas às HASA dos vertebrados como as de *Homo sapiens* (hsHAS) e *Xenopus laevis* (xlHAS), as HASA de streptococci possuem baixa identidade com valores variando entre 26 e 30% de identidade. Já quando as HASA de vertebrados são comparadas entre si não há uma alta identidade como vista entre HASA de bactérias, com valores próximos de 55%.

Tabela 5. Níveis de similaridade entre as Ácido Hialurônico Sintases de algumas bactérias e mamíferos.

	spHA S	seHA S	suHAS	hsHAS (1)	hsHAS (2)	hsHAS (3)	xlHAS	pmHAS	mmHA S
spHAS	--	72	71,46	27,43	28,11	28,08	27,19	30,23	27,29
seHAS	72	--	75,42	27,70	26,85	28,34	24,89	30,91	27,63
suHAS	71,46	75,42	--	29,93	26,11	26,26	28,89	32,11	31,23
hsHAS (1)	27,43	27,70	29,93	--	53,61	55,76	57,64	46,67	95,14
hsHAS (2)	28,11	26,85	26,11	53,61	--	70,51	55,62	25,71	53,61
hsHAS (3)	28,08	28,34	26,26	55,76	70,51	--	55,43	26,32	55,56
xlHAS	27,19	24,89	28,89	57,64	55,62	55,43	--	36	57,96
pmHAS	30,23	30,91	32,11	46,67	25,71	26,32	36	--	27,66
mmHAS	27,29	27,63	31,23	95,14	53,61	55,56	57,96	27,66	--

sp – *S. zooepidemicus*; se – *S. equisimilis*; su – *S. uberis*; hs – *H. sapiens*; xl – *X. laevis*; pm – *P. multocida*; mm – *M. musculus*.

Também a partir Tabela 4, verifica-se que a bactéria *P. multocida* contém uma HASA (pmHAS) com um padrão de identidade (~31%) e tamanho de proteína (972 aminoácidos) bem distinto quando comparada às outras bactérias streptococci. Estas observações em conjunto com estudos de topologia (Figura 5) e mecanismos de síntese de AH levaram pmHAS a ser classificada em um grupo distinto de HAS (DeAngelis 1996). pmHAS é classificada como HAS de classe II, enquanto todas as outras HAS existentes de bactérias, levedura, vírus, algas e vertebrados são classificadas como

HAS de classe I. As principais diferenças entre estas 2 classes de enzimas serão mais detalhadas nos tópicos a seguir.

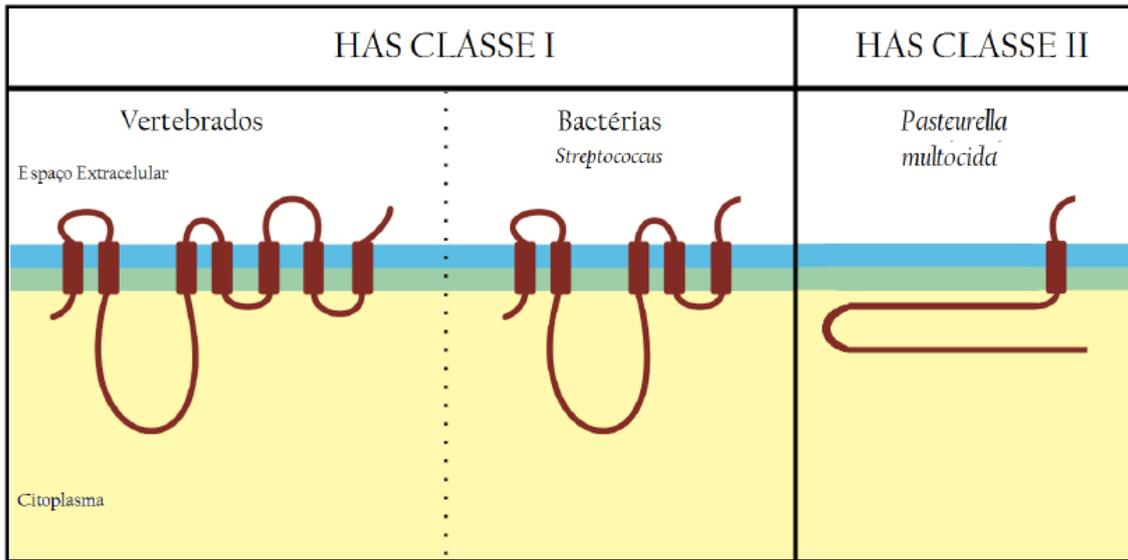


Figura 5. Predição do número de domínios transmembrânicos das enzimas HAS de classe I presentes em vertebrados e bactérias e classe II presente em *P. multocida*.

1.5.1 Ácido Hialurônico Sintases (HASA) de Classe I

Exceto no caso de *P. multocida*, todas as HASA descritas até hoje se encaixam no grupo das enzimas de Classe I. Isto inclui as HASA presentes em bactérias, vertebrados, mamíferos, algumas algas e na levedura *Cryptococcus neoformans* (M. et al. 2014).

Como já mencionado, enzimas HASA são classificadas dentro das Glicosiltransferases. Nas GSTs que sintetizam polímeros, geralmente a reação de adição dos monômeros nas cadeias poliméricas é catalisada através da extremidade não redutora, como é o caso por exemplo da enzima Glicogênio Sintase. As HAS de Classe I, ao contrário das de Classe II, incorporam os substratos em cadeias de AH através da extremidade redutora (Figura 6), sendo, portanto, os substratos aceptores e não os doadores da reação.

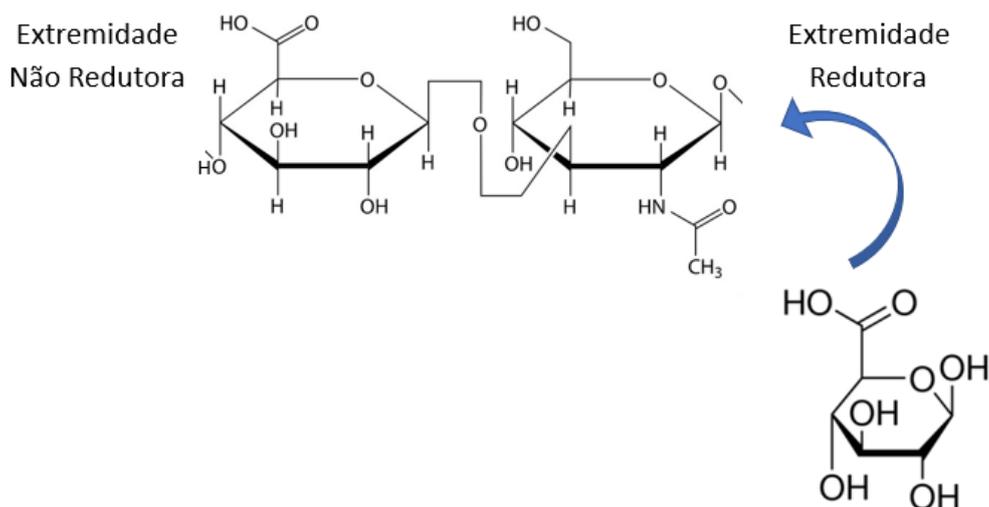


Figura 6. Mecanismos de incorporação dos substratos do AH em cadeias utilizado pelas enzimas HASA de Classe I.

Em mamíferos como em humanos e ratos, as HASA estão presentes em 3 distintas isoformas HASA1, HASA2 e HASA3 codificadas pelos genes *hasA1*, *hasA2* e *hasA3* (Itano and Kimata 2002b). Diferentes de mamíferos, as HASA de streptococci apresentam-se como isoforma única codificada pelo gene *hasA*. Todas as 3 principais HAS bacterianas conhecidas possuem um tamanho peptídico quase idêntico entre 417 e 419 aminoácidos (Tabela 4). Além disso, suHAS, seHAS e spHAS possuem em suas sequências a presença de 4 resíduos de cisteína, todos em posições bem conservadas. spHAS possui outros 2 resíduos não conservados, totalizando 6 (Létoffé *et al.* 1999). Inicialmente, estas análises sugeriram que estes resíduos poderiam ter uma relação direta com a localização dos principais sítios ativos das enzimas HAS de streptococci.

Testes com seHAS mostraram que esta enzima é inibida em meios contendo N-etilmaleimida (NEM), um composto comumente usado para alterar resíduos de Cisteína em proteínas. Através do cálculo da atividade da enzima seHAS, foi mostrado que após 60 minutos, a atividade enzimática caiu pela metade (de 100% para ~50%) após incubação com 5 mM de NEM (Tlapak-Simmons *et al.* 1998).

Recentemente, estudos detalhados de todos os aminoácidos da enzima HASA de *S. zooepidemicus* (seHAS) foram realizados de forma a entender como a enzima é organizada na membrana da célula bacteriana e como realiza a síntese de AH (Agarwal *et al.* 2019). O estudo identificou que seHAS (417 aminoácidos) contém 9 Elementos Sub-Estruturais (ESS), que são regiões em uma proteína que possuem alguma importância estrutural ou funcional para a enzima.

Todas as HASA de streptococci contém um domínio citoplasmático e 6 domínios de membrana, sendo 4 destes integrais de membrana e 2 anfipáticos (Heldermon, DeAngelis and Weigel 2001).

1.5.2 Ácido Hialurônico Sintases (HASA) de Classe II

HASA de *P. multocida* é a única enzima caracterizada dentro das HASA de Classe II. Estudos de predição de topologia em computador (TmPRED) sugerem que, diferente da classe I, pmHAS possui apenas 1 ou 2 domínios transmembrânicos, enquanto que outros algoritmos (SOSUI) classificam pmHAS como enzima localizada no citoplasma (Jing and De Angelis 2000).

Mesmo com todas as diferenças, análises da sequência peptídica da pmHAS mostram que esta enzima possui 2 motivos semelhantes com motivos presentes nas HAS de classe I. Estes motivos foram denominados A1 (resíduos 161-267) e A2 (resíduos 443-547) (Jing and De Angelis 2000). Estudos com a realização de mutações na pmHAS sugerem que A1 é responsável pela atividade de GlcNAc-Transferase e A2 é responsável pela atividade de GlcUA-transferase. Em comparação com a proteína nativa, uma mutação no domínio A1 (D196K) mantém a atividade GlcUA-Transferase em 100% mas reduz a atividade GlcNAc-Transferase para 3%. Já uma mutação no domínio A2 (D477K) reduz a atividade GlcUA-Transferase para 2% e reduz apenas levemente a atividade GlcNAc-Transferase para 70% (Jing and De Angelis 2000).

Estudos mais aprofundados com formas truncadas da enzima pmHAS também sugerem a localização do domínio transmembrânico da enzima. A forma nativa da pmHAS possui 972 aminoácidos (Tabela 4). A forma truncada da enzima sem 216 aminoácidos no C-terminal continua sendo capaz de se acoplar à membrana da bactéria. No entanto, quando o tamanho é reduzido de 216 para 269, a pmHAS se torna uma enzima citoplasmática sugerindo que a região entre os aminoácidos 703 e 756 está relacionada com o domínio transmembrânico (Figura 7). Embora testes com versões truncadas da pmHAS não tenham sido realizados dentro dos domínios A1 e A2, as atividades de GlcUA-Transferase e GlcNAc-Transferase também são afetadas quando pmHAS é afetada após o resíduo 650 (Jing and De Angelis 2000) sugerindo que estas regiões devem interagir com os domínios A1 e A2.

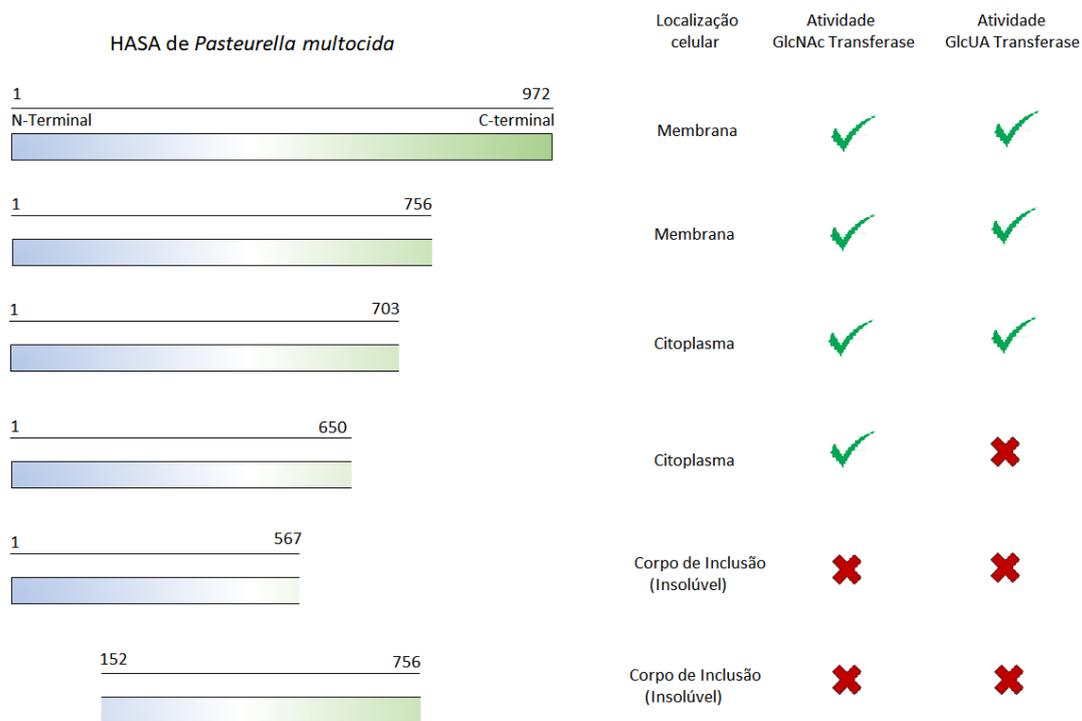


Figura 7. Localização celular e atividades dos domínios transferases da enzima HASA de *P. multocida* a partir da utilização de diferentes versões truncadas da enzima.

Outro aspecto bem estudado em relação às enzimas HAS é na forma como os 2 precursores do AH interagem e são unidos a partir do contato com a enzima. O Ácido Glicurônico ($C_6H_{10}O_7$; 194,139 g/mol) e a N-Acetil-Glicosamina ($C_8H_{15}NO_6$; 221,21 g/mol) possuem cada um seu próprio sítio de ligação na enzima HAS. Porém, a forma como cada um dos precursores é disponibilizada para a enzima parece afetar a síntese do AH. Este fenômeno é reforçado através da realização de experimentos da atividade da enzima HAS com os 2 substratos. Testes usando membranas isoladas contendo a HAS de *S. pyogenes* (spHAS) (Tlapak-Simmons *et al.* 1999) mostraram que a atividade da enzima HAS varia em função da proporção dos 2 precursores disponíveis para a enzima de acordo como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade da enzima HAS de *S. pyogenes* em função da proporção dos 2 precursores. Dados retirados de (Tlapak-Simmons *et al.* 1999).

Concentração de UDP-GlcNAc [mM]	Concentração de UDP-GlcUA [mM]	Proporção	Atividade da HAS (nmol/μg de proteína de membrana/h)
0,1	1	10/1	1

0,5	1	2/1	2
1	1	1/1	2,25

Ainda, em ensaios adicionais com membranas contendo spHAS, o K_M para UDP-GlcUA é de 17 μM quando 0,1 mM de UDP-GlcNAc é disponibilizado. Este mesmo valor de K_M sobe para 40 μM quando 1,5 mM de UDP-GlcNAc é colocado (Tlapak-Simmons *et al.* 1999).

Resultados semelhantes são também observados em estudos com HAS de classe II. Ensaio utilizando os 2 precursores do AH marcados ($[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ e $[^3\text{H}]\text{GlcNAc}$) mostraram que o V_{MAX} da enzima pmHAS também depende da concentração dos 2 precursores, como mostrado na Tabela 7:

Tabela 7. V_{MAX} da enzima HAS de *P. multocida* em relação à concentração dos 2 precursores. Ensaio realizado com 20 μg de enzima HAS. A máxima incorporação dos substratos na cadeia de AH definida como 780 dpm (desintegrações por minuto)/h foi normalizada como 100% V_{MAX} . Dados retirados de (DeAngelis 1996).

Concentração de UDP-GlcNAc [μM]	concentração de UDP-GlcUA [μM]	Proporção	% V_{max}
800	800	1/1	92
200	800	1/4	66
100	800	1/8	64
1000	700	1,4/1	96
1000	250	4/1	84
1000	125	8/1	80

Outro importante aspecto estudado nas HAS é a interação destas enzimas com determinados constituintes celulares presentes na membrana dos microrganismos. Alguns estudos sugerem que enzimas HAS precisam interagir com moléculas de Cardiolipina presentes na membrana para ter uma correta atividade (Tlapak-Simmons *et al.* 1998). De acordo com o tamanho da cadeia peptídica, spHAS (419 aminoácidos) e seHAS (417 aminoácidos) possuem uma massa calculada de 47,774 kDa e 47,778 kDa, respectivamente (DeAngelis, Papaconstantinou and Weigel 1993a). No entanto, estudos com membranas contendo as HAS de ambas as bactérias mostraram que ambas spHAS e seHAS possuem uma massa de ~65 kDa, que é ~17 kDa maior que o valor teórico. Inicialmente, era sugerido que as enzimas HAS de streptococci podiam ser dímeros, homodímeros ou passar por alguma modificação pós-traducional, no entanto, estas teorias foram rejeitadas (DeAngelis, Papaconstantinou and Weigel 1993a)

e hoje é elucidado que esta massa adicional de ~17 kDa é de determinados compostos celulares que auxiliam na atividade de HAS como a Cardiolipina.

1.6 Fisiologia de *Kluyveromyces lactis*

No intuito de gerar uma nova cepa geneticamente modificada produtora de AH, a levedura *K. lactis* foi escolhida neste estudo como plataforma de produção. *K. lactis* é uma levedura que foi originalmente encontrada e isolada em produtos derivados do leite (queijos e iogurtes). É um microrganismo mais conhecido e usado comumente para a produção da enzima lactase (β -galactosidase), usada na indústria para a geração de produtos livres de lactose (Bonekamp and Oosterom 1994). Estudos de revisão mostraram que *K. lactis* já foi utilizada na produção de mais de 50 proteínas heterólogas pela indústria (Spohner *et al.* 2016).

Dentre todas as características de *K. lactis*, a mais relatada na literatura é a sua capacidade de assimilar lactose/galactose como fonte de carbono, bem como a regulação deste através do promotor pLAC4 (Rodicio and Heinisch 2013). Durante crescimento em frasco em meio definido, *K. lactis* cepa JA6 consome toda a glicose do meio (2%) em 44 horas. Quando o açúcar disponibilizado é lactose (2%), todo o consumo ocorre em 20 horas (dos Santos 2013). *K. lactis* é mais adaptada ao consumo de lactose devido à presença no seu genoma de um sistema genético responsável por regular o metabolismo deste açúcar. Dentre estes genes, os principais envolvidos são *lac4*, *lac9*, *lac10*, *lac12*, *gal1*, *gal7* e *gal10* (Naumov 2005).

Todos estes produtos gênicos estão ilustrados na Figura 8. Uma vez disponibilizado para células de *K. lactis*, a lactose é internalizada através da permease LAC12 e metabolizada em glicose pela β -Galactosidase (LAC4). Glicose abastece diretamente a via glicolítica, enquanto galactose é convertida em galactose-1-fosfato pela via de Leloir gerando ao final glicose-6-fosfato também usado na glicólise. O gene *gal4* é o principal gene envolvido na indução dos outros genes relacionados com metabolização de galactose, enquanto *gal80* é o principal gene envolvido na inibição. Os genes *gal4* e *gal80* estão relacionados com atividades que resultam em efeitos antagônicos. Estudos iniciais mostraram que a indução realizada pelo fator de transcrição GAL4 é cessada em meios contendo uma ausência de galactose ou na presença de glicose (Zachariae, Kuger and Breunig 1993), em um mecanismo melhor explicado a seguir.

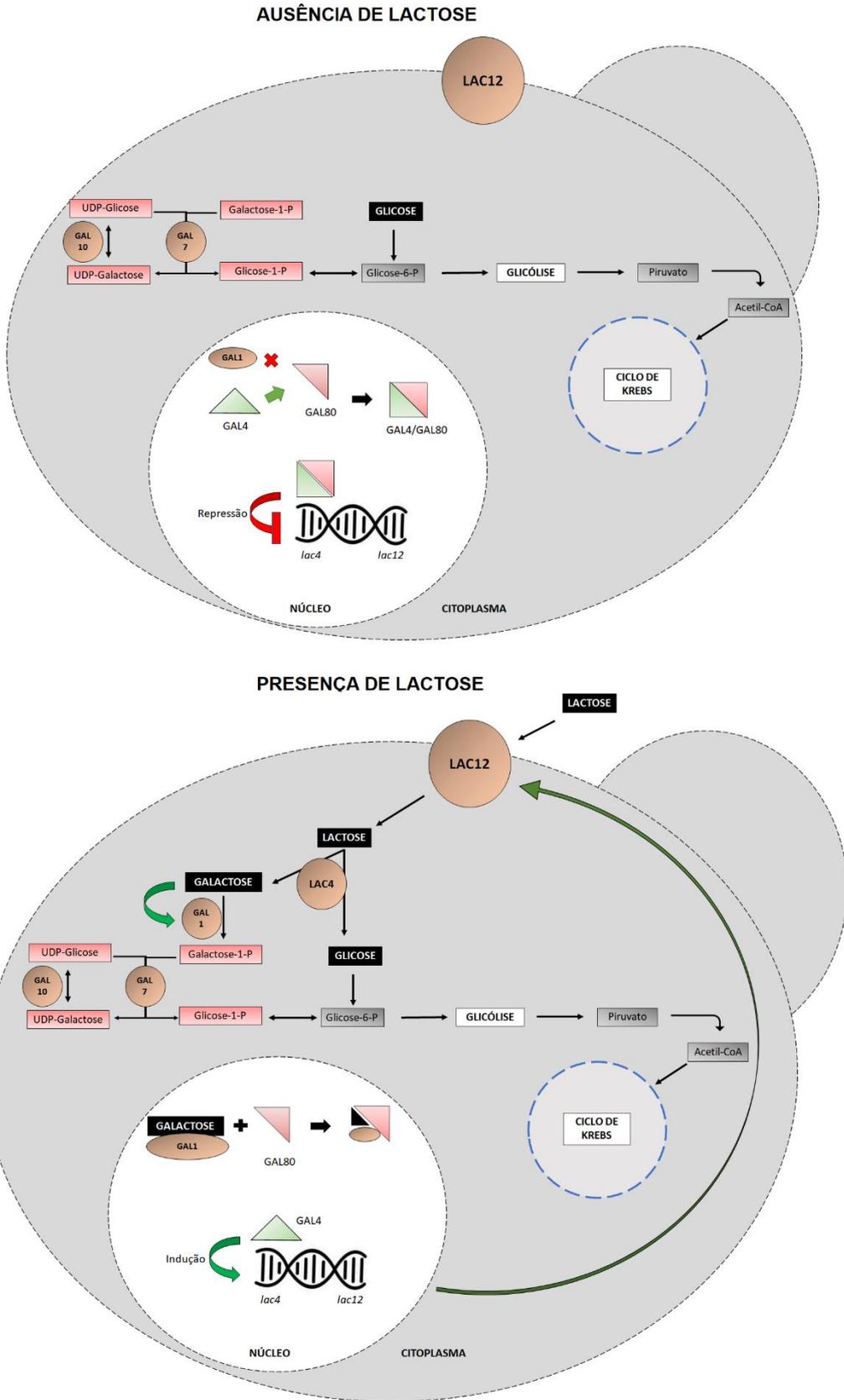


Figura 8. Mecanismos associados com a metabolização de lactose e sua regulação em células de *K. lactis* na ausência e presença de lactose. Caixas cinzas indicam a via da glicólise, caixas vermelhas indicam a via de Leloir. Setas verdes

indicam eventos associados com indução e setas vermelhas indicam eventos associados com repressão. Círculos marrons simbolizam enzimas.

Uma vez dentro da célula, galactose é capaz de interagir alostericamente com a enzima Galactoquinase (GAL1), codificada pelo gene *gal1*. Esta interação permite que GAL1 assumira uma conformação capaz de interagir com o repressor de transcrição GAL80 no núcleo da célula. Porém, GAL80 também é capaz de interagir com o indutor GAL4, formando no processo um dímero proteico responsável pela repressão dos genes *lac4/lac12*. O sequestro do repressor GAL80 pela interação com GAL1 diminui a concentração dos níveis do próprio GAL80 no núcleo, impedindo a formação do dímero GAL80/GAL4 e consequentemente evitando a repressão dos genes (Figura 8).

Um estudo prévio mostrou os efeitos observados durante a repressão e indução dos genes *lac* e *gal* através dos agentes indutores em *K. lactis* (dos Santos 2013). Em células de *K. lactis* cepa JA6 foi adicionado glicose (100 mM) após um crescimento destas em meio contendo lactose com carbono marcado (glicose-1-¹⁴C). Após a adição de glicose, houve uma diminuição da velocidade do fluxo $Lactose_{Extracelular} \rightarrow Lactose_{Intracelular}$ de 110 $\mu\text{moles/h/g}$ para 85 $\mu\text{moles/h/g}$, enquanto em uma cepa sem adição de glicose não houve variação considerável de velocidade durante o mesmo tempo de estudo (de 105 $\mu\text{moles/h/g}$ para 107 $\mu\text{moles/h/g}$). De modo a relacionar este resultado com o nível de expressão do gene *lac12*, o mesmo estudo realizou análise em microscópio das células contendo a enzima permease LAC12 com um marcador fluorescente GFP. Após crescimento em lactose 2% foi adicionado glicose (100 mM) ao meio. Antes da adição de glicose observava-se uma fluorescência principalmente localizada na membrana das células; após 5 minutos da adição observou-se uma absorvância espalhada no espaço intracelular; após 15 minutos da adição observou-se uma localização quase inteiramente vacuolar, indicando que a adição de glicose não apenas está relacionada com a supressão do gene *lac12*, mas também com a reorganização espacial das enzimas permease já presentes na célula. Neste mesmo estudo, a atividade da enzima β -galactosidase LAC4 foi medida em células separadamente crescidas em glicose 2%, lactose 2% e glicose 1% + lactose 2%. Em glicose houve uma atividade de 16,85 $\mu\text{moles/h/mg}$, em lactose houve uma atividade de 449,98 $\mu\text{moles/h/mg}$ e em Glicose + lactose houve uma atividade de 74,88 $\mu\text{moles/h/mg}$, indicando o efeito inibidor da glicose na atividade desta enzima. Porém, é necessário salientar que a glicose não é um inibidor total da expressão dos genes que resultam na atividade das enzimas LAC4 e LAC12, havendo ainda assim níveis de expressão basais (3,7%).

Também muito relatada na literatura está a capacidade que *K. lactis* possui em sobreviver durante condições nas quais a glicólise e/ou a respiração celular são suprimidas. A grande maioria das cepas de *K. lactis* conhecidas, contendo um fenótipo chamado RAG⁺, continuam conseguindo fermentar glicose mesmo em meios contendo antimicina. Este último é um antibiótico produzido pelo fungo *Streptomyces griseus* e atua inibindo a enzima redutase do UQ-citocromo C, conseqüentemente impedindo a ocorrência de fluxo de elétrons entre os citocromos b e c e inibindo a respiração celular (Rodicio and Heinisch 2013).

