



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Biologia Celular**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

# **Processos microbianos para obtenção de lovastatina e ácido hialurônico.**

**Kelly Assis Rodrigues**

**Brasília**

**2022**

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

Kelly Assis Rodrigues

***Processos microbianos para obtenção de lovastatina e ácido hialurônico.***

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

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Skorupa Parachin

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Costa Paes

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação da professora Dra. Nádia Skorupa Parachin, Co-orientação Prof. Dr. Hugo Costa Paes e com apoio financeiro do CNPq.

**Banca Examinadora**

Professora Dra. Nádia Skorupa Parachin  
Universidade de Brasília  
Presidente da Banca

Professora Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola  
Universidade de Brasília  
Membro Efetivo

Dr. Felix Gonçalves de Siqueira  
EMBRAPA  
Membro Efetivo

Dr. Antônio Milton Vieira Gomes  
BIOBREYER  
Membro Efetivo

Dra. Nadielle Tamires Moreira Melo Umpierre  
Membro Suplente

Esse trabalho é dedicado a todos os sobreviventes da pós-graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora Nádia Skorupa Parachin pelos 9 anos de aprendizado e confiança no meu trabalho. Serei sempre grata, você foi a primeira professora a me dar uma oportunidade em seu laboratório e foi quem me guiou quando eu mais precisei. Acho que você nem imagina o quanto impactou na minha vida, o quanto me inspirou e o quanto eu te admiro. Agradeço ao meu Co-orientador por todo o apoio e ensinamentos nessa reta final do doutorado, você foi um professor que aprendi a admirar. Queria ter tido coragem de puxar assunto com você há mais tempo.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial a Nadielle, são 9 anos de companheirismo nessa jornada acadêmica e ao João Heitor e Enzo, que dividiram comigo todos os perrengues de tentar fazer uma levedura produzir ácido hialurônico. Obrigada a Lyvia e ao Otávio, por todas as conversas e por todas as coisas que me ensinaram. A Ana Caroline, que foi uma boa companhia de laboratório nessa reta final.

Agradeço a minha família que sempre foi minha base para suportar tudo, em especial ao meu filho Bernardo, que sempre me mostra que tenho que continuar tentando mesmo quando tudo em mim grita para desistir.

Agradeço as professoras Ildinete, Larissa, João Alexandre e Élide por disponibilizarem seus laboratórios e seus equipamentos para que esse trabalho fosse realizado. Ao CNPq e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular por todo apoio financeiro e estrutural.

Agradeço a banca examinadora, Dr. Felix, Dra. Patrícia, Dr. Milton e Dra. Nadielle, por se disporem a avaliar esse trabalho. Tempo é algo valioso que nem todo mundo está disposto a doar um pouco.

E por último, agradeço ao Dr. Alexandre, o psicólogo do CAEP-UnB que me acompanha desde o mestrado e tem me ensinado a como tornar a vida possível. Sem seu acompanhamento eu já teria desistido a muito tempo.

<b>SUMÁRIO</b>	
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>14</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>LISTA DE ARTIGOS</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>21</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
1.1 Estatinas .....	22
1.2 Biossíntese de lovastatina e grupamento de genes.....	23
1.3 Regulação da biossíntese de lovastatina .....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>34</b>
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos .....	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 Materiais .....	35
4.2 Metodologia .....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.1 Produção de lovastatina e identificação molecular de isolados brasileiros .....	46
5.2 Montagem do genoma .....	49
5.3 Genômica comparativa do grupamento de biossíntese de lovastatina .....	51
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>57</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>58</b>
1.1 <i>Ogataea polymorpha</i> , características e aplicações .....	58

1.2	Promotores de <i>O. polymorpha</i> .....	60
1.3	Ácido Hialurônico .....	61
1.4	Biossíntese de AH.....	62
1.5	Fontes de obtenção do AH.....	65
1.6	Processos de Purificação de AH.....	66
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>71</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>72</b>
3.1	Objetivo Geral.....	72
3.2	Objetivos Específicos .....	72
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
4.1	Materiais .....	73
4.2	Metodologias.....	81
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>88</b>
5.1	Construção de cepas produtoras de AH.....	88
5.2	Cultivo e caracterização do crescimento de cepas produtoras de AH.....	88
5.3	Purificação de AH .....	92
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsio
ACP	Proteína transportadora de acil
AH	Ácido Hialurônoco
AT	Aciltransferase
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
CON	Condensação
CP450	Citocromo P450
CPC	cloreto de cetilpiridínio
CRISPRi	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats interference
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônia
DH	deidratase
DML	diidromonacolina L
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ER	Enoilreductase
FAE	Formamida e EDTA
FDA	Food and Drug Administration
g	grama
g/L	grama por litro
GRAS	Geralmente Considerado Seguro
HCl	Ácido clorídrico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
kDa	quilo Dalton
KR	cetoreductase
KS	ceto-sintase
KPI	Kunitz-type protease inhibitor
LDKS	Lovastatina Dicitídeo Sintase
LNKS	Lovastatina Nanocetídeo Sintase
M	Molar



Mf	Massa final
mg/L	miligrama por litro
Mi	massa inicial
mL	mililitro
mM	milimolar
MSF	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MT	metiltransferase
m/z	Massa/carga
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
ng	nanograma
nM	nanomolar
ORF	<i>Open reading frame</i>
OD	Densidade óptica
p/p	peso/peso
p/v	peso/volume
pb	pares de base
PCR	Polymerase chain reaction
pDHAS	promotor Dihidroxiacetona sintase
pFMD	promotor Formaldeído desidrogenase
PKA	Proteína quinase A
PKS	Policetídeo sintase
pMol	picomolar
pMOX	promotor metanol oxidase
QS	sensoriamento de quórum
RCC	Repressão Catabólica de carbono
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive oxygen species
SAM	S -adenosilmetionina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLS	Lauril sulfato de sódio
SmF	Submerged fermentation

SSF	<i>Solid state fermentation</i>
SOB	Super Optimal Broth
TE	tioesterases
TFA	Ácido Trifluoroacético
U	Unidade
UDP	Difosfato de uridina
uL	microlítro
Um	micromolar
UTP	Trifosfato de uridina
v/v	volume/volume
YPD	Yeas extract, peptone and dextrose
YPG	Yeas extract, peptone and glycerol
YPL	Yeas extract, peptone and lactose
YPM	Yeas extract, peptone and methanol

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diversidade morfológica dos fungos. Fontes: profissaobiotec.com.br; ANOFEL e <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/os-fungos.htm>. ..... 18
- Figura 2. Estatinas e Biossíntese de Colesterol. (A) Estrutura química de uma estatina evidenciando a semelhança entre o anel B-hidroxilactona e a molécula de HMG-CoA. (B) Exemplos de estruturas moleculares de estatinas, natural, sintética e semissintética. (C) Representação da via de biossíntese de colesterol..... 22
- Figura 3. Biossíntese de lovastatina. (A) Grupamento gênico de produção de lovastatina. Em amarelo estão os genes que codificam proteínas envolvidas com o mecanismo de resistência (ORF8) e transporte (ORF10) de lovastatina, em cinza genes com função não confirmada, em azul são genes que codificam PKSs, em verde genes que codificam enzimas auxiliares e outras enzimas envolvidas na síntese de lovastatina e em laranja estão os genes que codificam reguladores. (B) Esquematisação da via de síntese de lovastatina indicando os genes envolvidos em cada etapa e qual tipo de domínios está sendo usado na reação. (C) Esquematisação das PKSs evidenciando seus domínios e das demais enzimas indicando que tipo de reação ela catalisa. KS= cetosíntase; AT= Aciltransferase; DH= desidratase; MT= metiltransferase; ER= enoli redutase; KR= cetoreductase; ACP= Proteína transportadora de acil; C= Condensação; TE= tioesterase..... 27
- Figura 4. Mapa de localização dos amplicons gerados pelos oligonucleotídeos iniciadores para elucidar ausências observadas na montagem do grupamento da lovastatina. .... 46
- Figura 5. Quantificação por HPLC de lovastatina entre 35 *Aspergillus* sp. brasileiros e a cepa de referência ATCC 20542. Todos os experimentos foram realizados com três repetições biológicas. (\*) Cepas que tiveram o genoma sequenciado. .... 47
- Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança obtida com base na análise concatenada dos fragmentos gênicos de ITS,  $\beta$ -tubulina e calmodulina. As cepas analisadas se encaixaram em cinco ramos principais das espécies de *Aspergillus* da seguinte forma: *A. terreus*, *A. hortai*, *A. neoafricanus*, *A. alabamensis* e *A. aureoterreus*. Dentro de *A. terreus*, três clados

monofiléticos diferentes foram encontrados e nomeados como A, B e C. Os clados destacados são suportados por $\geq 70$ bootstraps ultrarrápidos e $\geq 70$ valores do tipo Shimodaira – Hasegawa.....	48
Figura 7. Correlação entre o grupo filogenético e a produção média de lovastatina. (*) $p > 0,01$ ; (**) $p < 0,01$ .....	49
Figura 8. Blocos sintéticos e polimorfismos genéticos no agrupamento de genes de lovastatina. A porcentagem de identidade de nucleotídeos entre o as regiões biossintéticas são codificadas por cores de cinza (50%) a azul (100%). A porcentagem de similaridade de aminoácidos é indicada como um gradiente de cor variando de 70 a 100%, como mostrado pela tecla colorida do lado direito.....	52
Figura 9. Regiões que foram elucidadas por meio de PCR. Os blocos em azul indicam os fragmentos que foram amplificados.....	53
Figura 10. <i>Ogataea polymorpha</i> . Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 5500 vezes. Fonte: esse trabalho.....	59
Figura 11. Estrutura molecular de uma unidade de dissacarídeo que compõe a molécula de ácido hialurônico, formada por uma molécula de ácido glucurônico e uma molécula de N-Acetil-glicosamina. Fonte: esse trabalho. ....	61
Figura 12. Via de biossíntese de AH em bactéria, evidenciando os possíveis desvios de metabólitos intermediários para utilização em outras vias. Adaptado de (Marcellin et al., 2014). ....	64
Figura 13. Esquematização da construção das cepas EMB 101, EMB 102 e EMB 104. ....	83
Figura 14. Descrição das cepas utilizadas com seus respectivos esquemas de promoção. As cepas EMB 102 e EMB 104 têm um gene induzível (setas vermelhas) e outro constitutivo (setas verdes); e a cepa EMB 103 têm ambos constitutivos.....	88
Figura 15. Perfil de crescimento (quadrado) e de produção de AH (losango) das cepas EMB 102 (A), EMB 103 (B) e EMB 104 (C), comparadas com a cepa NCYC495 (círculo). As setas indicam os tempos em que as culturas foram induzidas com metanol.....	90
Figura 16. Dados de crescimento. (A) velocidade de crescimento das cepas construídas comparando-as com a da cepa NCYC495 obtidas a partir da	

equação linear da reta, em que apenas a cepa EMB 103 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). (B) OD obtida ao final de cada crescimento, onde para as cepas EMB 102 e EMB 104, houve uma diferença significativa (\*) quando comparada a cepa NCYC495. Já a cepa EMB 103 não apresentou diferença significativa na OD ao final do cultivo se comparada a NCYC495 ( $p < 0,05$ ). 91

Figura 17. (A) Título de AH quantificado após cada protocolo de purificação, em que I foi o primeiro protocolo e II, o segundo, resultando no aumento do AH recuperado para as cepas EMB 103 e EMB 104. A cepa EMB 102 não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ). (B) Título de AH da cepa EMB 103 após o tratamento com diferentes detergentes, utilizando-se o primeiro protocolo de purificação: não se observou diferença estatística significativa entre eles..... 93

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1. Cepas avaliadas nesse trabalho.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação molecular das cepas. pb= pares de base.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na elucidação das regiões com baixa cobertura do genoma.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 4. Métricas do sequenciamento completo do genoma das oito cepas.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 5. Dados estatísticos sobre a montagem do genoma.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 6. Grau de pureza de AH obtido em diversos processos de purificação. O grau de pureza é dado pela pureza relativa do AH obtido ou pelo percentual de proteína quantificado ao final do processo.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 7. Descrição das cepas utilizadas nesse trabalho especificando seus genótipos.....</b>	<b>77</b>
<b>Tabela 8. Lista de vetores e plasmídeos utilizados nesse trabalho.....</b>	<b>78</b>
<b>Tabela 9. Lista de oligonucleotídeos iniciadores detalhando sua sequência, sítio de restrição inserido e temperatura de anelamento.....</b>	<b>79</b>
<b>Tabela 10. Lista de antibióticos.....</b>	<b>80</b>

## RESUMO

O uso de microrganismos para produção de biomoléculas vem despertando cada vez mais o interesse comercial. Durante o desenvolvimento desse trabalho, dois processos microbianos foram avaliados para produção de lovastatina e ácido hialurônico. A lovastatina é uma biomolécula produzida naturalmente por alguns fungos, com destaque para *Aspergillus terreus*. Ela atua como inibidor competitivo da 3-hidróxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma enzima chave da via de colesterol, contribuindo para a redução da hipercolesterolemia. Como o Brasil possui uma vasta biodiversidade, avaliou-se a produção de lovastatina em fungos do gênero *Aspergillus* isolados em território brasileiro, assim como a diversidade genômica destes fungos. Com isso identificou-se uma cepa a URM 5961, que apresentou uma produção de 0,6 g/L e alto grau de identidade genômica com a cepa referência ATCC 20542, que produz cerca de 1,0 g/L de lovastatina. O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero que pode ser produzido naturalmente por animais e alguns microrganismos. Por conta de suas características reológicas como viscosidade alta, higroscopicidade e biocompatibilidade, o AH é muito utilizado em tratamentos oftalmológicos, preenchimento facial e na formulação de cosméticos. A obtenção de AH de fontes naturais era originalmente a partir de tecido animal, como crista de galo ou, por bioprodução por bactérias patogênicas do gênero *Streptococcus*, mas estas fontes vêm sendo substituídas por produção heteróloga em outros microrganismos, como *Bacillus subtilis*. A levedura *Ogataea polymorpha* vem ganhando espaço como organismo para expressão heteróloga este trabalho se propôs a investigar seu potencial como hospedeira para a biossíntese de AH. Para este fim foram geradas três cepas, a EMB 102, EMB 103 e EMB 104, que se diferenciam quanto aos promotores utilizados para guiar os genes introduzidos. Confirmou-se a capacidade de *O. polymorpha* de produzir AH, onde a cepa EMB 103 apresentou uma produção de 0,8 mg/mL. Esses resultados abrem caminho para futuras investigações a fim de melhorar a produção desses compostos.

## ABSTRACT

The use of microorganisms to produce biomolecules has aroused increasing commercial interest. During the development of this work, two microbial processes were evaluated to produce lovastatin and hyaluronic acid. Lovastatin is a biomolecule produced naturally by some fungi, especially *Aspergillus terreus*. It acts as a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) reductase, a key enzyme in the cholesterol pathway, contributing to the reduction of hypercholesterolemia. As Brazil has a vast biodiversity, the production of lovastatin in fungi of the genus *Aspergillus* isolated in Brazilian territory was evaluated, as well as the genomic diversity of these fungi. Thus, a strain was identified, URM 5961, which presented a production of 0.6 g/L and high degree of genomic identity with the reference strain ATCC 20542, which produces about 1.0 g/L of lovastatin. Hyaluronic acid (HA) is a biopolymer that can be naturally produced by animals and some microorganisms. Due to its rheological characteristics such as high viscosity, hygroscopicity and biocompatibility, HA is widely used in ophthalmological treatments, facial fillers and in the formulation of cosmetics. Obtaining HA from natural sources was originally from animal tissue, such as rooster comb or, through bioproduction by pathogenic bacteria of the genus *Streptococcus*, but these sources have been replaced by heterologous production in other microorganisms, such as *Bacillus subtilis*. The yeast *Ogataea polymorpha* has been gaining ground as an organism for heterologous expression, this work aimed to investigate its potential as a host for the biosynthesis of AH. For this purpose, three strains were generated, EMB 102, EMB 103 and EMB 104, which differ in terms of the promoters used to guide the introduced genes. The ability of *O. polymorpha* to produce HA was confirmed, where the EMB 103 strain presented a production of 0.8 mg/mL. These results open the way for future investigations to improve the production of these compounds.



## LISTA DE ARTIGOS

Essa dissertação é baseada nos seguintes artigos:

Rodrigues, K. A.; Rocha, R. T.; Mulinari, F. F.; Guedes, A. V.; Teixeira, M. M.; Motta, D. O.; Fernandes, L.; Magalhães, B. S.; Felipe, M. S. S.; Pappas Jr., G. J.; Parachin, N. S. **Exploring the Brazilian diversity of *Aspergillus* sp. strains for lovastatin and itaconic acid production.** Fungal Genetics and Biology. v. 138, p. 103367, 2020.

**Contribuições:** prospecção das cepas, geração das sequencias para identificação molecular dos isolados, preparação de material para sequenciamento de genoma, redação do manuscrito e validação de dados.

Manfrão-Netto, J.H., Queiroz, E.B., Rodrigues, K.A., Coelho, C.M., Paes, H.C., Rech, E.L., Parachin, N.S.. **Evaluation of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* for Hyaluronic Acid Production.** Microorganism. 2021.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020312>

**Contribuições:** Construção dos plasmídeos e das cepas, purificação e a quantificação das amostras de Ácido Hialurônico, redação do manuscrito e validação de dados.

## INTRODUÇÃO

A relação dos fungos com os seres humanos começou antes mesmo de sua descoberta com o consumo de bebidas e alimentos fermentados, depois com a descoberta de que eram eles a causa de algumas doenças, mas foi com a descoberta da penicilina em 1928 que deu início à pesquisa de substâncias produzidas por fungos capazes de atuar como antibióticos (Yin et al., 2016). Além disso, os fungos despertam interesse biotecnológico por serem capazes de crescer em meios de baixa complexidade e custo, e de produzir e secretar uma grande variedade de enzimas, metabólitos secundários e pigmentos (Mueller and Schmit, 2007).

Fungos são microrganismos com notório potencial biotecnológico, de grande relevância ecológica e com relação estreita com os seres humanos. Esses microrganismos ocupam uma grande variedade de nichos, estando presente no solo, no ar, sobre a vegetação em decomposição, em alimentos e nas plantas (Gugnani, 2003). Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies, mas apenas 5% delas sejam conhecidas (Hawksworth, 1991). Os fungos são eucariotos capazes de existir em diferentes formas, podem ser unicelulares como as leveduras ou ter suas células organizadas em hifas que formam um emaranhado de filamentos chamado de micélio, que podem formar estruturas conhecidas como orelha de pau, cogumelos e bolores (Figura 1).



Figura 1. Diversidade morfológica dos fungos. Fontes: [profissaobiotec.com.br](http://profissaobiotec.com.br); ANOFEL e <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/os-fungos.htm>.

Os cogumelos são considerados fungos macroscópicos que possuem propriedades medicinais e nutricionais, utilizadas desde muito tempo atrás no combate de hemorragias, cólicas e outras enfermidades (Bononi et al., 1995). Os fungos filamentosos são importantes por seu papel ecológico na ciclagem de nutrientes além disso, são aplicados em processos industriais para a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e outros compostos de grande potencial biotecnológico (Adrio and Demain, 2003). Dentre os fungos filamentosos, o filo Ascomycota detém a maioria das espécies utilizada industrialmente, onde destacam-se aos gêneros *Monascus*, *Penicillium*, *Hypomyces*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Eupenicillium*, *Gymnoascus*, *Trichoderma* e *Aspergillus* (Abreu et al., 2015).

O gênero *Aspergillus* foi inicialmente registrado em 1729 pelo biólogo Pier Antonio Micheli (Ainsworth, 1976). Este gênero se destaca por sua relevância biotecnológica e na saúde, pois espécies como *A. flavus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus* são notórios causadores de infecções e intoxicações em humanos e animais (Suryanarayanan et al., 2009; Takahashi and Lucas, 2008). Outras espécies, como *A. terreus*, *A. orizae* e *A. niger* vêm sendo utilizados industrialmente, tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica, principalmente com o estabelecimento de ferramentas de manipulação genética para fungos, que permitiu que estas espécies sejam usadas para a produção de proteínas recombinantes (Sharma et al., 2009; Wang et al., 2005). Dentre elas, *A. terreus* é a principal espécie explorada para a produção de lovastatina, uma estatina natural muito utilizada na indústria farmacêutica (Mulder et al., 2015).

Já as leveduras são os fungos unicelulares mais utilizados industrialmente, principalmente na fermentação em larga escala para obtenção de bebidas alcoólicas, pães e etanol (Abreu et al., 2015). Com os avanços no desenvolvimento de técnicas de manipulação genética, as leveduras passaram a serem utilizadas como “fábricas celulares” para a produção heteróloga de proteínas e metabólitos como pigmentos, antibióticos, lipídeos e oligossacarídeos (Adrio and Demain, 2003). A levedura mais bem estudada e mais aplicada industrialmente é a *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na fabricação de pães e bebidas alcólicas (Abreu et al., 2015). Também possui ferramentas de manipulação genética muito bem estabelecidas, o que a torna um microrganismo modelo para expressão heteróloga de proteínas e produção de outras moléculas

de interesse biotecnológico (Abreu et al., 2015). No entanto outras leveduras vêm ganhando destaque como as leveduras metilotróficas *Komagataella phaffii* e *Ogataea polymorpha* e leveduras do leite como *Kluyveromyces lactis* e *K. marxianus* (Wagner and Alper, 2016).

Esses microrganismos podem ser aplicados em diversos processos para conversão de matéria e vem sendo utilizados como bioindicadores de qualidade de solo (Abreu et al., 2015; Santos et al., 2018). Por essa razão, diversos grupos vêm trabalhar no desenvolvimento de novas rotas de produção com base em microrganismos visando o desenvolvimento de processos que sejam economicamente viáveis e ecologicamente sustentáveis (Almeida et al., 2015).

Nesse trabalho foi avaliada a aplicação de fungos em dois processos para obtenção de biomoléculas de alto valor agregado. No primeiro foi realizado uma bioprospecção em cepas de *Aspergillus* sp. isoladas em território brasileiro em busca de uma cepa com potencial para produção de lovastatina. Além disso, realizou-se uma comparação a nível genômico para entender melhor as bases da biossíntese desse metabólito, concentrada no grupamento de genes relacionados a síntese de lovastatina. Já no segundo foi avaliada a capacidade da levedura *O. polymorpha* como hospedeira da via de síntese de ácido hialurônico, utilizando três combinações diferentes de promoção constitutiva e indutiva.