Outro importante aspecto observado em *K. lactis* é o impacto do fluxo metabólico da Via das Pentoses Fosfato (VPF) no metabolismo central desta levedura. Glicose-6-fosfato desidrogenase (codificada pelo gene *zwf*) é a primeira enzima da parte oxidativa da VPF, responsável por realizar o primeiro desvio da glicólise para a VPF (Figura 3). Cepas de *K. lactis zwf*Δ conseguem crescer em meio contendo 1% de glicose, porém apresentaram uma fase lag mais prolongada e um rendimento de biomassa 20% menor do que o obtido em uma cepa selvagem. Ainda, cepas selvagens conseguiram consumir toda a glicose em 24 h, enquanto *K. lactis zwf*Δ precisou de 40 h para o mesmo resultado. Em relação à produção de etanol, cepas selvagens produziram 2 g/L ao final de 24 h, enquanto a cepa *zwf*Δ produziu 0.025 g/L ao final de 33 h. Estes resultados sugerem que em *K. lactis* a presença do gene *zwf* é necessária para crescimento e sua falta afeta o crescimento normal da célula. Finalmente, em cepas *zwf*Δ o crescimento é totalmente inibido após a adição de antimicina, o que não ocorre em cepas selvagens, confirmando que em *K. lactis* a VPF é principalmente utilizada para a metabolização da glicose

K. lactis foi escolhida como plataforma para a síntese de AH por possuir características genéticas e de fisiologia energética favoráveis para a síntese de AH, bem como status GRAS (do inglês Generally Recognized as Safe) apropriado para a utilização na criação de produtos utilizados em humanos. Em termos genéticos, o gene *hasA* foi inserido em *K. lactis* sob controle do promotor LAC4, um promotor constitutivo forte mais conhecido de *K. lactis* e ativado com uma força até 100x maior na presença de galactose/glicose no meio (Leonardo, Bhairi and Dickson 1987; Ruzzi *et al.* 1987). Em termos energéticos, *K. lactis* é considerada uma levedura com efeito Crabtree-negativo (Rodicio and Heinisch 2013) e portanto não produz etanol durante condições aeróbias de crescimento, diferente de *S. cerevisiae*, o que pode favorecer a síntese de AH pela levedura, que depende de um alto custo metabólico para a célula através da utilização de moléculas que são majoritariamente sintetizadas durante um metabolismo aeróbio (UTP, ATP, Glutamina, NAD⁺ e Acetil-CoA). Por fim, leveduras como *K. lactis* são mais

adaptadas às condições de grande pressão e grandes concentrações de substrato (>100 g/L) do que bactérias, o que facilita o escalonamento do bioprocessamento para escalas maiores.

Dessa forma *K. lactis* foi utilizada como plataforma para a síntese heteróloga de AH (V. Gomes *et al.* 2019) (Patente BR 10 2016020186 1). Neste estudo, uma cepa selvagem (GG799) de *Kluyveromyces lactis* foi modificada geneticamente através da inserção dos genes *hasB* originário de *Xenopus laevis* (*xlhasB*) e *hasA* de *P. multocida* (*pmhasA*), gerando assim uma cepa denominada BAP produtora de AH (V. Gomes *et al.* 2019). *P. multocida* foi selecionada como origem do gene *hasA* por ser a única bactéria contendo uma HAS com 1 domínio transmembrânico e, portanto, teoricamente mais fácil de ser ancorada na membrana da levedura. *Xenopus laevis* foi selecionado como fonte do gene *hasB* pois, dentre os vertebrados, é o único organismo contendo um operon dos genes *hasA* e *hasB* capaz de sintetizar cadeias de AH de 20 MDa *in vitro*, enquanto que de uma forma geral animais produzem em média cadeias de 3 MDa (Pummill, Achyuthan and Deangelis 1998; Volpi *et al.* 2009; Jeong, Shim and Kim 2014a). Na cepa BAP de *K. lactis*, os genes *hasA* e *hasB* foram inseridos através de recombinação homóloga dentro do promotor LAC4 e utilizando o mesmo para guiar a expressão do gene *hasA* (Figura 9). Como forma de seleção, as cepas foram selecionadas por conterem o gene *amdS* responsável por codificar uma enzima Acetamidase originária de *Aspergillus niger*. Apenas cepas contendo o gene são capazes de crescer em um meio de cultura contendo Acetamida como fonte exclusiva de nitrogênio.

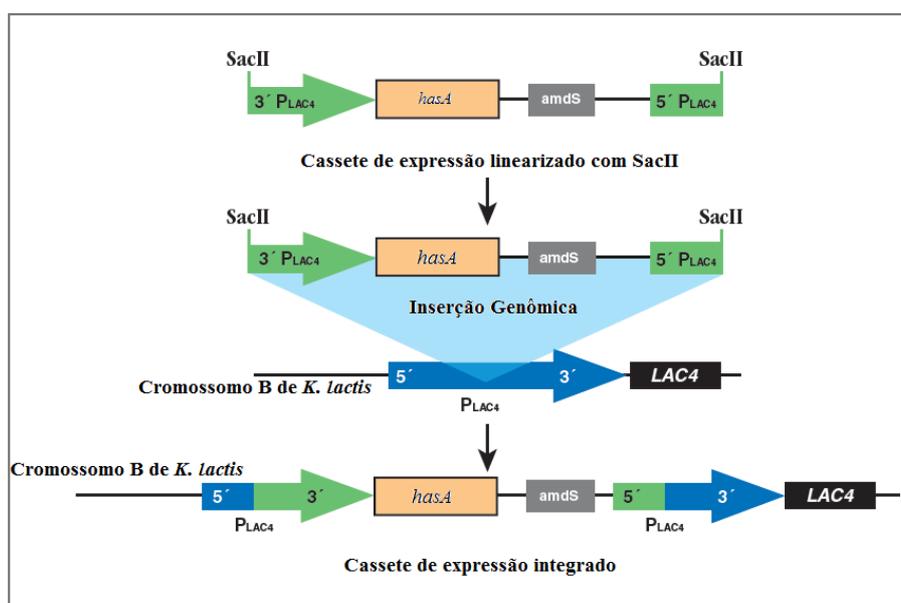


Figura 9. Integração genômica do cassete de expressão contendo o gene *hasA* no cromossomo de *K. lactis*. Integração do cassete de expressão do gene *hasB* não mostrado.

Durante o estudo, a cepa BAP produtora de AH foi capaz de sintetizar em frasco até 0,45 g/L de AH e em fermentador em batelada até 1,89 g/L de AH (V. Gomes *et al.* 2019). Outra importante característica observada durante crescimentos da cepa BAP foi um rendimento de geração de biomassa 20% menor comparado com o rendimento obtido da cepa selvagem, provavelmente devido ao desvio do fluxo de carbono da síntese de biomassa para a geração de AH. Os valores da produção de AH obtidos neste estudo, embora competitivos com mais da metade de outras cepas geneticamente modificadas (Tabela 3), ainda é inferior à produção de algumas cepas OGMs de bactérias como *B. subtilis* e *C. glutamicum*, sendo necessária o estudo e aplicação de ferramentas de engenharia genética e/ou metabólica de forma a otimizar a produção de AH nesta cepa.

1.7 Ferramentas utilizadas no melhoramento da produção de Ácido Hialurônico

Como previamente revisado (de Oliveira *et al.* 2016), após o estabelecimento de cepas geneticamente modificadas para a síntese de AH (Tabela 3), diversos estudos vêm realizando o desenvolvimento de estratégias que possam aumentar a produção de AH e/ou seu massa molecular. Dentre estas estratégias, pode-se citar a alteração do formato da célula via engenharia de morfologia (Zheng *et al.* 2020), adição de cópias extras dos genes *hasB* e *hasC* (Prasad, Jayaraman and Ramachandran 2010), mudança de promotores para versões com níveis de expressão mais fracos ou mais fortes (Jeong, Shim and Kim 2014b), mudança de temperatura durante o crescimento em bioreator (Li *et al.* 2021) e adição de hialuronidases ao meio de cultura (Afsharifar *et al.*). Embora algumas estratégias realizem a modificação de parâmetros relacionados com crescimento da célula e o meio de cultura, outras focam no entendimento de como o metabolismo geral da célula está distribuído em relação à via da síntese dos 2 precursores do AH. Células que sejam capazes de direcionar de forma mais eficiente o fluxo do substrato consumido para a síntese de UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc podem obter melhores resultados da síntese de AH considerando que não existe uma limitação de atividade da enzima HASA.

Neste sentido, a utilização de uma Análise de Fluxo Metabólico (AFM) surge como uma ferramenta para a quantificação das taxas de conversão de substratos em produtos dentro da célula. Durante uma AFM, o fluxo dos metabólitos intracelulares podem ser medidos por exemplo através da adição de um substrato contendo um carbono marcado (¹³C), que ao entrar na célula será consumido e espalhado pela rede metabólica, gerando os metabólitos que podem ser quantificados por equipamentos como espectrômetros de massa (Wolfgang 2001).

Ainda hoje, estudos na literatura envolvendo AFM em *K. lactis* são muito escassos e pouco aprofundados. Um dos poucos estudos disponíveis, por exemplo, realizou uma AFM em um conjunto de 40 leveduras *Saccharomyces*, dentre elas *K. lactis*, com o objetivo de investigar quanto da produção de biomassa nestas leveduras é dependente da glicólise, ciclo de Krebs e via das pentoses fosfato (Blank, Lehmbeck and Sauer 2005). Este mesmo estudo concluiu que *K. lactis* possui uma maior dependência pela via das pentoses fosfato para a geração de biomassa provavelmente devido à necessidade da reciclagem de NADPH. Considerando a entrada de substrato na célula como 100%, *K. lactis* apresentou um rendimento de biomassa de 0,45 g/g de glicose com o fluxo de aproximadamente 42% direcionado para a via das pentoses fosfato, (Blank, Lehmbeck and Sauer 2005), enquanto outras leveduras como *S. cerevisiae* apresentou um rendimento de biomassa de 0,15 g/g de glicose e com 12% do fluxo direcionado para a via das pentoses fosfato.

Portanto, após a realização de uma AFM em um microrganismo, é possível ser montada uma visualização geral de como os metabólitos estão distribuídos dentro de uma cepa de interesse. Estes dados em conjunto com dados dos níveis de expressão dos genes relacionados com cada fluxo fornecem um panorama geral da organização dos metabólitos na célula e seus respectivos genes relacionados. Neste sentido, a PCR quantitativa por transcrição reversa (RT-qPCR) é uma das ferramentas mais utilizadas para a determinação dos níveis de mRNA em diferentes sistemas biológicos (Bustin 2002). Embora seja uma técnica que apresente alta precisão, acurácia e rapidez de execução, diversos problemas podem ser encontrados durante o procedimento dependendo da qualidade das amostras de mRNA usadas e correta escolha dos genes endógenos de referência (Derveaux, Vandosomepele and Hellemans 2010). Outras formas de validação e análise de transcritos foram então também sendo utilizadas, como o RNA-Seq, que hoje é utilizada na análise de diversos organismos (Wang, Gerstein and Snyder 2009; Haas and Zody 2010).

Finalmente, a partir de todos os resultados obtidos em conjunto através de uma AFM, RT-qPCR e RNA-Seq, é possível não apenas estimar por fluxos quais vias metabólicas podem estar sendo limitantes ou não para a síntese de um metabólito de interesse, mas também entender como a expressão de cada gene está relacionada com a atividade de sua respectiva enzima relacionada. A partir destes dados, podem então ser utilizadas outras ferramentas de engenharia genética e/ou metabólica para uma apropriada readequação destes fluxos dentro da célula. Neste sentido, uma das estratégias que vem sendo utilizadas atualmente é a construção de circuitos genéticos que são capazes

de realizar a ativação/inativação da expressão de genes de interesse pela utilização de uma família de enzimas denominadas Serinas Integrases.

As Serinas Integrases são enzimas encontradas em bacteriófagos responsáveis por realizar nas células uma atividade de recombinação sítio específica (RSE). Estas enzimas são utilizadas pelos bacteriófagos como um mecanismo para integrar no genoma da bactéria hospedeira sequências genéticas do próprio bacteriófago durante uma invasão. Basicamente, as Integrases são capazes de reconhecer 2 pequenas sequências genéticas idênticas contidas tanto no código genético do próprio bacteriófago (chamada de sequência de *attP*) e no código genético da bactéria hospedeira (chamada de sequência *attB*), realizando no processo a integração do genoma do fago no genoma da bactéria para o início do ciclo de vida do vírus. As serinas integrases possuem este nome por possuírem um domínio catalítico conservado que usam um resíduo de serina nucleofílico para catalisar a clivagem das sequências de DNA em uma localização próxima do início do receptor de sinal de sequência (Stark 2014). Para melhor compreensão, a Figura 10 mostra uma representação da ação da enzima Integrase.

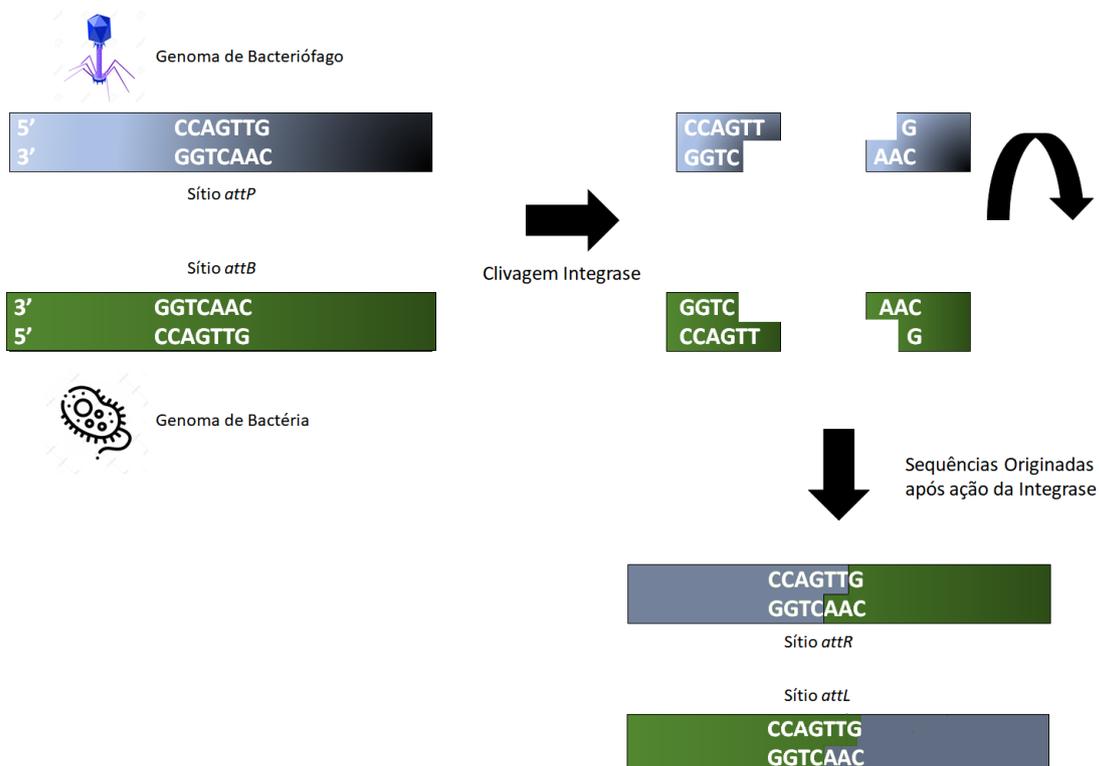


Figura 10. Mecanismo de ação da enzima Integrase para integração do genoma do bacteriófago no genoma de uma bactéria hospedeira.

Uma importante característica das Serinas Integrases é que a reação de recombinação catalisada é irreversível, ou seja, os sítios *attR* e *attL* não podem ser

novamente recombinados para a geração dos sítios *attP* e *attB* (Figura 10). Por este motivo, as sequências geradas após a ação das Integrases são estáveis.

Embora a atividade das Integrases tenha sido descrita originalmente relacionando 2 sequências de DNA distintas (DNA de um bacteriófago e DNA de bactéria hospedeiro), também é possível serem desenvolvidas estratégias com ambos os sítios *attP* e *attB* dentro de uma mesma sequência como um plasmídeo. Neste caso, é possível realizar a inversão de uma sequência de interesse do sentido 5' → 3' para o sentido 3' → 5', como esquematizado na Figura 11. Através da utilização de estratégias com os sítios *attP* e *attB* nas extremidades de um gene de interesse é possível inativar ou ativar a transcrição deste mudando sua orientação em relação ao respectivo promotor.

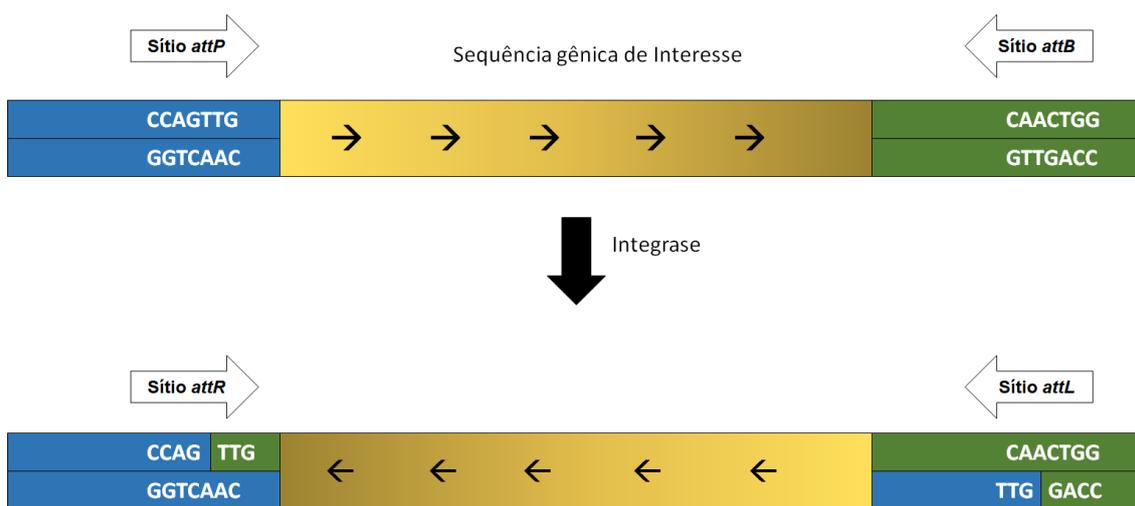


Figura 11. Ilustração da utilização de Integrases para a mudança do sentido de uma sequência genética.

Após a descoberta do mecanismo de ação das enzimas Integrases, diversas técnicas foram desenvolvidas no campo da Biologia Molecular de modo a usar estas enzimas como metodologia para inserção de sequências de DNA em determinados microrganismos (Fogg *et al.* 2014). As sequências *attP* e *attB* encontradas em bactérias até hoje são geralmente curtas (Li *et al.* 2018), contendo entre 40 e 50 pares de bases em comprimento. A reação realizada também é simples, necessitando apenas da proteína Integrase e uma molécula de DNA sem nenhum requisito topológico (Groth and Calos 2004). A utilização das Serinas Integrases já foi testada e mostrada como funcional em experimentos *in vitro* e em células eucarióticas como nas leveduras *Schizosaccharomyces pombe* (Thomason, Calendar and Ow 2001) e *O. polymorpha* (Manfrão-Netto *et al.* 2021), sendo também utilizadas no desenvolvimento de técnicas de engenharia genética (Brown *et al.* 2011), terapias gênicas (Calos 2006), biologia

sintética (Merrick, Zhao and Rosser 2018) e na criação de circuitos gênicos on/off em células vivas (Siuti, Yazbek and Lu 2013).

2. Objetivos

Objetivo Geral

Identificar as principais etapas limitantes da síntese de AH na cepa BAP de *K. lactis* para posterior realização de estratégias de otimização da síntese de Ácido Hialurônico.

Objetivos Específicos

Analisar o nível de transcrição, por RT-qPCR e RNA-Seq, de genes responsáveis por codificar enzimas possivelmente consideradas competidoras ou auxiliadoras da síntese de AH em *K. lactis*.

Realizar uma Análise de Fluxo Metabólico com carbono marcado (^{13}C -AFM) na cepa BAP de *K. lactis* de modo a identificar possíveis fluxos que sejam considerados limitantes para a síntese de AH.

A partir dos resultados alcançados nos objetivos supracitados, realizar a disrupção de genes responsáveis por codificarem enzimas presentes em fluxos metabólicos considerados competidores da síntese de AH.

Realizar a construção de um circuito genético através da utilização de Serinas Integrases com o objetivo de construir um sistema de ativação/inativação do gene associado com a síntese do AH (*hasAP*).

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados e desenvolvidos neste estudo estão listados na Tabela 8.

Tabela 8. Lista de microrganismos utilizados e criados neste estudo.

Microrganismo	Cepa	Informações / genótipo	Referência
Bactérias			
<i>E. coli</i>	XL10-Gold	Tetr Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMRmrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIq Δ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Stratagene (San Diego, California, EUA)
Levedura			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	GG799	Cepa selvagem sem modificações genéticas comercializada pela NEB (New England Biolabs).	NEB - New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, EUA).
<i>Kluyveromyces lactis</i>	BAP	Cepa GG799 contendo os genes <i>pmhasA</i> e <i>xlhasB</i>	(V. Gomes <i>et al.</i> 2019)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	BAP Δ <i>tps1</i>	Cepa BAP contendo a interrupção do gene <i>tps1</i> responsável por codificar a enzima Trealose-6-Fosfato Sintase	Este estudo
<i>Kluyveromyces lactis</i>	BAP-Int13	Cepa BAP contendo o gene da Integrase 13, além dos genes <i>hasA</i> e <i>hasB</i> invertidos em relação aos seus respectivos promotores.	Este estudo

3.2 Meios de Cultura

LB

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

pH 7,2

Em caso de meio LB ágar, é adicionado ágar 1,5%.

Em caso de meio LB Amp, é adicionado ágar 1,5% e 100 μ L/mL de Ampicilina.

SOB

Triptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,06% (p/v)
KCl	0,05% (p/v)

MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	20 mM

Os sais MgCl₂ e MgSO₄ foram diluídos no meio a partir de solução estoque 1M previamente filtrada com filtro de 0,22 µm.

SOC

Triptona	2% (p/v)
Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,05% (p/v)
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glicose	20 mM

Os sais KCl, MgCl₂ e MgSO₄, bem como Glicose foram diluídos no meio a partir de solução estoque 1M previamente filtrada com filtro de 0,22 µm.

Em caso de meio SOC Amp, é adicionado Ágar 1,5% e 100 µL/mL de Ampicilina.

YPD

Glicose	4% (p/v)
Extrato de levedura	0,75 % (p/v)
Peptona	1% (p/v)
K ₂ HPO ₄	0,25% (p/v)
MgSO ₄	0,05% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
Glutamina	0,04% (p/v)
Glutamato	0,06% (p/v)
Ácido Oxálico	0,02% (p/v)

YCB Ágar Acetamida

Meio YCB (BD Difco™)	1,17% (p/v)
Acetamida	5 mM
Tampão Fosfato de Sódio	30 mM
Ágar	2% (p/v)

Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

YNB

Sulfato de Amônia	10 g/L
Glicose	40 g/L
Biotina	52 µg/L
Pantotenato de Cálcio	400 µg/L
Ácido Fólico	2 µg/L
Inositol	27 mg/L
Ácido Nicotínico	5400 µg/L
Ácido Aminobenzóico	200 µg/L

Piridoxina HCl	400 µg/L
Riboflavina	200 µg/L
Tiamina HCl	400 µg/L
Ácido Bórico	500 µg/L
Sulfato Cúprico	40 µg/L
Iodeto de Potássio	100 µg/L
Cloreto de Cobalto	16 mg/L
Sulfato de Ferro	163 mg/L
Cloreto de Ferro	200 µg/L
Sulfato de Manganês	400 µg/L
Molibdato de Sódio	200 µg/L
Sulfato de Zinco	400 µg/L
Cloreto de Magnésio	0,2 g/L
Fosfato de Potássio Monobásico	4 g/L
Sulfato de Magnésio	0,5 g/L
Cloreto de Cálcio	0,1 g/L
Cloreto de Sódio	0,1 g/L

Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

3.3 Tampões e Soluções

Acetamida 100X

Acetamida 5,9% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

K₂HPO₄ 1 M

K₂HPO₄ 17,42% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

MgCl₂ 1 M

MgCl₂ 9,52% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

MgSO₄ 1 M

MgSO₄ 12% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

CaCl₂ 1 M

CaCl₂ 11 % (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

Glicose 1 M

Glicose 18% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

NaH₂PO₄ 0,1 M

NaH₂PO₄ . H₂O 2,78% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

Na₂HPO₄ 0,1 M

Na₂HPO₄ . H₂O 2,84% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

Ácido Acético 0,1 M

Ácido Acético Glacial 0,57% (v/v)

Acetato de Sódio 0,1 M

Acetato de Sódio 1,36% (p/v)

Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M pH 7,0

NaH₂PO₄ 0,1 M 42,30% (v/v)

Na₂HPO₄ 0,1 M 57,70% (v/v)

Tampão Acetato 0,2 M pH 6,0

Ácido Acético 0,1 M 5,2% (v/v)

Acetato de Sódio 0,1 M 94,8 (v/v)

No caso de Tampão Acetato + NaCl 0,15M é adicionada à solução 0,88 g de NaCl.

Acetato de Lítio 1M

Acetato de Lítio 6,6% (p/v)
Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

EDTA 0,5 M pH 8,0

EDTA . 2H₂O 18,61% (p/v)

Ajustar pH da solução para 8,0 com NaOH.

Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Tris-HCl 1M pH 8,0

Tris base 12.11 % (p/v)

Ajustar pH da solução para 8,0 com HCl.

Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Tampão TE 10X

EDTA 0,5 M pH 8,0 2% (v/v)

Tris-HCl 1 M pH 8,0 10% (v/v)

Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Solução de Acetato de Lítio

Acetato de Lítio 1M	10% (v/v)
Tampão TE 10X	10% (v/v)

Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Solução PEG mix

PEG 4000	40% (p/v)
Tampão TE 10X	10% (v/v)
Acetato de Lítio 1M	10% (v/v)

Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Solução estoque SDS 100X

SDS	10% (p/v)
-----	-----------

Solução estoque NaCl 1M (10X)

NaCl	5,8% (p/v)
------	------------

Brometo de Etídio

EtBr	10 mg/mL
------	----------

Tampão TBE 10X

Tris Base	10,78% (p/v)
EDTA	0,58% (p/v)
Ácido Bórico	0,55% (p/v)

pH 8,0

Tampão de Amostra

TE 20X	50% (v/v)
Glicerol	30% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)

Tampão de Transformação bacteriano (TFB)

MES 1M pH 6,3	1% (v/v)
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,89% (p/v)
CaC ₂ .2H ₂ O	0,14% (p/v)
KCl	0,74% (p/v)
Cloreto de Hexamina Cobalto	0,080% (p/v)

Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Marcador molecular para DNA

1 Kb DNA Ladder RTU (Ready-To-Use), 250-10.000 pb (Kasvi)

Tampão de Ligação (Thermo Fisher Scientific®) 10X

Tris-HCL	400 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM

ATP 5 mM
pH 7,8

Tampão de PCR (Phoneutria) 10X

KCl 500mM
Tris-HCl pH 8,4 100 mM
Triton X-100 1% (v/v)

Reagente CTAB para quantificação de Ácido Hialurônico

CTAB 2,5% (p/v)
NaOH 2% (p/v)

3.4 Antibióticos

Ampicilina 1000X

Ampicilina 100 mg/mL
Dissolvida em água deionizada ultra-pura e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm

G418

G418 200 mg/mL
Dissolvida em água deionizada ultra-pura e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm

3.5 Genes e plasmídeos

Os genes estudados neste trabalho estão listados na Tabela 9.

Tabela 9. Lista dos genes e plasmídeos utilizados neste estudo.

Gene	Originário de	Enzima codificada	Número de acesso (Genbank)
<i>pmhasA</i>	<i>P. multocida</i>	Ácido Hialurônico Sintase	MH728986
<i>xlhasB</i>	<i>Xenopus laevis</i>	UDP Glicose Desidrogenase	MH728990
<i>tps1</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Trealose-6-fosfato Sintase	XM_451921
<i>Integrase13</i>	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	Serina Integrase 13	WP_012095429.1
Plasmídeo	Descrição		Referência
pUG6	Plasmídeo utilizado para obtenção de gene de resistência kanMX Genótipo: loxP-pAgTEF1-kanMX-tAgTEF1-loxP		(Beinhauer <i>et al.</i> 1996)
pGEM-T-Easy	Plasmídeo utilizado para replicação do cassete de disrupção do gene <i>tps1</i> .		Promega Corporation

pGEM-tps1	Plasmídeo utilizado para replicação do cassete de interrupção do gene <i>tps1</i> . Contém o gene de resistência <i>kanMX</i> (antibiótico G418) flanqueado pelas 2 partes do gene <i>tps1</i> de <i>K. lactis</i> .	Este estudo
pKlac2	Vetor obtido comercialmente para expressão de genes em células de <i>Kluyveromyces lactis</i>	New England Biolabs Inc. (NEB)
pKLAC-AB-Int13	Vetor derivado de pKlac2 contendo um cassete de expressão do gene <i>Integrase13</i> e um sistema de expressão dos genes <i>xlhasB</i> e <i>hasAP</i> invertidos em relação aos respectivos promotores para transformação em <i>K. lactis</i> e utilização de estratégia envolvendo a Integrase 13.	Este estudo

3.6 Oligonucleotídeos Iniciadores

Uma lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo está apresentada na Tabela 10. Para a análise dos níveis de transcritos, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados com o auxílio do software online Primer 3 Web. Cada sequência foi desenhada pelo software de modo a conter as seguintes características: entre 18 e 28 nucleotídeos de comprimento; até 50% de sequência contendo CG; temperaturas de melting com menos de 1 °C de diferença; comprimento de amplicon gerado de no máximo 150 pb e valores de ΔG para dímeros e hairpins mais positivos do que -9 kcal/mol. Os Oligonucleotídeos foram então enviados para serem sintetizados em empresa especializada. O nome das sequências indica para qual gene e/ou transcrito os oligonucleotídeos foram utilizados.

Tabela 10. Lista dos Oligonucleotídeos Iniciadores utilizados neste estudo.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5' → 3')
Glicogênio sintase <i>forward</i>	AAA TCG CCG GTA TCC CAT CCC
Glicogênio sintase <i>reverse</i>	ATA GCA ACA CCA GCC AAC CAT TCG
1,3-β-d-glucana sintase <i>fks1 forward</i>	ACA ACT AAG ATT GGT GCT GGT ATG GG
1,3-β-d-glucana sintase <i>fks1 reverse</i>	TGG ATA TAG AAC ATC GGT GAT AGG CTT GTA TTT
1,3-β-d-glucana sintase <i>gsc2 forward</i>	TGT TTT GAT GCG AGG TGG ACG AA
1,3-β-d-glucana sintase <i>gsc2 reverse</i>	TCC CAT ACC GGA CCC AAT CTT AGT C
1,3-β-d-glucana sintase <i>fks3 forward</i>	ACA ACT AAG ATT GGT GCT GGT ATG GG
1,3-β-d-glucana sintase <i>fks3 reverse</i>	ACC GAT TGG AAT GGG TAT GTC AGT TAT
Trealose sintase <i>tps1 forward</i>	TGG GTT CAT GAT TAC TAT TTG ATG TTG
Trealose sintase <i>tps1 reverse</i>	GGG AAC GGC GTA TGT AAG
Trealose sintase <i>tps2 forward</i>	TGG GTT CAT GAT TAC TAT TTG ATG TTG
Trealose sintase <i>tps2 reverse</i>	TAA GAG ACC GTC CAG GAC
Trealose sintase <i>tps3 forward</i>	TGG GTT CAT GAT TAC TAT TTG ATG TTG

Trealose sintase tps3 <i>reverse</i>	TCT CTC TGA GGG AAA CAA CG
Quitina sintase 3 <i>forward</i>	TTT TCA AAC CCA TCG CTA CCC T
Quitina sintase 3 <i>reverse</i>	GTG CTT TGC CTG AAG AGT CC
Quitina sintase 2 <i>forward</i>	TCA GAA GAA GAT CAA TTC TCA TCG TTG G
Quitina sintase 2 <i>reverse</i>	GAG AGC GCA CCA GGA AG
Quitina sintase 1 <i>forward</i>	TCA GAA GAA GAT CAA TTC TCA TCG TTG G
Quitina sintase 1 <i>reverse</i>	CCT GGT AGG ACA GAT ATA AAC CCA AAG
Trancetolase <i>forward</i>	TGC TGG TTC TCA CTC CGT TCA C
Trancetolase <i>reverse</i>	CCA TCG GCT GGT CTC CAT ACT TG
Transaldolase <i>forward</i>	CGC TGC CAA GCA ACA AGC C
Transaldolase <i>reverse</i>	AAC GGC TTG AGC GAA AGA GAA CAA CA
Glutamato sintetase nad <i>forward</i>	CTG TCG CAC TGT CCC GAG AA
Glutamato sintetase nad <i>reverse</i>	AAA CTT GGT TTC GCA TGT GGA TTG G
Glutamato desidrogenase nad <i>forward</i>	TCC TGA CGA GGG TAC TGC AG
Glutamato desidrogenase nad <i>reverse</i>	ATT TTG GAA GCC TGC GTG ATC TGC
Glutamato desidrogenase nadp <i>forward</i>	TTG CTT TGC CAT GTG CCA CT
Glutamato desidrogenase nadp <i>reverse</i>	CTA GCG GAG TTT TGA GCC ATT TCC
Glutamina sintetase <i>forward</i>	AGG GTG ACT GGA ACG GTG CT
Glutamina sintetase <i>reverse</i>	GGT GGA CAT GGA TGC GGT TT
Fructose-6-p amidotransferase <i>forward</i>	TCC CCA TTG TTG ATC GGT GT
Fructose-6-p amidotransferase <i>reverse</i>	CGC AAG GTA CTT TCG TCA CC
Actina <i>forward</i>	TCT CCT TGC CTC ACG CTA TC
Actina <i>reverse</i>	CGG ACG ATT TCT CTT TCA GCG
Udp-glcnac pirofosforilase <i>forward</i>	GGG AGC ATT TTC TGA ACC AAT TGA GT
Udp-glcnac pirofosforilase <i>reverse</i>	CGG AAG ATC CCA ATC TCG TAC C
Hialuronan sintase hasa <i>forward</i>	TCC ATT CGA GGT GAT TGT CAC AG
Hialuronan sintase hasa <i>reverse</i>	GCA GCA CTA GCT TGG AAA CC
Udp-glicose desidrogenase hasb <i>forward</i>	GAT GTG AAC CAA GCC AGG ATC
Udp-glicose desidrogenase hasb <i>reverse</i>	CAG CTT CTT GAA TTG CAC CAT CAA T
Trealose sintase <i>forward</i>	ACT CGT CGA CCC TTG AAC GAA TGT CCT
Trealose sintase <i>reverse</i>	GGA CTA GTA ACT GGG ACG TCA TCG CTC A
Kanmx <i>forward</i>	CAT GGA TCC TCG ACA ACC CTT AAT ATA AC
Kanmx <i>reverse</i>	CCT GAA TTC CTA GTG GAT CTG ATA TCA CCT
Cas hasap <i>forward</i>	GGC TTG AGA TCC ATA GCT TCA AAA TG
Cas hasap <i>reverse</i>	TTC GAG CGT CCC AAA CCT TT
Hasap <i>forward</i>	TCC ATT CGA GGT GAT TGT CAC AG
Hasap <i>reverse</i>	GCA GCA CTA GCT TGG AAA CC
Cas hasb <i>forward</i>	CCA GTT CCC TGA AAT TAT TCC CCT
Cas hasb <i>reverse</i>	TTG GTT CAG CTG CTG CCT
Hasb <i>forward</i>	ATG TTT CAG ATC AAG AAG ATT TGT TGT ATT GG
Hasb <i>reverse</i>	TTA CAC ACG TTG CTT CTT GTG TG

3.7 Enzimas

Dentre as enzimas utilizadas neste estudo estão:

- T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific)
- Taq DNA Polimerase *pht* (Phoneutria)
- SuperScript *III Reverse Transcriptase* (Invitrogen)
- Liticase de *Arthrobacter luteus* (10 U/ μ L)

Além disto, as enzimas de restrição utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 11.

Tabela 11. Enzimas de restrição utilizadas neste estudo.

Enzima	Sítio	Tampão (Thermo Fisher Scientific®)	Temperatura
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	Fast Digest Green	37 °C
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	Fast Digest Green	37 °C

3.8 Crescimento das células em frasco

Alíquotas congeladas em solução de glicerol 30% em tubos criogênicos a -80 C° das cepas de *K. lactis* utilizadas neste estudo foram descongeladas e plaqueadas em meio YPD Agar, aonde foram em seguida incubadas a 30 C° por 72 horas. Depois de crescidas, colônias escolhidas aleatoriamente de *K. lactis* foram inoculadas em um tubo de fundo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio YPD e incubadas por 48 horas a 30 °C com agitação de 200 RPM. Após 1 dia, da suspensão celular foi retirada uma quantidade de células suficientes para o início de um inóculo em erlenmeyer aletado com OD₆₀₀ inicial de 0,1. Os erlenmeyers aletados, contendo 20% da capacidade total de meio YPD, foram então incubados a 30 °C com agitação de 200 RPM. O crescimento celular das cepas foi acompanhando através da leitura de OD₆₀₀ a cada 2 horas de crescimento. Para isto, os erlenmeyers foram colocados em ambiente estéril, do qual 1 mL de células foi retirado, colocado em uma cuveta de plástico e feita a leitura a 600 nm usando um leitor SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices®).

Quando especificado, no caso das cepas contendo o gene codificante da enzima Integrase, um pulso de Galactose foi adicionado ao frasco para uma concentração final de 2% quando as células alcançaram uma OD₆₀₀ de ~10.

3.9 Purificação do ácido hialurônico do meio de cultura

Para a purificação do Ácido Hialurônico, foi utilizado o protocolo de precipitação com etanol como previamente descrito (Yu and Stephanopoulos 2008). Primeiramente, o

meio de cultura contendo as células produtoras de AH foi primeiramente diluído com 1 volume de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1% e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos para o desprendimento das cápsulas de ácido hialurônico ao redor das paredes celulares. Após este tempo o meio foi centrifugado a 5000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sedimento celular foi descartado. O sobrenadante foi repassado a outro tubo de centrífuga, misturado com 2,5 volumes de etanol gelado e incubado por 1 hora em câmara fria a 4 °C, onde foi observada a formação de um complexo viscoso insolúvel nas cepas que foram capazes de sintetizar ácido hialurônico. Em seguida a solução foi centrifugada a 5000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi novamente lavado com etanol gelado, centrifugado e por fim lavado com 0,5 volume da quantidade original de meio de NaCl 0,1M e incubado à 37 °C overnight com agitação de 200 *RPM* para a dissolução do ácido hialurônico na solução. A solução foi então armazenada em freezer a -80 °C e, quando no caso, liofilizadas para posterior análise. Para a realização do processo de liofilização, a amostra foi retirada do Ultra Freezer e imediatamente colocadas dentro de um recipiente de vidro retangular de 500 mL de capacidade. O recipiente foi acoplado a um liofilizador LabConco (modelo 720402010) por pelo menos 24 horas, a -50 °C, com vácuo a 1720 mT. O vácuo foi aplicado à amostra vagarosamente e gradualmente por ~15 minutos até atingir 1720 mT a fim de evitar o surgimento de espuma na amostra.

3.10 Quantificação do Ácido Hialurônico

Neste estudo, o Ácido Hialurônico foi quantificado através da utilização de 2 métodos, o primeiro através da utilização do reagente Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) (Nicola 1955) e o segundo através da utilização do reagente colorimétrico Carbazol (Bitter and Muir 1962). O reagente CTAB quantifica soluções de AH através da formação de complexos insolúveis entre cadeias de AH e cadeias de CTAB, lidas em relação à sua absorvância. O reagente colorimétrico Carbazol é capaz de se ligar a monômeros de ácido glicurônico gerando uma cor roxa no processo quando colocadas em contato com uma amostra hidrolisada do AH.

3.10.1 Método CTAB de quantificação do Ácido Hialurônico

A quantidade de 50 µL das soluções purificadas de AH obtidas de acordo com a seção 3.9 foi misturada com 50 µL de tampão Acetato de sódio 0,2 M pH 6,0 e colocada em poços de placa de Elisa 96 poços de fundo chato transparente. A placa contendo as amostras foram incubadas à 37 °C por 10 minutos para a sincronização de todas as amostras e em seguida foi adicionado 100 uL de reagente CTAB. Imediatamente em

seguida, a absorbância da placa foi lida em equipamento sob um comprimento de onda de 400 nm por 10 minutos, no qual os dados de absorbância lidos aos 10 minutos foram registrados. Uma curva padrão foi feita pela utilização de soluções contendo 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/µL de ácido hialurônico sódico 99% purificado de *Streptococcus equi* (SigmaAldrich) diluídos em água ultra-pura deionizada. As absorbâncias da curva padrão foram lidas como descritas neste parágrafo, com a diferença de que foram misturadas com tampão acetato 0,2 M pH 6,0 contendo NaCl (íon Na⁺ estabilizador das hélices de Ácido Hialurônico em meio com alta pureza) à uma concentração final de 0,15M.

3.10.2 Método Carbazol de quantificação do Ácido Hialurônico

O método colorimétrico de carbazol foi utilizado para a quantificação do Ácido Hialurônico de acordo como previamente descrito (Bitter and Muir 1962) com algumas modificações. Primeiramente, 200 µL de água (usada como branco), padrões de AH ou amostras a serem analisadas foram adicionadas em tubos de 2 mL de capacidade previamente gelados em banho de gelo contendo 500 µL de uma solução de tetraborato de sódio 25 mM diluído em ácido sulfúrico concentrado. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 100 °C sob agitação em vórtex de 10 minutos para hidrólise das cadeias de AH e liberação do ácido glucurônico. Os tubos foram então deixados em temperatura ambiente por 3 minutos e em seguida foi adicionado 20 µL de uma solução carbazol 0.125% diluído em metanol puro. Os tubos foram então colocados sob uma segunda incubação de 100 °C sob agitação em vórtex de 10 minutos e em seguida submetidos à análise. 200 µL do volume de cada tubo foi colocado em uma microplaca elisa de 96 poços e lidas a 530 nm em um leitor de placas Biotek EON. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

3.11 Extração de RNA das células e transcrição reversa

Células de *K. lactis* da cepa BAP foram crescidas em meio YPD até uma OD₆₀₀ de 2 de acordo com a seção 3.8. O RNA total da cepa foi extraído utilizando reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies Inc., USA) seguindo as recomendações do manual do fabricante e utilizando 15 mL de suspensão celular contendo as leveduras. Após a extração, o RNA foi analisado e quantificado por visualização em gel usando o marcador 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi) como padrão. A transcrição reversa do RNA foi realizada com a utilização de SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante, utilizando 1 µg de RNA total e também utilizando primer Poli(T) de modo a fazer a transcrição de todos os mRNA contendo calda Poli-A.

O cDNA resultante gerado da reação foi diluído e utilizado diretamente para a realização da PCR em tempo real (RT-qPCR). Apenas amostras contendo uma relação OD₂₆₀/280 > 1.8 foram utilizadas para posteriores análises de transcritos. Para análise da integridade do RNA, foi utilizada metodologia de gel de agarose previamente descrita (Aranda, Lajoie and Jorcyk 2012).

3.12 PCR em tempo real para quantificação de transcritos

O cDNA extraído de acordo com a seção 3.11 foi utilizado como molde em reação de PCR em tempo real, utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial por 20s a 95 °C; 40 ciclos de 95 °C por 3s e 40 ciclos de 60 °C por 30s. Cada reação de 20 uL foi construída utilizando a Mistura Principal de PCR SYBR® Green (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. Oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 10) foram sintetizados para cada transcrito analisado e foram normalizados para o nível de expressão da actina de *K. lactis* previamente descrita como um gene Housekeeping (Salani and Bianchi 2006). Cada RT-qPCR foi feita realizando-se a diluição de cDNA em proporções 1:5, 1:10, 1:100 e 1:1000. A eficiência de amplificação foi medida de acordo com a equação da reta obtida pelas diluições e expressa em porcentagem. Todos os Oligonucleotídeos iniciadores usados apresentaram valores E de amplificação entre 87% e 115%. Para a verificação da correta especificidade dos Oligonucleotídeos Iniciadores, foram observadas todas as curvas de melting de cada alvo e observada a presença de um único pico correspondendo a um único amplicon gerado. A partir do uso do método Δ Ct, os níveis de expressão de todos os genes foram medidos. Os valores de Ct simbolizam o ciclo de PCR onde a amplificação de cDNA dos genes de interesse começou uma amplificação. O Δ Ct é essencialmente o Ct normalizado por um gene de actina, que é expresso na levedura em níveis semelhantes em estirpes modificadas e selvagens. Todas as análises dos transcritos foram realizadas em triplicata.

Ao total, foram escolhidos 20 genes e 1 controle endógeno (Actina) para serem analisados em relação ao nível de seus respectivos transcritos na célula. Todas as enzimas e reações relacionadas com estes 20 genes estudados estão listadas na Tabela 12:

Tabela 12. Lista das enzimas relacionadas com os 20 transcritos da cepa BAP de *K. lactis* analisados neste estudo.

	Enzima	Substrato	Produto
1	Glicogênio Sintase	UDP-Glicose + Amilose	UDP + Amilose
2	Subunidade FKS1 da enzima 1,3-β-D-Glucana Sintase	UDP-Glicose + 1,3-β-D-Glucana	UDP + 1,3-β-D-Glucana
3	Subunidade GSC2 da enzima 1,3-β-D-Glucana Sintase		
4	Subunidade FKS3 da enzima 1,3-β-D-Glucana Sintase		
5	Subunidade TPS1 do complexo Trealose Sintase	UDP-Glicose + Glicose-6-P	Trealose + UDP + Pi
6	Subunidade TPS2 do complexo Trealose Sintase		
7	Subunidade TPS3 do complexo Trealose Sintase		
8	Quitina Sintase III	UDP-N-Acetil Glicosamina + Quitina	UDP + Quitina
9	Quitina Sintase II		
10	Quitina Sintase I		
11	Transcetolase	Xilulose-5-P + Ribose-5-P	Gliceraldeído-3-P + Sedoheptulose-7-P
12	Transaldolase	Sedoheptulose-7-P + Gliceraldeído-3-P	Eritrose-4-P + Frutose-6-P
13	Glutamato Sintetase NAD dependente	Glutamina + 2-Oxoglutarato + NADH + H	2 Glutamato + NAD
14	Glutamato Desidrogenase NAD dependente	Glutamato + NAD	α-cetoglutarato + NADH
15	Glutamato Desidrogenase NADP dependente	Glutamato + NADP	α-cetoglutarato + NADPH
16	Glutamina Sintetase	Glutamato + Amonia + ATP	Glutamina + ADP
17	Glutamina Frutose-6-P amidotransferase	Frutose-6-P + Glutamina	Glucosamina-6-P + Glutamato
18	UDP-N-Acetil Glicosamina Pirofosforilase	N-Acetil Glicosamina-6-P + UTP	UDP-N-Acetil Glisosamina + Pi

19	UDP-Glucose Desidrogenase	UDP-Glicose + 2 NAD	2 NADH + UDP-GlcUA
20	Hialuronan Sintase	UDP-GlcUA + UDP-GlcNAc	Acido Hialurônico

Todos os 20 genes foram escolhidos com base na relação destes com possíveis desvios de fluxo em relação à síntese de AH ou por estarem relacionados com o fornecimento de cofatores utilizados para a produção do AH. Como visto na Tabela 12, embora 20 genes tenham sido analisados, alguns deles codificam diferentes isoformas de uma mesma enzima como no caso da Quitina Sintase, que possui 3 isoformas em leveduras. Há ainda genes que codificam apenas subunidades de um complexo catalítico maior, como no caso do complexo de síntese da trealose, que é formado por 3 subunidades codificadas por 3 genes distintos.

Os níveis dos transcritos destes 20 alvos foram então analisados tanto por RT-qPCR como por RNA-Seq usando o nível do transcrito do gene da Actina como um normalizador.

3.13 RNA-Seq

Em colaboração com laboratório externo (ISI Polímeros – Instituto SENAI de Inovação), a cepa BAP de *K. lactis* foi crescidas em meio YPD de acordo com a seção 3.8 por 48 horas. Em seguida, das células foi extraído o RNA total através da utilização do kit de extração de RNA de leveduras Qiagen RNeasy Mini Kit (Cat No. 74104) seguindo as recomendações do fabricante. Uma biblioteca de sequências foi gerada usando o kit TruSeq Stranded total RNA seguindo as recomendações do fabricante e para análise das sequências foi utilizada a tecnologia Illumina SBS seguindo as recomendações do fabricante. Todo o processo foi realizado em triplicata biológica.

3.14 Preparação de células competentes (*E. coli* cepa XL10-Gold)

Células competentes de *E. coli* foram preparadas de acordo com método previamente descrito (Green and Sambrook 2018). Células de *E. coli*. Cepa XL10-Gold foram semeadas em placa contendo meio LB ágar sem antibiótico a partir de estoque armazenado em freezer -80 °C por 16 horas a 37 °C. Em ambiente estéril cinco colônias foram inoculadas em 1 mL de meio SOB contendo MgSO₄ 20 mM. As colônias foram homogeneizadas em vortex em velocidade moderada e diluídas em mais 100 mL do mesmo meio em frasco de 1 litro. As células foram crescidas por 3 horas a 37 °C até OD₆₀₀ de 0,3. As células foram repassadas para tubos de polipropileno de 50 mL gelados estéreis de fundo côncavo e estocadas no gelo por 10 minutos.

As células foram centrifugadas a 2700 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspendidas em aproximadamente 20 mL (para cada tubo) de TFB gelado. As células ficaram em seguida estocadas no gelo por 10 minutos, centrifugadas a 2700 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspendidas em aproximadamente 4 mL (para cada tubo) de TFB.

Todas as suspensões celulares foram unidas em um único tubo de polipropileno de 50 mL gelado estéril e adicionado 140 µL de DMSO puro por 4 mL de suspensão de células. A suspensão foi misturada por inversão e estocada em banho de gelo. O conteúdo foi rapidamente repassado a tubos em alíquotas de 100 µL e armazenado a -80 °C.

3.15 Transformação em células de *E. coli*

Alíquotas de células competentes de *E. coli* cepa XL10-Gold congeladas a -80 °C em tubos criogênicos de 1,5 mL foram descongeladas por 10 minutos em banho de gelo. A seguir, foram misturados às células 10µL de DNA resultante da reação da ligação ou 1 µL de plasmídeo intacto de interesse para amplificação (~ 100 ng de DNA por transformação). O tubo contendo células e DNA foi incubado por 30 minutos em gelo, após isto as células foram 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 foram adicionadas ao tubo 900 µL de meio SOC e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação, 200 µL de células foram plaqueadas em meio SOC ágar seletivo contendo ampicilina e as placas foram colocadas invertidas em incubadora à 37 °C por 24 horas. O restante de células foi repassado a um tubo criogênico, misturado com glicerol puro estéril até concentração final de 15% e armazenado à -80 °C. Todos os processos descritos nesta seção foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

3.16 Reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as reações de amplificação por PCR relatados neste estudo foram feitas em microtubos de 0,2 mL contendo (a) 2 µL de tampão de PCR concentrado 10 vezes; (b) 0,6 µL de MgCl₂ 25 mM; (c) 1 µL de Oligonucleotídeo iniciador Forward 10 µM; (d) 1 µL de Oligonucleotídeo iniciador Reverse 10 µM; (e) 0,5 µL de dNTP 10 mM; (f) 1 unidade ou 0,2 µL da enzima "*Taq DNA Polimerase*"; (g) 10 ng de DNA molde a ser amplificado e (h) água ultra pura deionizada até completar volume final de 20 µL. Os microtubos contendo as reações foram inseridos em termociclador com os seguintes ciclos de temperatura: (a) 1 ciclo de 95 °C por 7 minutos; (b) 30 ciclos de 95 °C por 30

segundos, seguido de temperatura de anelamento dos Oligonucleotídeos iniciadores por 30 segundos, seguido por 72 °C por 2,5 minutos; (c) 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos e (d) resfriamento indefinidamente à 12 °C.

3.17 Clivagens com endonucleases dos plasmídeos

Todas as reações com endonucleases de restrição foram realizadas em microtubos de 0,2 mL contendo (a) 1 µg de DNA, (b) 2 µL de solução tamponante “Green Fast Digest Buffer” 10x concentrado (Thermo Fisher Scientific®), (c) 1 µL de enzima de restrição “Fast Digest” (Thermo Fisher Scientific®) e (d) água ultra-purificada deionizada até completar volume final de 20 µL. Nos casos em que a análise de restrição do DNA foi feita com 2 enzimas de restrição, 1 µL da segunda enzima também foi adicionada ao sistema, totalizando a ação de até 3 enzimas no sistema. Após preparada a reação de 20 µL, o microtubo foi incubado por 2 horas em incubadora à 37°C e após este tempo o microtubo foi aquecido a 80°C por 15 minutos para a inativação da enzima.

3.18 Purificação do DNA plasmidial e genômico

As reações de PCR ou as reações com endonucleases de restrição, contendo 1 µg de DNA e volume de 20 µL cada, foram purificadas de tampões, sais e restos de enzimas inativadas através da utilização do produto “GeneJET PCR Purification Kit” (Thermo Fisher Scientific®) seguindo as recomendações do manual do fabricante. Ao final do processo, foram obtidos aproximadamente 800 ng de cada DNA digerido e puro em um volume final de 30 µL.

3.19 Reações de ligação

Os fragmentos de interrupção utilizados neste estudo foram unidos entre si e dentro dos plasmídeos através de reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific®). Em um microtubo de 0,2 mL foram inseridos: (a) 100 ng de DNA vetor digerido linearizado; (b) 300 ng de DNA inserto digerido; (c) 2 µL de “T4 DNA Ligase Buffer” (Thermo Fisher Scientific®) concentrado dez vezes; (d) 2 µL de solução PEG 4000 à 50% (w/v); (e) 2 µL de enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific®) e (f) água ultra pura deionizada até completar volume final de 20 µL. O microtubo foi incubado overnight à 22 °C e após este tempo foi diretamente utilizado em transformação de células de *E. coli*.

3.20 Construção dos vetores de expressão

3.20.1 Cassete de interrupção do gene *tps1*

Para a construção do cassete de interrupção do gene *tps1* utilizado neste estudo, primeiramente foi realizada uma PCR do gene *tps1* usando os oligonucleotídeos iniciadores Trealose Sintase *Forward* e Trealose Sintase *Reverse* (Tabela 10). O gene amplificado resultante foi dividido em 2 partes chamados de *tps1*(5') e *tps1*(3') através do tratamento da sequência com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. Em seguida, o gene de resistência *kanMX* ao antibiótico G418 foi amplificado do plasmídeo PUG6 (Anexo 1) com a utilização dos Oligonucleotídeos Iniciadores *kanMX Forward* e *kanMX Reverse* (Tabela 10). Os fragmentos *tps1*(5') e *tps1*(3') foram então ligados nas extremidades do gene *kanMX*, clonados no plasmídeo pGEM-T-Easy seguindo as recomendações do fabricante e usado para replicação em *E. coli*. O mapa do plasmídeo resultante, denominado pGEM-*tps1* está apresentado no Anexo 2. Para melhor compreensão, uma ilustração de toda a metodologia está representada na Figura 12.