# CAPÍTULO I

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Estatinas

Estatinas são moléculas utilizadas como fármacos que atuam como inibidor competitivo da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase diminuindo assim os níveis de colesterol do organismo, pois a conversão de HMG-CoA em mevalonato é uma das primeiras etapas da biossíntese de colesterol (Figura 2C) (Barrios-González and Miranda, 2010). As estatinas possuem um anel  $\beta$ -hidroxilactona que é similar à estrutura da HMG-CoA, permitindo-lhe atuar como um inibidor (Figura 2A). As estatinas podem ser produzidas de forma natural, como a lovastatina; semissintética, como a sinvastatina e sintética, como a atorvastatina, a fluvastatina e a rosuvastatina (Figura 2B) (Manzoni and Rollini, 2002).

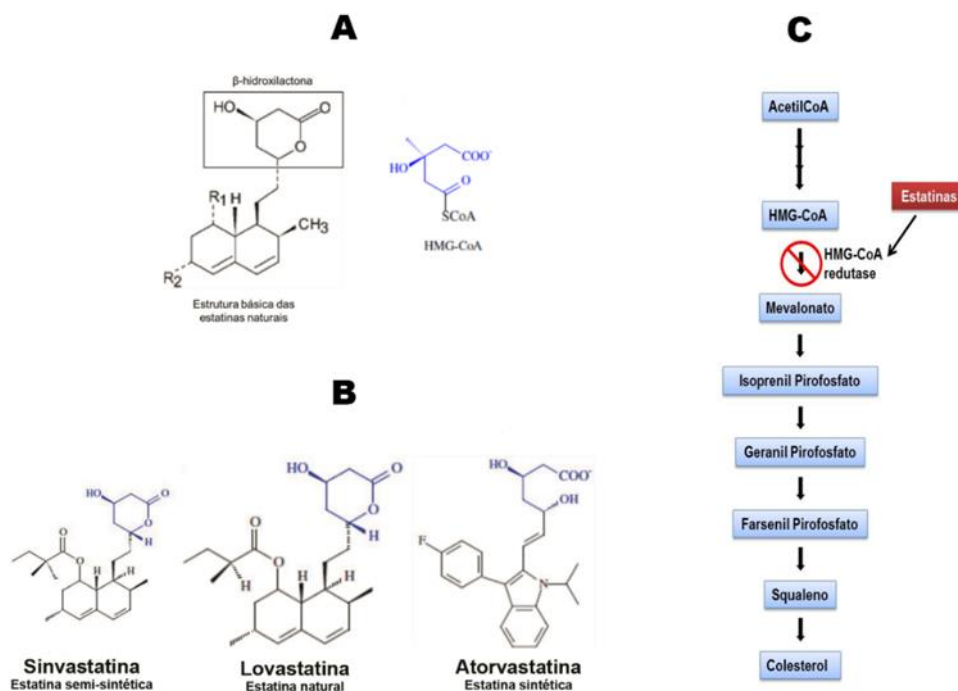


Figura 2. Estatinas e Biossíntese de Colesterol. (A) Estrutura química de uma estatina evidenciando a semelhança entre o anel  $\beta$ -hidroxilactona e a molécula de HMG-CoA. (B) Exemplos de estruturas moleculares de estatinas, natural, sintética e semissintética. (C) Representação da via de biossíntese de colesterol.

O primeiro registro da descoberta de uma estatina foi em 1976, isolada a partir de culturas de *Penicillium citrinium* e denominada mevastatina (Endo et al., 1976). Com o aumento do interesse comercial por inibidores da síntese de colesterol, a indústria farmacêutica Merck, da Alemanha, conseguiu isolar uma cepa de *A.*

*terreus*, a partir de amostras de solo da Espanha, que era capaz de produzir uma estatina semelhante à mevastatina, mas com maior eficácia na inibição da hipercolesterolemia (Alberts et al., 1980). Desde então a lovastatina passou a ser produzida industrialmente então pela cepa *A. terreus* ATCC 20542, sendo aprovada para uso em humanos em 1987 pela Food and Drug Administration (FDA), agência regulatória dos Estados Unidos. Foi também a primeira estatina a ser introduzida no mercado farmacêutico brasileiro em 1988 (Laufs and Böhm, 2005; Mahley et al., 2001).

### **1.2 Biossíntese de lovastatina e grupamento de genes**

A lovastatina é produzida pelo metabolismo secundário do fungo e, como boa parte dos metabolitos secundários desses microrganismos, os genes envolvidos em sua via estão organizados em grupamentos gênicos. O grupamento de biossíntese de lovastatina se estende por 65 kb e possui 18 genes (Kennedy et al., 1999a).

Ao longo dos anos diversos trabalhos buscaram elucidar a via de síntese de lovastatina. O primeiro gene identificado, *lovB*, codificava uma policetídeo sintase (PKS), que posteriormente passou a ser denominada lovastatina nonacetídeo sintase (LNKS) sendo responsável pela incorporação de nove unidades de acetato (Kennedy et al., 1999a; Vinci et al., 1991). Esta enzima de aproximadamente 250 kDa foi identificada a partir de cepas mutantes de *A. terreus*, o que possibilitou o isolamento de outros fragmentos de DNA da cepa ATCC 20542 que correspondiam ao restante do grupamento gênico (Kennedy et al., 1999a).

O papel da LNKS na síntese de lovastatina foi estudado a partir da expressão heteróloga do gene *lovB* em *Aspergillus nidulans*, cujos clones transformantes que expressavam a LNKS foram cultivados em fermentação submersa e depois analisados, buscando encontrar a molécula de dihidromonacolina L (DML), que é o intermediário produzido pela LNKS (Kennedy et al., 1999b). A DML não foi detectada nas culturas analisadas, mas foram detectados compostos da classe das purinas. Sabe-se que estes resultam do mau funcionamento de uma PKS; portanto, a presença deles foi atribuída a um defeito na LNKS com o domínio enoil-redutase (ER) inativo, levando à interrupção da síntese do produto. Com isto, levantou-se a hipótese de que, para a correta alongação da cadeia de DML, seria necessário a presença de uma ER para auxiliar nas reações intermediárias, sendo

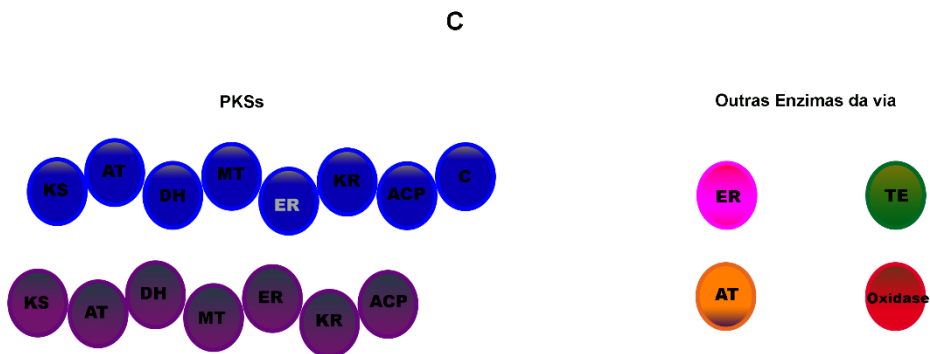
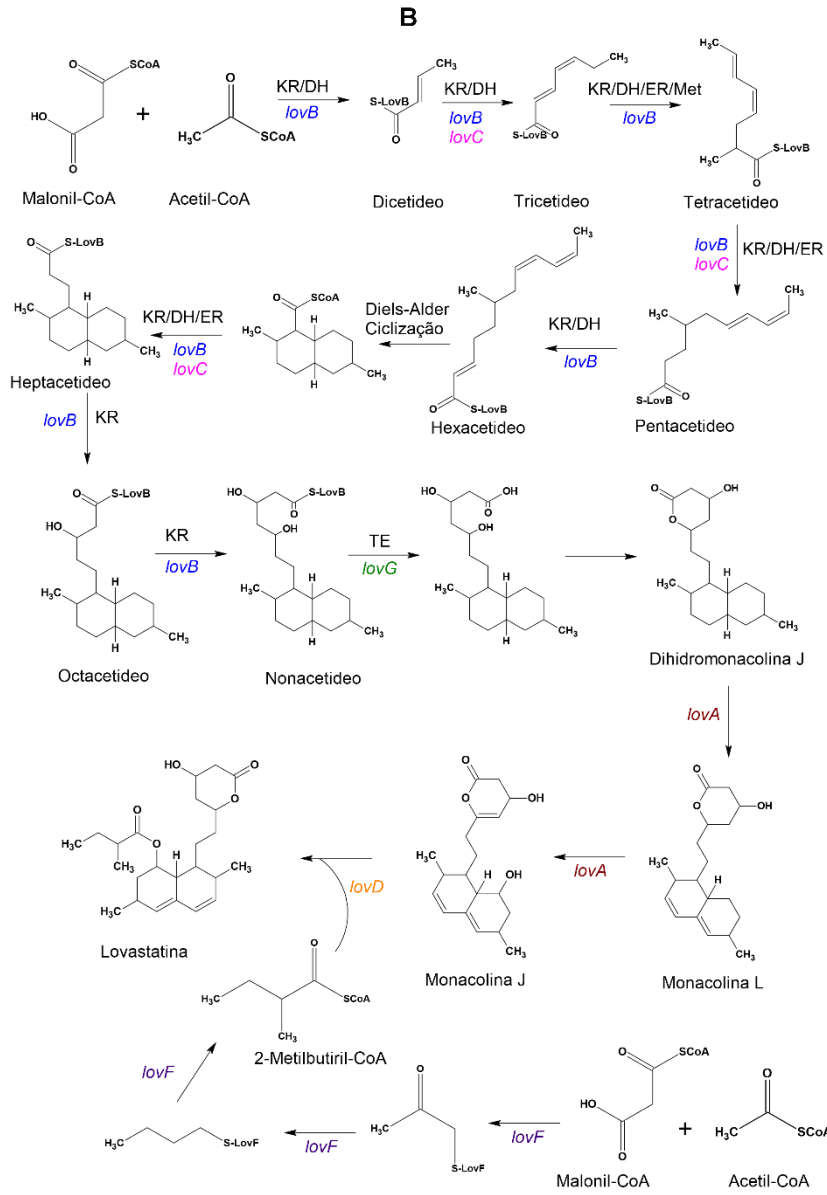
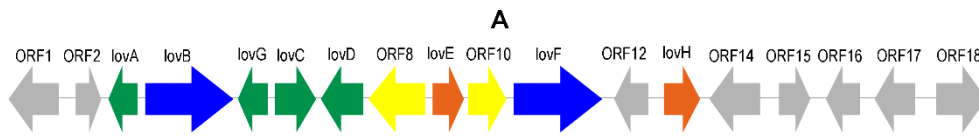
esta enzima indispensável para a correta síntese de lovastatina (Kennedy et al., 1999b). Posteriormente identificou-se uma proteína de 363 aminoácidos codificada pelo gene *lovC*, cuja sequência apresentava homologia com o domínio ER de outras PKS. Em um trabalho expressando *lovB* juntamente com *lovC* em *A. nidulans*, detectou-se a produção de DML, sendo essa a primeira comprovação de que uma enzima com domínio ER complementava o funcionamento da LNKS, cujo domínio ER não é funcional (Guenzi et al., 1998; Rangaswamy et al., 1998).

Em busca de entender melhor a forma como a LNKS sintetiza a DML reconstituiu-se as interações desta PKS *in vitro* (Ma et al., 2009). A LNKS foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae* e então purificada. O primeiro ensaio foi verificar a capacidade da enzima de iniciar a elongação da cadeia a partir de malonil-CoA sem a adição de cofatores. Observou-se que a enzima consegue iniciar a elongação da cadeia carregando malonato, mas a mantém apenas por mais duas condensações, resultando em um acúmulo de lactona, que é formada pela enolização e ciclização dos tricetídeos não reduzidos. Ao se adicionar o cofator NADPH, observou-se a ativação do domínio cetoreductase (KR), tornando a LNKS capaz de produzir pironas, pentacetídeos, hexacetídeos e heptacetídeos, além de cetonas. Também se verificou a necessidade de S-adenosilmetionina (SAM) para a correta elongação da cadeia, pois na sua ausência não ocorre metilação e a molécula é liberada da proteína transportadora de acil (ACP), sendo a SAM necessária também para a correta interação entre a LNKS e a ER codificada pelo gene *lovC*. Outro ponto interessante foi que, mesmo se adicionando à LNKS a ER, o NADPH e a SAM *in vitro*, não se detectou DML, mesmo que anteriormente a expressão de *lovB* e *lovC* em *A. nidulans* tenha resultado na sua correta formação. A clivagem da DML ácida do ACP-tioéster pode ser realizada por tioesterases (TE) envolvidas também na síntese de ácidos graxos e outras PKSs não relacionadas; por isso, testou-se o domínio TE da PKS13 de *Gibberella zeae*, que apresenta alta especificidade, e cuja adição à reação *in vitro* resultou na liberação da DML ácida.

Posteriormente se investigou se no grupamento de biossíntese de lovastatina haveria alguma TE específica que realizaria a liberação da DML (Xu et al., 2013). A análise de genômica comparativa com outros fungos produtores de estatina, como *P. citrinum* e *Monascus pilosus*, permitiu identificar uma região entre os genes *lovB* e *lovC* que apresentava homologia com enzimas da família das



esterases. A ORF5 passou a se chamar então *lovG* e sua disrupção levou à interrupção da síntese de lovastatina. Sendo assim, a primeira etapa da síntese de lovastatina é catalisada por uma PKS, codificada pelo gene *lovB*, que realiza a incorporação de nove unidades de acetato. Este processo exige a presença de NADPH e de SAM, além de uma ER auxiliar, codificada pelo gene *lovC*, para a correta elongação da DML, que então é liberada pela ação de uma TE codificada pelo gene *lovG* (Figura 3).



**Figura 3. Biossíntese de lovastatina. (A) Grupamento gênico de produção de lovastatina. Em amarelo estão os genes que codificam proteínas envolvidas com o mecanismo de resistência (ORF8) e transporte (ORF10) de lovastatina, em cinza genes com função não confirmada, em azul são genes que codificam PKSs, em verde genes que codificam enzimas auxiliares e outras enzimas envolvidas na síntese de lovastatina e em laranja estão os genes que codificam reguladores. (B) Esquemática da via de síntese de lovastatina indicando os genes envolvidos em cada etapa e qual tipo de domínios está sendo usado na reação. (C) Esquemática das PKSs evidenciando seus domínios e das demais enzimas indicando que tipo de reação ela catalisa. KS= cetosíntase; AT= Aciltransferase; DH= desidratase; MT= metiltransferase; ER= enol redutase; KR= cetoreductase; ACP= Proteína transportadora de acil; C= Condensação; TE= tioesterase.**

Após a formação de DML, ainda é necessária sua oxidação a monacolina J, para que então ela esteja apta a receber o dicetídeo formado na segunda parte da via de síntese. Portanto, investigou-se a presença de uma oxidase dentro do grupamento gênico, identificando-se dois genes: *lovA* e a ORF17, ambos com homologia à oxidase da classe do citocromo P450 (CP450). Um estudo, avaliando a influência do gene *lovA* na formação de monacolina J, realizou a disrupção desse gene e concluiu que o mutante só era capaz de produzir DML (Sorensen et al., 2003). A ORF17 não foi avaliada experimentalmente.

A segunda parte da produção de lovastatina é catalisada por outra PKS, codificada pelo gene *lovF*, denominada lovastatina dicetídeo sintase (LDKS) (Hendrickson et al., 1999). Esta enzima de 2.532 aminoácidos é responsável pela formação da cadeia lateral 2-metilbutiril da lovastatina (Figura 3). Assim como a LNKS, a LDKS possui os domínios KS (ceto-sintase), AT (aciltransferase), DH (dehidratase), MT (metiltransferase), ER, KR e ACP, mas não possui o domínio de condensação (CON) e seu domínio ER é funcional, não sendo necessário uma ER auxiliar. A LDKS também não possui o domínio TE, por isso a molécula de 2-metilbutiril gerada continua ligada ao seu domínio ACP até que seja transferida para o composto monacolina J, reação catalisada por uma acil transferase codificada pelo gene *lovD*, formando então a molécula de lovastatina (Xie et al., 2006).

Além dos genes de biossíntese, foram identificados genes de resistência à própria lovastatina (Subazini and Kumar, 2011). O mecanismo de resistência a metabolitos tóxicos em fungos consiste em duas estratégias. A primeira é o transporte ativo do metabólito para fora da célula (Keller, 2015): o grupamento de

biossíntese de lovastatina foi identificado um transportador MFS (do inglês *Major Facilitator Superfamily*), codificado pela ORF10, que passou a se chamar *lovT*, cuja função seria evitar o acúmulo de lovastatina intracelular. A segunda estratégia consiste em uma cópia do gene que codifica o alvo de atuação do metabólito. No caso do grupamento de biossíntese de lovastatina, identificou-se uma cópia do gene que codifica a enzima HMG-CoA redutase, originalmente conhecida como ORF8 e que passou a se chamar *lovR*, que se propõe ser resistente à lovastatina (Keller, 2015). Também foram identificados no grupamento dois fatores de transcrição, ambos com motivos de dedos de zinco para ligação ao DNA, *lovE* e *lovH* (Kennedy et al., 1999a). Os demais genes estão identificados apenas como ORFs (*Open Reading Frame*) e suas funções foram somente preditas por homologia.

### **1.3 Regulação da biossíntese de lovastatina**

A regulação da biossíntese de metabólitos secundários em fungos é um processo complexo que envolve diversos fatores e uma quantidade considerável de proteínas, que muitas vezes se complementam (Zhang et al., 2020). Nos últimos anos, o foco nos mecanismos regulatórios da biossíntese de lovastatina tornou-se um tema mais estudado, sendo os fungos *A. terreus* e *Monascus* sp. os organismos referência nas pesquisas de regulação metabólica (Zhang et al., 2020). A síntese de lovastatina é regulada por fatores ambientais, regulação gênica por fatores de transcrição específicos e globais e pelo mecanismo de sinalização conhecido como sensoriamento de quórum (QS) (Barrios-González et al., 2020).

#### *1.3.1 Precursores e indutores*

Algumas substâncias foram estudadas quanto a sua capacidade de induzir a síntese de lovastatina ou aumentar o *pool* de precursores e assim, o rendimento do processo. Como a lovastatina é produzida a partir de acetil-CoA e malonil-CoA, substâncias como ácido cítrico, ácido acético e metionina participam da sua síntese (Chan et al., 1983). Em um estudo avaliando o efeito de etanol, acetato de sódio, citrato de sódio, citrato trissódico, metionina e fenilalanina como precursores na fermentação submersa (SmF, do inglês *Submerged fermentation*) de *M. purpureus* mostrou que a adição de 4,0 g/L de citrato de sódio aumentou o rendimento de lovastatina em 52,6% (Zhang et al., 2014). Em outro estudo de

otimização da produção de lovastatina por *M. ruber* em fermentação em estado sólido, Xu e colaboradores perceberam que a adição de 0,3% de ácido acético também aumentou o rendimento de lovastatina (Xu et al., 2005). Já Kamal e colaboradores mostraram que a adição de 20% de acetato de sódio aumentou significativamente o rendimento da lovastatina produzida por *A. terreus* em SmF (Kamal et al., 2018).

Das substâncias estudadas como indutoras da síntese de lovastatina, destacam-se os ácidos linoleico e glutâmico. O ácido linoleico adicionado a culturas submersas de *M. ruber* na concentração de 512  $\mu$ M aumentou o rendimento de lovastatina em 1,35 vezes (Huang et al., 2018). Também se observou um aumento do nível de transcrição do gene *mokH* (*lovH*). Efeito semelhante foi provocado pelo ácido glutâmico, cuja adição a 10 mM aumentou em 3,5 vezes o rendimento de lovastatina em *Monascus* sp. (Zhang et al., 2017).

### 1.3.2 Regulação metabólica

A produção de metabólitos secundários em fungos é comumente regulada por biossinalização, cujas vias também atuam na diferenciação celular (Zhang et al., 2020), com destaque para vias de receptores acoplados a proteínas G. Sabe-se que as subunidades alfa da proteína G apresentam grande diversidade entre os fungos, que se correlacionam com os diferentes papéis da sinalização (García-Rico et al., 2017; Min et al., 2005). Na via da proteína quinase A (PKA), o cAMP atua como um mediador da expressão gênica intracelular em *Monascus* sp. (Min et al., 2005). Realizou-se um estudo avaliando o efeito de diferentes concentrações de cAMP na síntese de metabólitos secundários e na germinação de esporos em *M. ruber*, e se constatou que este segundo mensageiro regula positivamente o crescimento e a síntese de metabólitos secundários (Lai et al., 2011). Outro trabalho adicionou ácido linoleico a uma cultura de *M. ruber* e ele aumentou o conteúdo de cAMP no fungo, o que ativou a PKA e levou a um aumento da expressão dos genes *mokA* e *mokH* e do título final de lovastatina produzida (Huang et al., 2018).

A regulação metabólica pode ocorrer por fatores como QS, regulação catabólica por fonte de carbono, reação ao estresse, mudança de temperatura e pH. Dentre eles, QS é um mecanismo comum em fungos e seus mediadores induzem a produção de metabólitos secundários além de atuarem na diferenciação celular (Zhang et al., 2020) e receptores acoplados a proteína G

também fazem parte do processo. A butirolactona é uma das muitas moléculas envolvidas no QS de fungos. Em *Streptomyces* atua na diferenciação celular e na síntese de estreptomicina (Yung-Hun et al., 2009). Em *A. terreus*, a butirolactona é um potencial indutor específico da produção de lovastatina. A adição de 20 nM de butirolactona em SmF de *A. terreus* aumentou o rendimento de lovastatina em 2,5 vezes (Raina et al., 2012). Análises de transcriptoma revelam uma expressão diferencial em estágios específicos de crescimento após adição de butirolactona, aumentando significativamente a expressão dos genes *lovB* e *lovF* (Palonen et al., 2014; Raina et al., 2012).