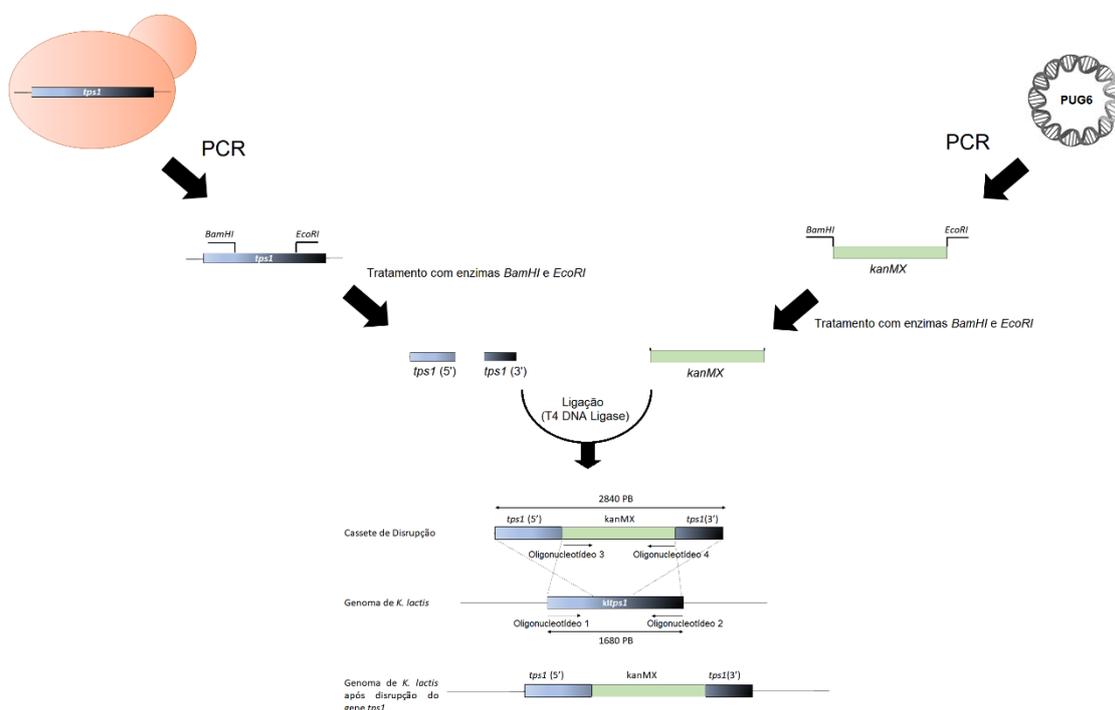


Figura 12. Estratégia utilizada neste estudo para a construção do cassete de interrupção do gene *tps1*.

3.20.2 Plasmídeo Integrase

O plasmídeo pKLAC-AB-Int13 foi utilizado neste estudo para a construção de um sistema de ativação/inativação dos genes *hasA* e *hasB* através da enzima Integrase 13. O plasmídeo pKLAc2 (New England Biolabs Inc. - NEB) (Anexo 3) foi utilizado como

molde para a construção de um plasmídeo contendo: (1) o gene codificante da Serina Integrase 13 sob controle do promotor LAC4; (2) o gene *hasA* originário de *P. multocida* ladeado pelas sequências dos sítios *attP* e *attB* e em orientação invertida em relação ao promotor TEF e (3) o gene *hasB* originário de *Xenopus laevis* ladeado pelas sequências dos sítios *attP* e *attB* e em orientação invertida em relação ao promotor GPD. Um mapa da construção está apresentado no Anexo 4. Todas as sequências foram otimizadas para expressão em *K. lactis* através da utilização do software online “IDT Codon Optimization Tool”. Os sítios alvos da Integrase *attP* e *attB* foram colocados flanqueando os genes *hasA* e *hasB* em orientação reverso complemento. A escolha do gene da Integrase 13 e as sequências dos sítios *attP* e *attB* foi baseado nas informações de estudo prévio (Yang *et al.* 2014) que mostraram que o sítio da Integrase 13 é mais específico apenas para atividade da Integrase 13 e não é reconhecido por outras Integrases ou enzimas. As sequências contendo os sítios *attP* e *attB* da Integrase 13 estão mostradas no Anexo 5. O plasmídeo foi sintetizado por laboratório externo Epoch Life Science Inc (Missouri, TX, USA).

3.21 Transformação levedura *K. lactis*

Os plasmídeos utilizados neste estudo foram inseridos nas células de *K. lactis* através de protocolo de choque térmico (Gietz, Woods and Peg 2002). As células a serem transformadas de *K. lactis* foram crescidas em 5 mL de meio YPD em tubo 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 da cultura celular foi lida e esta utilizada para a realização de um inóculo em 50 mL de meio YPD de modo que o crescimento celular inicie com OD₆₀₀ de 0,1. Este inóculo foi realizado em erlenmeyer aletado de capacidade de 250 mL e colocado em shaker a 30 °C com agitação de 200 RPM. Após aproximadamente 7 horas, a OD₆₀₀ foi novamente monitorada e espera-se o alcance de um valor entre 0,9 – 1. As células foram então repassadas a um tubo de fundo cônico de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 3000 xg em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 5 mL de tampão TE e centrifugadas novamente por 3 minutos a 3000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado, as células foram lavadas com 5 mL de solução de Acetato de Lítio 0,1 M e centrifugadas por 5 minutos a 3000xg em temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspensas em 0,5 mL de solução de Acetato de Lítio 0,1 M. Após a homogeneização, com a pipeta foram repassados para um tubo de 1,5 mL: (a) 1 µg de DNA 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 de células. Em seguida foi adicionado ao tubo

700 μ L de solução PEG, a mistura foi homogeneizada e colocada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo foi adicionado ao tubo 48 μ L de DMSO puro estéril (Dimetilsulfóxido), misturado, e imediatamente foi aplicado um choque térmico nas células por 15 minutos à 42 °C em banho de água. Após o choque, as células foram centrifugadas por 2 minutos à 3300 xg em temperatura ambiente e lavadas 2 vezes seguidas com 1 mL de água deionizada. Uma terceira ressuspensão foi realizada com 1 mL de água deionizada pura e desta suspensão celular foram plaqueados volumes de 20, 50 e 100 μ L em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas à 30 °C por 3-4 dias. O restante de células foi repassado a um tubo criogênico, misturado com glicerol até concentração final de 20% e armazenado à -80 °C. Todos os processos descritos neste tópico foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

3.22 Seleção e armazenamento das leveduras contendo as modificações genéticas concluídas (PCR de colônia)

Após o crescimento das células em placa como descrito na seção 3.21, foram selecionadas aleatoriamente de cada placa 20 colônias. Cada colônia foi repassada para um microtubo de 0,4 mL contendo 20 μ L de água deionizada. Os microtubos foram vigorosamente agitados de modo a suspender as células e em seguida foram colocados em banho de água à temperatura fervente por 10 minutos. Após este tempo, os microtubos foram passados a um banho de gelo e desta suspensão 1 μ L foi retirado e utilizado como DNA molde para a realização de reação de PCR como descrito na seção 3.16 de modo a confirmar a integração da modificação genética no genoma da levedura pela utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos. Após os resultados da PCR, as colônias que apresentam os genes integrados no genoma foram repassadas à 5 mL de meio YPD em um tubo de fundo cônico de 50 mL e colocadas a 30 °C com agitação de 200 RPM por 48 horas. Após os 2 dias, 1 mL desta suspensão celular é repassada a um tubo criogênico, misturado com glicerol puro estéril até concentração final de 20% e armazenado à -80 °C. Todos os processos descritos neste parágrafo foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

3.23 Análise por gel dos genes, RNAs, plasmídeos e cassetes

Todos os genes, RNAs, cassetes e plasmídeos vindos ou não de reações de transcrição reversa, análise de restrição, desfosforilação, ligação e PCR descritos neste estudo foram analisados em gel de agarose 1%. 1 g de agarose foi dissolvida em 100 mL de tampão TBE 1X. Em seguida, a solução foi agitada e aquecida por 2 minutos em microondas com potência a 70% e na solução foi adicionado Brometo de Etídio de modo a

obter uma concentração final de 0,5 µg/mL. Após ocorrida a solidificação, no gel foram aplicadas as amostras de DNA diluídas em tampão de carregamento juntamente com um marcador “1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi)”. O gel foi aplicado sob uma corrente de 80 Volts durante 60 minutos em tampão TBE 1X e em seguida analisado sob radiação ultra-violeta.

3.24 Crescimento em Biorreator em Batelada para Análise de Fluxo Metabólico com glicose marcada ¹³C₆

Fermentações em batelada da cepa BAP foram realizadas em bioreator New Brunswick BioFlo® 115 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com uma capacidade de 1.3 L. Pré-inóculos da cepa foram feitos em frasco (Seção 3.8) com 20 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB) contendo sulfato de Amônio e sem aminoácidos (Sigma-Aldrich, Louis, MO) em um frasco com capacidade de 0.5 L. O meio de cultura foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante usando glicose (40 g/L) como fonte de carbono. A pré-cultura foi utilizada para inocular 0.5 L do mesmo meio YNB no fermentador de modo a começar com uma OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.1. O crescimento foi conduzido a 30 °C. Durante toda o crescimento, o pH do meio de cultura foi mantido em 6 através da injeção automática de NaOH 2 M a partir de uma garrafa de alimentação e o Oxigênio Dissolvido foi mantido em 30% através da utilização de um sistema que mantinha a agitação dentro do fermentador variável. Oxigênio foi disponibilizado ao fermentador através de um air flow de 2 vvm. O crescimento em biorreator foi realizado em duplicata biológica. O crescimento celular das cepas foi acompanhando retirando-se dos fermentadores amostras de aproximadamente 5 mL para leitura de OD₆₀₀ e armazenamento do sobrenadante obtido a cada 2 horas. As leituras de OD₆₀₀ foram retirados utilizando 1 mL de células, que foi colocado em uma cuveta de plástico e feita a leitura a 600 nm usando um leitor SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices®).

Durante a cultivo, o consumo de glicose foi analisado por HPLC imediatamente após a retirada de cada ponto de leitura do fermentador. A partir dos resultados obtidos pela quantificação da glicose e considerando uma fase log de crescimento celular, foi adicionado através de uma garrafa de alimentação um pulso contendo glicose ¹³C₆ marcada de modo a corresponder a 10% de toda a glicose presente naquele momento no biorreator. A partir deste ponto, as amostras então foram retiradas do bioretor para possível visualização dos metabólitos marcados.

3.25 Análise dos Metabólitos Intracelulares

3.25.1 Protocolo de Quenching

A metodologia de Quenching foi feita de acordo como previamente descrito para leveduras (Canelas *et al.* 2008). Aproximadamente 2 horas após a aplicação do pulso de glicose $^{13}\text{C}_6$ marcada, 5 mL de cultura celular foram retirados do fermentador e imediatamente misturados com 45 mL de metanol puro previamente refrigerado a $-40\text{ }^\circ\text{C}$. Imediatamente a amostra foi centrifugada por 5 minutos a $4000 \times g$ usando centrífuga Eppendorf MiniSpin com o rotor previamente resfriado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Durante o procedimento, foi buscado o menor tempo possível de exposição das células ao metanol. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo metanol foi descartado e o precipitado imediatamente guardado em Ultra freezer a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da extração.

3.25.2 Extração dos metabólitos celulares

A extração de metabólitos foi realizada através da utilização do protocolo de etanol fervente como previamente descrito (Gonzalez, François and Renaud 1997). Resumidamente, o precipitado celular (5mL) congelado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ foi retirado do Ultra-Freezer e imediatamente ressuscitado em 20 mL de solução de etanólica 75% v/v ajustada a um pH 7,5 com HEPES 10 mM. As células foram incubadas por 3 minutos em banho de água a $85\text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, o lisado celular foi incubado em gelo para resfriamento e posteriormente centrifugado por 3 minutos a $4000 \times g$ a $-9\text{ }^\circ\text{C}$. O precipitado celular foi descartado e o sobrenadante foi colocado a $45\text{ }^\circ\text{C}$ em um concentrador para evaporação do etanol. O resíduo liofilizado foi guardado para posterior análise em Cromatografia Gasosa com Espectômetro de Massa (GC-MS).

3.26 Análise dos Metabólitos Extracelulares

3.26.1 Detecção e quantificação de substratos e produtos celulares

Durante as fermentações, a cada 2 horas foram retiradas amostras de 1 mL do fermentador. Cada amostra foi colocada em um tubo cônico com 1,5 mL de capacidade e centrifugada a $12000 \times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente. O precipitado celular foi então descartado e o sobrenadante foi repassado para outro tubo e guardado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até posterior análise.

A utilização de glicose e a produção de acetato, etanol, lactato, glicerol e trealose foram quantificadas usando Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, 10 Japan) equipado com detectores de Índice de Refração e UV (210-nm). A cromatografia foi realizada usando uma coluna para ácidos orgânicos Shim-pack SCR-

101H (Shimadzu) (300 mm x 7,9 mm id) equilibrada a 60 °C. Foi utilizada como fase móvel H₂SO₄ 5 mM a um fluxo de 0,6 mL/min. Cada corrida durou 29 minutos.

Para a aplicação no HPLC, os sobrenadantes da cultivo em biorreator foram diluídos 5 vezes e para cada corrida foram utilizados 10 µL de amostra. Antes das análises, foi construída uma curva padrão contendo 6 diferentes concentrações de glicose, acetato, etanol, lactato e glicerol, de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13. Concentração das amostras usada para Curva Padrão em HPLC.

Composto	Nível de calibração					
	1	2	3	4	5	6
Glicose	10 g/L	5 g/L	2,5 g/L	1,25 g/L	0,625 g/L	0
Glicerol	10 g/L	5 g/L	2,5 g/L	1,25 g/L	0,625 g/L	0
Etanol	10 g/L	5 g/L	2,5 g/L	1,25 g/L	0,625 g/L	0
Acetato	2,5 g/L	1,25 g/L	0,625 g/L	0,03125 g/L	0,15625 g/L	0
Lactato	2,5 g/L	1,25 g/L	0,625 g/L	0,03125 g/L	0,15625 g/L	0
Trealose	10 g/L	5 g/L	2,5 g/L	1,25 g/L	0,625 g/L	0

3.27 Análise de Crescimento Celular por peso seco

Quando especificado, também foi analisado o peso seco em cada tempo da crescimento no biorreator. Para isto, 2 mL de células foram retirados do fermentador a cada 2 horas e aplicados diretamente sobre uma membrana. Previamente à aplicação das células, a membrana foi colocada por ≥12 horas em um forno a 60 °C e pesada. Com a ajuda de um kitasato, sob a membrana foi aplicado um ambiente de vácuo de modo a aspirar todo o meio aquoso contido nas células. Com água destilada, as células foram lavadas 2 vezes diretamente na membrana. Finalmente, a membrana contendo as células foi colocada em forno a 80 °C por ≥12 horas e pesada novamente. Para o cálculo da quantidade de células (em g/L), o peso da membrana + célula foi subtraído do peso inicial da membrana e multiplicado por 500.

3.28 Análise dos Constituintes Celulares

3.28.1 Liofilização

Após o protocolo de Quenching de acordo com a seção 3.25.1, as células congeladas a -80 °C foram retiradas do Ultra Freezer e imediatamente colocadas dentro de um recipiente de vidro retangular de 500 mL de capacidade. O recipiente foi acoplado ao liofilizador por ≥24 horas, a -50 °C, com vácuo a 1720 mT. O vácuo foi aplicado à amostra vagarosamente e gradualmente por ~15 minutos até atingir 1720 mT a fim de evitar o surgimento de espuma na amostra. Após a liofilização, as células foram

repassadas para outro tubo cônico de plástico de 50 mL vazio previamente pesado e o peso das células foi calculado.

Para a quantificação dos principais constituintes celulares, foram pesadas diferentes quantidades de liofilizado celular de acordo com os valores da Tabela 14.

Tabela 14. Quantidade total de células liofilizadas utilizadas nos diferentes protocolos de análise dos constituintes celulares.

Constituinte celular	Quantidade de células (mg)
Carboidrato total	0,1
Proteína total	5
Lipídeo total	150
DNA total	100
RNA total	5

3.28.2 Extração e Quantificação de Carboidratos Totais

A quantificação de carboidratos foi realizada de acordo com protocolo colorimétrico previamente descrito (Dubois *et al.* 1956). Resumidamente, em um tubo cônico de 15 mL de capacidade contendo 0,1 mg de liofilizado celular, foi adicionado 1 mL de fenol 5%. Após uma breve agitação por inversão, foi adicionado vagarosamente ao tubo 5 mL de H₂SO₄ puro. A mistura foi colocada em agitador vortex em velocidade média por 5 segundos. A solução foi então deixada em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente para o estabelecimento da cor e em seguida colocada em banho de água a 25 °C por 20 minutos. Após isto, 200 µL de cada amostra foi repassada para uma placa de 96 poços e lida usando um leitor SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices®). Para a leitura de hexoses foi usado um comprimento de onda de 488 nm e para pentoses foi usado 480 nm. Além das leituras do lisado celular, também foi feita previamente uma curva padrão contendo glicose diluída em fenol 5% nas concentrações de 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 0. Todo o protocolo descrito neste tópico foi feito dentro de capela de exaustão devido à forte reação exotérmica entre o H₂SO₄ puro e a solução contendo os carboidratos.

3.28.3 Extração e Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com o protocolo da reação de Biureto previamente descrito (Haward w. Robinson 2013). Resumidamente, em um tubo cônico plástico de 15 mL de capacidade foi colocado 5 mg de liofilizado celular e a este foi adicionado 3 mL de NaOH 1 M. A mistura foi colocada em banho de água fervente por 5 minutos e em seguida resfriado em banho de gelo por 2 minutos. Após resfriado, foi

adicionado ao tubo 1 mL de CuSO_4 2,5%. O tubo foi então colocado em agitador shaker na velocidade máxima por 1 minuto, deixado em repouso por 5 minutos e em seguida centrifugado por 1 minuto a 12000 x g em temperatura ambiente. 200 μL de cada sobrenadante foi repassado para uma placa de 96 poços e lido usando um leitor SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices®) usando um comprimento de onda de 555 nm. Além das leituras do lisado celular, também foi feita previamente uma curva padrão contendo Albumina de Soro Bovino (BSA) diluído em 3 mL de NaOH 1M nas concentrações de 5 mg/mL, 4 mg/mL, 3 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL e 0.

3.28.4 Extração e Quantificação de Lipídeos Totais

A quantificação de lipídeos foi feita de acordo com o protocolo previamente descrito (Hara and Radin 1978). Resumidamente, em tubo cônico plástico de 50 mL de capacidade contendo 150 mg de células foi adicionado 18 mL de solução hexano:isopropanol 3:2. A mistura foi colocada em agitador vortex com agitação média por ≥ 14 horas em temperatura ambiente. Após a extração, foi adicionado ao tubo 12 mL de Na_2SO_4 0,47 M. Após a adição do Na_2SO_4 , as 2 fases presentes no tubo foram separadas em centrífuga por 1 minuto a 10000 x g em temperatura ambiente. A fase contendo os lipídeos (fase superior contendo hexano) foi repassada para outro tubo cônico plástico de 50 mL. Dentro de uma capela de exaustão, foi adicionado à fase um fluxo de nitrogênio gasoso por ≥ 12 horas até a completa evaporação do líquido e surgimento do precipitado contendo os lipídeos.

3.28.5 Extração e Quantificação de DNA

A quantificação de DNA total nas células foi determinada a partir da utilização do método por fluorescência de Hoechst como previamente descrito (De Mey *et al.* 2006). Resumidamente, amostra liofilizada de biomassa foi dissolvida em tampão TNE (NaCl 1 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 0,1 M pH 7,4) a uma concentração de 25 mg/ml. A amostra foi misturada com 2 mL de solução de Hoechst (Hoechst 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão TNE) e submetida a análise de fluorescência através da leitura a um comprimento de onda de 356/648 nm. Uma curva padrão foi feita usando DNA de esperma de Salmão (Sigma-Aldrich).

3.28.6 Extração e Quantificação de RNA

A quantificação de RNA total foi feita de acordo com o protocolo previamente descrito (De Mey *et al.* 2006). Resumidamente, em tubo cônico plástico de 15 mL de capacidade contendo 5 mg de células foi adicionado 10 mL de HClO_4 0,7 M gelado. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho de gelo e em seguida centrifugada por 10 minutos a 4 °C a 8000 rpm. As células foram lavadas 2 vezes com 10 mL de HClO_4 0,7 M gelado,

centrifugadas e ressuspendidas em 10 mL de KOH 0,3 M. A mistura foi dividida em 2 amostras contendo 5 mL cada e incubadas a 37 °C por 1 hora para hidrólise das células. Em seguida, a solução foi neutralizada com a adição de 1 mL de HClO₄ 3M gelado e centrifugadas 10 minutos a 4 °C a 8000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi reservado em outro recipiente plástico e o precipitado foi lavado 2 vezes com 1 mL de HClO₄ 0,5 M. Os 3 sobrenadantes foram misturados em um único recipiente e 1 mL deste foi colocado em um cubeta quartzo para leitura a 260 nm em espectrofotômetro. A quantidade de RNA foi calculada usando $1 A_{260} = 0,038 \text{ mgRNA/mL}$, considerando uma cubeta de 1 cm de comprimento e o fator de diluição da amostra.

3.29 Análises de Fluxo Metabólico (AFM)

Todos os resultados de AFM obtidos neste trabalho foram obtidos a partir do auxílio com colaboradores e publicados em estudo prévio (Morais 2020). As principais metodologias utilizadas estão descritas nos subtópicos a seguir:

3.29.1 Definição da Rede metabólica

Para a definição da rede metabólica, foram escolhidos os principais fluxos presentes em *K. lactis* que de alguma forma pudessem afetar a síntese de AH, seja sendo um fluxo competidor ou auxiliador. Assim, ao final da seleção foram englobadas as vias metabólicas da glicólise, biossíntese de glicerol, fermentações láctica e alcoólica, via das pentoses fosfato, ciclo do ácido tricarboxílico, síntese de trealose, síntese de glutamina e glutamato e as reações presentes na via de produção de ácido hialurônico. Para isso, foram utilizados os bancos de dados MetaCyc e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Uma lista destas reações está apresentada na Tabela 15.

Tabela 15. Vias metabólicas utilizadas para a realização das análises de fluxo metabólico feitas neste estudo.

Metabolismo	Reação
Via das pentoses fosfato	Xilulose-5-P → Ribulose-5-P
	Xilulose-5-P + Eritrose-4-P → Frutose-6-P + Gliceraldeído-3-P
	Xilulose-5-P + Ribose-5-P → Sedoheptulose-7-P + Gliceraldeído-3-P
	Ribulose-5-P → Ribose-5-P
	Sedoheptulose-7-P + Gliceraldeído-3-P → Eritrose-4-P + Frutose-6-P
	Glicose-6-P + 2 NADP → Ribulose-5-P + CO ₂ + 2 NADPH
Glicólise	Glicose-6-P ↔ Frutose-6-P
	Frutose-6-P + ATP ↔ Frutose-1,6-Bifosfato + ADP
	Frutose-1,6-Bifosfato → Dihidroxiacetona-P + Gliceraldeído-3-P
	Dihidroxiacetona-P → Gliceraldeído-3-P
	Dihidroxiacetona-P + NADH → Glicerol + NAD
	Gliceraldeído-3-P + NAD → Fosfoenolpiruvato + NADH
	Fosfoenolpiruvato + ADP → Piruvato + ATP
Piruvato → Acetaldeído + CO ₂	
Fermentação	Acetaldeído + NADH → Etanol + NAD
	Acetaldeído + NADP → Acetato + NADPH

	Acetato + CoA + ATP → Acetil-CoA + ADP + Pi
Ciclo de krebs	Piruvato + CO ₂ + ATP → Oxaloacetato + ADP + Pi
	Acetil-CoA + Oxaloacetato → Citrato + CoA
	Citrato → Isocitrato
	Isocitrato + NAD → Ácido α-cetoglutárico + CO ₂ + NADH
	Ácido α-cetoglutárico + NAD → Succinato + NADH + CO ₂
	Succinato → Fumarato
	Fumarato → Malato
	Malato + NAD → Oxaloacetato + NADH
Via de síntese do AH	Glicose-6-P ↔ Glicose-1-P
	Glicose-1-P + UTP → PPi + UDP-Glicose
	UDP-Glicose + 2 NAD ⁺ → UDP-GlcUA + 2 NADH + 2 H ⁺
	Frutose-6-P + Glutamina → Glicosamina-6-P + Glutamato
	Glicosamina-6-P + Acetil-CoA → GlcNAc-6-P + CoASH
	GlcNAc-6-P + UTP → UDP-GlcNAc + PPi
	UDP-GlcUA + UDP-GlcNAc → Ácido Hialurônico + 2 UDP
Síntese de quitina	UDP-N-Acetil-Glucosamina + [1,4-(N-acetil-β-D-glicosaminil)] _n
	→ UDP + [1,4-(N-acetil-β-D-glicosaminil)] _{n+1}
Síntese de trealose	UDP-Glicose + Glicose-6-P → Trealose-6-P + UDP
	Trealose-6-P → Trealose + Pi
Metabólitos externos	Glicerol → Glicerol Externo
	CO ₂ → CO ₂ Externo
	Etanol → Etanol externo
	Piruvato → Piruvato Externo
	Acetato → Acetato Externo
	Succinato → Succinato Externo

Para a aplicação em software da AFM, foi escolhido o modelo metabólico iOD907 já descrito em prévio estudo (Dias *et al.* 2014) e disponível em bancos de dados. Este modelo possui quatro compartimentos e 1476 metabolitos distribuídos em 1867 reações. Para que o modelo se adequasse a cepa utilizada para produção de AH, as reações e compostos que completam a via de síntese do polímero foram acrescentados, além de uma reação de retirada de AH do sistema.

3.29.2 Cromatografia Gasosa Acoplada A Espectrômetro de Massa (GC-MS)

Antes da realização do GC-MS, as amostras obtidas após a extração dos metabólitos intracelulares (Seção 3.25) foram passadas por um processo de derivatização conforme descrito em prévio estudo (Vital *et al.* 2017). Às amostras foram colocadas 40 µL de cloridrato de metoxamina solubilizada em solução de 20 mg/mL de piridina e homogeneizadas em vortex por 10 segundos, as amostras foram incubadas em agitador térmico sob agitação constante de 900 rpm por 2 horas a 37 °C. Ao final da incubação, os tubos foram brevemente centrifugados para retirar a condensação da tampa e foram adicionados 70 µL de N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) e

homogeneizados em vortex novamente. As amostras foram novamente incubadas nas mesmas condições anteriores, porém por 30 minutos. Ao final do tempo a condensação da tampa foi retirada novamente por centrifugação e 100 µL da mistura foram transferidos para frascos de cromatografia para inserção no equipamento de cromatografia acoplada a espectrometria de massa.

Os frascos para cromatografia contendo 100 µL de amostra proveniente da derivatização foram posicionados no autosampler e 1 µL é automaticamente injetado na parte de cromatografia gasosa (Agilent Technologies 7820A) contendo uma coluna analítica optima 5ms (30m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 mm de espessura do filme). O protocolo automatizado scanner com atraso de solvente utiliza hélio como gás carreador a uma taxa de 1 mL/minuto e a temperatura varia de 70°C por 5 minutos, 10 °C por 1 minuto e escala para 300 °C por 5 minutos, também foi utilizado o método SIM de análise para buscar mais especificamente pelas faixas de massa de aminoácidos e ácidos orgânicos. Conforme as amostras passam pela coluna e são separadas, elas no compartimento onde está o espectrômetro de massa, com a temperatura da linha de transferência e a fonte ionizante a 250°C com energia dos elétrons em 70 eV. O analisador então detecta o espectro de massa e com a ajuda do software ChemStation as informações referentes ao espectro de massa e perfil cromatográfico são compiladas e mostradas ao usuário.

3.29.3 Análise de Balanço de Fluxo (ABF)

Todas as análises e modificações feitas para a análise de balanço de fluxo foram realizadas em python3 com o pacote cobrapy versão 0.18.1 e solucionador GLPK sob a licença de uso GPL. As simulações realizadas para o modelo da cepa BAP tiveram a maximização da reação de produção de AH como objetivo e todas as regras impostas e reações mantiveram-se as mesmas a exceção da reação de biomassa cujo valor foi estipulado utilizando a taxa de crescimento da levedura obtida em prévio estudo (de Oliveira *et al.* 2016). A máquina utilizada continha as seguintes especificações: sistema operacional Windows 10, processador AMD ryzen5 3600, 32GB de memória RAM.

Originalmente, a reação selecionada pelo modelo para ser maximizada durante a ABF era a reação de biomassa, no entanto, para fins de análise de gargalos referentes a produção de AH, a reação de produção de AH foi definida como objetivo da análise. Como a partir desse momento a produção de biomassa deixou de ser o foco das simulações, foi necessário inserir uma regra para que haja produção de biomassa. Essa regra consiste em limitar o fluxo mínimo da reação para mimetizar o valor da taxa de crescimento obtido nos estudos prévios com a cepa BAP (V. Gomes *et al.* 2019).

3.30 Cálculo das Taxas de crescimento e Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir de curvas de crescimentos realizados neste estudo foram plotados e analisados no software GraphPad Prism versão 8.0.2 (263). A taxa específica de crescimento das cepas foi analisada baseada no coeficiente angular da reta da fase logarítmica dos pontos obtidos durante fase exponencial de crescimento.

Diferenças entre populações de 2 ou mais amostras foram analisadas usando o teste-t estatístico não pareado com $P < 0,05$ bicaudal disponibilizado pelo software. Valores da produção de AH foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey's. Todas as construções genéticas apresentadas neste trabalho foram obtidas a partir do uso do software SnapGene® versão 5.1.5.

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise dos níveis de transcritos da cepa BAP

Os níveis dos transcritos dos 20 alvos analisados neste estudo (Tabela 12) por RT-qPCR e por RNA-Seq usando o nível do transcrito do gene da Actina como um normalizador estão representados na Figura 13.

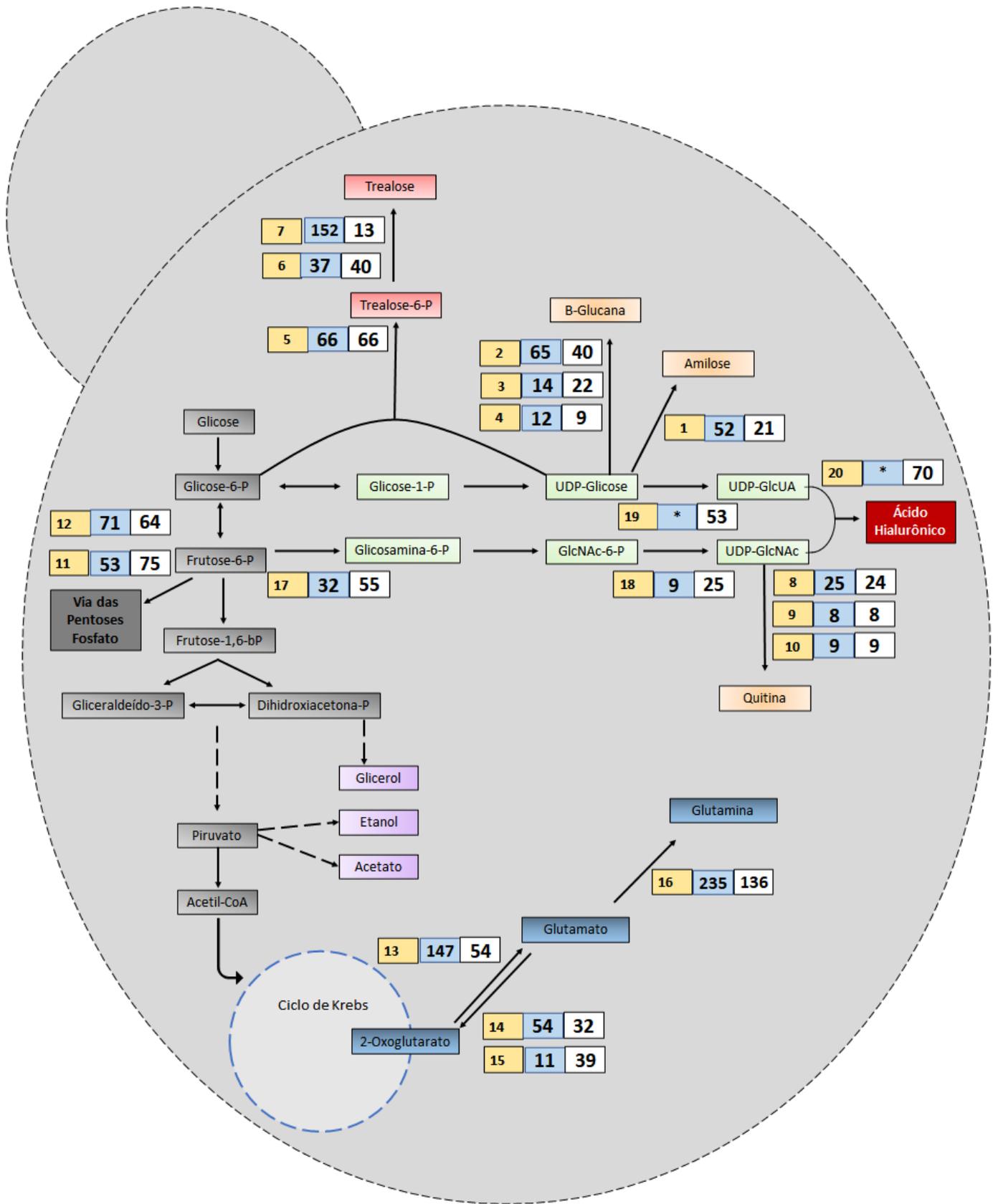


Figura 13. Mapa metabólico da síntese de AH com os valores obtidos dos níveis dos 20 transcritos selecionados como alvo neste estudo. Caixas amarelas apresentam o número da reação descrito na Tabela 12; Caixas azuis apresentam os valores dos níveis de transcritos obtidos por RNA-Seq; Caixas brancas apresentam os valores dos níveis de transcritos obtidos por RT-qPCR. Todos os valores foram obtidos considerando o nível da actina como 100% e gerados a partir da realização de média de triplicata biológica. * significa que não foram encontrados valores de fluxo durante esta análise.

Os valores de RNA-Seq e RT-qPCR apresentados na Figura 13 estão também representados na forma de gráfico com os respectivos erros no Anexo 6 e o relatório geral obtido com os dados do RNA-Seq também estão apresentados no Anexo 7.

Como observado na Figura 13, não foram encontrados níveis de transcritos dos genes *hasB* (19) e *hasA* (20) por RNA-Seq, enquanto por RT-qPCR, estes níveis foram de 53% e 70%, respectivamente, em relação ao nível da actina (Figura 13). Este resultado pode ser explicado devido à diferença no tempo de extração do RNA total das células para as 2 metodologias. Para o RT-qPCR, o RNA total da cepa BAP foi extraído durante o começo da fase exponencial de crescimento, momento no qual a célula está ativamente crescendo. Para o RNA-Seq, o RNA total da cepa foi extraído ao final do cultivo das células após 48 horas de crescimento. Considerando que a síntese de AH é diretamente relacionada com atividade de crescimento celular (V. Gomes *et al.* 2019), isto pode ter influenciado na ocorrência da transcrição dos genes *hasA* e *hasB*. Durante a construção da cepa BAP de *K. lactis* (V. Gomes *et al.* 2019), o gene *hasB* foi colocado sob controle do promotor GPD, enquanto o gene *hasA* foi colocado sob controle do promotor LAC4 nativo de *K. lactis*, ambos os promotores fortes e constitutivos. Portanto é esperado que haja valores de transcrição destes 2 genes.

O transcrito 1, associado com a enzima glicogênio sintase, corresponde à enzima responsável por sintetizar amilose a partir das moléculas de Glicose vindas da UDP-Glicose (Figura 13). A amilose é um polissacarídeo que corresponde a aproximadamente 30% da molécula de amido e é considerada uma molécula de reserva energética para a célula produzida em condições não estressantes (McCann and Barnett 1986), portanto é esperada a síntese de amilose juntamente com o AH durante a fase exponencial do crescimento celular. Os níveis deste transcrito foram de respectivamente, 52% e 21% em relação à actina, respectivamente para RNA-Seq e RT-qPCR.

Igualmente à enzima Glicogênio Sintase, os transcritos 2,3 e 4 estão associados a um complexo enzimático que utiliza UDP-Glicose como substrato. Este complexo, chamado de 1,3-β-D-Glucan Sintase é formado por 3 subunidades denominadas FKS1, FKS2 e FKS3, codificadas pelos genes *fks1*, *fks2* e *fks3* (Klis *et al.* 2002). A 1,3-β-D-Glucan produzida por esta enzima é um polímero que corresponde a ~55% da quantidade de polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae* (Klis *et al.* 2002) e no qual outros

componentes de parede celular, como a quitina, são associados. Portanto, esta enzima também tem sua atividade associada com o crescimento celular e síntese de biomassa. Os transcritos de FKS1, FKS2 e FKS3 apresentaram, respectivamente, níveis de 65%, 14% e 12% em relação ao nível de actina em análise de RNA-Seq e níveis de 40%, 22% e 9% em relação aos níveis de actina na análise por RT-qPCR, respectivamente.

Os transcritos 5, 6 e 7 estão associados com 3 genes responsáveis por codificar 3 subunidades que, em conjunto, originam um complexo sintetizante do metabólito trealose. Este complexo, chamado de Complexo da Trealose (CT), sintetiza moléculas de trealose utilizando Glicose-6-fosfato e UDP-Glicose como substrato, ambas estas moléculas usadas pela via de síntese de UDP-GlcUA (Figura 13) e, portanto, um forte candidato a competidor da síntese de AH. Os transcritos 5, 6 e 7 apresentaram níveis de, respectivamente, 66%, 37% e 152% em relação ao nível de actina para RNA-Seq e de 66%, 40% e 13% em relação ao nível da actina para RT-qPCR, respectivamente.

Além da 1,3- β -D-Glucan, um segundo componente da parede celular de leveduras, a quitina, também foi analisada. Este composto é produzido pela enzima Quitina Sintase, que em *S. cerevisiae* é encontrada como 3 diferentes isoformas codificadas pelos genes *chsI*, *chsII* e *chsIII* (Lesage and Bussey 2006) e relacionadas com os transcritos 8, 9 e 10 neste estudo. Em *S. cerevisiae*, a quitina corresponde a apenas 2% do peso seco total da célula (Lesage and Bussey 2006), porém, é uma molécula formada por repetições de UDP-GlcNAc, um dos precursores do AH. Por este motivo a síntese de quitina é diretamente competidora com a síntese de AH. Todos os níveis de transcritos associados com as 3 quitinas sintases apresentaram valores <30% em relação à actina, tanto por RNA-Seq como por RT-qPCR (Figura 13). Os valores obtidos das 3 quitinas sintases neste estudo também confirma a observação em outros estudos de que a quitina sintase 3 é a isoforma com maiores níveis de transcrito presentes na célula (Bulawa 1992).

Os transcritos 11 e 12 estão relacionados com a via das Pentoses Fosfato através, respectivamente, das enzimas Transcetolase e Transaldolase. Os níveis dos transcritos de ambas foram estatisticamente semelhantes aos níveis obtidos pela HASA (transcrito 20). Estudos com a deleção do gene *zwf* (*glicose-6-fosfato desidrogenase*) de *K. lactis* mostraram que a cepa é incapaz de crescer em fontes de carbono como glicose nestas condições (Tarrío *et al.* 2006). O gene *zwf* é responsável por codificar a enzima que converte Glicose-6-fosfato no primeiro precursor do ramo não oxidativo da via das pentoses fosfato. Adicionalmente, cepas de *K. lactis* contendo deleções de principais genes envolvidos com a glicólise (*pgi* – phosphoglucose isomerase e *pfk* –

phosphofruktokinase) resultaram em uma cepa que ainda foi capaz de crescer em glicose, porém a uma taxa de crescimento ~ 30% menor (Goffrini, Wésolowski-Louvel and Ferrero 1991). Todos estes resultados sugerem que em *K. lactis* há uma maior dependência pela via das pentoses fosfato para a metabolização de glicose, diferente de outras leveduras como *S. cerevisiae* onde >90% da glicose consumida é metabolizada via glicólise (Tarrío *et al.* 2006). A via das pentoses fosfato é responsável por regenerar moléculas como UTP, que são utilizadas como cofatores para a síntese de AH e a deleção de genes envolvidos com a utilização desta via podem tanto reduzir a síntese de AH, como também causar uma falha no crescimento de *K. lactis*.

Dos transcritos 13 até 17, todas as reações envolvidas com as respectivas enzimas estão relacionadas com a reciclagem de glutamina e glutamato pela célula. Partindo da glicólise, a primeira reação da via de geração do precursor UDP-GlcNAc e catalisada pela enzima Glutamina Frutose-6-P amidotransferase utiliza 1 molécula de glutamina como cofator gerando 1 molécula de glutamato durante o processo. Este glutamato precisa então ser regenerado em glutamina novamente através de reações relacionadas com o Ciclo de Krebs (Figura 13). Os transcritos 13 até 17 foram analisados de modo a identificar possíveis etapas limitantes na síntese de AH devido à uma ausência de glutamina. No entanto, alguns valores obtidos foram superiores aos níveis da actina, como o transcrito 13 com um nível 147% maior que o nível da actina e o transcrito 16 com um nível 235% maior que o nível de actina, ambos os dados a partir de RNA-Seq (Figura 13).

Finalmente, o transcrito 18 correspondente à enzima HASD / UDP-N-Acetil Glicosamina Pirofosforilase apresentou um nível de 9% e 25% em relação ao nível da actina, respectivamente para RNA-Seq e RT-qPCR (Figura 13). Alguns estudos envolvendo as bactérias geneticamente modificadas produtoras de AH utilizaram em suas construções super expressões do gene *hasD* para análise de um possível aumento na síntese do AH. Em estudo com uma cepa de *C. glutamicum* (Cheng *et al.* 2017), por exemplo, 2 cepas foram criadas e crescidas em condições idênticas, uma cepa contendo super expressões dos genes *hasA + hasB + hasC* e outra cepa contendo super expressão dos genes *hasA + hasD* (Figura 3). A cepa ABC foi capaz de produzir em frasco 5.5 g/L de AH, enquanto que a cepa AD produziu 1 g/L, sugerindo que o braço do precursor UDP-GlcUA é mais limitante para a síntese de AH, como também demonstrado por outros estudos realizados com *B. subtilis* (Jia *et al.* 2013).

A partir da análise de todos estes 20 transcritos foram então elaboradas 2 principais estratégias envolvendo a disrupção e a ativação da expressão de genes com o objetivo

de aumentar a síntese da AH. Dentre os 3 metabólitos estudados neste tópico e considerados diretamente competidores com a via de síntese do AH (Figura 13), 2 deles (1,3-β-D-Glucan e Quitina) são usados para síntese de parede celular, enquanto a trealose não. Considerando que a deleção dos genes que codificam a 1,3-β-D-Glucan Sintase e Quitina Sintase podem resultar na geração de uma cepa com dificuldades em crescimento devido a um afrouxamento da parede celular, isto também pode deprimir a síntese de AH ou tornar a cepa menos resistente às condições de agitação e pressão durante o cultivo no biorreator. Por este motivo, o gene da trealose foi escolhido para disrupção no genoma da cepa BAP e avaliação dos efeitos disto na síntese de AH. Em relação à estratégia envolvendo a um aumento do nível de expressão gênica, foi observado que o gene *hasA* apresentou valores abaixo do esperado (70% em relação à actina) considerando que ele está sob controle do promotor LAC4, que é o mais forte e bem descrito em *K. lactis*. De forma a contornar este problema, uma estratégia envolvendo a utilização de uma Serina Integrase foi elaborada com o objetivo de realizar a expressão do gene *hasA* apenas em um momento específico do crescimento celular. Com esta estratégia, foi hipotetizado realizar um desacoplamento do crescimento celular com a síntese de AH, possivelmente aumentando a síntese deste último. Ambos os resultados destas 2 estratégias estão descritos nas seções a seguir.

4.2 Disrupção do gene Trealose (*tps1*) da cepa BAP

A trealose é um dissacarídeo formado a partir da união de 2 moléculas de glicose através de uma ligação α 1-1 (Figura 14). Inicialmente, a trealose era descrita como uma molécula utilizada pelas células apenas como reserva energética (Paalman *et al.* 2003), semelhante ao glicogênio, no entanto, outros estudos mostraram que a trealose é também utilizada em mecanismos protetores nas células. A trealose é por exemplo utilizada como uma molécula protetora contra estresses osmóticos em *E. coli* (Purvis, Yomano and Ingram 2005) e *S. cerevisiae* (Hounsa *et al.* 1998) e contra choques térmicos em *Yarrowia lipolytica* (Flores, Gancedo and Petit 2011) e *S. cerevisiae* (Carroll *et al.* 2003). Isto é possível devido às características químicas da trealose, que é um dissacarídeo não redutor e muito estável, suportando altas temperaturas e condições de grande acidez sem ser degradada.

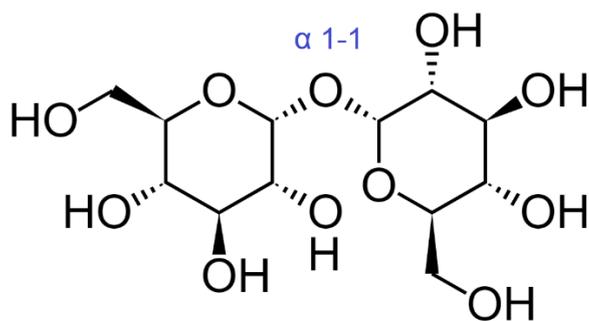


Figura 14. Estrutura química da Trealose.

A trealose é sintetizada por um complexo chamado de complexo trealose (CT). De acordo com a anotação genética de *K. lactis*, nesta levedura o CT é formado por 3 subunidades: TPS1 (Trealose 6-Fosfato Sintase), responsável por catalisar a condensação de 2 moléculas de glicose gerando Trealose-6-Fosfato; TPS2 (Trealose Fosfatase), responsável por converter Trealose 6-Fosfato em Trealose e uma terceira subunidade sem funções catalíticas, mas com funções regulatórias chamada de GSS1 (Componente de um sistema de sensibilidade à glicose). Estas reações estão ilustradas, respectivamente, como as reações 5, 6 e 7 na Figura 13.

Considerando os resultados obtidos a partir das análises de transcritos (Seção 4), um cassete de interrupção para o gene *tps1* foi montado de acordo como descrito na seção 3.20.1 e representado na Figura 12. O cassete foi utilizado para transformação da cepa BAP de *K. lactis* no intuito de eliminar a síntese de trealose na célula. Apenas a eliminação da subunidade TPS1 do metabolismo de *K. lactis* é necessária para a completa inutilização do CT, já que a subunidade TPS2 depende do produto formado pela subunidade TPS1 para catalisar a reação de formação da trealose.

Após transformação do cassete de interrupção em *K. lactis* e análise do crescimento de algumas colônias em meio contendo o antibiótico G418, a correta integração foi confirmada a partir de PCR com a utilização dos Oligonucleotídeos iniciadores Trealose Sintase Forward e Trealose Sintase Reverse (Tabela 10). O gene *tps1* apresenta um tamanho de 1.6 kb intacto e de 2.8 kb contendo a interrupção pelo gene *kanMX* (Figura 12). O tamanho de 2.8 kb foi confirmado através de gel de agarose, tendo sido gerada a cepa BAP $\Delta tps1$.

A cepa BAP $\Delta tps1$ e BAP (utilizada como controle) foi então crescida em meio YPD em frasco aletado em 3 diferentes fontes de carbono a uma contração inicial de 2%: glicose, galactose e frutose. As curvas de crescimentos obtidas estão apresentadas na Figura 15.

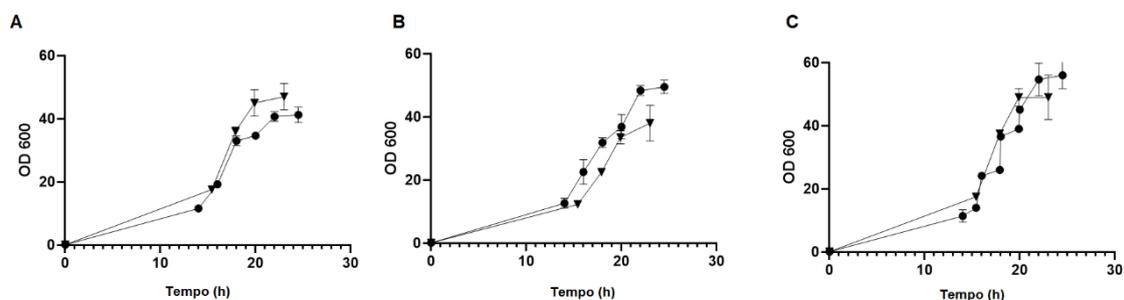


Figura 15. Perfil de crescimento das cepas BAP (●) e BAP $\Delta tps1$ (▼) por 24 horas em meio YPD contendo (A) Glicose, (B) Galactose e (C) Frutose.

Os dados da taxa de crescimento (μ_{MAX}), OD₆₀₀ final obtida e produção de AH pelas cepas nas fermentações em frasco estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Taxa de crescimento (μ_{MAX}) e OD₆₀₀ final obtidas pelas cepas BAP e BAP $\Delta tps1$ durante crescimento em frasco em meio YPD contendo diferentes fontes de carbono. Dados calculados a partir de média de triplicata biológica.

Fonte de carbono	Cepa	μ_{max} (h ⁻¹)	OD ₆₀₀ final	Ácido hialurônico (g/l)
Glicose	BAP	0,25 ± 0,03	41 ± 2	0,45 ± 0.4
	BAP $\Delta tps1$	0,22 ± 0,02	47 ± 3	0,21 ± 0.5
Galactose	BAP	0,21 ± 0,01	49 ± 6	0,18 ± 0.2
	BAP $\Delta tps1$	0,22 ± 0,02	38 ± 4	0,09 ± 0.3
Frutose	BAP	0,25 ± 0,02	56 ± 3	0,12 ± 0.2
	BAP $\Delta tps1$	0,23 ± 0,01	49 ± 5	0,02 ± 0.2

Estatisticamente não foram observadas diferenças entre o perfil de crescimento das cepas BAP e BAP $\Delta tps1$, bem como também não foi observada diferenças entre a taxa específica de crescimento (μ_{MAX}) e OD₆₀₀ final entre as cepas analisadas nas mesmas fontes de carbono. Em relação à síntese de Ácido Hialurônico, houve um decréscimo na produção de AH de aproximadamente 54%, 50% e 83% para glicose, galactose e frutose, respectivamente. Estes resultados indicam que a deleção de trealose do metabolismo de *K. lactis* não é capaz de aumentar a síntese de AH na célula.

De modo a confirmar que a disrupção do gene *tps1* realmente resultou na eliminação da síntese de trealose na célula, após o final do crescimento em frasco foi realizada uma extração dos metabólitos das cepas BAP $\Delta tps1$ e BAP (usada como controle) de acordo com a Seção 3.25.2 e quantificação por cromatografia de acordo com a Seção 3.26.1. Os cromatogramas dos metabólitos extraídos das cepas BAP e BAP $\Delta tps1$, bem como o cromatograma de uma solução contendo apenas trealose (utilizada como padrão)

estão mostrados na Figura 16. Os cromatogramas apontam a ausência de trealose intracelular na cepa BAP $\Delta tps1$ devido à ausência do pico em 8,9 minutos.

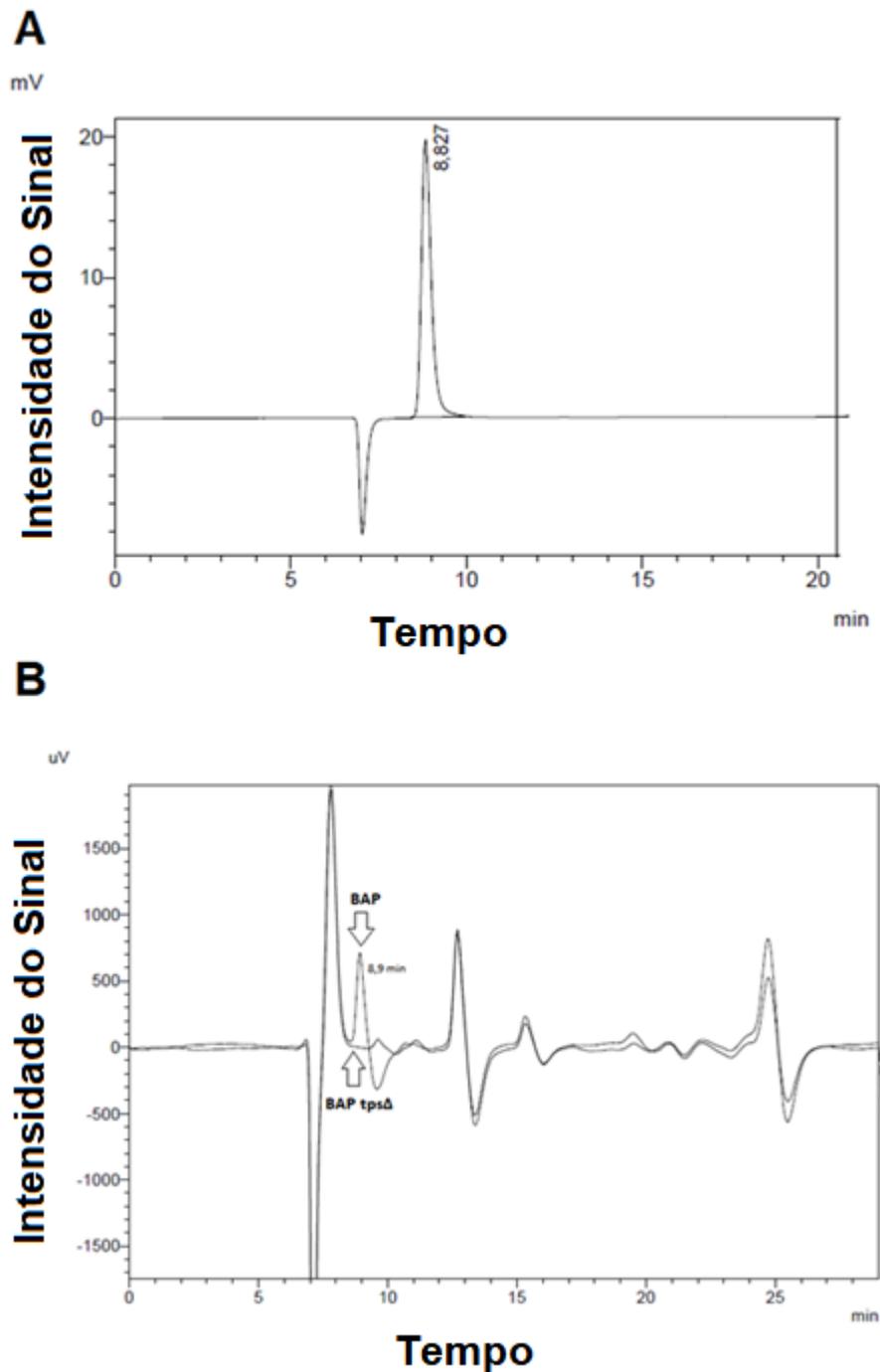


Figura 16. (A) Análise por HPLC de uma solução padrão contendo Trealose (1 g/L) diluída em água. O pico em 8,9 minutos representa o pico da trealose e o pico negativo representa o pico da água. (B) Análise sobreposta por HPLC da extração dos metabólitos intracelulares das cepas BAP BAP $\Delta tps1$.