### 1.3.3 Regulação por fatores ambientais

A síntese de metabolitos secundários também pode ser regulada diretamente por fatores ambientais como pH, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio, espécies reativas de oxigênio, luz e estímulos originários de outros fungos (Pan and Liu, 2018). A repressão catabólica de carbono (RCC) é um importante fator para regular o crescimento e a síntese de metabólitos em fungos. Em *Aspergillus*, a RCC é regulada pelo gene *creA* (elemento responsivo a catabólitos A). A proteína CreA, codificada por este gene, é um regulador global que contém dedos de zinco da classe CYS2-His2 e que se liga ao motivo 5'-SYGGRG-3' no DNA, atuando como um repressor (Adnan et al., 2017). Em *A. terreus*, há motivos 5'-SYGGRG-3' a montante do gene *lovE* e especula-se que este seja afetado pela RCC (Hajjaj et al., 2001).

Respostas ao estresse também são outra importante forma de ativação do metabolismo secundário. Alguns estímulos específicos externos podem gerar mudanças na conformação da cromatina, acetilando ou metilando o DNA, o que modula a expressão de genes específicos (Keats et al., 2007). A produção de lovastatina em *A. terreus* é maior em fermentação em estado sólido (SSF, do inglês *solid state fermentation*) que em SmF, o que está diretamente conectado com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *Reactive oxygen species*), em SSF o fungo produz menos ROS que em SmF (Miranda et al., 2013). A resposta a ROS causa a ativação de vias regulatórias que expressam várias enzimas antioxidantes via fatores de transcrição que também atuam na síntese de metabólitos secundários. Quando os níveis de ROS aumentam em *A. terreus*, os genes associados à lovastatina também são induzidos. Os genes *lovE* e *lovF* apresentam sítios de ligação para diversos reguladores de estresse oxidativos e

estes inibem a expressão de genes envolvidos na síntese de metabólitos (Miranda et al., 2014).

Estudos apontam ainda que a síntese de lovastatina pode ser regulada por retroalimentação. Casas-López e colaboradores observaram que, ao se adicionar entre 50 e 250 mg/L de lovastatina exógena após 24 horas de cultivo, houve uma diminuição de cerca de 93% na produção de lovastatina, sem redução do crescimento (Casas López et al., 2004). Jia e colaboradores também suplementaram o cultivo com 100 mg/L de lovastatina exógena em dois estágios de crescimento do fungo: no início da fermentação e na fase de crescimento rápido. Houve uma redução de 76,4% da produção final de lovastatina quando da adição no início do cultivo e de 20%, quando na fase de crescimento rápido (Jia et al., 2010). Entretanto, ainda é necessário investigar em qual nível essa regulação acontece.

#### 1.3.4 Regulação Genética

Além dos estímulos externos, a regulação gênica do metabolismo secundário em fungos ocorre por meio de reguladores específicos localizados nos respectivos grupamentos gênicos e por reguladores globais, como o LaeA (Zhang et al., 2020). No grupamento de biossíntese de lovastatina há dois fatores de transcrição, codificados pelos genes *lovE* e *lovH* (Kennedy et al., 1999a). Em *Monascus*, o fator de transcrição é codificado pelo gene *mokH* (Chen et al., 2008). Estes genes codificam proteínas com estruturas de dedos de zinco que se ligam ao DNA e ativam a transcrição. Estudos mostram que a deleção de *lovE* impede a síntese de lovastatina, não sendo detectados nem os metabólitos intermediários (Kennedy et al., 1999a). Já sua superexpressão leva a um aumento da produção de lovastatina. Zhgun e colaboradores expressaram constitutivamente uma cópia adicional de *lovE* na cepa selvagem de *A. terreus* ATCC20542 e isto aumentou o rendimento de lovastatina em dez vezes (Zhgun et al., 2019)

O fator de transcrição LaeA codifica uma proteína histona metilase que atua no rearranjo da cromatina e funciona como um regulador global da síntese de metabólitos secundários, estando presente em diversas espécies de fungos (Barrios-González et al., 2020). Esta proteína atua em conjunto com outras cinco proteínas (VeA, VelB, VosA e VelC), formando o complexo Velvet. A disrupção do gene *laeA* em *A. nidulans* e *A. fumigatus* resultou numa diminuição da pigmentação do micélio e na diminuição significativa da síntese de metabólitos

secundários (Bok and Keller, 2004), mas o mecanismo de regulação difere entre as espécies de fungos (Zhang et al., 2020). Para verificar a influência do LaeA na síntese de lovastatina, Bok e Keller utilizaram uma cepa de *A. nidulans* que já havia sido utilizada por Kennedy e colaboradores para explorar aspectos da produção de lovastatina, criando a partir dela uma com a deleção e outra com a superexpressão de *laeA* (Bok and Keller, 2004; Kennedy et al., 1999a). A deleção levou a uma redução dos níveis de transcritos dos genes *lovE* e *lovC*, além de uma diminuição na produção de monacolina J. Já quando o *laeA* foi superexpresso, os níveis de transcritos de *lovE* e *lovC* aumentaram e a produção de monacolina J aumentou em aproximadamente 400%. Isto sugere um papel regulador do LaeA na biossíntese de lovastatina (Teresa et al., 2015).



## 2. JUSTIFICATIVA

Estatinas estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo todo. Além de ser utilizada como redutor dos níveis sanguíneos de colesterol, a lovastatina também se mostrou eficiente na redução da progressão da doença de Alzheimer, infecções renais, proliferação de células cancerígenas e no tratamento de fraturas ósseas, demonstrando que ela apresenta um grande potencial biotecnológico (Seenivasan et al., 2008). Até o momento, uma única cepa do fungo *Aspergillus terreus* (ATCC20542) é utilizada na produção industrial de lovastatina. Uma das razões pode ser a falta de sucesso em obtenção de novas cepas produtoras de lovastatina em estudos de bioprospecção realizados na Índia, Egito e Indonésia (Mangunwardoyo et al., 2012; Osman et al., 2011; Praveen et al., 2014; Upendra et al., 2013).

A prospecção de cepas brasileiras produtoras de lovastatina é o estágio inicial para o desenvolvimento do processo de produção deste composto em território brasileiro. A análise de cepas com produção de diferentes quantidades de lovastatina permitirá um estudo comparativo que pode aprimorar o conhecimento sobre a via biossintética deste metabólito. O sequenciamento e a comparação das cepas isoladas no Brasil com a cepa utilizada industrialmente podem apontar novos caminhos para o aumento da produção de lovastatina.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar cepas de *A. terreus* isoladas no Brasil quanto a sua capacidade de produção de lovastatina em comparação com a cepa ATCC 20542; e correlacionar a produção de lovastatina com os dados genômicos concentrados no grupamento de produção de desta substância.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Confirmar a identificação dos isolados brasileiros por meio de marcadores moleculares;
- Verificar quão relacionadas as cepas são filogeneticamente;
- Confirmar, por meio de amplificação de regiões específicas, se as lacunas identificadas pela montagem do grupamento de lovastatina eram perdas gênicas ou erro de montagem por conta da baixa cobertura do sequenciamento.
- Correlacionar os dados genômicos com os dados de produção de lovastatina obtidos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Cepas utilizadas

As cepas utilizadas (Tabela 1) foram obtidas junto as coleções: Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Industria (CBMAI - CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP), Coleção de Culturas Tropicais (CCT - Fundação André Tosello, Campinas, SP), Instituto Oswaldo Cruz (IOC - Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ) e Universidade Federal de Pernambuco (URM - Recife, PE). A cepa controle ATCC 20542 foi obtida com a American Type Culture Collection. Para as cepas obtidas de coleções brasileiras foi solicitada autorização de acesso ao patrimônio genético junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (número de registro A5285FD).

**Tabela 1. Cepas avaliadas nesse trabalho.**

<b>Cepas utilizadas nesse estudo</b>						
ATCC 20542	IOC 4269	URM 3371	URM 4347	URM 5047	URM 5254	URM 5468
CBMAI 193	IOC 4285	URM 3420	URM 4362	URM 5061	URM 5256	URM 5514
CCT 3320	IOC 4299	URM 3571	URM 4602	URM 5093	URM 5279	URM 5650
IOC 216	URM 224	URM 3858	URM 4658	URM 5181	URM 5281	URM 5864
IOC 3995	URM 1876	URM 4199	URM 4957	URM 5251	URM 5333	URM 5961

#### 4.1.2 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores estão descritos nas Tabela 2 e Tabela 3.

**Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação molecular das cepas. pb= pares de base.**

<b>Gene</b>	<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Senti do</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>	<b>Referência</b>
<b>ITS</b>	ITS1F	Foward	CTTGGTCATTTAGAGG AAGTAA	641pb	(Gardes & Bruns, 1993)

	ITS4	Reve rse	TCCTCCGCTTATTGATA TGC		(White et al., 1990)
<b>Beta- tubulina</b>	Bt2a	Fowa rd	GGTAACCAAATCGGTG CTGCTTTC	495pb	(Glass & Donald son, 1995)
	Bt2b	Reve rse	ACCCTCAGTGTAGTGA CCCTTGGC		
<b>Calmod ulina</b>	Cmd5	Fowa rd	CCGAGTACAAGGAGGC CTTC	660pb	(Hong et al., 2006)
	Cmd6	Reve rse	CCGAGTACAAGGAGGC CTTC		

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na elucidação das regiões com baixa cobertura do genoma.

<b>Região de amplificação</b>	<b>Direção</b>	<b>Sequência 5' -- 3'</b>	<b>Temperatura de Anelamento</b>
<b>S</b>	Forward	CATCGACGTCGGTCTTCAG	60°C
	Reverse	AACGGACTCAACGAGATCTA CC	60°C
<b>U</b>	Forward	CGGAACTGGATCACAGCTAA	59°C
	Reverse	GTGGCGGTAGACCCATCTT	60°C
<b>P</b>	Forward	AATAACGCCGCACAAACC	60°C
	Reverse	AATAACGCCGCACAAACC	60°C
<b>J</b>	Forward	TTAGTCCTCTCGGCGAAGTC	60°C
	Reverse	GGGGTGAAAAGGGCTTAA A	60°C
<b>K</b>	Forward	AACCGTGTCAACATCAATGC	60°C
	Reverse	CGGTTATTGCGAGCCAGAT	60°C

<b>R</b>	Forward	AATGAATCGATCAGCTTAGT GC	59°C
	Reverse	ATTTGCGACAGGAGCAACTC	59°C
<b>Q</b>	Forward	CTTGAAAATGACGGGCTCTT	59.5°C
	Reverse	CAAGCCTCTTGCCAATGAA	59.5°C
<b>N</b>	Forward	TCCTTTGACAGCAGCATGAA	59°C
	Reverse	ACTCCAAGAGGCTTCTCGAC	59°C

#### 4.1.3 Meios de Cultivo

- **BDA (Batata Dextrose Ágar)**

BDA (Dinâmica) 39 g/L

O BDA foi dissolvido em 1 litro de água destilada e esterilizado por meio de autoclave.

- **Meio Definido para produção de Lovastatina**

O meio definido foi descrito por (Pecyna and Bizukojc, 2011). A fonte de nitrogênio, fonte de carbono e Elementos traços foram esterilizadas por autoclave separadamente.

- Fontes de Nitrogênio

Extrato de Levedura	4 g
Dihidrofosfato de Potássio	1,51 g
Sulfato de Magnésio	0,52 g
Cloreto de Sódio	0,4 mL
Sulfato de Zinco	1 mg
Cloreto Férrico	2 mg
Elementos Traços	1 mL

Todos os elementos foram dissolvidos em água destilada e o volume ajustado para 800 mL.

- Fonte de Carbono

Lactose	20 g
---------	------

A lactose foi diluída em água destilada e o volume ajustado para 200 mL. Depois de estéreis, a fonte de carbono foi adicionada à fonte de nitrogênio, totalizando 1 L de meio.

○ Elementos-traços (Solução estoque 10x)

Biotina	4 mg
Borato de sódio	10 mg
Cloreto de Manganês	5 mg
Molibdato de Sódio	5 mg
Sulfato de Cobre	25 mg

Os elementos-traços foram diluídos em água destilada e o volume, ajustado para 100 mL.

*4.1.4 Soluções e soluções tamponantes*

• **Tampão de extração de DNA**

Tris 100 mM, pH 8,0

Cloreto de Sódio 1,4 M

EDTA 20 mM, pH 8,0

Os reagentes foram dissolvidos no volume desejado para trabalho e esterilizado por autoclave. Após esterilização, adicionou-se 0,2% (v/v) de beta-mercaptoetanol, 2% (p/v) de polivinilpirimidina e 2% (p/v) de CTAB.

• **Solução de lavagem de DNA**

Acetato de amônio 10 mM

Etanol 70% (v/v)

A solução de acetato de amônio foi preparada separadamente na concentração de 1 M, esterilizada em autoclave, e então dissolvida em etanol 70% para a concentração final de 10 mM.

• **Tampão TE**

Tris 10 mM, pH 8,0

EDTA 1 mM

Os componentes foram dissolvidos em água deionizada no volume desejado e então esterilizados em autoclave.

- **Tampão de Carregamento**

Azul de Bromofenol	0,02% (p/v)
Sacarose	2 M
TAE	1X

- **TBE 10X**

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

Dissolver em 1 litro de água destilada e esterilizar em autoclave.

- **Tampão de PCR IB (Phoneutria) 10 X**

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

- **Enzimas, marcadores, Kits e outros reagentes**

- Marcador molecular para DNA Ladder 1 Kb Plus – Invitrogen;
- Taq DNA Polimerase pht – Phoneutria;
- Kit E.Z.N.A. Cycle Pure Kit D6493-02 - Omega Bio-tek
- Ampicilina 100 mg/mL.
- Clorofórmio - Alphatec
- Álcool Isoamílico - Synth
- Etanol - Dinâmica
- Isopropanol – Dinâmica

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 *Cultivo das cepas*

As cepas foram cultivadas em meio BDA por 7 dias a 28 °C, em seguida foram mantidas a 4 °C. O pré-inóculo em 50 mL de meio definido para a produção de lovastatina foi realizado a partir do cultivo em meio BDA e incubado a 28 °C e 180 rpm por 48 horas. A partir do pré-inóculo, realizou-se um inóculo em 50 mL de meio definido para a produção de lovastatina, em triplicata, com concentração inicial de 0,05 g/L de biomassa, mantido sob as mesmas condições do pré-inóculo por 120 horas. Essas condições foram baseadas em (Vilches Ferrón et al., 2005).

#### 4.2.2 Determinação de biomassa

As membranas de nitrocelulose (0,20 mm) foram secas no micro-ondas por aproximadamente 5 minutos, em seguida foram pesadas em balança de precisão para obter o peso inicial ( $M_i$ ). Foram coletados 5 mL do meio de cultura líquido contendo o fungo. Em seguida, os 5 mL foram passados por um sistema de filtragem a vácuo, e as membranas foram secas novamente por mais 5 minutos aproximadamente e pesadas para obter o peso final ( $M_f$ ). O peso seco ( $P_s$ ) foi determinado pela Equação 1, cujo resultado é dado em gramas / 5 mL. A partir do peso seco foi possível calcular a concentração de biomassa ( $C$ ) em gramas por litro (Equação 2) e então o volume ( $V$ ) do pré-inóculo a ser adicionado ao inóculo foi calculado pela Equação 3.

##### Equação 1

$$P_s = M_f - M_i$$

##### Equação 2

$$C = P_s \cdot 200$$

##### Equação 3

$$V = \frac{2,5}{(C - 0,05)}$$

#### 4.2.3 Extração de lovastatina de sobrenadante e micélio

A partir dos inóculos, coletou-se 1 mL da cultura, que foi transferido para microtubos de centrífuga de 2 mL, que foram então centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo e adicionou-se 500 $\mu$ L de acetato de etila. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. A fase superior foi transferida para um microtubo de centrífuga novo de 1,5 mL. À fase inferior foi adicionado mais 500  $\mu$ L de acetato de etila e a extração foi repetida mais uma vez. Em seguida, a fase coletada foi seca a vácuo, por aproximadamente 20 minutos e armazenada a -20 °C para análise de cromatografia (Pecyna and Bizukojc, 2011).

Para a extração de lovastatina de micélio, pesou-se aproximadamente 0,5 g de micélio em microtubos de 2 mL e adicionou-se 1 mL de acetato de etila. A amostra foi misturada em vórtex por 30 segundos e incubada por 1 hora a 40 °C com agitação de 120 rpm. Após as amostras terem sido centrifugadas por 2



minutos em velocidade máxima, o sobrenadante foi transferido para um microtubo novo. A amostra foi seca a vácuo e armazenada a -20 °C.

#### 4.2.4 *Detecção e quantificação de lovastatina*

Para a detecção da lovastatina, usou-se uma coluna C-18 Shim-pack VP-ODS (150 x 4.6 mm), com volume máximo de 1 mL. A corrida consistiu em um gradiente binário, no qual a fase móvel B consistia em acetronitrila com 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) e a fase móvel A continha água com 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético. O gradiente começou com 35% de acetoneitrila mais 0,1% TFA por 30 segundos, depois aumentou-se a acetoneitrila para 95%, manteve-se esta concentração linear por 3 minutos e então ela foi diminuída novamente para 35%, interrompendo-se o processo aos 16.01 minutos. A lovastatina foi detectada tanto na forma ácida, quanto na forma lactona, com picos por volta de 9,5 minutos e 11,5 minutos, respectivamente. O comprimento de onda utilizado foi de 238 nm, e o fluxo, de 1 mL por minuto em um sistema de HPLC (High-performance Liquid Chromatography) da Shimadzu com volume de injeção de 20 µL.

A quantificação foi realizada com base em uma curva de calibração com as seguintes concentrações: 0,05 g/L; 0,075 g/L; 0,125 g/L; 0,25 g/L; 0,5 g/L; 0,75 g/L; 1,0 g/L e 1,5 g/L. As amostras de lovastatina extraída dos inóculos foram ressuspensas em 200 µL de acetoneitrila 95%. O padrão utilizado foi o Mevinolin M2147 (Sigma), também solubilizado em acetoneitrila 95%. O padrão utilizado está em sua forma lactona e como as duas formas têm tempo de retenção diferentes, para se obter uma quantificação mais precisa, foi necessário realizar uma reação para obter também a forma ácida do padrão. Para isso 1 mL do padrão foi misturado a 50% (v/v) de hidróxido de sódio 0,1 M e a solução foi mantida a 50 °C por 2 horas. Após este passo, o padrão, agora em sua forma ácida, foi utilizado para se obter a curva de calibração.

#### 4.2.5 *Extração de DNA genômico*

A extração de DNA foi feita como descrito por (Michiels et al., 2003). Os fungos foram cultivados em meio definido para a produção de lovastatina por 48 horas. Em seguida, o micélio foi separado do caldo de cultura por centrifugação e então macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido até se obter um pó branco. Aproximadamente 2 g do macerado foram transferidos para um tubo de centrífuga de fundo cônico de 50 mL contendo 15 mL de tampão de extração pré-

aquecido. A amostra foi incubada a 60 °C por 60 minutos, misturando-se por inversão a cada 15 minutos. Foram então adicionados 15 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24/1) à solução, e a amostra foi então agitada em vórtex e centrifugada por 5 minutos à 3000 g à temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um tubo novo e a extração com clorofórmio:álcool isoamílico foi repetida mais duas vezes. À última coleta, adicionou-se à fase aquosa 2/3 de seu volume em isopropanol, misturou-se por inversão e incubou-se a amostra à temperatura ambiente durante a noite. Ela foi então centrifugada a 4500 g por 15 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 15 mL da solução de lavagem e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, a amostra foi novamente centrifugada a 3000 g à temperatura ambiente e a lavagem foi repetida mais uma vez. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de Tampão TE, adicionaram-se 5 U de RNase e incubou-se a solução a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se então 1 mL de fenol à amostra, que foi agitada fortemente até se formar uma emulsão, que foi centrifugada por 5 minutos a 3000 g à temperatura ambiente. A fase aquosa foi então transferida para um microtubo de centrifugação estéril. A extração foi repetida com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25/24/1) e com clorofórmio:álcool isoamílico (24/1). À fase aquosa coletada adicionou-se acetato de amônio a 7,5 M, pH 7,7, para uma concentração final de 2,5 M, mais dois volumes de etanol gelado. A amostra foi homogeneizada e incubada no gelo por 5 minutos, e depois centrifugada a 4500 g por 15 minutos a 4 °C. A amostra foi então lavada com etanol 70% duas vezes. A amostra de DNA foi secada e então ressuspensionada em 60 µL de água MilliQ® estéril e quantificada num espectrofotômetro de microvolume NanoDrop®. Este procedimento foi realizado para todas as cepas deste estudo e para as cepas selecionadas que tiveram o genoma sequenciado.

#### *4.2.6 Amplificação e sequenciamento dos fragmentos para identificação molecular*

Amplificaram-se três regiões do genoma: a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e partes dos genes de  $\beta$ -tubulina e calmodulina, utilizados na identificação de fungos (Samson et al., 2011; János Varga et al., 2007b, 2007a; J. Varga et al., 2007).

A amplificação da região ITS foi realizada com o oligonucleotídeo iniciador 5' ITS1F e o iniciador 3' ITS4 (Gardes and Bruns, 1993; White et al., 1990). Cada

reação foi composta por tampão de Taq polimerase; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP; 25 pmol de cada iniciador; 3 U de Taq Polimerase; e aproximadamente 5 ng de DNA, para 25 µL de solução final (White et al., 1990). As condições programadas no termociclador foram: 10 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 60 segundos; anelamento a 55 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos; com extensão final a 72 °C por 10 minutos (Smit et al., 1999).

A região do gene  $\beta$ -tubulina foi amplificada com os iniciadores Bt2a (5') e Bt2b (3') (Glass and Donaldson, 1995). Cada reação foi composta por tampão de Taq polimerase; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM dNTP; 0,2 mM de cada iniciador; 2,5 U de Taq Polimerase e aproximadamente 10 ng de DNA, com volume final de reação de 25 µL (Glass and Donaldson, 1995). As condições programadas no termociclador foram desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguida de 32 ciclos com desnaturação a 94 °C por 60 segundos; anelamento a 56 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos; finalizado com extensão a 72 °C por 10 minutos (Glass and Donaldson, 1995).

Para a amplificação da região do gene calmodulina, utilizaram-se os iniciadores Cmd5 (5') e o Cmd6 (3') (Hong et al., 2006). Cada reação continha tampão de Taq polimerase; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq polimerase, 0,5 mM de dNTP; 30 pmol de cada iniciador e aproximadamente 10 ng de DNA, com volume final de 25 µL de reação. As condições programadas no termociclador foram desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 50 segundos; anelamento a 54 °C por 50 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos; finalizado por 7 minutos de extensão a 72 °C (Serra et al., 2006).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% para verificar se a região foi amplificada no tamanho esperado. Em seguida, as amostras positivas foram purificadas com o *kit* E.Z.N.A. Cycle Pure Kit D6493-02 da Omega Bio-tek. As amostras foram então sequenciadas no Laboratório de Sequenciamento de DNA de Universidade Católica de Brasília, utilizando-se um sequenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems) e o BigDye Terminator *kit* v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram utilizadas para gerar a árvore filogenética das cepas.