Até hoje, a deleção do gene *tps1* foi realizada em 4 cepas de leveduras: *S. cerevisiae* (Hohmann *et al.* 1993), *Yarrowia lipolytica* (Flores, Gancedo and Petit 2011), *Hansenula polymorpha* (*Ogataea polymorpha*) (Reinders *et al.* 1999) e a própria *Kluyveromyces lactis* (Luyten *et al.* 1993). Neste último, na cepa de *K. lactis* Δ *tps1* denominada JA6 foi observada uma incapacidade de crescimento em meio YPD ágar contendo glicose, o que não ocorreu neste estudo. Ainda, na cepa JA6 foi observada uma inibição da fase de crescimento em frasco quando ao meio de cultura eram adicionados pulsos de glicose e frutose. Após um crescimento inicial em galactose, a adição de um pulso de 3,6 g/L de glicose e frutose resultaram em uma inibição de crescimento de ~50% na cepa JA6. Da mesma forma, após um crescimento inicial em frasco em galactose, a adição de um pulso de 0,8 g/L de glicose e frutose resultaram em uma inibição de crescimento de, respectivamente, 40% e 28% (Luyten *et al.* 1993). Todos estes dados foram obtidos quando comparados com o crescimento da cepa JA6 sem adição de pulsos, contendo apenas galactose. Em *S. cerevisiae*, os resultados da deleção da trealose também apresentaram efeitos semelhantes, já que cepas desta leveduras sem o gene *tps1* tornam-se completamente incapazes de crescer em meios contendo glicose como fonte de carbono (Hohmann *et al.* 1993). Ainda hoje não está claro porque cepas de *S. cerevisiae* com a ausência de um Complexo Trealose funcional não conseguem crescer em glicose, mas a principal hipótese aceita é que a primeira enzima da glicólise (Hexoquinase) é controlada e regulada pelo CT (Jules *et al.* 2008). Células sem um CT funcional possuem uma atividade de Hexoquinase descontrolada, o que acaba inviabilizando a célula devido ao estresse metabólico sofrido. Esta hipótese também explica por que cepas de *S. cerevisiae* Δ *tps1* conseguem crescer em frutose como fonte de carbono, já que para este substrato a enzima hexoquinase não é utilizada para abastecer a glicólise (Jules *et al.* 2008).

Em relação *K. lactis*, em termos de enzimas não é possível explicar porque este estudo apresentou resultados conflitantes com o estudo anterior usando a cepa JA6 de *K. lactis* Δ *tps1*. Diferente do anterior (Luyten *et al.* 1993), neste estudo não foi realizado um crescimento usando pulsos de fonte de carbono, mas sim um crescimento usando a mesma fonte de carbono durante toda o cultivo (Figura 15). Além disto, não há estudos na literatura de caracterização de enzima hexoquinase de *K. lactis*, sendo, portanto, necessário mais informações a respeito de uma possível regulação desta enzima pela trealose.

Os resultados obtidos neste tópico são mais similares aos obtidos pelas cepas Δ *tps1* de *Y. lipolytica* (Flores, Gancedo and Petit 2011), *H. polymorpha* (Reinders *et al.* 1999). Em *Y. lipolytica*, o crescimento da cepa Δ *tps1* não é afetado em crescimento em glicose 2%

em frasco. O mesmo resultado também foi observado em *H. polymorpha*, porém nesta levedura foi observado que a cepa $\Delta tps1$ apresentou uma taxa de sobrevivência 1000 vezes menor que uma cepa não deletada quando era aplicado um choque térmico de 56,5 °C por 1 hora, indicando que a trealose está relacionada com a proteção de estresses térmicos na célula (Reinders *et al.* 1999).

Em relação aos resultados obtidos da produção de AH pela cepa $\Delta tps1$, é hipotetizado que a trealose não seja de fato uma molécula competidora com a síntese de AH, já que esta molécula está muito mais relacionada com outras funções regulatórias na célula do que como uma molécula sintetizada para uso como substrato por outras enzimas ou como reserva energética. Durante estresses térmicos, osmóticos ou de privação de nutrientes, a quantidade de trealose em células de *S. cerevisiae* pode chegar a atingir até 15% do peso seco total da célula, enquanto que durante a fase exponencial de crescimento pouca trealose é sintetizada (Lillie and Pringle 1980). Isto também significa que a quantidade de trealose intracelular obtida em uma célula também depende do tempo no qual as células foram coletadas do meio de cultura, o que pode explicar a diferença de mais de 10 vezes obtida (Figura 13) entre os níveis do transcrito 7 (correspondente à subunidade regulatória da trealose/ TPS3) nas análises de RT-qPCR (realizada com células no início de crescimento) e RNA-Seq (realizada com células no final do crescimento após 48 horas).

Finalmente, há ainda a hipótese de que os transcritos 5 (relacionado com a subunidade TPS1) e 6 (relacionado com a subunidade TPS2) tenham apresentado os valores de respectivamente 66% e 37% em relação ao nível da actina devido a um estresse sofrido durante a preparação das amostras durante a prévia extração do RNA total.

4.3 Utilização de Serina Integrase como estratégia para otimização da produção de AH

Neste estudo, uma estratégia com a utilização de uma Integrase foi desenvolvida de modo a testar o impacto da ativação ou inativação da expressão do gene *hasA* em diferentes tempos de cultura na BAP de *K. lactis*. Esta estratégia foi desenvolvida devido à observação em estudos prévios da literatura dos impactos da expressão dos genes *hasA/hasB/hasC/hasD* em cepas geneticamente modificadas e brevemente explicados nos parágrafos a seguir.

Alguns estudos com bactérias produtoras de AH mostraram que a síntese do AH e sua consequente massa molecular dependem de específicas concentrações intracelulares dos 2 monômeros precursores UDP-GlcNAc e UDP-GlcUA. Em uma cepa geneticamente modificada de *B. subtilis* (Jia *et al.* 2013), a expressão dos genes

hasA/hasB/hasC resultou em uma produção de AH de 6,8 g/L contendo uma massa molecular de 4,55 MDa, enquanto em uma cepa com a expressão dos genes *hasA/hasD* foi observada uma produção de 2,4 g/L com uma massa molecular de apenas 13,20 kDa, indicando que nesta bactéria a via do precursor UDP-GlcUA é mais limitante para a síntese de AH tanto em termos de produção como em termos de massa molecular. Neste mesmo estudo também foi avaliada a influência do início tempo de expressão do gene *hasA* durante o crescimento de *B. subtilis*. Através do uso de um promotor *xylA* induzido por xilose, uma cepa contendo o gene *hasA* induzido 2 horas após início do cultivo produziu 3,4 g/L de AH com uma massa molecular de 5,43 MDa, enquanto uma cepa contendo o gene *hasA* induzido após 8 horas produziu um valor semelhante de 3,1 g/L, porém com uma massa molecular muito abaixo de 8 kDa, indicando que expressões tardias do gene *hasA* resultam em cadeias com menor massa molecular. Ambas as cepas também tiveram a expressão em conjunto dos genes *hasB* e *hasC*, mas sem as diferenças no tempo de indução. Considerando que a síntese de AH é associado com o crescimento da célula, estes resultados podem ser explicados pois durante a fase exponencial de crescimento há uma maior disponibilidade dos 2 precursores, conseqüentemente, uma melhor produção pela enzima HASA. Em *B. subtilis*, um tempo de cultivo menor é associado com a produção de cadeias maiores de AH e maiores tempos são associados com produção de cadeias de tamanhos menores (Jia *et al.* 2013).

No produtor natural *S. zooepidemicus*, foram realizados estudos com o crescimento da cepa em meio contendo, separadamente, glicose e glicosamina (20g/L)(Chen *et al.* 2013). Na via de síntese do AH, a Glicose ao ser fosforilada em Glicose-6-P é capaz de abastecer a via de síntese do UDP-GlcUA e a glicosamina pode ser fosforilada em glicosamina-6-P para abastecimento da via do UDP-GlcNAc (Figura 3). Não houve diferenças entre o rendimento de AH obtido quando comparado os crescimentos em glicose (10,7 g/g de peso seco) e em glicosamina (10,8 g/g de peso seco). Em relação a massa molecular, houve uma diminuição de 1,8 MDa no crescimento em glicose para 1,5 MDa no crescimento em glicosamina. Como esperado, ocorreu um aumento na concentração intracelular de UDP-GlcNAc: de 0,86 g/g de peso seco no crescimento em glicose para 1,92 g/g de peso seco no crescimento em glicosamina. Porém, no crescimento em glicosamina não foi detectada concentração intracelular de UDP-GlcUA, o que pode explicar porque não houve melhora na síntese de AH.

Em estudos envolvendo leveduras, também houve diferenças na produção de AH dependendo dos genes expressos em células de *P. pastoris* (Jeong, Shim and Kim 2014a). Nesta levedura, os genes *hasA/hasB/hasC/hasD* foram super expressos em

diferentes combinações com o uso de um promotor induzido por metanol. Uma cepa contendo a super expressão dos genes *hasA* e *hasB* produziu 0,2 g/L de AH com massa de 0,22 MDa, enquanto uma cepa contendo a expressão dos genes *hasA*, *hasB* e *hasD* produziu 1,6 g/L de AH com massa de 1,2 MDa. Ainda neste estudo, uma cepa contendo a expressão dos genes *hasA*, *hasB*, *hasC* e *hasD* alcançou uma produção bastante similar com a cepa sem o *hasC* (1,7 g/L de AH com massa de 1,2 MDa), indicando que a enzima HASC não é limitante para a síntese de AH. Em oposto ao observado em bactérias, o estudo envolvendo *P. pastoris* indica que a via UDP-GlcNAc é a mais limitante para a síntese de AH ou que pelo menos neste microrganismo é necessária uma concentração equilibrada (1:1) dos 2 precursores do AH para uma melhor síntese.

Neste estudo, o plasmídeo pKLAC-AB-Int13 (Anexo 4) construído de acordo com a seção 3.20.2 foi transformado em *K. lactis* e plaqueado em meio seletivo contendo Acetamida como única fonte de nitrogênio. Após crescimento em meio seletivo, a cepa gerada chamada de BAP-Int13 teve a integração dos genes *hasA* e *hasB* confirmada a partir da realização de PCR do DNA genômico com os Oligonucleotídeos Iniciadores *hasAP Forward/hasAP Reverse* e *hasB Forward/hasB Reverse*, respectivamente (Tabela 10).

A cepa BAP-Int13 e BAP (usada como controle), foi submetida a um crescimento em meio YPD contendo 2% de glicose. Após 10 horas de crescimento, um pulso de galactose (para uma concentração final de 2%) foi adicionado ao meio de cultura de modo a realizar a indução do gene da Integrase 13 e consequente ativação da transcrição dos genes *hasA* e *hasB* no caso da cepa BAP-Int13. Esta estratégia, ilustrada na Figura 17 foi escolhida devido a hipótese de que a síntese de AH poderia ser melhorada após o a realização de um desacoplamento entre a síntese de biomassa e a síntese de AH pela levedura. A realização de um crescimento em 2 etapas na qual a célula pudesse primeiramente realizar uma síntese de biomassa e só então produzir AH (após a inversão do gene *hasA* em relação ao promotor) poderia disponibilizar mais eficientemente os 2 precursores UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc para a enzima HASA. Além disto, também já foi relatado (V. Gomes *et al.* 2019) que na cepa BAP de *K. lactis* existe uma prolongação da fase lag quando a cepa produz AH.

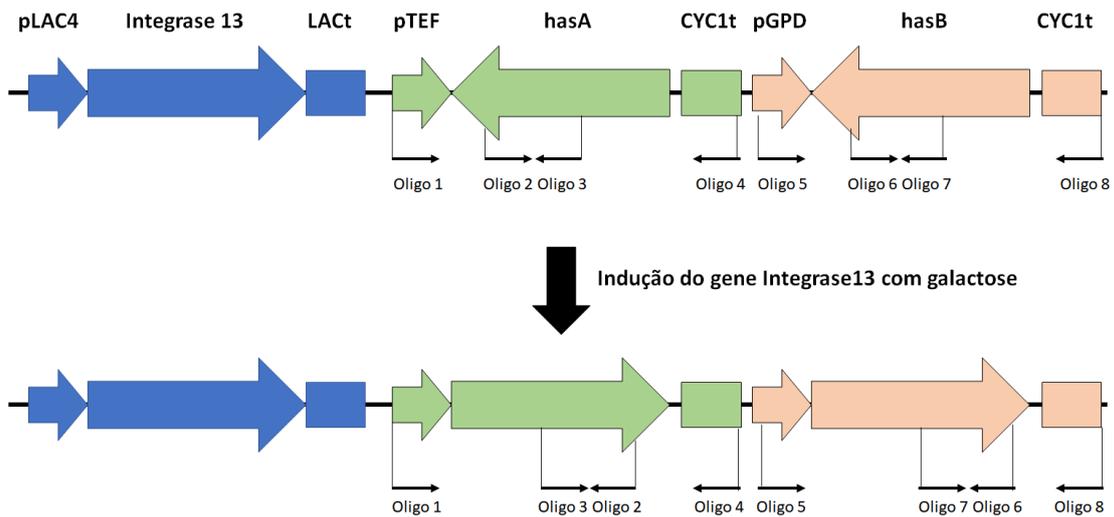


Figura 17. Representação do DNA genômico da cepa BAP-Int13 contendo os genes *hasA* e *hasB* antes e após indução por galactose do promotor LAC4. Uma lista de 8 Oligonucleotídeos iniciadores e seus locais aproximados de ancoramento é também apresentado na figura.

As curvas de crescimento em frasco das cepas BAP-Int13 e BAP estão mostradas na Figura 18.

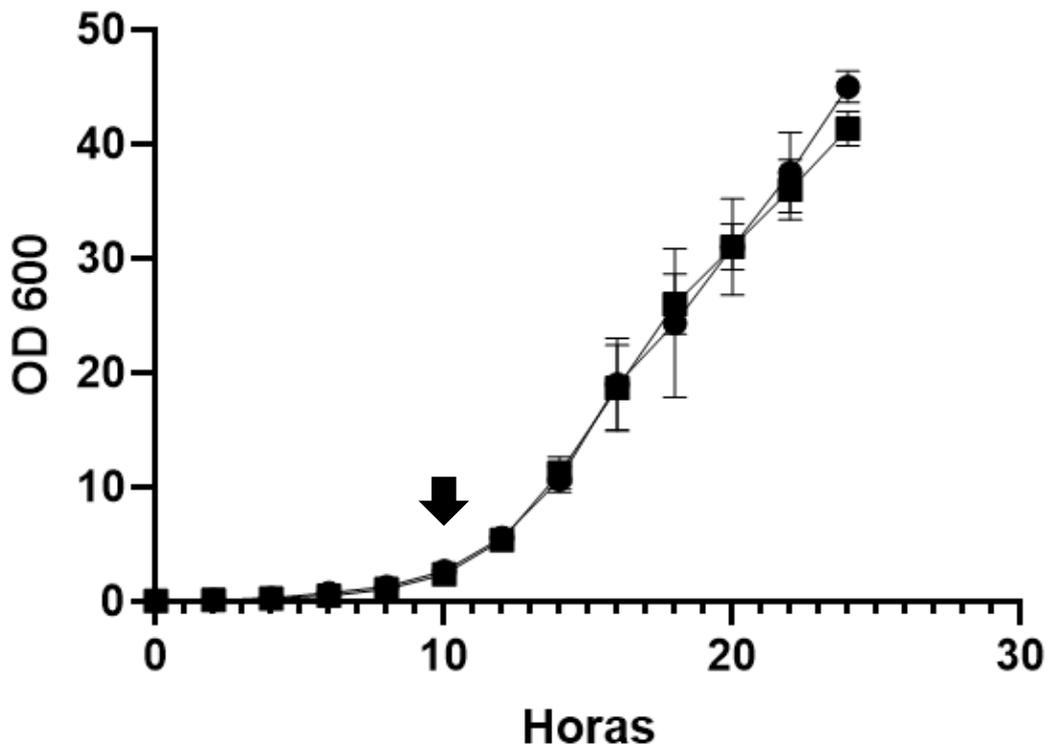


Figura 18. Perfil de crescimento das cepas BAP (■) e BAP-Int13 (●) após crescimento de 24 horas em frasco contendo 2% de glicose. A seta preta indica o momento no qual galactose a uma concentração final de 2% foi adicionada ao frasco para indução do gene da Integrase 13. Dados obtidos a partir de média de triplicata biológica.

Os dados da taxa de crescimento (μ_{MAX}), OD₆₀₀ final e produção de AH quantificado pelo método carbazol obtido pelas cepas BAP e BAP-Int13 nos crescimentos em frasco estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Taxa de crescimento (μ_{MAX}), OD₆₀₀ final obtida e produção de AH pelas cepas BAP e BAP-Int13 após crescimento em frasco.

Cepa	μ_{max} (h ⁻¹)	OD ₆₀₀ final	Ácido hialurônico (g/L)
BAP	0,29 ± 0,01	44 ± 2	0.49 ± 0.3
BAP-Int13	0,30 ± 0,01	43 ± 3	0.57 ± 0.5

Como observado nos resultados acima, não houve diferenças estatísticas no crescimento, OD₆₀₀ final e síntese de AH entre as cepas BAP e BAP-Int13. Estudos realizados com a cepa BAP de *K. lactis* mostraram que, em comparação com uma cepa selvagem, nesta cepa a síntese de AH ocasiona uma diminuição do rendimento de biomassa gerada a partir de glicose em ~20% e conseqüentemente uma redução na OD₆₀₀ final (V. Gomes *et al.* 2019). Caso houvesse uma ativação da transcrição dos genes *hasA* e *hasB* na cepa BAP-Int13 após indução com galactose, era esperada uma mudança no perfil de crescimento da cepa após este tempo.

De modo a confirmar que os genes *hasA* e *hasB* estavam de fato em sentido oposto aos seus respectivos promotores antes da indução por galactose, foi coletada uma amostra no tempo 2 h (Figura 18) durante o crescimento da cepa BAP-Int13 e desta extraído o DNA genômico para análise da direcionalidade dos genes por PCR. A direcionalidade do gene *hasA* foi verificada a partir de PCR com os Oligonucleotídeos Iniciadores 1, 2 e 3 (Figura 17) e analisados em gel de agarose representado na Figura 19. A partir do gene *hasA* foi observada a ocorrência da amplificação de um fragmento de 2833 pb gerado pelos oligonucleotídeos Iniciadores 1 e 2, indicando, portanto, que o gene estava na orientação correta para expressão a partir do promotor pTEF desde o início do crescimento. Caso o gene estivesse em orientação oposta ao promotor, não deveria haver ocorrência de amplificação com os oligonucleotídeos Iniciadores 1 e 2, mas sim a ocorrência de amplificação de um fragmento de 1192 pb a partir da utilização dos oligonucleotídeos Iniciadores 1 e 3 (Figura 17), o que não aconteceu. Na Tabela 10, oligonucleotídeos iniciadores 1, 2 e 3 correspondem respectivamente às sequências Cas *hasAP Forward*, *hasAP Forward* e *hasAP Reverse*.

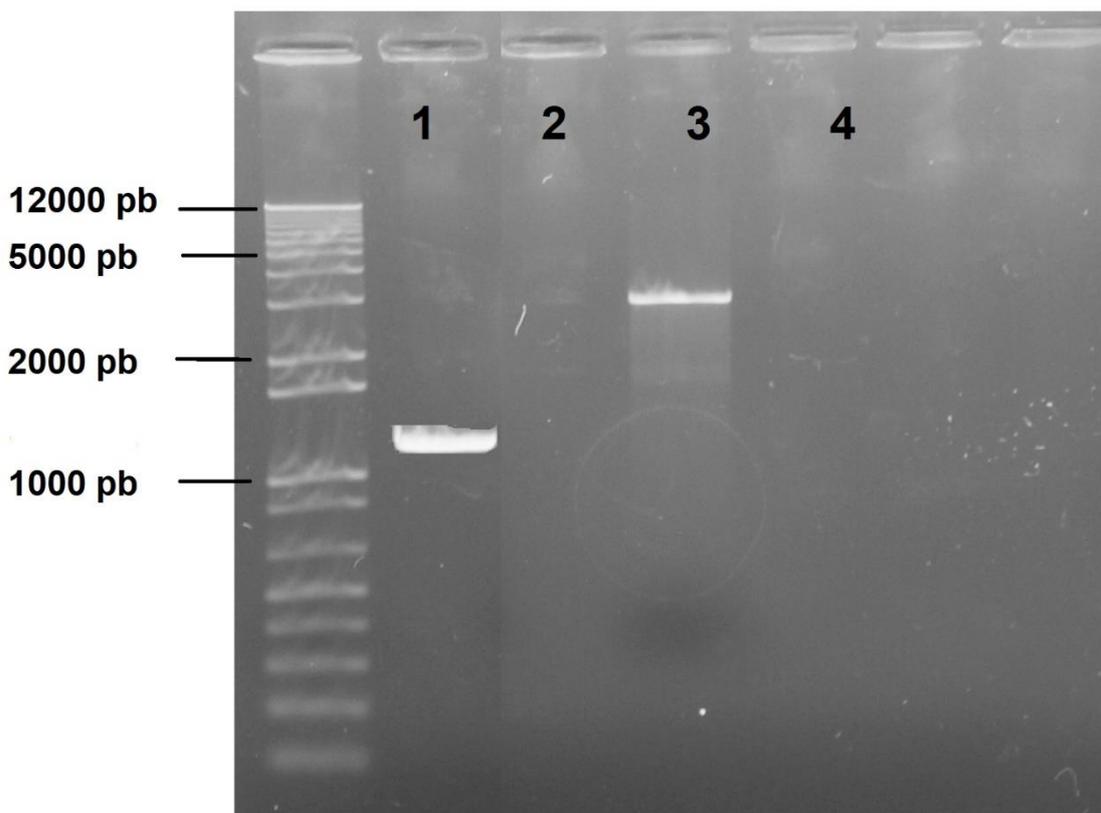


Figura 19. Análise em gel de agarose da direcionalidade do gene *hasA* na cepa BAP-Int13. À esquerda da foto poço contendo o marcador de peso 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen). Poço 1 mostra a PCR do plasmídeo pKlac-AB-Int13 (usado como controle) com os Oligonucleotídeos Iniciadores 1 e 3; Poço 2 mostra a PCR do plasmídeo pKlac-AB-Int13 (usado como controle) com os Oligonucleotídeos Iniciadores 1 e 2; Poço 3 mostra a PCR do DNA genômico da cepa BAP-Int13 com os Oligonucleotídeos Iniciadores 1 e 2; Poço 4 mostra a PCR do DNA genômico da cepa BAP-Int13 com os Oligonucleotídeos Iniciadores 1 e 3.

Em estudo muito semelhante com a utilização da mesma Integrase-13 em células de *O. polymorpha* produtoras de AH (cepa EMB103), houve uma síntese de AH de 197,76 µg/mL de AH sugerindo que a enzima Integrase conseguiu realizar a troca de sentido do gene *hasA*, porém não houve diferença significativa entre esta cepa EMB103 e uma cepa sem a presença de integrases (EMB102) que produziu 151,20 µg/mL de AH (Manfrão-Netto *et al.* 2021).

Na cepa BAP-Int13, o gene da Integrase foi colocado sob controle do promotor LAC4. Como já discutido na introdução deste trabalho, alguns estudos já mostraram que o gene da enzima β-galactosidase foi ativado em níveis basais mesmo na ausência do indutor em meio de cultura contendo glicose (Flores *et al.* 2000; Spohner *et al.* 2016). A partir disto, é hipotetizado que a glicose presente nas pré-culturas ou no início da fermentação da cepa BAP-Int13 foi responsável por ativar a expressão do gene da

Integrase 13, responsável por colocar os genes *hasA* e *hasB* em posições de ativação desde o momento da coleta da amostra.

4.4 Análise de fluxo metabólico com carbono marcado $^{13}\text{C}_6$

De modo a realizar a análise dos fluxos metabólitos de *K. lactis* e sua relação com o metabolismo de AH, neste estudo a cepa BAP foi crescida em Bioreator em batelada contendo meio YNB como descrito na Seção 3.24. O perfil de crescimento da cepa no biorreator é apresentado na Figura 20 .

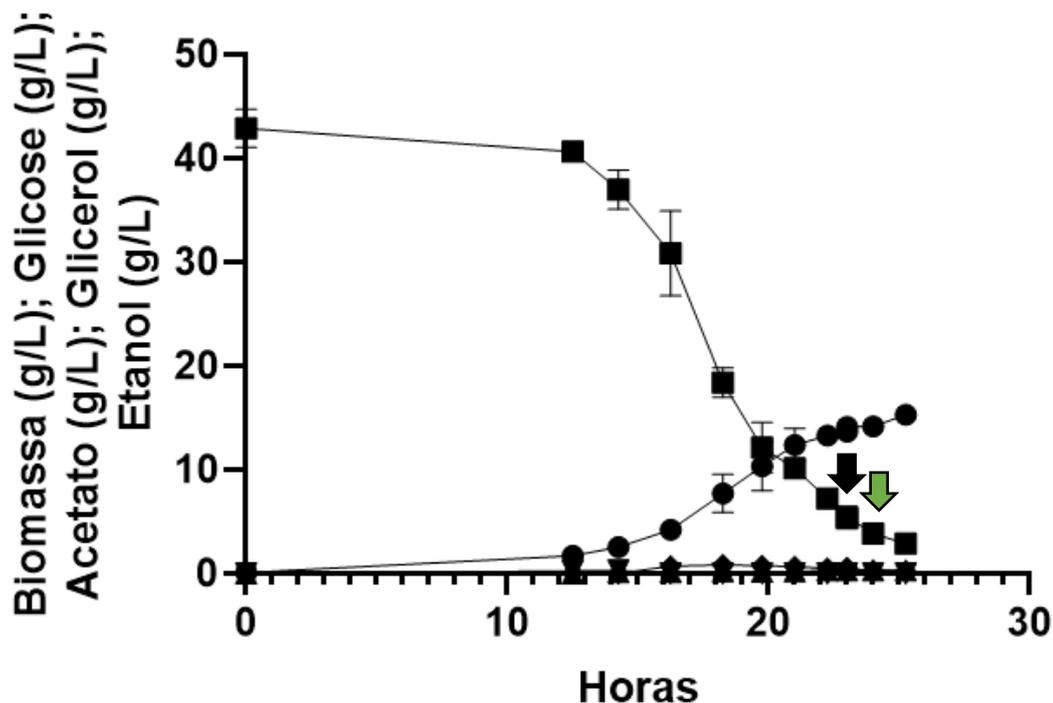


Figura 20. Perfil de crescimento da cepa BAP após crescimento em Bioreator em batelada em meio YNB. A seta preta indica o ponto no qual foi aplicado um pulso de glicose contendo carbono $^{13}\text{C}_6$ marcado no biorreator a uma concentração final de 10% em relação à glicose total contida no meio. A seta verde indica o ponto coletado para análise dos metabólitos intracelulares e extracelulares e utilizados na análise de fluxo metabólico. Resultados obtidos de média de duplicata biológica. ● representa Biomassa; ■ representa glicose; ▼ representa glicerol; ▲ representa acetato e ◆ representa etanol.

Os dados de crescimento, rendimentos e produção de AH obtidos a partir desta batelada estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Dados de taxa de crescimento máxima (μ_{MAX}), Biomassa final (g/L); Ácido Hialurônico produzido (g/L), além dos rendimentos de glicerol, acetato e biomassa obtidos do crescimento das células em batelada em meio YNB pela cepa BAP de *K. lactis*.

μ_{MAX} (h^{-1})	Biomassa Final (g/L)	AH (g/L)	$Y_{\text{Glicerol/Glc}}$	$Y_{\text{Acetato/Glc}}$	$Y_{\text{Biomassa/Glc}}$
$0,2671 \pm 0,05$	$15,7 \pm 3,8$	$0,3 \pm 0,3$	$0,02 \pm 0,01$	$0,006 \pm 0,001$	$0,47 \pm 0,06$

Como observado nos resultados acima, houve uma produção de AH pela cepa BAP, porém sem significância estatística e muito menor que os obtidos em bateladas realizadas com o mesma cepa em meio não definido YPD (1.89 g/L) (V. Gomes *et al.* 2019). Como já mostrado em estudos anteriores com cepas de *S. zooepidemicus* a utilização de meios complexos resulta em uma melhor produção de AH (Chen *et al.* 2012), porém devido a razões ainda não elucidadas.

Antes dos cálculos dos fluxos metabólicos, foi realizada uma análise da composição da biomassa de *K. lactis*, de forma a fornecer dados mais robustos para as análises do software. Os resultados da análise elementar dos principais constituintes de biomassa da cepa BAP estão apresentados na Figura 20.

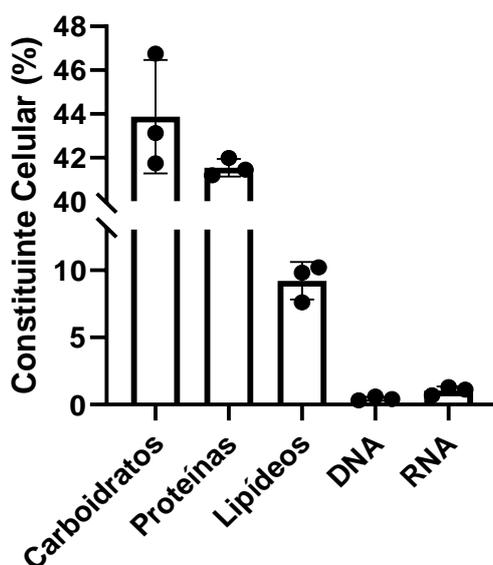


Figura 21. Composição elementar da cepa BAP de *K. lactis*

Os resultados da composição de biomassa estão de acordo com outros resultados obtidos em leveduras, como em *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*) (Carnicer *et al.* 2009).

Os fluxos medidos a partir da utilização de glicose com carbono $^{13}\text{C}_6$ marcado para todas as reações de *K. lactis* estão representados no Anexo 8 e os principais valores de fluxos relacionados com a síntese de AH estão sumarizados no mapa metabólico da Figura 22.

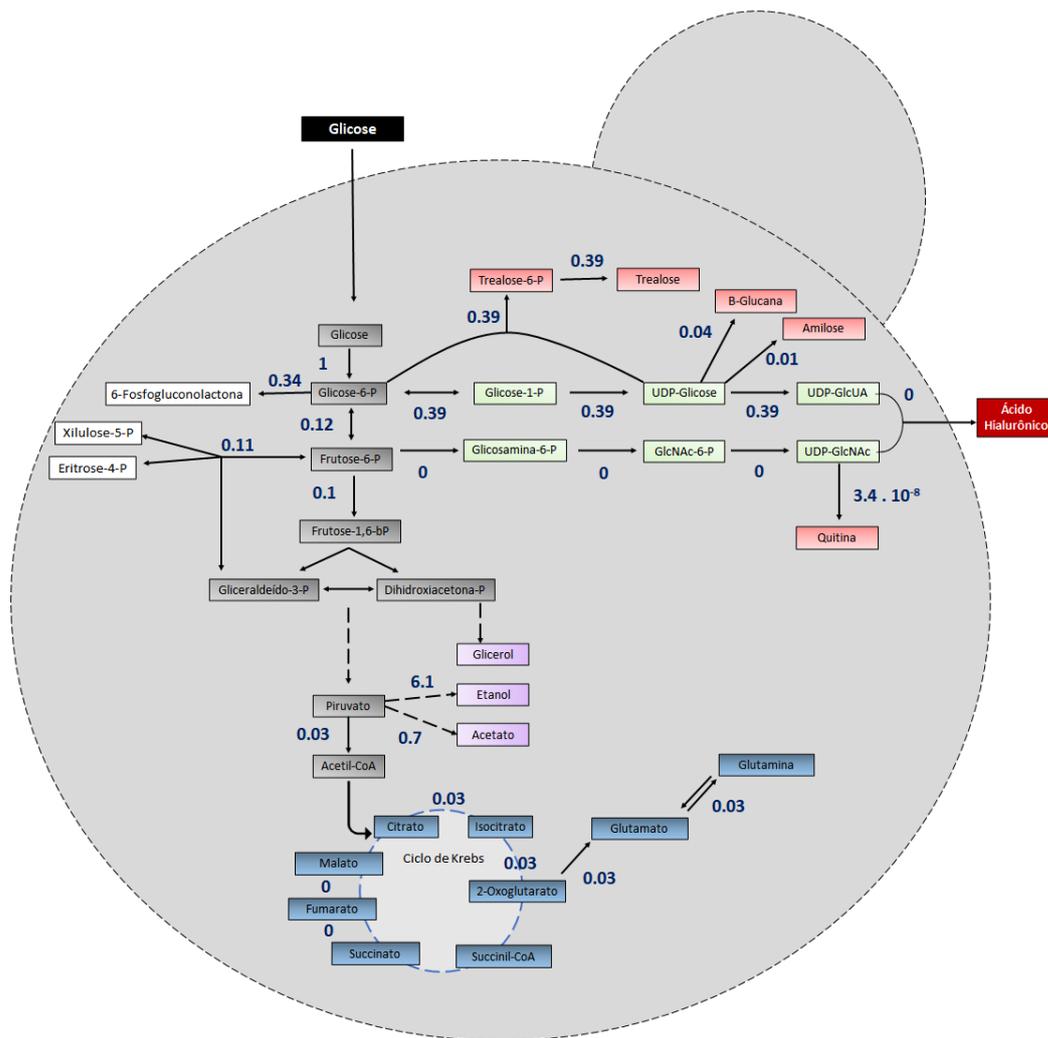


Figura 22. Análise de fluxo metabólico dos metabólitos intracelulares da cepa BAP após 24 horas de crescimento em meio YNB em crescimento em batelada determinados por GC-MS. Os dados foram obtidos após utilização de glicose contendo carbono marcado. Os valores de fluxos estão determinados como porcentagem considerando a entrada de glicose na célula como 100%, ou 1.

Embora tenham sido obtidos resultados para as principais reações estudadas, durante a análise estatística não foi possível averiguar os intervalos de confiança de cada fluxo. O software utilizado para a análise (13cflux2) acusou grandes variações estatísticas durante os cálculos, o que sugere insuficiência na quantidade de dados experimentais suplementados ou construção incoerente do modelo metabólico. Os fluxos obtidos demonstram a grande competição que ocorre por carbono para a síntese dos precursores do AH, como uma distribuição similar de fluxos pelas reações que sequestram carbono da glicólise no nodo de glicose-6-fosfato. Além disso, também há ausência de fluxos no ciclo do Ciclo de Krebs, o que é impossível uma vez que a levedura foi analisada durante condição aeróbica. Por fim, a via de produção de um dos precursores de AH está sem fluxo o que sugere uma impossibilidade na produção do

polímero, no entanto, a cepa produziu AH (Tabela 18), o que reforça mais uma vez a necessidade de mais dados experimentais para tornar o modelo mais robusto.

Em um resultado concordante com os obtidos pela análise do nível de transcritos (Figura 13), foram obtidos valores muito baixos próximos de 0 nos fluxos dos metabólitos competidores com a síntese de AH (1,3-β-D-Glucana, Amilose e Quitina). Apenas a síntese de trealose apresentou valores um pouco mais altos de fluxo (39%), porém, como já discutido nos resultados da cepa BAP $\Delta tps1$, a trealose pode não ser uma competidora com a síntese de AH por estar envolvida com outros processos fisiológicos na célula.

K. lactis é uma levedura com efeito Crabtree negativo e não produz etanol em condições aeróbias, no entanto, como mostrado em prévio estudo (V. Gomes *et al.* 2019) a cepa BAP é capaz de produzir etanol durante a síntese de AH, o que explica a presença de fluxos (6,1%) para etanol nesta cepa. Como discutido na introdução deste trabalho, vários estudos sugerem que em *K. lactis* existe uma maior dependência pela metabolização da glicose através da via das pentoses fosfato (Tarrío *et al.* 2005, 2006), o que explica os valores de fluxo obtidos nos nodos da glicose-6-P (34%) e frutose-6-P (12%) que se ligam à VPF.

Estes resultados sugerem que, embora em *K. lactis* exista um fluxo para a síntese dos 2 precursores do AH, esta síntese pode ser melhorada através de estratégias que envolvam o desvio de carbono da glicólise para a síntese de AH, por exemplo, através de super expressões dos genes que codificam as enzimas UDP-Glicose Pirofosforilase (Glicose-1-P \rightarrow UDP-Glicose) e Frutose-6-P Amidotransferase (Frutose-6-P \rightarrow Glicosamina-6-P).

Ainda, é importante salientar que uma das premissas que precisam ser respeitadas para a realização de uma AFM está na consideração de que a célula em estudo está em estado estável de crescimento, ou seja, que durante a análise a célula está mantendo uma taxa constante de consumo e produção de seus metabólitos. Idealmente, AFMs são realizados em fermentadores com operação contínua (quimiostatos), que são capazes de assegurar esse estado celular. Neste estudo, a AFM foi realizada a partir de um crescimento em batelada alimentada, o que também pode explicar a baixa confiança obtida nos dados. Estudos posteriores realizados em quimiostato e com mais replicatas biológicas são necessários.

A partir do conjunto de dados obtidos (Morais 2020) e mostrados no Anexo 8, foram realizados testes *in silico* para a determinação de possíveis reações limitantes da

síntese de AH. De todas as deleções realizadas, apenas 2 destas resultaram em um aumento considerável (>10%) no fluxo da síntese de AH. A primeira reação foi a produção de biomassa, cuja deleção aumentou em 62% a síntese de AH. A segunda reação foi a reação de manutenção de ATP celular, cuja deleção aumentou em 22% a síntese de AH. Ambos os resultados foram esperados já que a síntese de AH é um processo celular que compete diretamente com o crescimento celular e exige muita energia na forma de ATP como comprovado em estudos prévios (Yoshimura *et al.* 2015).

Finalmente, também foram feitas análises *in silico* de deleções não apenas de genes únicos, mas de fluxos metabólicos inteiros para uma avaliação do impacto disto na síntese de AH. A avaliação da repressão da glicólise (Figura 23) e da via das pentoses fosfato (Figura 24) estão representadas a seguir:

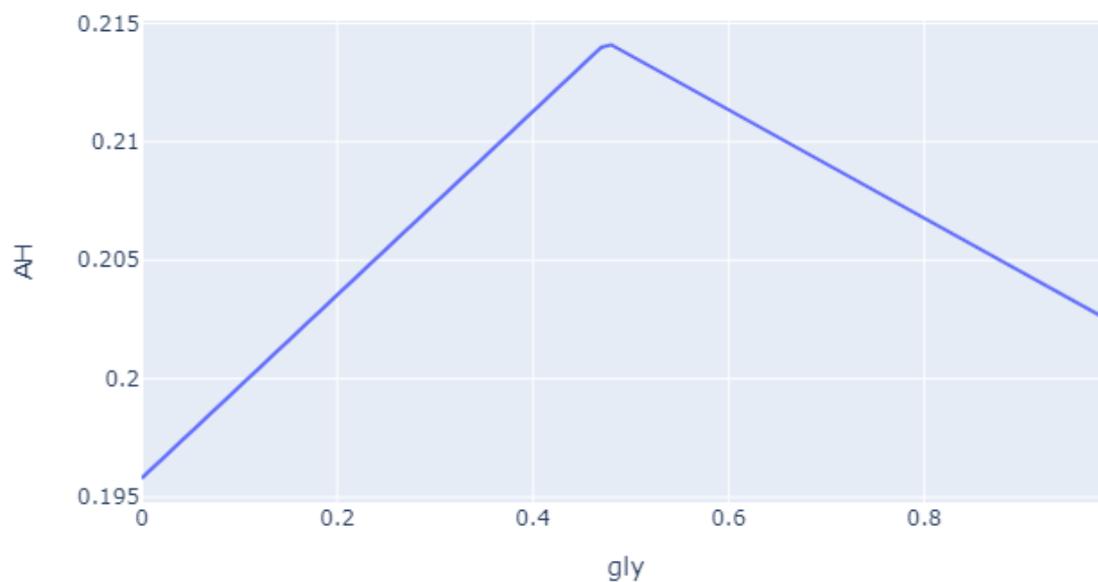


Figura 23. Impacto das mudanças do fluxo da glicólise (gly) no fluxo da síntese de ácido hialurônico, ambos os fluxos estão $\text{mmol}\cdot\text{gDw}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

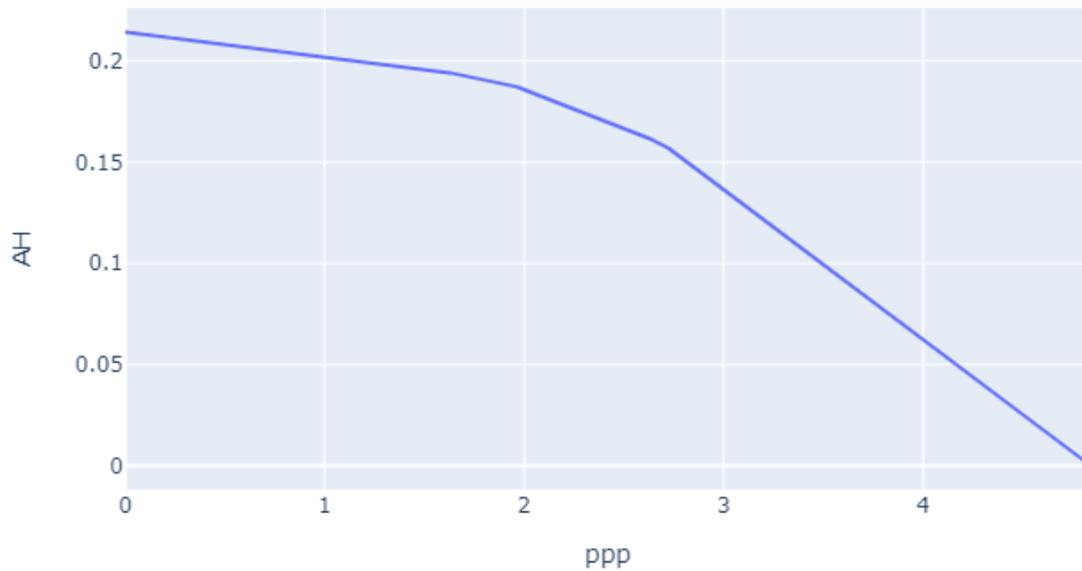


Figura 24. Impacto das mudanças do fluxo da via das pentoses fosfato (ppp) no fluxo da síntese de ácido hialurônico, ambos os fluxos estão $\text{mmol}\cdot\text{gDw}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Como visto na Figura 23, níveis de fluxo da glicólise muito altos ou muito baixos não resultam na melhor síntese de AH. Este resultado pode ser explicado pois a glicólise é utilizada pela levedura para crescimento e geração de energia. Fluxos muito baixos podem acarretar na morte da célula e inviabilidade da síntese de AH e fluxos muito altos ocasionam um desvio do fluxo de carbono da síntese de AH. Já em relação à via das pentoses fosfato (Figura 24), é indicado que quanto maior o fluxo para esta via menor o fluxo da síntese de AH, já que esta funciona como uma via competidora.

5. Conclusões e Perspectivas

Após o desenvolvimento de cepas microbianas geneticamente modificadas produtoras de AH, diversos estudos vêm usando estratégias de engenharia metabólica e biologia sintética para o melhoramento desta produtividade.

Neste estudo, a cepa BAP não foi capaz de sintetizar AH em valores maiores que o obtido pelo trabalho original (V. Gomes *et al.* 2019). Porém os resultados aqui presentes indicam algumas limitações nessa cepa, podendo servir de base para melhorar a produção de AH nesse organismo.

A cepa BAP com o gene da trealose deletado (BAP- $\Delta tps1$) não conseguiu produzir mais AH que a cepa parental provavelmente devido à trealose não possuir valores de fluxo altos suficientes para serem considerados como limitantes para a síntese de AH. Ainda, a trealose é considerada uma molécula associada mais com funções regulatórias na célula do que com funções de consumo para obtenção de energia. Finalmente, estudos de fisiologia de *K. lactis* são escassos na literatura e estudos anteriores com a disrupção do gene *tps1* apresentaram resultados contraditórios (Luyten *et al.* 1993) com os apresentados aqui.

Os resultados obtidos com a cepa contendo o gene da enzima Integrase-13 também não serviram para um melhoramento da síntese de AH. Porém, a estratégia envolvendo a enzima Integrase pode ser melhor utilizada em estudos posteriores para o controle de genes envolvidos com a competição da síntese de AH, como os genes responsáveis pela Quitina Sintase ou de alguns intermediários da glicólise. A utilização de uma estratégia contendo Integrase para a ativação/inativação da Quitina Sintase ou outro metabólito envolvido com a síntese de parede celular, por exemplo, pode aumentar a síntese de AH desacoplando de uma forma mais eficiente a síntese de biomassa da síntese de AH. Esta estratégia pode ser eficiente considerando que uma completa inativação (disrupção) do gene da Quitina Sintase, por exemplo, pode matar a célula e deixá-la não viável devido ao afrouxamento da parede celular.

Os valores dos níveis de transcrição obtidos neste estudo também mostraram que os metabólitos usados na síntese de parede não são grandes competidores com a síntese de AH, mas que, considerando níveis de transcrição semelhantes com níveis de tradução, existe uma grande limitação nas enzimas que conectam os nodos da glicólise com a síntese dos 2 precursores (UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc). De modo a superar este problema, estratégias envolvendo a super-expressão dos genes que conectam a via da glicólise com a via de síntese de UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc podem ser utilizadas de modo a desviar o fluxo de uma forma mais eficiente para esta síntese.

Este estudo também foi o primeiro a realizar uma análise de fluxo metabólico em uma levedura produtora de AH e um dos primeiros na literatura a realizar análise de fluxo em *K. lactis*, bem como uma análise elementar de suas células. A partir destes resultados também foi possível observar que existe uma limitação da síntese de AH ocasionada por um fluxo insuficiente de carbono para os ramos de síntese dos 2 precursores UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc a partir da glicólise. Estratégias envolvendo por exemplo o uso de Integrases para a supressão de genes da glicólise ou de síntese de constituintes de parede celular podem ser aplicadas para um melhoramento da síntese de AH em estudos posteriores. Uma alternativa é também a inserção de novas cópias dos genes *hasA* na cepa BAP, tanto de classe II como de classe II.

Diversas outras estratégias podem também ser utilizadas para um melhoramento da síntese de AH na cepa BAP, não apenas envolvendo a adição ou deleção de genes, mas também envolvendo mudanças durante o crescimento das células. Em bactérias, estresses ocasionados na célula por temperaturas altas de crescimento ou adição de antibióticos tendem a gerar células capazes de produzir AH com cadeias maiores.

6. Publicações Relevantes

Dentre os artigos científicos publicados durante este trabalho estão: (1) o trabalho envolvido na descrição e caracterização do AH produzido pela cepa BAP de *K. lactis* e o (2) trabalho envolvido na descrição dos resultados da deleção do gene da trealose (*tps1*) em *K. lactis*. Ambos os trabalhos estão apresentados, respectivamente, nos Anexos 9 e 10.

7. Referências

- Afsharifar A, Virology P, Taghavi SM *et al.* Heterologous production of Hyaluronic Acid in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing a human Hyaluronan synthase 2. **2**:1–18.
- Agarwal G, Krishnan K V., Prasad SB *et al.* Biosynthesis of Hyaluronic acid polymer: Dissecting the role of sub structural elements of hyaluronan synthase. *Sci Rep* 2019;**9**, DOI: 10.1038/s41598-019-48878-8.
- Amazon.com: 120 mg Hyaluronic Acid Rooster Comb Extract, Made from Injuv Rooster Comb Extract (270) : Health & Household.
- Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 2012;**33**:366–9.
- Badour SS. Novel hyaluronic acid produced from algae. 1999.
- Badri A, Raman K, Jayaraman G. Uncovering novel pathways for enhancing hyaluronan synthesis in recombinant *Lactococcus lactis*: Genome-scale metabolic modeling and experimental validation. *Processes* 2019;**7**:1–14.
- Balazs EA, Denlinger JL. Viscosupplementation: A new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1993;**20**:3–9.
- Beinhauer J, Hegemann JH, Heck S *et al.* A New Efficient Gene Disruption Cassette for Repeated Use in Budding Yeast. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:2519–24.
- Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 1962;**4**:330–4.
- Blank LM, Hugenholtz P, Nielsen LK. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci. *J Mol Evol* 2008;**67**:13–22.
- Blank LM, Lehmbeck F, Sauer U. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* 2005;**5**:545–58.
- Bonekamp FJ, Oosterom J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* - A review. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;**41**:1–3.
- Brown WRA, Lee NCO, Xu Z *et al.* Serine recombinases as tools for genome engineering. *Methods* 2011;**53**:372–9.
- Bulawa CE. CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 1992;**12**:1764–76.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002;**29**:23–39.
- Calos MP. The phiC31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2006;**6**:633–45.
- Canelas AB, Ras C, ten Pierick A *et al.* Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. *Metabolomics* 2008;**4**:226–39.
- Carnicer M, Baumann K, Töplitz I *et al.* Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microb Cell Fact* 2009;**8**, DOI: 10.1186/1475-2859-8-65.
- Carroll D, Elbein AD, Pan Y *et al.* New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 2003;**13**:17R.
- Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol - Head Neck Surg* 2001;**124**:607–14.
- Chen WY, Marcellin E, Steen J a. *et al.* The Role of Hyaluronic Acid Precursor Concentrations in Molecular Weight Control in *Streptococcus zooepidemicus*. *Mol Biotechnol* 2013:1–10.
- Chen YH, Li J, Liu L *et al.* Optimization of flask culture medium and conditions for hyaluronic acid production by a *streptococcus equisimilis* mutant NC2168. *Brazilian J Microbiol* 2012;**43**:1553–61.
- Cheng F, Gong Q, Yu H *et al.* High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant

- Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol J* 2016;**11**:574–84.
- Cheng F, Luozhong S, Guo Z *et al*. Enhanced Biosynthesis of Hyaluronic Acid Using Engineered *Corynebacterium glutamicum* Via Metabolic Pathway Regulation. *Biotechnol J* 2017.
- Cheng F, Yu H, Stephanopoulos G. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab Eng* 2019, DOI: 10.1016/j.ymben.2019.07.003.
- Chien L-J, Lee C-K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007a;**77**:339–46.
- Chien LJ, Lee CK. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnol Prog* 2007b;**23**:1017–22.
- China Ce Beauty Filler 1ml 2ml Ha Gel Price Cross Linked Hyaluronic Acid Injection Buy Injectable Dermal Filler - China High Quality Hyaluronic Acid, Dermal Filler.
- DeAngelis PL. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. *Biochemistry* 1996;**35**:9768–71.
- DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *J Biol Chem* 1993a;**268**:14568–71.
- DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 1993b;**268**:19181–4.
- Denlinger JL, El-Mofty AAM, Balazs EA. Replacement of the liquid vitreous with sodium hyaluronate in monkeys: II. Long-term evaluation. *Exp Eye Res* 1980;**31**:101–17.
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 2010;**50**:227–30.
- Dias O, Pereira R, Gombert AK *et al*. iOD907, the first genome-scale metabolic model for the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol J* 2014;**9**:776–90.
- Dougherty B a., Van De Rijn I. Molecular characterization of hasA from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. *J Biol Chem* 1994;**269**:169–75.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK *et al*. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 1956;**28**:350–6.
- Essendoubi M, Gobinet C, Reynaud R *et al*. Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy. *Ski Res Technol* 2016;**22**:55–62.
- Flores CL, Gancedo C, Petit T. Disruption of *yarrowia lipolytica* TPS1 gene encoding trehalose-6-P synthase does not affect growth in glucose but impairs growth at high temperature. *PLoS One* 2011;**6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0023695.
- Flores CL, Rodríguez C, Petit T *et al*. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 2000;**24**:507–29.
- Fogg PCM, Colloms S, Rosser S *et al*. New applications for phage integrases. *J Mol Biol* 2014;**426**:2703–16.
- FOLLETT AE. Preparation and some properties of hyaluronic acid from umbilical cord of the pig. *J Biol Chem* 1948;**176**:177–84.
- Ghazi K, Deng-Pichon U, Warnet JM *et al*. Hyaluronan Fragments Improve Wound Healing on In Vitro Cutaneous Model through P2X7 Purinoreceptor Basal Activation: Role of Molecular Weight. *PLoS One* 2012;**7**, DOI: 10.1371/journal.pone.0048351.
- Gietz BRD, Woods RA, Peg DNA. [4] Transformation of Yeast by Lithium Acetate / Single-Stranded Carrier DNA / Polyethylene Glycol Method. 2002;**350**:87–96.
- Goffrini P, Wésolowski-Louvel M, Ferrero I. A phosphoglucose isomerase gene is involved in the Rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *MGG Mol Gen Genet* 1991;**228**:401–9.
- V. Gomes AM, C. M. Netto JH, Carvalho LS *et al*. Heterologous Hyaluronic Acid Production in *Kluyveromyces lactis*. *Microorganisms* 2019;**7**:294.
- Gonzalez B, François J, Renaud M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 1997;**13**:1347–56.

- Graves M V, Burbank DE, Roth R *et al.* Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella-like green algae. *Virology* 1999;**257**:15–23.
- Green MR, Sambrook J. The hanahan method for preparation and transformation of competent *Escherichia coli*: High-efficiency transformation. *Cold Spring Harb Protoc* 2018;**2018**:183–90.
- Groth AC, Calos MP. Phage integrases: Biology and applications. *J Mol Biol* 2004;**335**:667–78.
- Haas BJ, Zody MC. Advancing RNA-Seq analysis. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:421–3.
- Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 1978;**90**:420–6.
- Haward w. Robinson CGH. The biuret reaction in the determination of serum proteins. *J Chem Inf Model* 2013;**53**:1689–99.
- Heldermon C, DeAngelis PL, Weigel PH. Topological organization of the hyaluronan synthase from *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 2001;**276**:2037–46.
- Hmar RV, Prasad SB, Jayaraman G *et al.* Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (has) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis*. *Biotechnol J* 2014;**9**:1554–64.
- Hohmann S, Neves MJ, de Koning W *et al.* The growth and signalling defects of the ggs1 (fdp1/byp1) deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase PII. *Curr Genet* 1993;**23**:281–9.
- Hounsa C-G, Brandt E V., Thevelein J *et al.* Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 1998;**144**:671–80.
- Huang G, Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv* 2018;**25**:766–72.
- Itano N, Kimata K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 1996;**271**:9875–8.
- Itano N, Kimata K. Mammalian Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life* 2002a;**1**:195–9.
- Jeong E, Shim WY, Kim JH. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *J Biotechnol* 2014a;**185**:28–36.
- Jia Y, Zhu J, Chen X *et al.* Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. *Bioresour Technol* 2013;**132**:427–31.
- Jin P, Kang Z, Yuan P *et al.* Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metab Eng* 2016;**35**:21–30.
- Jing W, De Angelis PL. Dissection of the two transferase activities of the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase: Two active sites exist in one polypeptide. *Glycobiology* 2000;**10**:883–9.
- Jong A, Wu CH, Chen HM *et al.* Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryot Cell* 2007;**6**:1486–96.
- Jules M, Beltran G, François J *et al.* New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Appl Environ Microbiol* 2008;**74**:605–14.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K *et al.* Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2002;**26**:239–56.
- Kumari K, Weigel PH. Identification of a membrane-localized cysteine cluster near the substrate-binding sites of the *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase. *Glycobiology* 2005;**15**:529–39.
- Leonardo JM, Bhairi SM, Dickson RC. Identification of upstream activator sequences that regulate induction of the beta-galactosidase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Cell Biol* 1987;**7**:4369–76.
- Lesage G, Bussey H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;**70**:317–43.