#### 4.2.7 Análise Filogenética

As sequências geradas foram analisadas utilizando o algoritmo PHRED, em que os nucleotídeos de baixa qualidade foram identificados e eliminados. O programa cap3 foi utilizado para montar as sequências de consenso para cada *locus* (Huang and Madan, 1999). Todas as sequências foram depositadas no GenBank. O alinhamento simultâneo das sequências foi realizado na plataforma SATé usando os programas MAFFT (Kato et al., 2002) e MUSCLE. Os alinhamentos recuperados foram verificados manualmente para evitar bases emparelhadas incorretamente no software BioEdit v7.0.5.2 ware (Hall, 1999). O software IQ-TREE foi usado para inferir a árvore mais provável com parcimônia máxima (Nguyen et al., 2014) com a opção “-m TEST” ativada (jModelTest) (Darriba et al., 2012) para a seleção do modelo. O ramo de apoio foi calculado usando-se 1000 bootstraps rápidos juntamente com um teste de razão de verossimilhança semelhante a Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT) (Guindon et al., 2010). As árvores filogenéticas foram visualizadas usando-se o programa FigTree 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Utilizaram-se as sequências das seguintes espécies de *Aspergillus* como grupo de referência: *A. neoaffricanus*, *A. alabamensis*, *A. ambiguus*, *A. aureoterreus*, *A. carneus*, *A. floccosus*, *A. hortai*, *A. microcysticus*, *A. neoindicus*, *A. neoniveus*, *A. niveus* e *A. pseudoterreus*.

#### 4.2.8 Sequenciamento genômico

As cepas de *Aspergillus* ATCC 20542, URM 224, URM 1876, URM 5061, URM 5254, URM 5256, URM 5650 e URM 5961 foram usadas para sequenciamento do genoma completo. As oito bibliotecas genômicas foram preparadas de acordo com o protocolo Nextera DNA (Illumina), em que 25 ng de DNA purificado foram fragmentados, com tamanho médio de fragmento de 300 pb, e ligados a adaptadores. O sequenciamento e geração de *clusters* foram feitos de acordo com o protocolo Illumina MiSeq, usando-se *reads* de 250 pb pareadas (2x250 pb) para os isolados URM 224, URM 1876, URM 5254, URM 5256, URM 5650 e URM 5961, enquanto as cepas ATCC20.542 e URM 5061 foram sequenciadas usando-se *reads* de 150 pb pareadas (2x150 pb).

As sequências brutas foram processadas com Trimmomatic (Bolger et al., 2014) para remover adaptadores e bases das extremidades principais que faziam a pontuação no PHRED cair abaixo de 3. As sequências foram varridas com ampla janela de 4 bases e um corte era realizado quando a qualidade média por base

caia abaixo de 15, resultando em um conjunto de boa qualidade para ser usado na montagem do *cluster* de biossíntese de lovastatina.

#### 4.2.9 Montagem do genoma e análise do grupamento de biossíntese de lovastatina

As sequências obtidas das cepas ATCC 20542, URM 224, URM 1876, URM 5061, URM 5254, URM 5256, URM 5650 e URM 5961 foram montadas usando-se o programa de montagem *de novo* SPAdes (versão 2.3.1), com os comprimentos de k-mer 21, 33, 55, 77, 99 e 127 (Bankevich et al., 2012). Para avaliar a qualidade e a integridade das unidades de montagem, usou-se a *pipeline* FGMP (versão 1.0) (Cissé and Stajich, 2019).

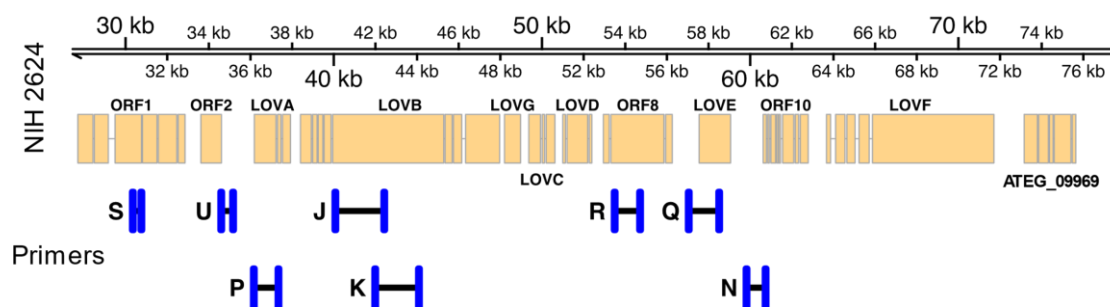
Em seguida, realizaram-se etapas adicionais guiadas para as montagens em que o grupamento de biossíntese de lovastatina não ficou contido em no máximo dois *contigs*, utilizando-se o genoma de referência de *A. terreus* NIH 2624 como guia. A ferramenta utilizada nesta etapa foi o Ragout (versão 2.2) com os parâmetros s “-solid-scaffolds” e “-refine” (Kolmogorov et al., 2014). Após esta etapa, os arcabouços gerados para cada cepa foram mapeados usando o minimapa 2, tendo como referência o genoma da cepa *A. terreus* NIH 2624 (Li, 2018) com parâmetros adicionais “-c -cs -x asm5”.

Com base nos resultados do mapeamento, a sequência correspondente ao grupamento de biossíntese de lovastatina foi filtrada para cada cepa, correspondendo a sequência anotada no genoma de referência da cepa *A. terreus* NIH 2624. Os genes importantes para a biossíntese de lovastatina estão localizados em uma porção contígua do genoma de referência entre 35.000 bp a 85.000 bp do supercontig CH476609 da cepa NIH 2624. Essas sequências foram submetidas a previsões e anotações de genes usando scipio (Hatje et al., 2011; Keller et al., 2008). Após anotações, os grupamentos de biossíntese de todas as cepas foram comparados e o resultado, visualizado utilizando-se o pacote genoPlotR (Guy et al., 2010).

#### 4.2.10 PCR para confirmar algumas lacunas observadas na montagem do *cluster*

Após a montagem do grupamento de biossíntese de lovastatina, foram observadas para as cepas URM 224, URM 1876, URM 5256 e URM 5254 algumas lacunas. A fim de confirmar se essas lacunas eram realmente a ausência da

sequência de nucleotídeos nessa região ou apenas uma consequência da baixa cobertura do sequenciamento, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3) que cobriam as regiões observadas na Figura 4. Como estas regiões não possuíam uma nomenclatura específica, utilizaram-se letras do alfabeto para designar os iniciadores.



**Figura 4. Mapa de localização dos amplicons gerados pelos oligonucleotídeos iniciadores para elucidar ausências observadas na montagem do grupamento da lovastatina.**

#### 4.2.11 Análise estatística

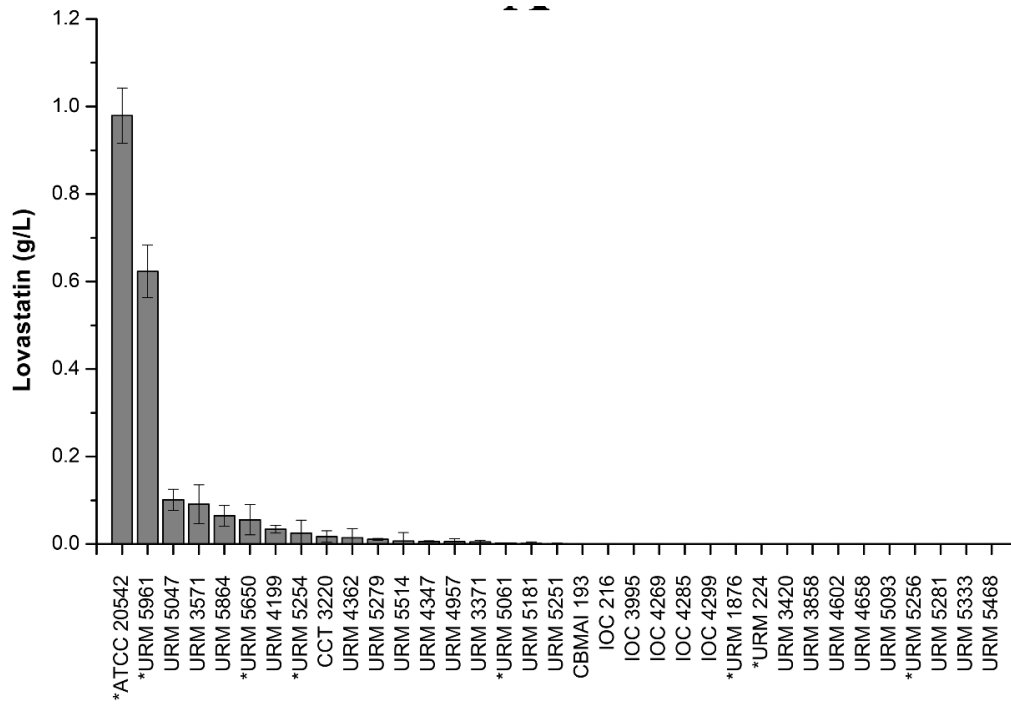
A prospecção das cepas foi realizada em triplicatas biológicas e cada extração e quantificação de lovastatina foi realizada em triplicatas técnicas. Foi aplicado um teste de variância com  $p > 0,05$  e um teste  $t$  de Student para verificar o nível de significância da diferença entre as médias por meio do GraphPad Prism versão 7.00 para Windows.

Para verificar a correlação entre a produção de lovastatina e a filogenias das cepas, um teste  $t$  não pareado foi aplicado usando o GraphPad Prism para Windows (versão 7.01). A produção média de cada metabólito foi comparada segundo sua identificação filogenética. Para essa análise foram considerados apenas os dados diferentes de zero e que apresentaram mais de um representante para o clado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

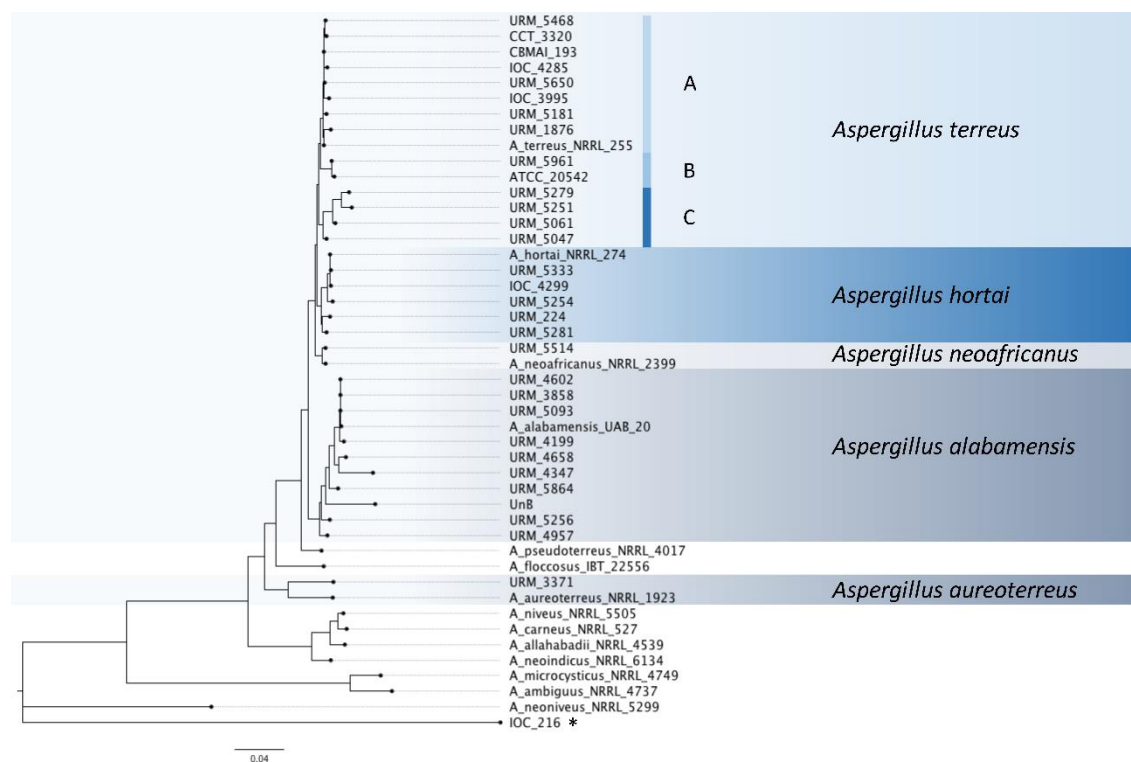
### 5.1 Produção de lovastatina e identificação molecular de isolados brasileiros

Avaliando a produção de lovastatina das cepas, a ATCC 20542, utilizada como cepa controle, apresentou produção de 1,0 g/L de lovastatina como já relatado na literatura, (Bizukojc and Ledakowicz, 2009; Casas López et al., 2005; Pecyna and Bizukojc, 2011). Das cepas isoladas em território brasileiro, somente dezesseis apresentaram produção, variando de 0,05 g/L a 0,6 g/L (Figura 5).



**Figura 5. Quantificação por HPLC de lovastatina entre 35 *Aspergillus* sp. brasileiros e a cepa de referência ATCC 20542. Todos os experimentos foram realizados com três repetições biológicas. (\*) Cepas que tiveram o genoma sequenciado.**

Os 35 isolados analisados foram distribuídos em cinco clados, sendo eles *A. terreus*, *A. hortai*, *A. neoafrikanus*, *A. alabamensis* e *A. aureoterreus* (Figura 6). Desses, o clado *A. terreus* apresentou três grupos monofiléticos, identificados como A, B e C, em que 15 cepas foram distribuídas. É importante destacar o grupo B, onde estão concentradas as cepas com maior produção de lovastatina, ATCC 20542 e URM 5961. Apenas a cepa IOC216 não correspondeu a uma espécie de *Aspergillus*, sendo colocada em um ramo não relacionado com as demais.



**Figura 6.** Árvore de máxima verossimilhança obtida com base na análise concatenada dos fragmentos gênicos de ITS,  $\beta$ -tubulina e calmodulina. As cepas analisadas se encaixaram em cinco ramos principais das espécies de *Aspergillus* da seguinte forma: *A. terreus*, *A. hortai*, *A. neoafrikanus*, *A. alabamensis* e *A. aureoterreus*. Dentro de *A. terreus*, três clados monofiléticos diferentes foram encontrados e nomeados como A, B e C. Os clados destacados são suportados por  $\geq 70$  bootstraps ultrarrápidos e  $\geq 70$  valores do tipo Shimodaira – Hasegawa.

Correlacionando a produção de lovastatina com os dados filogenéticos (Figura 7), é possível observar que a produção de lovastatina concentra-se principalmente nos clados *A. terreus*, destacando o grupo B, onde estão as cepas ATCC 20542, que é a cepa controle junto com a cepa URM 5961, que apresentou maior produção lovastatina entre os isolados brasileiros de 0,6 g/L. Também foi detectada lovastatina em culturas contendo *A. alabamensis* URM 5256.



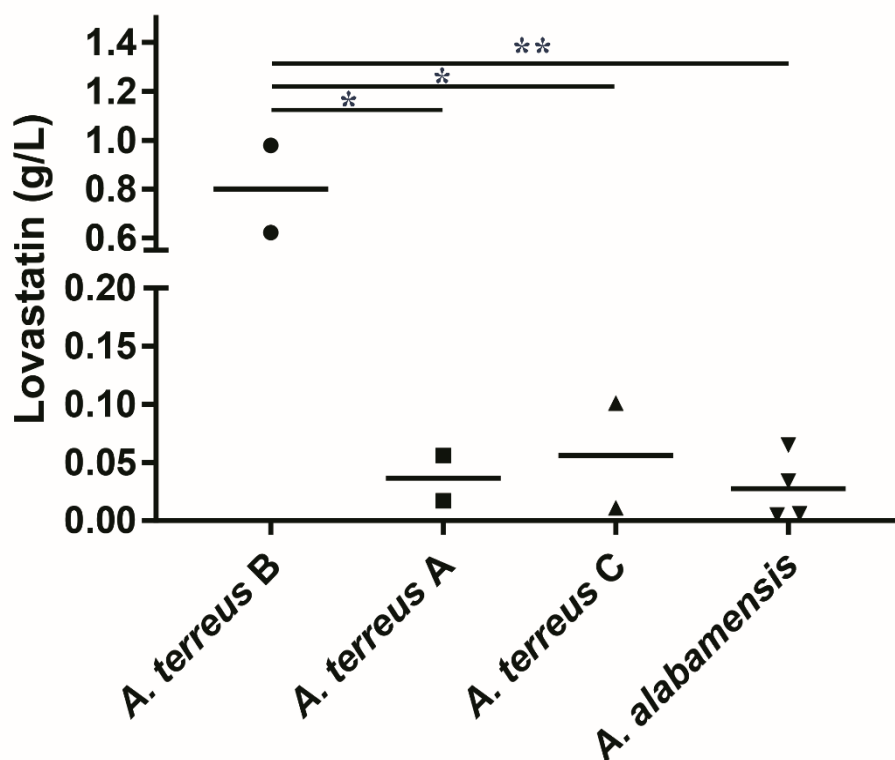


Figura 7. Correlação entre o grupo filogenético e a produção média de lovastatina. (\*)  $p > 0,01$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ .

## 5.2 Montagem do genoma

Para comparar o fenótipo com o genótipo, as cepas ATCC 20542, URM 224, URM 1876, URM 5061, URM 5254, URM 5256, URM 5650 e URM 5961 foram selecionadas para análise comparativa de seus genomas por apresentarem diferentes níveis de produção de lovastatina.

A análise da profundidade e da cobertura do sequenciamento mostrou uma variação de profundidade de 16x, observado para a cepa URM 224, a 41x no caso da cepa URM 5061 (Tabela 4). Esta variação de profundidade acabou impactando na amplitude da cobertura, que variou de 85 a 96% do genoma de referência.

Tabela 4. Métricas do sequenciamento completo do genoma das oito cepas.

Cepa	ATCC 20542	URM 5961	URM 5256	URM 5650	URM 5254	URM 1876	URM 5061	URM 224
Número total de bases (Gb)	1.89	1.28	1.27	0.99	0.80	1.00	1.61	0.54

<b>Percentual de Q20 após o pré-processamento</b>	67.7	86.5	86.4	85.5	88.6	89.9	84.6	90.0
<b>Tamanho médio de reads após pré-processamento (bases)</b>	138	177	121	178	176	188	118	200
<b>Profundidade média de cobertura</b>	39.73	36.10	33.95	28.78	20.80	25.74	41.14	15.57
<b>Abrangência da cobertura do genoma de referência</b>	0.94	0.93	0.92	0.96	0.86	0.86	0.88	0.85

A montagem *de novo* gerada para cada cepa e a cobertura do sequenciamento influenciou diretamente no número de contigs nos conjuntos que apresentaram uma menor profundidade de sequenciamento, resultando em um número muito maior de contigs que as cepas que apresentaram maior cobertura do genoma (Tabela 4) (Sims et al., 2014). O número de contigs tende a ser visto como indicador do nível de fragmentação de montagem, o que pode vir a impactar análises posteriores como a predição gênica e comparação de genomas (Sims et al., 2014).

A montagem guiada por genoma utilizando o programa Ragout (Kolmogorov et al., 2014) realizada para as cepas URM 5,254, URM 1876 e URM 224, que apresentaram uma montagem altamente fragmentada, resultou no ordenamento dos contigs desvinculados em scaffolds, melhorando a contiguidade de todos os conjuntos e diminuindo a diferença acentuada do número de contigs por cepa observada inicialmente (Tabela 5).