- Létoffé S, Nato F, Goldberg ME *et al.* Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol Microbiol* 1999;**33**:546–55.
- Li H, Sharp R, Rutherford K *et al.* Serine Integrase attP Binding and Specificity. *J Mol Biol* 2018;**430**:4401–18.
- Li Y, Shi Z, Shao Y *et al.* Temperature-controlled molecular weight of hyaluronic acid produced by engineered *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett* 2021;**43**:271–7.
- Lillie SH, Pringle JR. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol* 1980;**143**:1384–94.
- Liu L, Liu Y, Li J *et al.* Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact* 2011;**10**:99.
- Longas MO, Russell CS, He XY. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr Res* 1987;**159**:127–36.
- Lu JF, Zhu Y, Sun HL *et al.* Highly efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* R42 derived from heterologous expression of bacterial haemoglobin and mutant selection. *Lett Appl Microbiol* 2016;**62**:316–22.
- Luyten K, De Koning W, Tesseur I *et al.* Disruption of the *Kluyveromyces lactis* GGS1 gene causes inability to grow on glucose and fructose and is suppressed by mutations that reduce sugar uptake. *Eur J Biochem* 1993;**217**:701–13.
- M. L, M. F, Y. L *et al.* Capsular hyaluronic acid of *cryptococcus neoformans* contributes to fungal invasion across the alveolar-capillary interface. *Int J Infect Dis* 2014;**21**:282.
- Manfrão-Netto JHC, Queiroz EB, Rodrigues KA *et al.* Evaluation of *ogataea (Hansenula) polymorpha* for hyaluronic acid production. *Microorganisms* 2021;**9**:1–16.
- Mao Z, Chen RR. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium sp.* *Biotechnol Prog* 2007;**23**:1038–42.
- Mao Z, Shin HD, Chen R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;**84**:63–9.
- McCann AK, Barnett JA. The utilization of starch by yeasts. *Yeast* 1986;**2**:109–15.
- Merrick CA, Zhao J, Rosser SJ. Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology. *ACS Synth Biol* 2018;**7**:299–310.
- De Mey M, Lequeux G, Maertens J *et al.* Comparison of DNA and RNA quantification methods suitable for parameter estimation in metabolic modeling of microorganisms. *Anal Biochem* 2006;**353**:198–203.
- Morais DG. Análise de Fluxo Metabólico em cepa de *Kluyveromyces lactis* produtora de ácido hialurônico. 2020.
- Müllegger J, Lepperdinger G. Hyaluronan is an abundant constituent of the extracellular matrix of *Xenopus* embryos. *Mol Reprod Dev* 2002;**61**:312–6.
- Naumov GI. Domestication of dairy yeast *Kluyveromyces lactis*: Transfer of cluster of genes of β -galactosidase (LAC4) and lactose permease (LAC12). *Dokl Akad Nauk* 2005;**401**:279–81.
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P *et al.* Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet Med (Praha)* 2008;**53**:397–411.
- Nicola DF. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Rockefeller Inst Med Res* 1955.
- de Oliveira JD, Carvalho LS, Gomes AMV *et al.* Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microb Cell Fact* 2016;**15**:119.
- Paalman JWG, Verwaal R, Slofstra SH *et al.* Trehalose and glycogen accumulation is related to the duration of the G1 phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2003;**3**:261–8.
- Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol* 2012;**4**:253–8.
- Pelkonen S, Lindahl SB, Suomala P *et al.* Transmission of *streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans. *Emerg Infect Dis* 2013;**19**:1041–8.
- Prasad SB, Jayaraman G, Ramachandran KB. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Appl*

- Microbiol Biotechnol* 2010;**86**:273–83.
- Pummill PE, Achyuthan AM, Deangelis PL. Enzymological Characterization of Recombinant *Xenopus* DG42, A Vertebrate Hyaluronan Synthase. *Biochemistry* 1998;**273**:4976–81.
- Purvis JE, Yomano LP, Ingram LO. Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:3761–9.
- Reed RK, Lilja K, Laurent TC. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol Scand* 1988;**134**:405–11.
- Reinders A, Romano I, Wiemken A *et al.* The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol* 1999;**181**:4665–8.
- Rodicio R, Heinisch JJ. Yeast on the milky way: Genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 2013;**30**:165–77.
- Rosa CS da, Hoelzel SC, Viera VB *et al.* Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. *Ciência Rural* 2008;**38**:2593–698.
- Ruzzi M, Breunig KD, Ficca a G *et al.* Positive regulation of the beta-galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the GAL upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1987;**7**:991–7.
- Salani F, Bianchi MM. Production of glucoamylase in pyruvate decarboxylase deletion mutants of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;**69**:564–72.
- dos Santos AM. Regulação do transporte de lactose em *Kluyveromyces lactis* JA6. 2013.
- Saranraj P, Sivakumar, Sivasubramanian J *et al.* Production, Optimization And Spectroscopic Studies Of Hyaluronic Acid Extracted From *Streptococcus pyogenes*. *Int J Pharm Biol Arch* 2011;**2**:954–9.
- Schmut O. A method for the purification of bovine vitreous body hyaluronic acid. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1981;**673**:192–6.
- Severo C, Rosa D, Freire A *et al.* Purification and characterization of hyaluronic acid from chicken combs. *Ciência Rural* 2012;**42**:1682–7.
- Shah M V., Badle SS, Ramachandran KB. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochem Eng J* 2013;**80**:53–60.
- Sheng JZ, Ling PX, Zhu XQ *et al.* Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: A case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer. *J Appl Microbiol* 2009;**107**:136–44.
- Shiedlin A, Bigelow R, Christopher W *et al.* Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules* 2004;**5**:2122–7.
- Siuti P, Yazbek J, Lu TK. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nat Biotechnol* 2013;**31**:448–52.
- Spohner SC, Schaum V, Quitmann H *et al.* *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol* 2016;**222**:104–16.
- Stark. The Serine Recombinases. *Mob DNA III* 2014:73–89.
- T. C L, J. R. E F. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992;**6**:2397–2404.
- Tarrío N, Becerra M, Cerdán ME *et al.* Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 2006;**6**:371–80.
- Tarrío N, Díaz Prado S, Cerdán ME *et al.* The nuclear genes encoding the internal (KINDI1) and external (KINDE1) alternative NAD(P)H:ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2005;**1707**:199–210.
- Thomason LC, Calendar R, Ow DW. Gene insertion and replacement in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by the *Streptomyces* bacteriophage ϕ C31 site-specific recombination system. *Mol Genet Genomics* 2001;**265**:1031–8.
- Timoney JF. The pathogenic equine streptococci. *Vet Res* 2004;**35**:397–409.

- Tlapak-Simmons VL, Baggenstoss BA, Kumari K *et al.* Kinetic characterization of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. *J Biol Chem* 1999;**274**:4246–53.
- Tlapak-Simmons VL, Kempner ES, Baggenstoss BA *et al.* The active streptococcal hyaluronan synthases (HASS) contain a single HAS monomer and multiple cardiolipin molecules. *J Biol Chem* 1998;**273**:26100–9.
- Vigetti D, Ori M, Viola M *et al.* Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis. *J Biol Chem* 2006;**281**:8254–63.
- Vital CE, Giordano A, de Almeida Soares E *et al.* An integrative overview of the molecular and physiological responses of sugarcane under drought conditions. *Plant Mol Biol* 2017;**94**:577–94.
- Volpi N, Schiller J, Stern R *et al.* Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem* 2009;**16**:1718–45.
- Wang Y, Hu L, Huang H *et al.* Eliminating the capsule-like layer to promote glucose uptake for hyaluronan production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun* 2020;**11**, DOI: 10.1038/s41467-020-16962-7.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:57–63.
- Ward PN, Field TR, Ditcham WGF *et al.* Identification and disruption of two discrete loci encoding hyaluronic acid capsule biosynthesis genes hasA, hasB, and hasC in *Streptococcus uberis*. *Infect Immun* 2001;**69**:392–9.
- Westbrook A, Ren X, Oh J *et al.* Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. *Metab Eng* 2018, DOI: S1096717617304081.
- Widner B, Dollen S Von, Tang M *et al.* Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:3747–52.
- Wolfgang W. *13C Metabolic Flux Analysis.*, 2001.
- Xu B, Pei X, Su Y *et al.* Capsule of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* hampers the adherence and invasion of epithelial and endothelial cells and is attenuated during internalization. *FEMS Microbiol Lett* 2016;**363**, DOI: 10.1093/femsle/fnw164.
- Yang L, Nielsen AAK, Fernandez-Rodriguez J *et al.* Permanent genetic memory with >1-byte capacity. *Nat Methods* 2014;**11**:1261–6.
- Yoshimura T, Shibata N, Hamano Y *et al.* Heterologous production of hyaluronic acid in an ϵ -Poly-L-Lysine producer, *Streptomyces albulus*. *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**:3631–40.
- Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab Eng* 2008;**10**:24–32.
- Zachariae W, Kuger P, Breunig KD. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator LA1C9 (K1GAL4). *Nucleic Acids Res* 1993;**21**:69–77.
- Zheng Y, Cheng F, Zheng B *et al.* Enhancing single-cell hyaluronic acid biosynthesis by microbial morphology engineering. *Synth Syst Biotechnol* 2020;**5**:316–23.

8. Anexos

Anexo 1

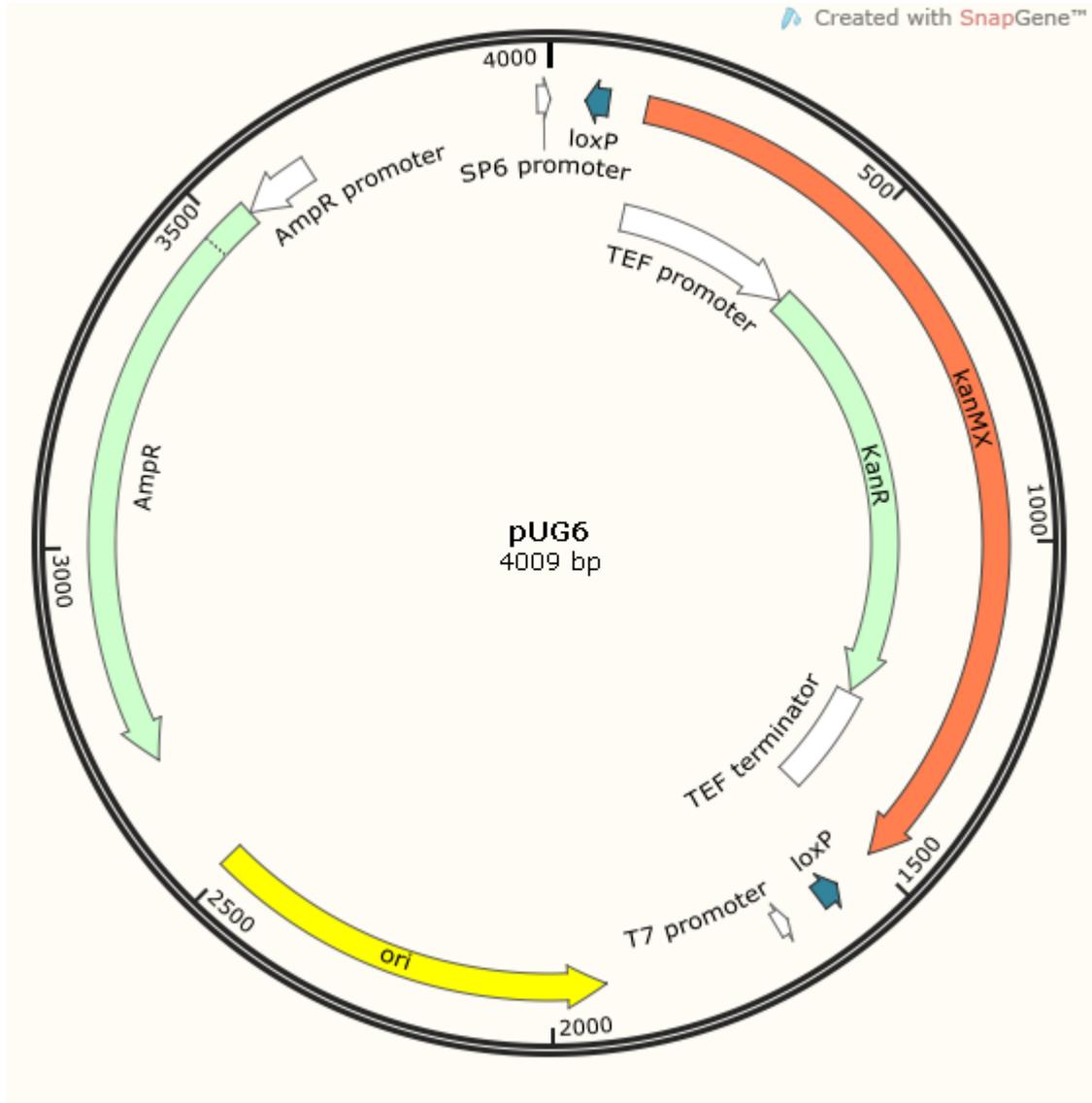


Figura 25. Mapa do Plasmídeo pUG6.

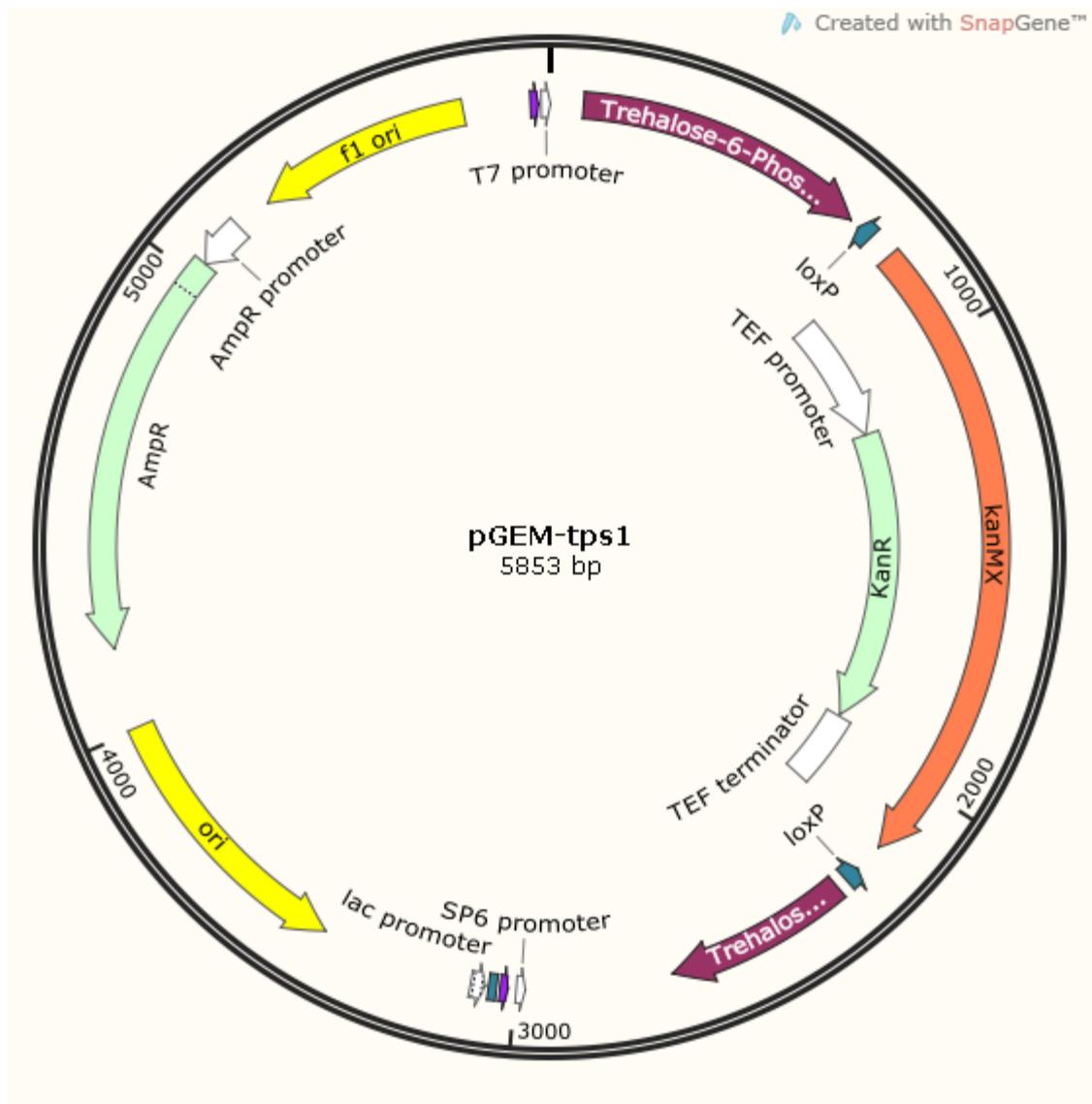


Figura 26. Mapa do plasmídeo pGEM-tps1.

Anexo 3

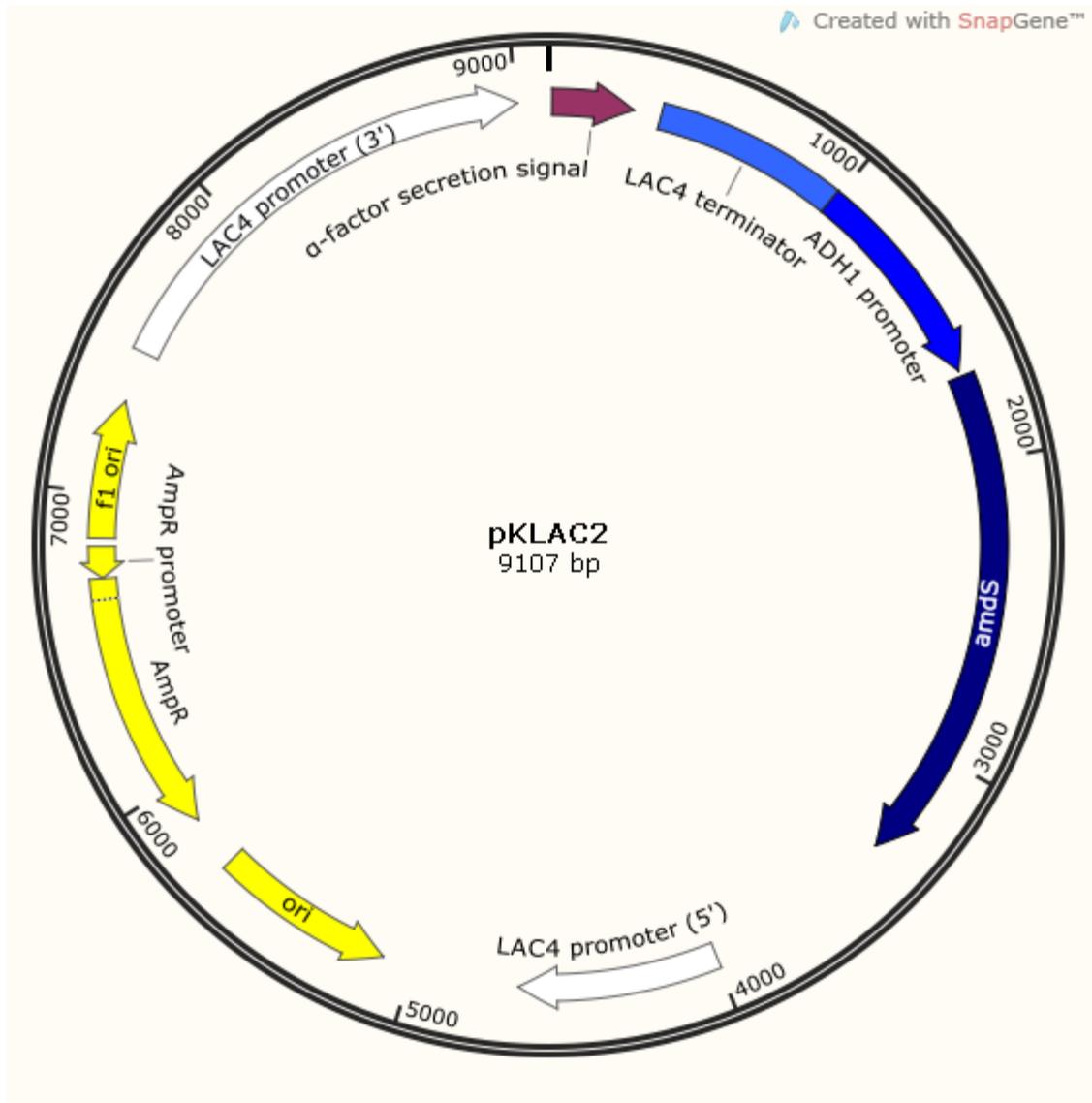


Figura 27. Mapa do plasmídeo pKlac2.

Anexo 4

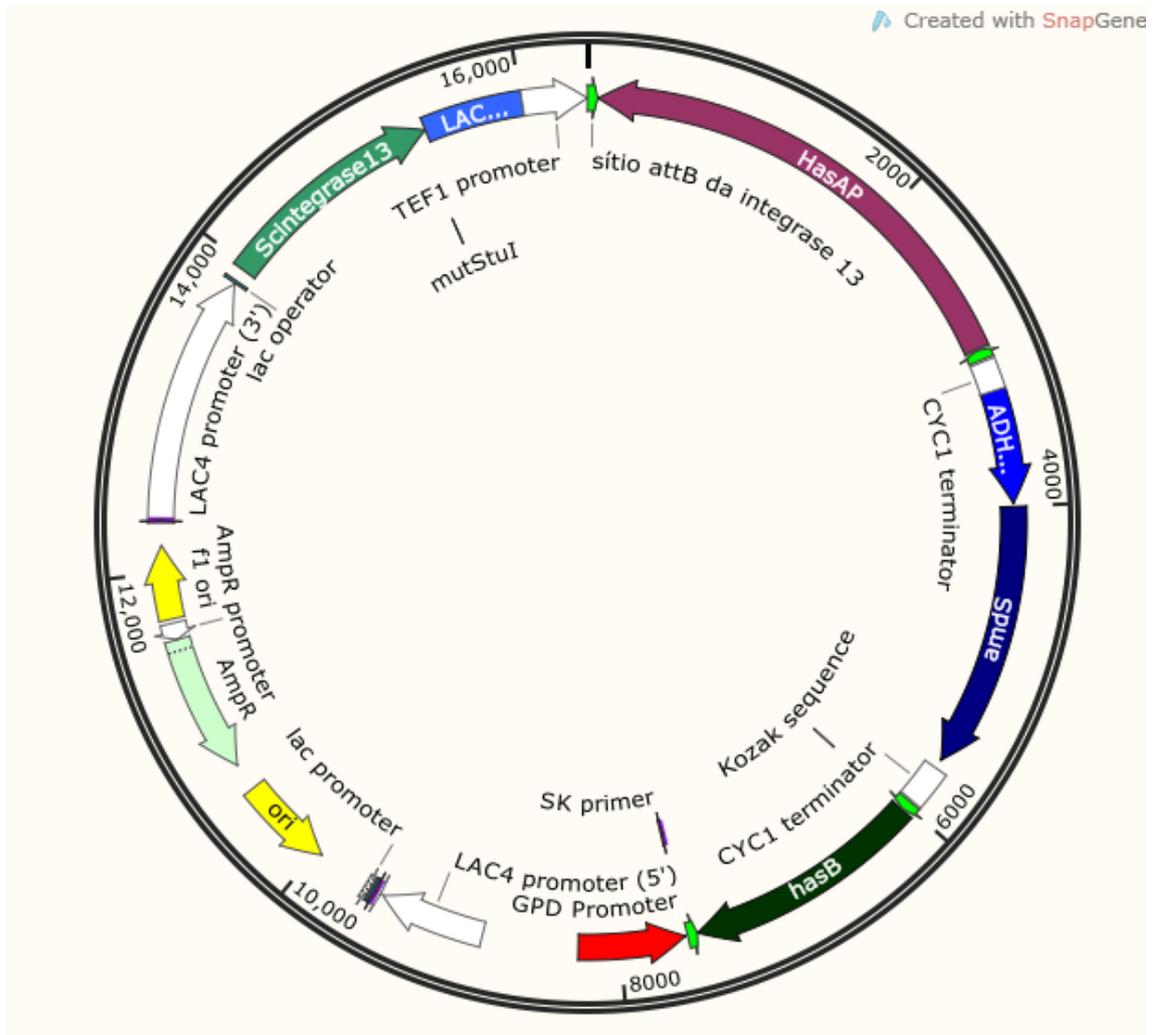


Figura 28. Mapa do plasmídeo pKlac-AB-Int13

Anexo 5

Tabela 19. Sequências attB e attP reconhecidas pela Integrase utilizadas neste estudo. Em vermelho estão destacados os sítios de clivagem. Sequência originária de *Bacillus cytotoxicus* cepa NVH 391-98. Número NCBI: YP_001376196.

Sítio attP	CGCATACATTGTTGTTGTTTTCCAGAT CCAGTTG GTCCTGTAAATATAAGCAATCCATGTGAGT
Sítio attB	CAATAACGGTTGTATTTGTAGAACTGA CCAGTTG TTTTAGTAACATAAATACAACCTCCGAATA

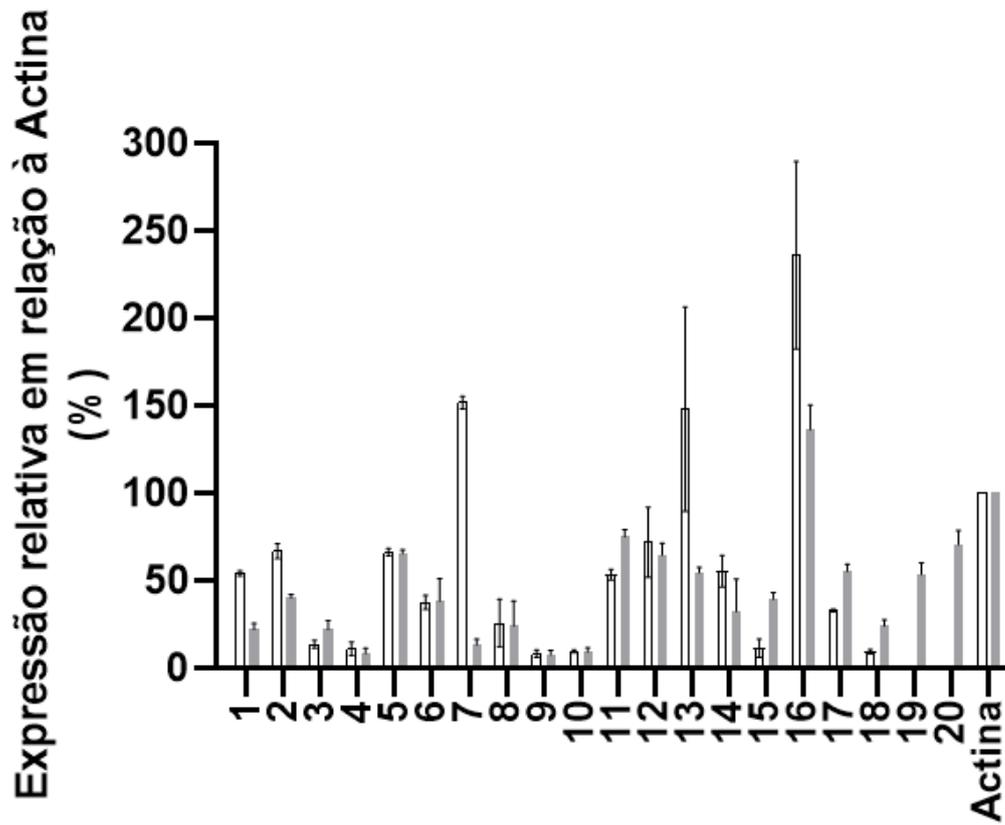


Figura 29. Expressão relativa dos transcritos dos 20 genes analisados neste estudo em relação à actina. Caixas brancas simbolizam os valores obtidos por RNA-Seq e caixas cinzas simbolizam os valores obtidos por RT-qPCR. Dados obtidos a partir de triplicata biológica.