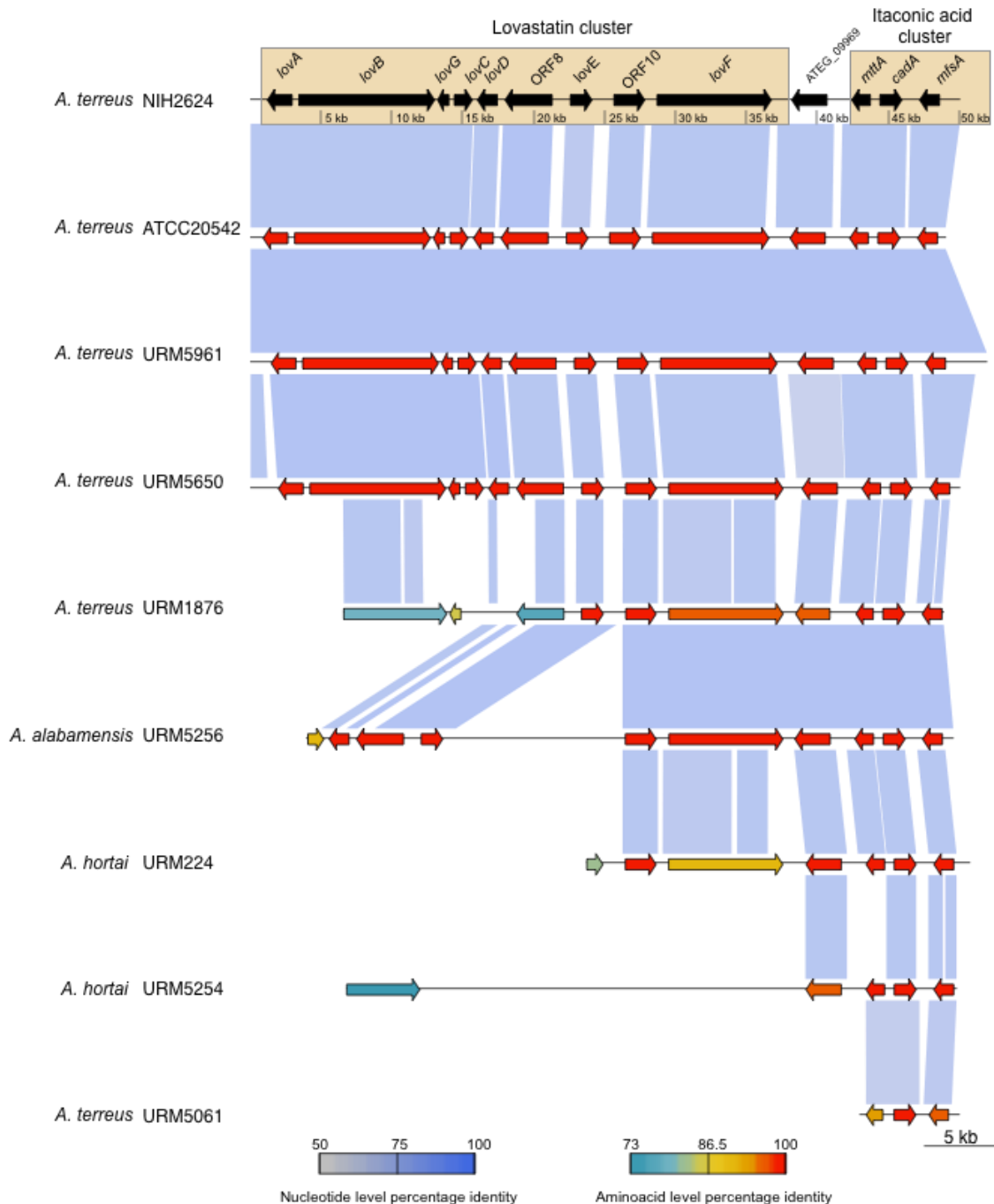
**Tabela 5. Dados estatísticos sobre a montagem do genoma.**

Cepa	ATCC	URM	URM	URM	URM	URM	URM	URM
	<b>20542</b>	<b>5961</b>	<b>5256</b>	<b>5650</b>	<b>5254</b>	<b>1876</b>	<b>5061</b>	<b>224</b>
<b>Comprimento total (Mb)</b>	30.28	30.29	30.18	30.13	26.3	26.55	30.75	25.14
<b>N50</b>	360	307,62	292,9	349,69	4,74	5,045	299,87	4,164
<b>Número de contigs (&gt;0pb)</b>	173	228	252	443	9,528	9,064	343	9,833
<b>Comprimento do maior contig</b>	991,3	1,311,690	1,322,790	1,397,437	51,119	74,218	890,69	54,426
<b>Conteúdo médio de GC (%)</b>	52.16	52.16	52.05	52.46	50.61	51	52.27	50.09
<b>FGMP (%)</b>	97.6	97.3	98	97.5	88.8	90.4	97.6	84.8
<b>Número de scaffolds após a montagem guiada por genoma</b>	21	26	27	28	19	19	24	29

### 5.3 Genômica comparativa do grupamento de biossíntese de lovastatina

Os dados de genômica mostram que para as cepas ATCC 20542 e URM 5961 há uma identidade de sequência de 100% para o grupamento gênico de biossíntese de lovastatina, sendo as cepas que também apresentaram maior produção (Figura 8). A cepa URM 5650, que apresentou um título de 0,05 g/L de lovastatina, com similaridade de sequência de 98,5%, entretanto apresenta uma grande variação nas regiões intergênicas, o que poderia explicar a diferença no nível de produção se comparada as outras duas cepas (Figura 8). Para as demais

cinco cepas é possível observar que grande parte do cluster de biossíntese de lovastatina apresenta diversas perdas gênicas, algumas em regiões de genes-chaves que podem estar diretamente relacionados com a drástica diminuição e até ausência da produção de lovastatina. Para verificar melhor essas possíveis perdas, foram realizadas PCRs com oligonucleotídeos iniciadores específicos para algumas regiões, como mostra a Figura 9.



**Figura 8. Blocos sintéticos e polimorfismos genéticos no agrupamento de genes de lovastatina. A porcentagem de identidade de nucleotídeos entre o as regiões biossintéticas**

são codificadas por cores de cinza (50%) a azul (100%). A porcentagem de similaridade de aminoácidos é indicada como um gradiente de cor variando de 70 a 100%, como mostrado pela tecla colorida do lado direito.

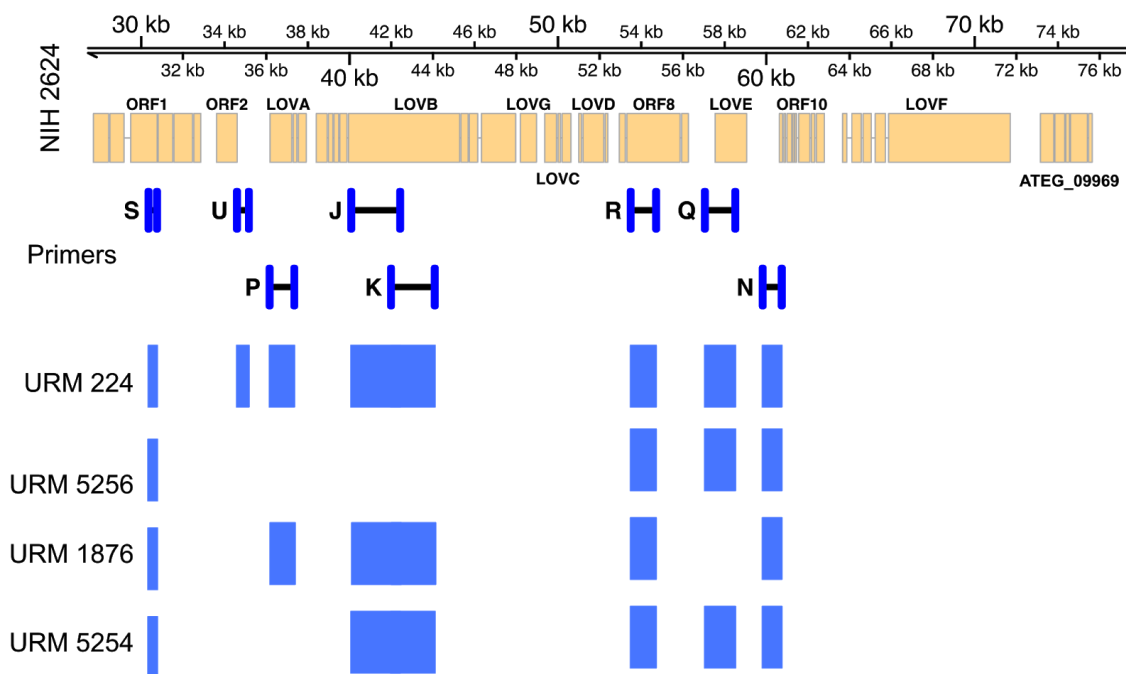


Figura 9. Regiões que foram elucidadas por meio de PCR. Os blocos em azul indicam os fragmentos que foram amplificados.

Pela montagem do genoma a partir do sequenciamento para cepa URM 224, identificada como *A. hortai*, os genes *lovB* e *lovF* responsáveis respectivamente pela codificação das proteínas lovastatina nonacetídeo sintase e lovastatina dicetídeo sintase, estariam ausentes no genoma (Figura 8). Entretanto, a cepa apresentou amplificação para as oito regiões selecionadas para confirmação por PCR, ressaltando assim a baixa cobertura obtida no sequenciamento para essa cepa.

Outra cepa em que foi possível verificar a perda de uma parte do grupamento foi a URM 5256, identificada como *A. alabamensis*. Na montagem do genoma a partir do sequenciamento, o gene *lovB* teria sido perdido, assim como também há uma lacuna entre os genes *lovA* e *lovD*, que poderiam também ser atribuídos à baixa cobertura do sequenciamento. A análise por PCR confirma que essa cepa possui uma perda de ao menos 10 mil pb da região inicial do grupamento, restando o restante a partir da região da ORF8. A cepa URM 1876 apresentou todos os genes essenciais para a produção de lovastatina, com o gene *lovB* confirmado por

PCR, mas não apresentou produção de lovastatina. Outro caso que vale destacar é a cepa URM 5061, na qual foi verificada uma perda drástica de genes do grupamento, o que foi confirmado por PCR, não havendo amplificação para nenhuma das regiões analisadas.

Em um trabalho analisando comparativamente 16 genomas do gênero *Aspergillus*, verificou-se que os genes relacionados a PKSs, que em sua grande maioria estão relacionados com a produção de metabólitos secundários, apresenta uma grande variação no número genes individuais (de 13 a 42 genes individuais) (de Vries et al., 2017). Estas variações não estão correlacionadas ao tamanho do genoma, o que sugere uma relação com o estilo de vida de cada fungo e das necessidades individuais de cada espécie. Estudos comparando espécies de fungos filamentosos quanto a grupamentos de genes relacionados a metabólitos secundários relatam frequentemente alta divergência, com grupamentos que estão presentes em apenas uma espécie ou em um pequeno grupo de espécies, o que dificulta determinar, por exemplo, a base genética ou os condutores evolutivos para tal divergência (Lind et al., 2017). Um trabalho analisando 66 cepas da espécie *Aspergillus fumigatus* quanto a genes relacionados à produção de metabólitos secundários mostrou que as divergências entre os grupamentos podem estar relacionadas a polimorfismo genético, à perda ou ao ganho de genes não funcionais e até mesmo à perda ou ao ganho de um grupamento inteiro (Lind et al., 2017).

O ambiente pode ser um fator de regulação do metabolismo secundário. Diversos metabólitos secundários de fungos podem ser considerados armas que conferem alguma vantagem ao fungo em seu nicho (Pan and Liu, 2018). A conservação desses grupamentos pode estar relacionada ao nicho que o organismo ocupa e o quão útil é o metabólito. Por exemplo, espécies endofíticas como *Diaporthe ampelina* não apresentam o grupamento de biossíntese de lovastatina em seu genoma (Bhargavi et al., 2018). Isto foi sustentado no estudo comparando fungos endofíticos e fungos de solo quanto ao potencial produtor de lovastatina, não sendo observada a produção de lovastatina por fungos endofíticos. A produção de lovastatina se concentrou em espécies do gênero *Aspergillus*, todas isoladas de solo (Praveen et al., 2014). Em algumas espécies de microrganismos, a lovastatina age como inibidor de crescimento, como é o caso de *Candida albicans*, *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* (Lorenz and

Parks, 1990; Nyilasi et al., 2010). Entretanto, não se pode afirmar que o papel biológico da lovastatina seja impedir o crescimento de outros microrganismos, pois os testes de inibição de crescimento são realizados em laboratório e a concentração utilizada do metabólito não corresponde necessariamente à concentração na natureza. Um exemplo disto é a ação da fenazina produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, que em alta concentração atua como um antifúngico em *A. fumigatus* e em concentrações moderadas induz a esporulação (Zheng et al., 2015).

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Microrganismos da biodiversidade brasileira revelam grande potencial para a produção de metabólitos de grande valor para aplicações biotecnológicas. Das 35 cepas analisadas nesse trabalho, apenas 15 foram identificadas com *Aspergillus terreus*, as demais cepas foram distribuídas entre *A. hortai*, *A. neoafricanus*, *A. alabamensis* e *A. aureoterreus*. Quanto à produção de lovastatina, foi identificada uma cepa isolada em território brasileiro com produção de 0,6 g/L, que corresponde a 60% do que é produzido pela cepa ATCC 20542.

O sequenciamento das oito cepas que produzem níveis diferentes de lovastatina revelou que o grupamento gênico de biossíntese de lovastatina possui alta incidência de perdas gênicas que se correlacionam com deficiências na produção de metabólitos, ligando o genótipo ao fenótipo. Este nível de plasticidade do genoma pode estar relacionado a mecanismos adaptativos para nichos ecológicos como uma das principais forças motrizes para a produção deste metabólito secundário.

Pela montagem do grupamento gênico de lovastatina é possível observar duas cepas brasileiras, URM 5961 e URM 5650, que possuem todo o grupamento gênico, mas não produzem a mesma quantidade de lovastatina que a cepa controle. Isto abre caminho para investigações mais aprofundada a respeito da regulação da via. Comparar o nível de transcrição do grupamento gênico entre as cepas poderia revelar o motivo para a diferença de produção observada, bem como pontos de melhoramento genético.

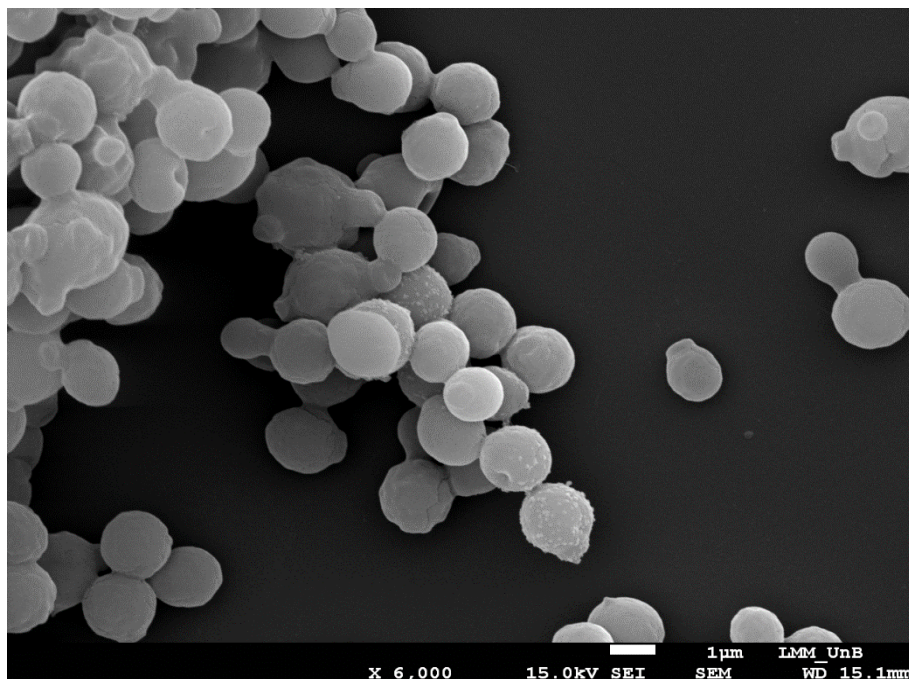


# CAPÍTULO II

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Ogataea polymorpha*, características e aplicações

A levedura *O. polymorpha* (Figura 10), anteriormente chamada de *Hansenula polymorpha*, é um fungo pertencente ao filo Ascomycota e à família Pichiaceae. Além disso, pertence ao grupo de leveduras metilotróficas e, por suas características singulares, é considerada uma fábrica de proteínas, sendo muito utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia (Dijk et al., 2000). Por ser capaz de crescer entre temperaturas de 30 °C e 50 °C, *O. polymorpha* é considerada uma levedura termotolerante, o que facilita a produção heteróloga de proteínas de mamíferos, tendo em vista que estas geralmente precisam de uma temperatura em torno de 37 °C para se manter ativas. Ela é capaz de metabolizar diversas fontes de carbono como glicerol, glicose, xilose, celobiose e metanol (Manfrão-Netto et al., 2019). A capacidade de metabolizar o metanol permitiu que fossem isolados promotores fortemente induzíveis por metanol, tais como o pMOX (metanol oxidase), pDHAS (Dihidroxiacetona sintase) e pFMD (Formaldeído desidrogenase). As enzimas envolvidas na catálise do metanol estão localizadas nos peroxissomos em *O. polymorpha*, o que leva ao aumento do número de peroxissomos quando a levedura é cultivada em metanol. Por este motivo, *O. polymorpha* é utilizada como modelo de estudo da proliferação de peroxissomos (Dijk et al., 2000). Além disso, *O. polymorpha* possui status GRAS (Geralmente Considerado Seguro) e possui estratégias estabelecidas para cultivo em biorreatores (Jenzelewski, 2002).



**Figura 10. *Ogataea polymorpha*. Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 5500 vezes. Fonte: esse trabalho.**

São conhecidas três linhagens de *O. polymorpha* atualmente. A cepa CBS4732 (CCY38-22-2; NRRL-Y-5445; ATCC34438) foi isolada no Brasil em campos irrigados de Pernambuco (Morais e Maia, 1959). A cepa DL-1 também foi isolada de amostra de solo (Levine e Cooney, 1973). Já a cepa NCYC495 (CBS1976; ATAA14754; NRLL-Y-1798) foi isolada a partir de suco de laranja concentrado em um laboratório da Flórida, Estados Unidos (Wickerham, 1951). As duas primeiras cepas, CBS4732 e DL-1, são comumente utilizadas com aplicações industriais, enquanto a cepa NCYC495 tem sido utilizada em escala laboratorial como modelo de estudo. Estas cepas foram isoladas por grupos não relacionados entre si e posteriores estudos filogenéticos reclassificaram isolados de *O. polymorpha* em duas diferentes espécies: *O. polymorpha* e *O. parapolyomorpha*. Com isso, as cepas NCYC495 e CBS4732 foram reclassificadas como *O. polymorpha*, já que são filogeneticamente próximas, e a cepa DL-1 foi classificada como *O. parapolyomorpha* e é filogeneticamente mais distante das outras duas (Kurtzman e Robnet, 2010; Suh e Zhou; 2010). Recentemente, a cepa NCYC495 teve seu genoma depositado com número de referência GCF\_001664045.1 (Riley et al., 2016)

Atualmente *O. polymorpha* é aplicada na produção de antígenos para três vacinas contra hepatite B: a Gen Vax B<sup>®</sup> do Serum Institute of India; a

HepavaxGene® da Johnson & Johnson e a Biovac-B® da Wockhardt. Também é aplicada na produção de biofármacos como insulina (Wosulin® da Wockardt), hirudina (Thrombexx®) e IFNa-2a (Reiferon®) ambos da Rhein Minapharm (Gellissen et al, 2005). Além disso vários outros estudos vêm sendo desenvolvidos tendo *O. polymorpha* como hospedeiro para produção heteróloga, mas ainda em escala laboratorial.

### 1.2 Promotores de *O. polymorpha*

Alguns trabalhos utilizam a indução de promotores ocasionada pela presença do metanol para regular a produção heteróloga de proteínas em *O. polymorpha*, sendo os promotores pMOX e pFMD mais utilizados. Em um trabalho para verificar as mudanças do perfil transcricional ocasionado pela adaptação à mudança da fonte de carbono de glicose para metanol, mostrou que os genes *fmd*, *mox* e *dhas* são regulados positivamente na presença do metanol, levando a um aumento de 350, 17,3 e 19 vezes na expressão, respectivamente, quando comparados à condição em que a glicose era a fonte de carbono (van Zutphen et al., 2010).

Embora existam outras leveduras metilotróficas como *Komagataella phaffii*, também bastante utilizada na produção heteróloga de proteínas por conta de seus promotores fortemente induzíveis, *O. polymorpha* possui a vantagem de ter alguns promotores que não são reprimidos em glicerol, o que não ocorre frequentemente em *K. phaffii* (Hartner and Glieder, 2006; Vogl and Glieder, 2013). Esta diferença de repressão catabólica foi observada quando Raschke e colaboradores clonaram o gene da proteína KPI, que é um inibidor de protease do tipo Kunitz, em *O. polymorpha* e *K. phaffii* sob a promoção do pAOX1 (pMOX em *O. polymorpha*) (Raschke et al., 1996). Quando as leveduras foram cultivadas em glicose como fonte de carbono, o mRNA para o gene *kpi* não foi detectado. Quando foi adicionado metanol para ativação do pAOX1, o mRNA foi detectado abundantemente. Entretanto, quando as células foram cultivadas em glicerol, o mRNA para o gene *kpi* foi detectado apenas em *O. polymorpha*, sugerindo que a via de assimilação de metanol nessa levedura possui um controle diferenciado do controle apresentado por *K. phaffii*, o que pode ser uma vantagem ao se utilizar esse promotor.

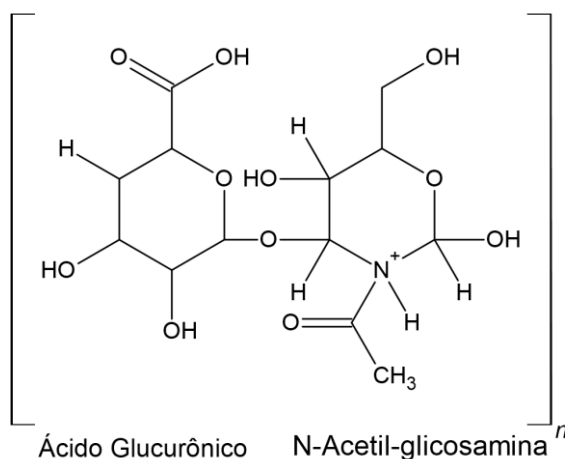
Outro exemplo de como esses promotores são fortemente regulados pôde ser observado por Mayer e colaboradores ao utilizar *O. polymorpha* como hospedeiro para produção heteróloga da enzima fitase (Mayer et al., 1999). Esta enzima é

utilizada como suplemento de ração animal, pois atua na liberação do fósforo presente nas plantas. O gene que codifica a fitase foi expresso em *O. polymorpha* sob a regulação do pFMD, resultando em uma produção de 13,5 g/L de proteína utilizando glicose ou xarope de glicose como fonte de carbono. Este resultado foi considerado um dos maiores títulos já obtido de uma proteína expressa de forma heteróloga, tendo em vista que os maiores títulos relatados na época eram de 2,5 g/L para uma invertase de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris*, e 2,25 g/L de uma glicose oxidase de *A. niger* expressa em *O. polymorpha* (Mayer et al., 1999).

Um estudo em que foram analisados promotores de genes de choque térmico mostrou que eles são ativados quando a levedura é submetida a um aumento da temperatura (40 °C), sendo o promotor pTPS1 do gene que codifica a trealose-6-fosfato sintase (*tps1*) o mais fortemente ativo (Amuel et al., 2000).

### 1.3 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero composto por moléculas de ácido glucurônico e *N*-Acetilglicosamina, ligados alternadamente por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3 (Figura 11) (Yao et al., 2021). Este composto é naturalmente encontrado no líquido sinovial, humor vítreo e em tecidos conjuntivos de vários organismos, com a função de preencher os espaços intercelulares e articulações, prevenindo assim danos causados por choque mecânico (Engström-Laurent, 1997).



**Figura 11. Estrutura molecular de uma unidade de dissacarídeo que compõe a molécula de ácido hialurônico, formada por uma molécula de ácido glucurônico e uma molécula de *N*-Acetil-glicosamina. Fonte: esse trabalho.**

O AH é produzido naturalmente por diversos organismos, dentre eles animais como os humanos, coelhos, bovinos, sapos e galos; bactérias, como os patógenos *Streptococcus equi*, *S. zooepidermicus*, *S. equisimilis*, *S. pyogenes*, *S. uberis* e *Pasteurella multocida*; algumas algas, como *Chlorella* sp. quando infectadas por *Chlorovirus*; e por leveduras como o patógeno *Cryptococcus neoformans* (de Oliveira et al., 2016; Fallacara et al., 2018). A produção heteróloga já foi descrita em *Lactococcus lactis* (Chien and Lee, 2007a), *Escherichia coli* (Yu and Stephanopoulos, 2008), *Bacillus subtilis* (Yoshimura et al., 2015), *Corynebacterium glutamicum* (Hoffmann and Altenbuchner, 2014), *K. phaffii* (Jeong et al., 2014) e *Kluyveromyces lactis* (V. Gomes et al., 2019a), entre outros.

O AH possui características reológicas como alta viscosidade, higroscopicidade, e grande capacidade de lubrificação, além de biocompatibilidade, que o tornou uma molécula de grande interesse em diversos ramos da indústria farmacêutica e cosmética (Salwowska et al., 2016). A respeito da qualidade de AH, a principal característica analisada é o tamanho das cadeias poliméricas. As cadeias maiores possuem propriedades físico-químicas adequadas para diversas aplicações, para isso as cadeias de qualidade devem atingir massa molecular na ordem de 10<sup>4</sup> a 10<sup>7</sup> kDa (Armstrong et al., 1997). Porém, cadeias menores também têm aplicações clínicas, pois possuem atividades biológicas especiais como atuar como um estimulante para proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Campo et al., 2010).

#### **1.4 Biossíntese de AH**

A biossíntese de AH tem como precursores a glicose-6-fosfato e a frutose-6-fosfato, o que divide a via em dois ramos (Figura 12). No primeiro ramo a glicose-6-fosfato é convertida por uma fosfoglucomutase, codificada pelo gene *Pmg*, em glicose-1-fosfato, que em bactérias é utilizada também na produção de polissacarídeo de parede celular e de armazenamento. A glicose-1-fosfato é convertida pela UDP-glicose pirofosforilase, codificada pelo gene *hasC*, pela adição de um UDP, a partir de um UTP, liberando um pirofosfato e gerando o nucleotídeo de açúcar UDP-glicose. A UDP-glicose, que também é utilizada na via de produção de ácido teicóico, é então convertida em ácido UDP-glucurônico pela ação da UDP-glicose desidrogenase, codificada pelo gene *hasB*, gerando 2 NADH. O segundo ramo da via parte da frutose-6-fosfato, que é convertida em glucosamina-6-fosfato pela adição de um grupo amina, proveniente de uma

glutamina, e liberando um glutamato. Esta reação é catalisada por uma aminotransferase. A glicosamina-6-fosfato é transformada em glicosamina-1-fosfato, pela ação de uma glicosamina mutase, e então a glicosamina-1-fosfato é convertida em N-acetilglicosamina-1-fosfato e depois em UDP-N-acetilglicosamina pela ação da enzima codificada pelo gene *hasD*, que realiza as ações de acetiltransferase e pirofosforilase. O AH é então produzido pela AH sintase, que realiza a ligação entre o ácido UDP-glucurônico e a UDP-N-Acetilglicosamina, liberando 2 UDP a cada ligação (Figura 12) (Chong et al., 2005; Marcellin et al., 2014).

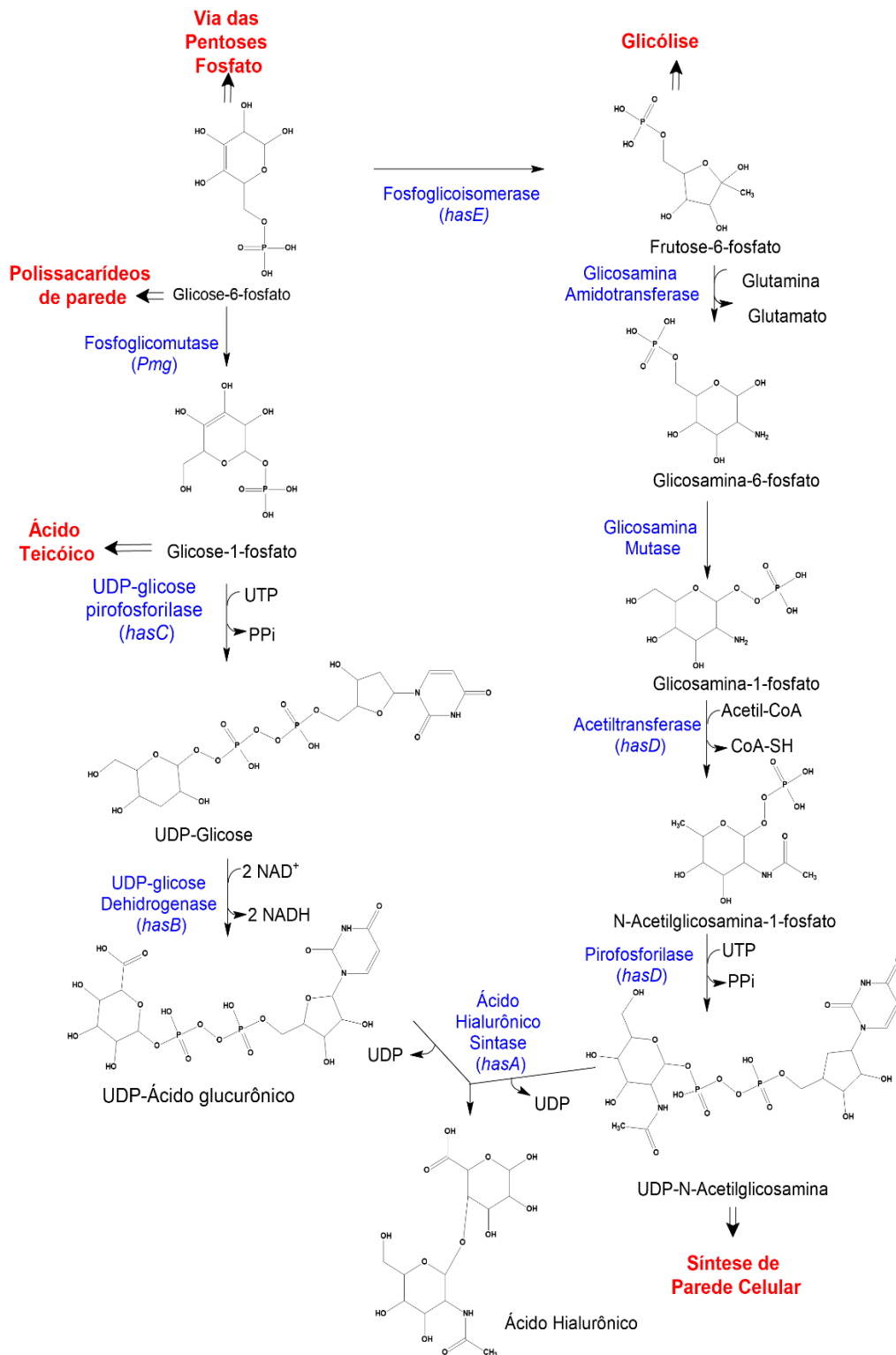


Figura 12. Via de biosíntese de AH em bactéria, evidenciando os possíveis desvios de metabólitos intermediários para utilização em outras vias. Adaptado de (Marcellin et al., 2014)).

O AH é um composto cujos precursores estão diretamente ligados ao metabolismo central do microrganismo, o que leva a um investimento realmente



caro para célula, tanto se tratando do consumo de carbono quanto no quesito energia. Para a síntese de um mol de unidade dissacarídica utilizado na produção do AH, são consumidos pela célula 2 moles de glicose, 5 moles de trifosfato de nucleotídeo, sendo 3 ATPs e 2 UTP, mais 1 mol de acetil-CoA (Widner et al., 2005).

Para contornar esse gasto de energia, em bactérias naturalmente produtoras, os genes responsáveis pela síntese de AH estão organizados em operons. O primeiro operon investigado foi de *S. pyogenes*, onde se viu que ele continha os genes *hasA*, *hasB* e *hasC* (DeAngelis et al., 1993). Outros operons *has* foram encontrados em outras espécies de *Streptococcus* e possuíam, além dos genes *hasA*, *hasB* e *hasC*, dois genes adicionais, *hasD* e *hasE*, também envolvidos na via, como é o caso de *S. zooepidemicus*, permitindo assim que a via de síntese de AH tenha, dos dois açúcares precursores, níveis adequados disponíveis (Sze et al., 2016; Widner et al., 2005).

### 1.5 Fontes de obtenção do AH

O primeiro AH com grau de pureza de aplicação farmacêutica foi produzido na década de 1970, quando um método de extração e purificação do polímero a partir de crista de galo e cordões umbilicais humanos foi estabelecido (Balazs, 1979). A partir de 1980, o AH começou a ser utilizado na formulação de sistemas para entrega de fármacos para melhorar a eficiência terapêutica (Benedetti et al., 1990; Egbu et al., 2018; El Kechai et al., 2016; Xie et al., 2011; Yerushalmi et al., 1994). Porém, o AH proveniente da crista do galo pode carregar diversos compostos que causam reações alérgicas e já foi relatado um caso de reação inflamatória após a injeção de AH extraído da crista de galo (Puttick et al., 1995).

Outra forma de se obter AH foi por fermentação de cepas do grupo C ou A do gênero *Streptococcus*, mas ela não é mais tão vantajosa, tendo em vista a escassez de ferramentas de manipulação genética para esse gênero. Além disso, estas cepas apresentarem algum grau de patogenicidade, o que dificulta e encarece também o processo de purificação do produto final (Kim et al., 1996; Widner et al., 2005). Por este motivo, diversos grupos se empenham em desenvolver um microrganismo recombinante, que possua status GRAS e seja capaz de produzir AH com um alto rendimento e um alto peso molecular.

*Bacillus subtilis* foi a primeira bactéria que produziu AH de forma heteróloga, o que exigiu a expressão do operon contendo o gene *hasA* e superexpressando os

genes *hasB* e *hasC* ou *hasD*, alcançando título de AH por volta de 6,8 g/L (Widner et al., 2005). Outra bactéria engenheirada foi a *L. lactis*: expressando *hasA* e *hasB*, induzidos pela presença de nisina, o que resultou em 0,65 g/L de AH (Chien and Lee, 2007a). *E. coli* também foi utilizada como hospedeiro para a produção de AH, com a expressão do operon HasABC resultando em ~190 mg/L de AH e utilizando o *hasA* de *S. equisimilis*. Outra bactéria que vem apresentando resultados interessantes é a *C. glutaminum*, em que se relatou que os operons HasAB e HasABC são ótimos para realizar a expressão heteróloga, resultando em 5,4 g/L de AH com 48 horas de cultivo (Cheng et al., 2017).

A via de síntese de AH também foi inserida em organismos eucariotos, como leveduras e células vegetais. A produção em *K. phaffii* foi realizada com a inserção de *xhasA* e *xhasB* provenientes de *Xenopus laevis* e com diversas combinações de superexpressão dos genes *hasC*, *hasD* e *hasE* (Jeong et al., 2014). Neste trabalho demonstrou-se que, com a inserção apenas dos genes *xhasA* e *xhasB* sob a regulação do promotor *AOX1*, a levedura apresentou uma produção de 200 mg/L de AH. Quando os autores co-expressaram também os genes *hasC*, *hasD* e *hasE*, a produção aumentou consideravelmente, bem como o peso molecular do AH produzido, resultando em uma produção de 0,8-1,7 g/L de AH, com um peso molecular de 1,2–2,5 MDa (Jeong et al., 2014). Outra levedura utilizada foi *K. lactis*, em cujo genoma foram inseridos os genes *hasAp* de *Pasteurella multocida* e *hasB* de *X. laevis*, resultando em uma produção de 1,89 g/L de AH (V. Gomes et al., 2019b). A produção em células vegetais foi relatada em células de tabaco, mas a produção não foi quantificada pelos autores (Rakkhumkaew et al., 2013). Recentemente, relatamos a produção heteróloga utilizando *O. polymorpha*, o que será melhor discutido neste trabalho (Manfrão-Netto et al., 2021).

### **1.6 Processos de Purificação de AH**

O processo de purificação do AH é uma etapa que requer tanta atenção quanto o seu processo de produção, pois um AH com um alto grau de pureza é necessário, principalmente para aplicações clínicas, pois a utilização de AH não purificado ou com um certo grau de impurezas pode acarretar reações inflamatórias, como já relatado (Balazs, 2009; Puttick et al., 1995). Conforme o processo de obtenção de AH foi mudando, novas formas de recuperar o AH foram sendo estudadas.

Um dos grandes gargalos da purificação do AH é a quantidade de proteína que também é recuperada, principalmente a partir de tecidos animais em que proteínas compõem a matriz de proteoglicanos e são responsáveis pelas reações alérgicas em diversas aplicações de produtos contendo AH (Murado, 2012). Na Tabela 6 estão descritos alguns métodos de purificação de AH com o grau de pureza obtido, mas a maioria dos trabalhos não relatam o grau de pureza.

**Tabela 6. Grau de pureza de AH obtido em diversos processos de purificação. O grau de pureza é dado pela pureza relativa do AH obtido ou pelo percentual de proteína quantificado ao final do processo.**

<b>Fonte de obtenção de AH</b>	<b>Processo de recuperação</b>	<b>Grau de pureza</b>	<b>de</b>	<b>Referência</b>
<b>Crista de galo</b>	Precipitação com CPC	3% - 7% de proteína	de	(Swann, 1968)
<b>Tecido ocular de peixe</b>	Filtração (300 kDa; diafiltração) e Eletrodeposição de Proteína	18% de AH		(Murado et al., 2012)
	Precipitação com etanol (1,5:1) (v/v)	88% de AH		
<b>Caldo fermentativo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i></b>	Filtração tangencial, MF e UF, 100 e 300 kDa, diafiltração)	0,07% de proteína	de	(Zhou et al., 2006)
<b>Caldo fermentativo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i></b>	Filtração (tangencial, UF, 100 kDa, diafiltração)	90%		(Oueslati et al., 2015)
<b>Caldo fermentativo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i></b>	Precipitação com isopropanol (1:1) (v/v)	14,1% de proteína	de	(Rangaswamy and Jain, 2008)
	Adsorção com sílica gel, 2% (p / v)	4,5% de proteína		
	Filtração e adsorção com conjunto de filtro de carvão de 0,45 µm	0,6% de proteína	de	
	Filtração (diafiltração, 5 vezes, 50 kDa)	0,06% de proteína	de	
<b>Caldo fermentativo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i></b>	Quatro precipitações com etanol (3: 2) (v/v)	87% de AH		(Sousa et al., 2009)

<b>Caldo fermentativo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i></b>	Três precipitações com etanol (2:1) (v/v)	55% de AH	(Cavalcanti et al., 2019)
<b>Caldo fermentativo de <i>Streptococcus zooepidemicus</i></b>	Precipitação com isopropanol (2:1) (v/v)	79% de AH	(Cavalcanti and Santana, 2019)

Quando o AH passou a ser produzido por fermentação de bactérias do gênero *Streptococcus*, em que a mais utilizada é *S. zooepidemicus*, a precipitação com solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona e isopropanol passou a ser a etapa mais comum no processo de purificação de AH, sendo o etanol e o isopropanol os solventes mais utilizados, tendo em vista a toxicidade dos outros solventes, além de apresentarem um custo menor (Cavalcanti et al., 2020). Recentemente, estudou-se a utilização de etanol em duas proporções (2:1 e 3:1 (v/v)), bem como o efeito da adição de cloreto sódico e a modulação de pH na purificação de AH a partir de caldo fermentativo de *S. zooepidemicus* (Cavalcanti et al., 2019). Foram realizadas três precipitações consecutivas, e se demonstrou uma pureza de 55% com a proporção de 2:1 (v/v) e pH 4, com recuperação de 85% do AH produzido.

O isopropanol foi utilizado por Rangaswamy e Jain, também na precipitação de caldo fermentativo de *S. zooepidemicus*, na proporção 1:1 (v/v), em que se obteve uma proporção de 16,5% (p/p) de proteína para AH (Rangaswamy and Jain, 2008). Já em outro trabalho, também utilizando *S. zooepidemicus*, mas com três proporções diferente de isopropanol, mostrou-se que, em uma única precipitação na proporção 2:1 (v/v), foi possível recuperar 76% do AH produzido, com uma pureza de 79%, em pH 3 (Cavalcanti and Santana, 2019). Outra investigação do efeito da precipitação com etanol, na proporção 3:1 (v/v), em que se realizaram quatro precipitações consecutivas, alcançou uma pureza relativa por volta de 91%, com uma redução do teor inicial de proteínas de 87% (Sousa et al., 2009).

Outra forma de precipitação de AH comumente utilizada como alternativa aos solventes orgânicos são os sais quaternários, como o cloreto de cetilpiridínio (CPC) e o brometo de cetiltrimetilamônia (CTAB), tendo em vista que eles formam complexos com o AH que o retiram de solução. Depois, o complexo AH-sal pode

ser separado novamente em uma solução iônica ou pelo uso de algum solvente orgânico (Cavalcanti et al., 2020). A precipitação com CPC foi utilizada como uma das etapas de purificação de AH extraídos de crista de galo, em que se obteve um teor de proteína entre 3% e 7% (Swann, 1968). A precipitação com CPC também é utilizada em diversos trabalhos com caldo fermentativo de *B. subtilis* (Chien and Lee, 2007b; Adam W. Westbrook et al., 2018; Westbrook et al., 2016; Widner et al., 2005). Já o CTAB é utilizado em combinação com solventes orgânicos, como etanol, e o complexo formado pelo CTAB e o AH também pode ser utilizado para quantificação, pois gera uma turbidez na solução, que pode ser medida por espectrofotometria (Cavalcanti et al., 2020; Oueslati et al., 2014).

Outro processo envolvido na purificação do AH é a filtração, que também pode ser usada para melhorar o desempenho da etapa de precipitação. No trabalho realizado por Zhou e colaboradores, usaram micro- e ultrafiltrações sequenciais para separar o AH do caldo fermentativo de *S. zooepidemicus*, com passagens através de membranas de fluoreto de polivilideno de 0,2 e 0,45  $\mu\text{m}$ ; e de 100 kDa e 300 kDa respectivamente (Zhou et al., 2006). Os melhores resultados foram com um teor de aproximadamente 0,07% de proteína, com recuperação de 77% de AH. Geralmente a filtração é associada a outras etapas, como centrifugação e precipitação.

Após a filtração e a precipitação, é comum o uso de outra etapa, chamada absorção, que se baseia na utilização de algum sólido com capacidade de reter seletivamente compostos em sua superfície. Dentre eles, o carvão ativado é sem dúvida o mais utilizado devido a sua disponibilidade e baixo custo (Cavalcanti et al., 2020). A comparação de dois adsorventes, carvão ativado e alumina gama, utilizados separadamente ou combinados, já foi investigada (Yeon et al., 2008). Dentre várias concentrações, o melhor resultado foi de uma combinação de 3% de carvão ativado e 1,5% de alumina gama, resultando em um teor de proteína de 0,8  $\mu\text{g/mL}$  de proteína; quando utilizados separadamente, 3% de carvão ativado e 2% de alumina gama resultaram em 1,7  $\mu\text{g/mL}$  e 1,9  $\mu\text{g/mL}$  de proteína, respectivamente. Outro trabalho investigou a ação de 10 g/L de bentonita 30 g/L de carvão ativado como adsorventes. O resultado foi um teor de proteína em relação ao AH de 0,44% (p/p) após o tratamento com bentonita e de 0,12% (p/p), com carvão ativado (Hemant, Phase Nakul; Sonal, Tyagi; Bondalakunta, 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

A engenharia de *O. polymorpha* é uma boa alternativa para a produção do biopolímero, por não oferecer risco a saúde humana, apresentar boa faixa de tolerância a temperatura, ter técnicas de manipulação genética bem estabelecidas e ainda apresentar fortes promotores de expressão heteróloga. Por isso, nosso grupo de pesquisa já possui três cepas em que se confirmou a produção de AH.

Recentemente foi publicado um modelo metabólico em escala genômica para *O. polymorpha* (Zorrilla and Kerkhoven, 2021), o que nos permitirá prever *in silico* como a inserção da via de produção de AH influencia outras rotas metabólicas da levedura, assim como realizar simulações de alterações em vias metabólicas competidoras que possam aumentar a produção de AH em *O. polymorpha*. Outro ponto de investigação é como funciona a distribuição de carbono pelas rotas metabólicas de *O. polymorpha*, o que pode ser simulado pelo modelo e então confirmado por análises de fluxo metabólico, que é importante caso uma das estratégias a ser abordada seja a redistribuição do fluxo de carbono como forma de melhorar o rendimento de AH, e para entender melhor a fisiologia da levedura. Além disso, nosso grupo já desenvolveu outro modelo de produção de AH, em *K. lactis*, que também pode servir de base de comparação para estudos em *O. polymorpha*.

Além da importância para a pesquisa de base, este trabalho também tem importância econômica, tendo em vista que o mercado de AH movimentou valores em torno de 9,1 bilhões de dólares no ano de 2019, segundo a "Transparency Market Research", com estimativas de atingir cerca de 16,6 bilhões de dólares em 2027. Por isso, o desenvolvimento de uma cepa de *O. polymorpha* com alto rendimento e produzindo um AH com alto peso molecular é de grande importância.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar cepas de *O. polymorpha* produtoras de ácido hialurônico quanto à quantidade de AH produzido e como essa produção pode ser aumentada.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Construir os plasmídeos pHIPZ18\_*hasAp*, pHIPZ7\_*hasAp* e pHIPH4\_*hasB*;
- Confirmar a produção de AH nas cepas construídas,
- Otimizar o processo de purificação do AH produzido por *O. polymorpha*.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Meios de cultura

- **Meio L (caldo de lisogenia)**

Peptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	5 g
Ágar bacteriológico	15 g

Os componentes foram diluídos em água destilada e o pH, ajustado para 7,0, com volume final ajustado para 1 L. Para o meio líquido, não foi adicionado o ágar bacteriológico.

- **Meio SOB**

Peptona	20 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	0,5 g
Ágar bacteriológico	15 g

Os componentes foram diluídos em água destilada e o pH ajustado para 7,0, com o volume final ajustado para 1 L. Para o meio líquido, não foi adicionado o ágar bacteriológico.

- **Meio YPD**

Peptona	20 g
Extrato de Levedura	10 g
Glicose	20 g

O extrato de levedura e a peptona foram diluídos em água destilada e o volume, ajustado para 900 mL. A glicose foi dissolvida em 100 mL de água destilada e ambas as soluções foram esterilizadas por autoclavagem e depois misturadas, completando o volume de 1 L de meio. Em caso de meio sólido, foram adicionados 15 g de ágar bacteriológico à solução com extrato de levedura e peptona.

- **Meio YPM**

Peptona	20 g
Extrato de Levedura	10 g
Metanol	20% (v/v)

O extrato de levedura e a peptona foram diluídos em água destilada e o volume, ajustado para 900 mL. Após esterilização por autoclavagem, adicionaram-se 100 mL de metanol, diluído previamente para 20% em água deionizada estéril.

- **Meio otimizado para produção de AH**

Peptona	10 g
Extrato de Levedura	7,5 g
Fosfato de Dipotássio	2,5 g
Sulfato de Magnésio	0,5 g
Cloreto de Sódio	5 g
Glutamina	0,4 g
Ácido Glutâmico	0,6 g
Ácido Oxálico	0,2 g
Glicose	40 g

Todos os componentes do meio, com exceção da glicose, foram dissolvidos em água destilada e o volume, ajustado para 900 mL. A glicose foi dissolvida em 100 mL de água destilada e adicionada ao restante do meio após a esterilização das duas soluções por autoclave (Im et al., 2009).

#### 4.1.2 Soluções e Soluções Tamponantes

- **Tampão TED**
- Tris-HCl 100 mM, pH 8,0
- EDTA 50 mM, pH 8,0

Os componentes foram misturados no volume desejado, o pH foi ajustado com HCl 1M, e a solução foi esterilizada por autoclavagem. Antes da utilização, adicionou-se  $\beta$ -Mercaptoetanol a 175 mM.

- **Tampão STM**
- Sacarose 270 mM
- Tris-HCl 10 mM, pH 8,0
- Cloreto de Magnésio 1 mM

Os componentes foram misturados no volume final desejado e então foi esterilizado utilizando autoclave.

- **Tampão de Lise**

Triton 100X	400 $\mu$ L
Tris-HCl 1M, pH 8.0	200 $\mu$ L
SDS 10%	2 mL
EDTA 0,5M	40 $\mu$ L
NaCl 1M	2 mL

Os componentes foram misturados no momento da utilização e o volume foi ajustado para 20 mL.

- **Solução bórax para quantificação de AH**
- 25 mM de Tetraborato de sódio decahidratado (bórax)

O bórax foi dissolvido em Ácido Sulfúrico absoluto, tomando as devidas precauções ao agitar, pois a mistura é de difícil homogeneização.

- **Solução de Carbazol**
- Carbazol 0,125% (p/v)

O carbazol foi dissolvido em Etanol ou Metanol absoluto.

- **Tampão TBE 10X**

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

Ácido Bórico	0,55% (p/v)
--------------	-------------

- **Tampão TAE 10X**

Tris Base	400 mM
EDTA	9 mM
Ácido Acético	11,42 mL

- **Tampão de Carregamento**

Azul de Bromofenol	0,02% (p/v)
Sacarose	2 M
TAE	1X

- **Solução Stains-All**

0,005% (p/v) de Stains-All da Sigma foi dissolvido em 500 mL de etanol 50% (v/v).

- **SDS 0,1% (Dodecil Sulfato de Sódio)**

0,1% de SDS (p/v) foi dissolvido em água deionizada.

- **CTAB 4%**

4% de CTAB (p/v) foi dissolvido em água deionizada.

- **Tween80 0,2%**

0,2% de Tween80 (v/v) foi dissolvido em água deionizada.

- **SLS 0,1% (Lauril éter sulfato de sódio)**

0,1% de SLS (p/v) foi dissolvido em água deionizada.

- **Tampão CCMB80**

Acetato de Potássio 1M, pH 7	10 mL
Cloreto de Cálcio Dihidratado	11,8 g
Cloreto de Manganês Tetrahidratado	4 g
Cloreto de Magnésio Hexahidratado	2 g
Glicerol	10% (v/v)
Água MilliQ	100 mL

Os componentes foram misturados e o volume ajustado para 1 L com água MilliQ®.

#### 4.1.3 Cepas

As cepas utilizadas nesse trabalho, assim como as linhagens originadas dele, estão descritas na Tabela 7.

**Tabela 7. Descrição das cepas utilizadas nesse trabalho especificando seus genótipos.**

<b>Microrganismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Referência</b>
<b><i>E. coli</i></b>	DH10B	F <i>endA1 deoR+ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)76 97 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) StrR λ</i>	Invitrogen
<b><i>O. polymorpha</i></b>	NCYC49 5	<i>Δyku80</i>	(Saraya et al., 2012)
<b><i>O. polymorpha</i></b>	EMB 101	<i>hasAp</i> de <i>Pasteurella multocida</i> e <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i> integrados no genoma	(Manfrão-Netto et al., 2021)
<b><i>O. polymorpha</i></b>	EMB 102	<i>hasAp</i> de <i>Pasteurella multocida</i> e <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i> integrados no genoma	(Manfrão-Netto et al., 2021)
<b><i>O. polymorpha</i></b>	EMB 103	<i>hasAp</i> de <i>Pasteurella multocida</i> e <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i> integrados no genoma. O gene de serino integrases utilizadas para rotacionar os genes <i>hasAp</i> e <i>hasB</i> , sob a promoção do pMOX.	(Manfrão-Netto et al., 2021)
<b><i>O. polymorpha</i></b>	EMB 104	<i>hasP</i> de <i>S. zooepidemicus</i> e <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i> integrados no genoma	(Manfrão-Netto et al., 2021)

#### 4.1.4 Vetores e Plasmídeos

Todos os vetores e plasmídeos utilizados nesse trabalho estão descritos na Tabela 8.

**Tabela 8. Lista de vetores e plasmídeos utilizados nesse trabalho.**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
<b>pHIPH4</b>	Plasmídeo integrativo de <i>O.polymorpha</i> contendo promotor AOX e marca de seleção para higromicina	(Saraya et al., 2012)
<b>pHIPZ7</b>	Plasmídeo integrativo de <i>O.polymorpha</i> contendo promotor TEF e marca de seleção para zeocina	(Saraya et al., 2012)
<b>pHIPZ18</b>	Plasmídeo integrativo de <i>O.polymorpha</i> contendo promotor ADH1 e marca de seleção para zeocina	(Saraya et al., 2012)
<b>pHIPH4_hasB</b>	Plasmídeo integrativo derivado do pHIPH4, contendo o gene <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i>	(Manfrão-Netto et al., 2021) e este trabalho
<b>pHIPZ18_hasAp</b>	Plasmídeo integrativo derivado do pHIPZ18, contendo o gene <i>hasAp</i> de <i>P. multocida</i>	(Manfrão-Netto et al., 2021) e este trabalho
<b>pHIPZ7_hasAp</b>	Plasmídeo integrativo derivado do pHIPZ7, contendo o gene <i>hasAp</i> de <i>P. multocida</i>	(Manfrão-Netto et al., 2021) e este trabalho
<b>pHIPZ18_hasB</b>	Plasmídeo integrativo derivado do pHIPZ18, contendo o gene <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i>	(Manfrão-Netto et al., 2021)
<b>pHIPH4_hasAs</b>	Plasmídeo integrativo derivado do pHIPH4, contendo o gene <i>hasAs</i> de <i>S. zooepidemicus</i>	(Manfrão-Netto et al., 2021)

<b>pGEM-T easy</b>	Vetor utilizado para clonagem de produtos de PCR	Invitrogen
<b>pGEM_ <i>hasB</i></b>	Plasmídeo contendo o <i>hasB</i> , originado de PCR para adição de sítios de restrição específicos	Este trabalho
<b>pGEM_ <i>hasAp</i></b>	Plasmídeo contendo o <i>hasAp</i> , originado de PCR para adição de sítios de restrição específicos	Este trabalho
<b>pBSK_ <i>hasAp</i></b>	Plasmídeo contendo o gene sintético <i>hasA</i> de <i>Pasteurella multocida</i>	(V. Gomes et al., 2019a)
<b>pBSK_ <i>hasB</i></b>	Plasmídeo contendo o gene sintético <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i>	(V. Gomes et al., 2019a)
<b>pBSK_ <i>hasAs</i></b>	Plasmídeo contendo o gene sintético <i>hasA</i> de <i>S. zooepidemicus</i>	Este trabalho

Os plasmídeos da série pHIP foram cordialmente cedidos pelo grupo de pesquisa da Universidade de Groningen ( <https://www.rug.nl/research/molecular-cell-biology/research/the-hansenula-polymorpha-expression-system>).

#### 4.1.5 Oligonucleotídeos iniciadores

Todos os oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho, bem como suas sequências e características estão descritas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Lista de oligonucleotídeos iniciadores detalhando sua sequência, sítio de restrição inserido e temperatura de anelamento.

Oligonucleotídeo	Sequência	Sítio adicionado	Temperatura de anelamento
<b>hasB_ foward</b>	AAAGTCGACTTACACACGTT GCTTC	Sall	57° C
<b>hasB_ reverse</b>	AAAAAGCTTAATGTTTCAGA TCAAGAAGATTTGTTGTA	HindIII	57° C
<b>hasAp_ foward</b>	<b>AAGCTTAAGCTTATGAATAC</b> CTTATCTC	HindIII	60° C
<b>hasAp_ reverse</b>	AAAGTCGACGCCTTTACAAT GTGATTGA	Sall	60° C

#### 4.1.6 Enzimas

Taq DNA Polimerase	Phoneutria
T4 DNA ligase	Thermo Fisher Scientific
FastAP Thermosensitive	Thermo Fisher Scientific
Alkaline Phosphatase	
RNAse	Thermo Fisher Scientific
FastDigest HindIII	Thermo Fisher Scientific
FastDigest Sall	Thermo Fisher Scientific
FastDigest EcoRI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest XhoI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest PstI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest AgeI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest StuI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest XbaI	Thermo Fisher Scientific

#### 4.1.7 Antibióticos

Os antibióticos utilizados na seleção das cepas recombinantes estão descritos na Tabela 10, assim como as concentrações de estoque e de uso.

**Tabela 10. Lista de antibióticos.**

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentração de estoque</b>	<b>Concentração de seleção</b>
<b>Ampicilina</b>	100 mg/mL	100 µg/mL
<b>Higromicina (Sigma-Aldrich)</b>	50 mg/mL	300 µg/mL
<b>Zeocina (Sigma-Aldrich)</b>	100 mg/mL	100 µg/mL

#### 4.1.8 Kits utilizados

- GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific): foi utilizado para purificar os produtos de PCR utilizados nas construções;
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific): foi utilizado para recuperar os plasmídeos que foram replicados em bactéria;



- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific): foi utilizado para recuperar fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.

## 4.2 Metodologias

### 4.2.1 Amplificação dos genes

Os genes *hasB* e *hasAp* foram amplificados por PCR a partir dos plasmídeos pBSK\_*hasB* e pBSK\_*hasAp* respectivamente, para adição dos sítios de restrição para as enzimas HindIII e Sall nas extremidades. Cada reação continha tampão para PCR 10X (Phorontria) na concentração 1X; 0,2 mM de dNTP; 1,5 mM de cloreto de magnésio; 0,05 mM de cada iniciador; 1 U de Taq Polimerase e 20 ng de DNA molde, com volume final de 20µL. O programa consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos; anelamento à temperatura de cada par de iniciadores por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos; com extensão final a 72 °C por mais 4 minutos. A amplificação foi analisada em gel de agarose a 0,8% e os produtos de PCR, purificados com o GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).

### 4.2.2 Construção dos Plasmídeos

Os produtos de PCR correspondentes aos genes *hasB* e *hasAp* foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), dando origem aos plasmídeos pGem\_*hasB* e pGem\_*hasAp*. Isto foi feito porque a clivagem direta dos produtos de PCR com as enzimas de restrição para ligação direta aos plasmídeos da série pHIP não teve êxito.

- **pHIPH4\_*hasB***

Os plasmídeos pGem\_*hasB* e o pHIPH4 foram digeridos com as enzimas de restrição HindIII e Sall, seguindo as orientações do fabricante. Os fragmentos correspondentes ao *hasB* e ao pHIPH4 linearizado foram purificados a partir de um gel de agarose 0,8%, utilizando-se o GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Os fragmentos foram então ligados pela enzima T4 DNA ligase, seguindo as orientações do fabricante, para então ser inseridos em bactéria para replicação, resultando no plasmídeo pHIPH4\_*hasB*.

- **pHIPZ18\_*hasAp***

Para a construção do pHIPZ18\_*hasAp*, o plasmídeo pBSK\_*hasAp* foi digerido pelas enzimas de restrição PstI, HindIII e XbaI, liberando três fragmentos de DNA:

um de 2964 pb que corresponde ao gene *hasAp* e outros de 2560 e 291 pb, correspondentes ao pBSK. A *PsiI* foi necessária porque, quando o pBSK\_ *hasAp* era digerido apenas com *HindIII* e *XbaI*, os dois fragmentos resultantes, de 2964 pb do gene *hasAp* e de 2815 pb do pBSK, eram indistinguíveis em gel de agarose. Em paralelo, o plasmídeo pHIPZ18 foi digerido com *HindIII* e *XbaI*, que liberam um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pares de base correspondente ao gene de uma GFP. Os fragmentos correspondentes ao gene *hasAp* e ao plasmídeo pHIPZ18 foram purificados a partir do gel de agarose 0,8% e ligados para dar origem ao plasmídeo pHIPZ18\_ *hasAp*.

- **pHIPZ7\_ *hasAp***

A partir do plasmídeo pHIPZ18\_ *hasAp* foi montado o plasmídeo pHIPZ7\_ *hasAp*, para troca do promotor. Para isso, os plasmídeos pHIPZ18\_ *hasAp* e o pHIPZ7 foram digeridos com *HindIII* e *XhoI*, e os fragmentos correspondentes ao *hasAp* liberado e ao pHIPZ7 linearizado foram purificados a partir de gel de agarose 0,8% e então ligados para dar origem ao plasmídeo pHIPZ7\_ *hasAp*.

#### 4.2.3 Construção das cepas produtoras de AH

As cepas foram construídas inserindo combinações dos plasmídeos, contendo o gene *hasA* e *hasB* como ilustrado na Figura 13.

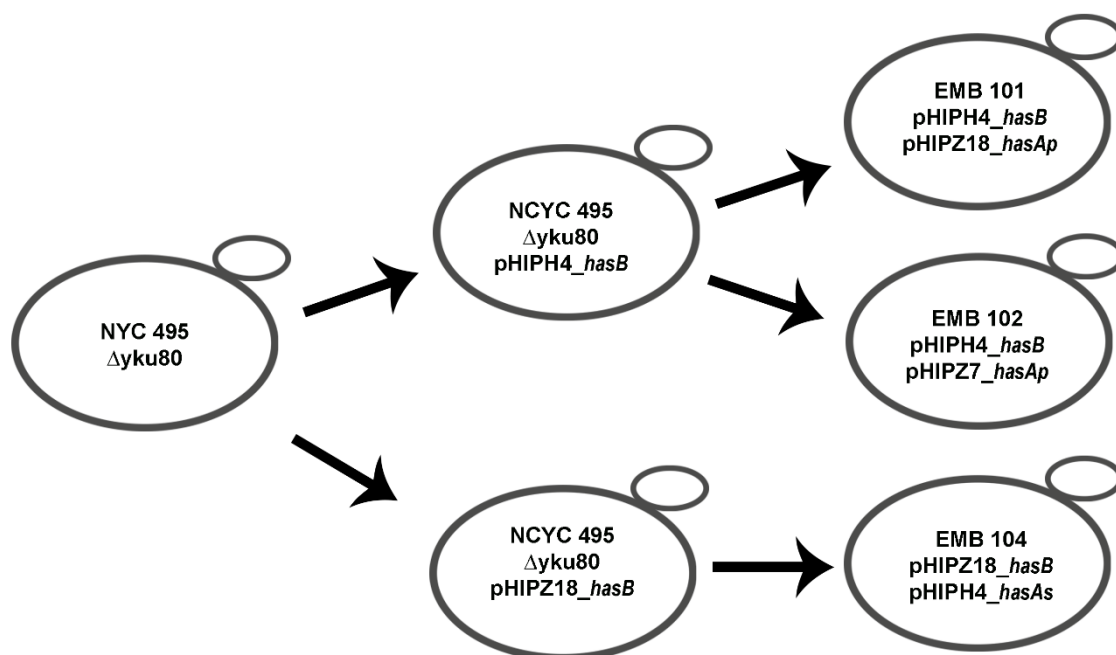


Figura 13. Esquematização da construção das cepas EMB 101, EMB 102 e EMB 104.

#### 4.2.4 Transformação de bactéria

- *Preparação de células competentes*

Primeiramente as células de bactéria foram retiradas do estoque em ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e plaqueadas em meio SOB, seguido de incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. A partir da placa, fez-se um pré-inóculo em 2 mL de meio SOB em tubo de centrífuga de 15 mL, que foi incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm por 16 horas. A partir do pré-inóculo, fez-se um inóculo em 205 mL de meio SOB, que foi novamente incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm. O crescimento das células foi acompanhado pela medição da densidade óptica (OD) a 600 nm, até que se atingisse a OD de 0,26. As células foram então centrifugadas a 5000 rpm e  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e o sobrenadante, descartado. As células foram então ressuspensas em 80 mL de tampão CCMB80 e incubadas no gelo por 20 minutos. Foram então novamente centrifugadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células, novamente ressuspensas em 10 mL de tampão CCMB80 e incubadas no gelo por mais 20 minutos. Então, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram distribuídas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e

armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para uso posterior (Green and Sambrook, 2018).

- *Transformação de células termo competentes de E. coli*

Alíquotas de células de *E. coli* DH10B termo competentes foram retiradas do ultrafreezer e mantidas no gelo para descongelar. Adicionou-se então 1-5  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial, que foi delicadamente misturado às células com a ponteira. Seguiram-se incubações no gelo por mais 30 minutos, a  $42^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e novamente no gelo por 2 minutos. Então foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de meio LB, pré-aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os tubos foram então incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm por 1 hora, para recuperação das células, em seguida semearam-se alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e 150  $\mu\text{L}$  em placas contendo LB e o antibiótico de seleção (Green and Sambrook, 2018).

#### 4.2.5 *Transformação de levedura*

O procedimento de transformação foi adaptado de um protocolo previamente descrito por (Saraya, 2014)). Primeiramente, cultivou-se a cepa NCYC495 em placa de YPD a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. A partir da placa, inoculou-se uma colônia em 50 mL de YPD, que foram incubados por 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm. A partir deste pré-inóculo, fez-se um inóculo de 100 mL de meio YPD com a  $\text{OD}_{600}$  inicial de 0,1; este foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm até que se atingisse uma  $\text{OD}_{600}$  de 1,2 a 1,5. O inóculo foi então transferido para tubos de centrifuga de 50 mL, que foram centrifugados por 5 minutos, 3000  $g$  e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado.

As células foram ressuspensas em 25 mL de tampão TED e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm por 15 minutos. Foram então centrifugadas novamente por 5 minutos a 3000  $g$  e temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado. As células foram então lavadas com 35 mL de tampão STM gelado, seguido de centrifugação a 3500  $g$  e  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a lavagem foi repetida. As células foram então ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão STM, e alíquotas de 60  $\mu\text{L}$  foram distribuídas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL.

Às alíquotas de células adicionaram-se no máximo 4  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial linearizado e transferiram-se as suspensões para cuvetas de eletroporação de 2 mm, previamente resfriadas. As condições da descarga elétrica foram 50  $\mu\text{F}$ , 150  $\Omega$  e 1,5 kV; o equipamento utilizado foi o eletroporador celular BTX ECM600. Após

o choque, foram adicionados 940  $\mu\text{L}$  de meio YPD às cuvetas e então o volume foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL, que foram incubados a 37 °C e agitação de 200 rpm, por pelo menos 2 horas. Em seguida alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$  e 600  $\mu\text{L}$  foram semeadas em placas de YPD e antibiótico de seleção (Tabela 10).

#### 4.2.6 *Cultivo das cepas*

Em todos os experimentos, foram semeadas placas de YPD, incubadas a 37 °C por 48 h. As placas foram feitas no máximo com uma semana de antecedência. A partir delas, inocularam-se em 5 mL de meio YPD em tubos de centrífuga de 15 mL, que foram incubados a 37 °C e 200 rpm por 16 horas. A partir do pré-inóculo foi feito um inóculo em 100 mL de meio YPD, para as cepas NCYC495, EMB102 e EMB104, com  $\text{OD}_{600}$  inicial de 0,3. A  $\text{OD}_{600}$  foi monitorada a cada 1,5 hora para acompanhar o crescimento, e com 7 horas e 20 horas de cultivo adicionou-se metanol a 1% (v/v) para indução do promotor pMOX. Após aproximadamente 26 horas de cultivo, as células foram coletadas, lavadas e transferidas para 100 mL de meio otimizado para produção de AH. Após a transferência, coletou-se 1 mL de amostra a cada 2 horas para extração de AH e medição de  $\text{OD}_{600}$ .

Outro cultivo foi feito com as cepas NCYC495 e EMB103. Primeiramente, a cepa EMB103 foi cultivada em 10 mL de YPM com higromicina a 37 °C e 200 rpm por 48h. Este inóculo foi semeado em placas contendo YPD com higromicina. Destas foi feito o inóculo em 100 mL de meio otimizado para produção de AH. O crescimento e a produção de AH foram acompanhados pela coleta de 1 mL de cultura a cada 1,5 hora. Todos os cultivos foram realizados em triplicata biológica. Para os inóculos, foram utilizados frascos de 1 L aletados, para melhorar a aeração.

#### 4.2.7 *Purificação de AH*

Foram testados dois métodos de purificação de AH. No primeiro protocolo, 50 mL de cultura foram adicionados a 1 volume de SDS 0,1% (p/v) e as amostras foram mantidas em agitação por 10 minutos e então centrifugadas por 5 minutos a 4500 g para separação das células. Ao sobrenadante adicionou-se 1,5 volume de etanol gelado e as amostras foram incubadas a 4 °C durante a noite e então centrifugadas a 4500 g e 4 °C por 30 minutos. O sedimento foi então lavado com 25 mL de etanol 75% e NaCl a 0,15 M. Após mais uma centrifugação, o

sobrenadante foi descartado e o sedimento, incubado à temperatura ambiente para evaporação do etanol. Ao fim, as amostras foram ressuspensas em água MilliQ® (Jeong et al., 2014).

Para o segundo protocolo de purificação do AH, adicionou-se às amostras 1 volume (v/v) de SDS 0,1%, seguido de incubação à temperatura ambiente por 5 horas, com mistura por inversão a intervalos de aproximadamente 15 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado, descartado. Ao sobrenadante adicionou-se 1 volume de etanol absoluto gelado, e as amostras foram então incubadas a 4 °C por pelo menos 24 horas. Em seguida, foram centrifugadas a 12000 g e 4 °C por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensado em 500 µL de água MilliQ® autoclavada. Adicionaram-se então 3 volumes de etanol absoluto gelado e o processo de precipitação foi repetido. As amostras foram então ressuspensas em 500 µL de água MilliQ® novamente e submetidas à quantificação por carbazol (Cavalcanti et al., 2019; Wang et al., 2014).

Além disso, verificou-se o efeito de outros detergentes na liberação da cápsula de AH: SDS 0,1%; CTAB 4%; Tween-80 0,2% e SLS 0,1%, que foram adicionados ao caldo fermentativo, na proporção 1:1 (v/v) e com incubação subsequente por 10 minutos, sendo as amostras agitadas por inversão. Em seguida, elas foram precipitadas duas vezes com 1,5 volume de etanol durante a noite, e então centrifugadas e ressuspensas em água MilliQ® para quantificação. Para este teste, usou-se apenas o caldo fermentativo da cepa EMB 103.

#### *4.2.8 Quantificação de AH*

O procedimento de quantificação de AH foi adaptado de Bitter and Muir, 1962. Em tubos de ensaio, misturaram-se 500 µL de solução borax a 200 µL de amostra, a que se seguiu incubação a 100 °C por 10 minutos. Na sequência, adicionaram-se 30 µL de solução de carbazol; a solução foi delicadamente misturada e incubada novamente por mais 15 minutos. Após as amostras chegarem à temperatura ambiente, 200 µL foram aplicados, em triplicata, a poços de microplacas de 96 poços de fundo chato, e realizou-se a leitura a 530 nm com o leitor de placas Eon™ (BioTek®). O título de AH foi calculado como descrito por (Widner et al., 2005). Usou-se uma curva padrão com as concentrações: 10

$\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{g/mL}$ ; 50  $\mu\text{g/mL}$ ; 100  $\mu\text{g/mL}$ ; 200  $\mu\text{g/mL}$ ; 300  $\mu\text{g/mL}$ ; 400  $\mu\text{g/mL}$ ; 500  $\mu\text{g/mL}$  e 600  $\mu\text{g/mL}$ . O padrão utilizado foi o AH 99% da Sigma-Aldrich.

#### *4.2.9 Análise estatística*

Realizou-se uma análise de variância para verificar se houve alguma diferença entre as amostras. Um teste Tukey foi aplicado para comparar as médias das taxas de crescimento e OD final, com  $p < 0,05$ , comparando-se cada amostra à cepa controle negativo NCYC495. Para verificar a diferença entre os métodos de purificação, aplicou-se um teste t não pareado, com  $p < 0,05$ . Os testes foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 7.00 para Windows.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Construção de cepas produtoras de AH

*O. polymorpha* vem sendo modificada por engenharia metabólica para atuar na produção de etanol a partir de xilose (Kurylenko et al., 2014) ou de glicerol (Hong et al., 2010). Também já foi aplicada na expressão de proteínas, mas a produção de ácidos orgânicos por engenharia metabólica ainda não havia sido relatada. Este trabalho se propôs a avaliar se *O. polymorpha* seria capaz de produzir AH pela inserção dos genes *hasA* e *hasB*. Para isso foram criadas três cepas, em que se testaram três combinações de promotores constitutivos com o promotor pAOX (Figura 14). A cepa EMB101 foi construída com os plasmídeos pHIPZ18\_*hasAp* e pHIPH4\_*hasB*; a cepa EMB102, com pHIPZ7\_*hasAp* e pHIPH4\_*hasB* e a cepa EMB104, com pHIPH4\_*hasAs* e pHIPZ18\_*hasB*. Os genes *hasB* de *X. laevis* e *hasAp* de *P. multocida* foram escolhidos por terem sido expressos em outras leveduras como *K. phaffii* e *K. lactis* e suas proteínas terem apresentado atividade nesses sistemas (Jeong et al., 2014; V. Gomes et al., 2019a).

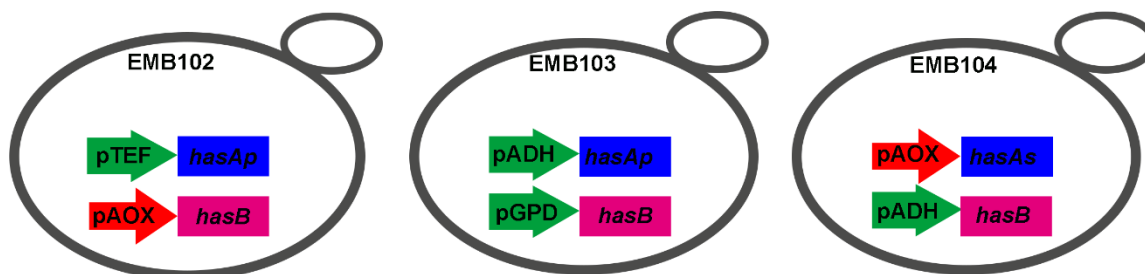


Figura 14. Descrição das cepas utilizadas com seus respectivos esquemas de promoção. As cepas EMB 102 e EMB 104 têm um gene induzível (setas vermelhas) e outro constitutivo (setas verdes); e a cepa EMB 103 têm ambos constitutivos.

A cepa EMB101 apresentou uma certa instabilidade no sítio de integração do plasmídeo pHIPZ18\_*hasAp*: os clones selecionados perdiam o gene com o passar das gerações. Isto ensejou a criação das demais cepas.

### 5.2 Cultivo e caracterização do crescimento de cepas produtoras de AH

A levedura *O. polymorpha* é diferente de outras leveduras metilotróficas como *K. phaffii*, cujo promotor AOX é fortemente induzível por metanol mesmo na presença de glicose. Em *O. polymorpha*, o pMOX (pAOX) é reprimido na presença



de glicose em condição não limitante (Hartner and Glieder, 2006). Por isso, o cultivo das cepas EMB 102 e EMB 104 foi dividido em duas etapas: uma de crescimento e outra de produção. Na etapa de crescimento o objetivo foi acumular biomassa e quando a concentração de glicose no meio estava baixa adicionou-se metanol para induzir a expressão gênica de *hasB* ou *hasA*, para então iniciar a etapa de produção. Nesta, as células foram transferidas para um meio novo para que com a indução dos genes heterólogos se iniciasse a produção de AH. A EMB 103 foi previamente cultivada em metanol para garantir a indução da ação da integrase, e então foi inoculada em meio contendo glicose. Um dos principais pontos levantados por trabalhos anteriores foi que a produção de AH afetaria diretamente o crescimento celular pois seus precursores derivam diretamente do metabolismo central dos organismos, gerando assim uma competição entre a produção de AH e o crescimento celular (de Oliveira et al., 2016; Adam W Westbrook et al., 2018). Para as cepas EMB 102 e EMB 104 isso não ficou muito evidente na etapa de crescimento, pois nesta fase ainda não há a produção de AH (Figura 15).

Foi observado na cepa EMB 102 um título de AH foi de 0,186 mg/mL (Figura 15 A). Nesta cepa, a síntese de UDP-ácido glucurônico só é iniciada após a expressão do gene *hasB*, que é induzido pela adição de metanol ao meio de cultura quando a glicose já está em um nível limitante. Desta forma, a produção de AH fica limitada, mesmo a cultura sendo transferida para um meio novo com glicose não limitante (Figura 15 A). Nos estudos anteriores, o aumento da concentração de AH foi alcançado após diversas melhorias na via de biossíntese de AH, sendo a superexpressão de genes nativos, que codificam enzimas que catalisam reações intermediárias da via, correspondentes aos genes *hasC*, *hasD* e *hasE*, a estratégia mais utilizada para melhoramento (Adam W Westbrook et al., 2018; Widner et al., 2005; Yu and Stephanopoulos, 2008). O UDP-ácido glucurônico é considerado um componente limitante da via de AH, daí ter a coexpressão do gene nativo para a UDP-glicose desidrogenase (*hasB*) junto com o gene *seHas*, que codifica a AH sintase de *S. equisimilis* foi uma estratégia usada para melhorar a produção de AH em *Bacillus* (Widner et al., 2005).

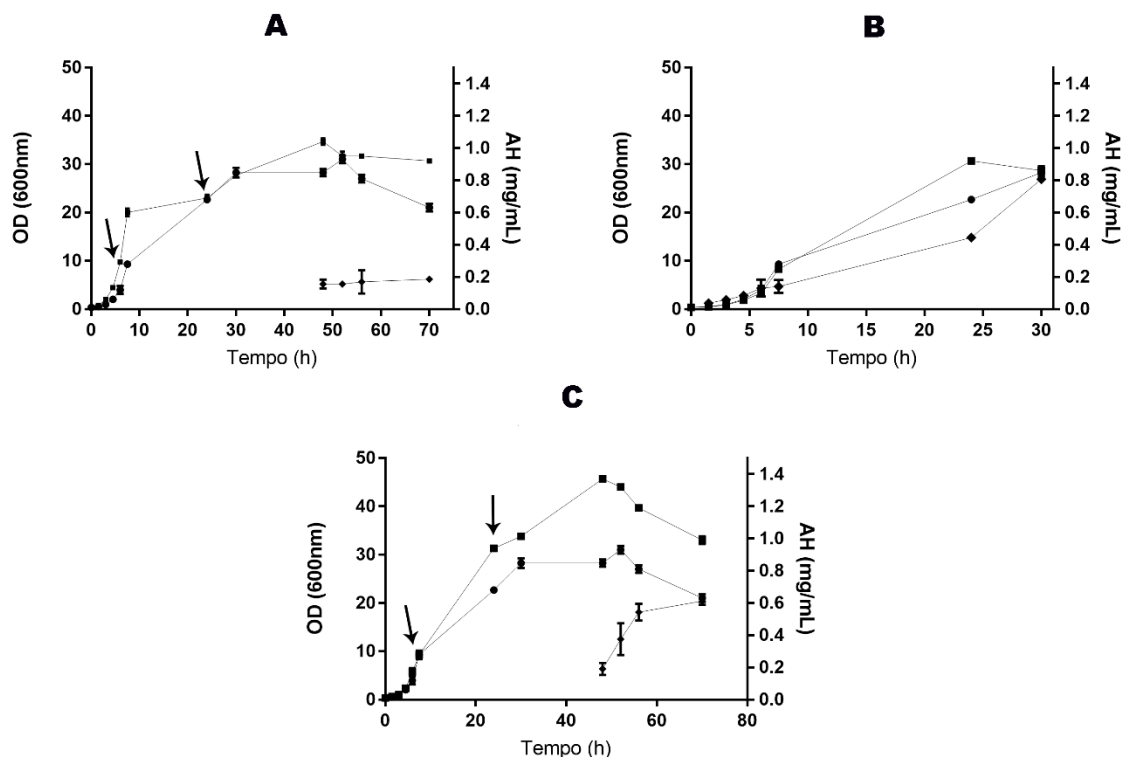


Figura 15. Perfil de crescimento (quadrado) e de produção de AH (losango) das cepas EMB 102 (A), EMB 103 (B) e EMB 104 (C), comparadas com a cepa NCYC495 (círculo). As setas indicam os tempos em que as culturas foram induzidas com metanol.

Já a cepa EMB 104 expressa constitutivamente o gene *hasB*, o que leva a célula a acumular UDP-ácido glucurônico intracelular durante a etapa de crescimento. Assim, quando a síntese da AH sintase começa após a indução por metanol do gene *hasAs*, a produção de AH se inicia de forma mais eficiente, pois a célula já possui ambos os precursores, o que resultou em um título de 0,612 mg/mL de AH (Figura 15 C). No trabalho de produção heteróloga de AH utilizando *K. phaffii*, a expressão do operon contendo os genes *hasA* e *hasB* sob a ação do promotor pAOX1 resultou numa produção de aproximadamente 200 mg/L e o maior título alcançado foi de 1,7 g/L quando, além de se expressar *hasA* e *hasB*, super expressaram os genes nativos correspondentes a *hasC* e *hasD* (Jeong et al., 2014). Outra levedura recentemente engenheirada para a produção de AH foi *K. lactis*, que apresentou o título de 1,8 g/L, com a introdução dos *hasB* de *X. laevis* e *hasA* de *P. multocida* (V. Gomes et al., 2019a). Assim como a EMB 104, a cepa BAP de *K. lactis* possui o gene *hasB* expresso de forma constitutiva pelo promotor pGPD e o gene *hasA* expresso de forma indutiva pelo pLAC4.

A cepa EMB 103 possui ambos os genes expressos constitutivamente, de modo que, conforme os precursores vão sendo produzidos, o AH também vai sendo sintetizado (Figura 15 B), atingindo-se um título de 0,807 mg/mL de AH. A produção impactou na velocidade de crescimento desta cepa quando comparada à cepa não produtora NCYC495 (Figura 16 A), em contraste com as cepas EMB 102 e EMB 104. Quando comparamos a OD final de crescimento, houve diferença significativa entre as cepas EMB 102 e 104, quando comparadas a NCYC495. Já entre as NCYC495 e a EMB 103, não houve diferença significativa (Figura 16 B).

Trabalhos anteriores relatam a importância de haver um equilíbrio entre os precursores UDP-ácido glucurônico e UDP-*N*-acetilglicosamina (Vigetti et al., 2014). Um desequilíbrio de proporção entre eles impacta diretamente na atividade da AH sintase, pois quando há uma baixa nos níveis de UDP-*N*-acetilglicosamina, interrompe-se a elongação da cadeia polimérica, o que impacta não só a produção, mas também a massa molecular do polímero (Jagannath and Ramachandran, 2010). Outro ponto de destaque de trabalhos anteriores é a utilização de promotores induzíveis para o gene da AH sintase, deixando o restante da via ser expressa de forma constitutiva, levando ao acúmulo de precursores intracelulares (Cheng et al., 2017; Chien and Lee, 2007a; Adam W Westbrook et al., 2018; Widner et al., 2005).

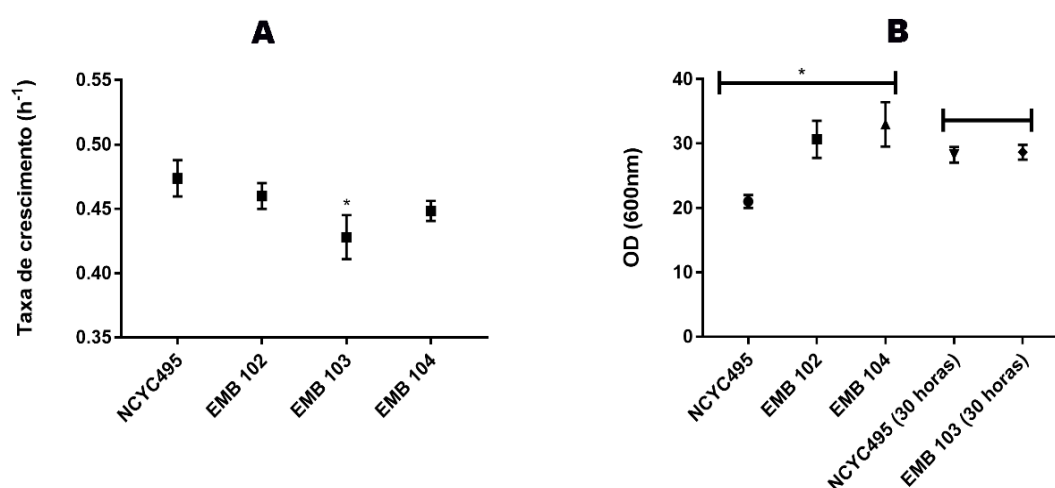
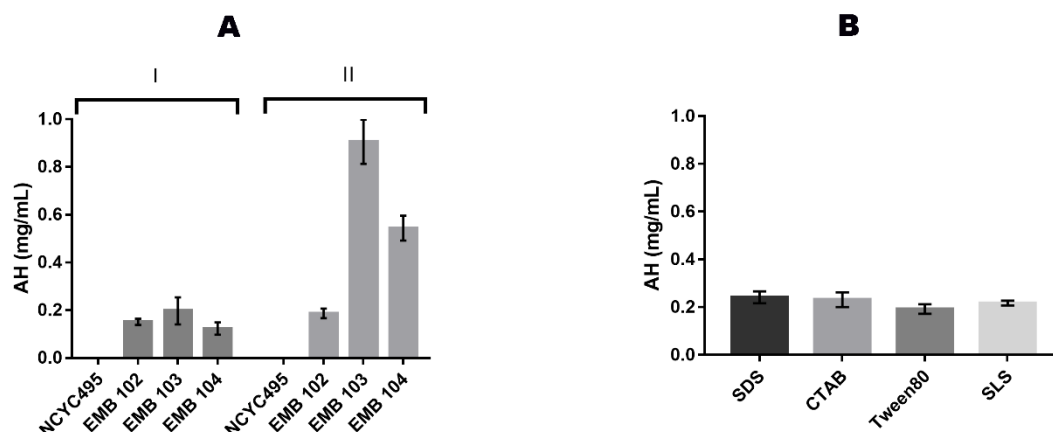


Figura 16. Dados de crescimento. (A) velocidade de crescimento das cepas construídas comparando-as com a da cepa NCYC495 obtidas a partir da equação linear da reta, em que apenas a cepa EMB 103 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). (B) OD obtida ao final de cada crescimento, onde para as cepas EMB 102 e EMB 104, houve uma diferença significativa (\*) quando comparada a cepa NCYC495. Já a cepa EMB 103 não apresentou diferença significativa na OD ao final do cultivo se comparada a NCYC495 ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Purificação de AH

Foram comparados dois métodos de purificação de AH neste trabalho, sendo que as principais diferenças entre eles foram o tempo de incubação para a remoção da cápsula de AH e a quantidade de precipitações realizadas com etanol (Figura 17A). Os dados mostram que, para *O. polymorpha*, incubar as células com o detergente por 5 horas foi mais eficiente que por 10 minutos, que é o tempo geralmente utilizado na remoção da cápsula em outros microrganismos (Jeong et al., 2014; Rakkhumkaew et al., 2013; Shah et al., 2013; Sunguroğlu et al., 2018; V. Gomes et al., 2019a). Outra diferença significativa foi na precipitação com etanol. No primeiro protocolo foi realizada apenas uma precipitação na proporção 1:1 (v/v), que resultou em título de AH de 0,197 mg/mL para a EMB 103; 0,123 mg/mL para a EMB 104 e 0,151 mg/mL para a EMB 102. Já o segundo protocolo, em que foi utilizada na primeira precipitação a proporção de etanol para cultura de 1,5:1 (v/v) e na segunda precipitação, a proporção de 3:1 (v/v); resultou em um aumento do AH recuperado para 0,807 mg/mL e 0,612 mg/mL para as cepas EMB 103 e EMB 104 respectivamente. A cepa EMB 102 apresentou produção de 0,186 mg/mL, mas estatisticamente não foi um aumento relevante comparado ao resultado obtido no primeiro protocolo (Figura 17A).

A utilização da proporção de etanol para cultura de 3:1 (v/v) mostrou-se melhor para recuperação de AH de caldo fermentativo de *S. zooepidemicus* (Cavalcanti et al., 2019; Pourzardosht and Rasaei, 2017) e em *B. subtilis* (Zhang et al., 2016). Outros trabalhos também utilizaram outras proporções, como 2:1 (Zakeri et al., 2017), utilizando caldo fermentativo de *S. zooepidemicus*; e 1,5:1 em *L. lactis* (Sunguroğlu et al., 2018). Outro ponto observado foi a quantidade de precipitações: diversos trabalhos utilizam pelo menos duas, relatando que a cada precipitação também aumentou o grau de pureza do AH (Zakeri et al., 2017; Zhang et al., 2016).



**Figura 17. (A) Título de AH quantificado após cada protocolo de purificação, em que I foi o primeiro protocolo e II, o segundo, resultando no aumento do AH recuperado para as cepas EMB 103 e EMB 104. A cepa EMB 102 não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ). (B) Título de AH da cepa EMB 103 após o tratamento com diferentes detergentes, utilizando-se o primeiro protocolo de purificação: não se observou diferença estatística significativa entre eles.**

Outra pergunta levantada foi: será que outro composto com característica de detergente melhoraria a liberação da cápsula de AH da célula? A fim de testar essa hipótese, testaram-se quatro detergentes: SDS, CTAB, Tween80 e SLS (Figura 17B), mas não foi observada diferença estatística na quantidade de AH recuperado. Diversos trabalhos utilizam SDS 0,1% para a remoção da cápsula, o que se mostrou eficiente em *Bacillus*, *E. coli*, *L. lactis*, *K. lactis*, *K. phafii* e *S. zooepidemicus* (Sunguroğlu et al., 2018; V. Gomes et al., 2019a; Yu and Stephanopoulos, 2008; Zakeri et al., 2017; Zhang et al., 2016). O CTAB é outro composto já descrito na literatura com utilidade no processo de purificação de AH, tendo em vista que é um sal quaternário que, quando em contato com a solução com AH, forma um precipitado, retirando o AH de solução (Cavalcanti et al., 2020; Lago et al., 2005). Todavia, sua ação em remover a cápsula de AH não havia sido descrita. A utilização de sais quaternários é comum no processo de purificação, em que o mais utilizado é o CPC em culturas de *Bacillus* e *C. glutamicum* (Cheng et al., 2017; Adam W Westbrook et al., 2018; Westbrook et al., 2016; Widner et al., 2005). Os demais detergentes não foram descritos na literatura para fins de remoção da cápsula.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho mostrou que *O. polymorpha* pode ser uma boa candidata para se inserirem rotas de produção de ácidos orgânicos. A inserção dos genes *hasB* e *hasA* foi suficiente para as cepas produzirem o AH, sendo que a cepa EMB 103 apresentou o melhor título, de 0,807 mg/mL, mas há possibilidades de melhorar a produção e outras análises precisam ser realizadas.

Uma delas é quanto ao tamanho do AH que está sendo produzido pelas cepas EMB 102, EMB 103 e EMB 104. Visando o melhoramento da cepa algumas estratégias podem ser testadas como a super expressão dos genes que codificam outras enzimas da via – *hasC*, *hasD* e *hasE* – para verificar se isto aumentaria o título de AH. A deleção ou atenuação de vias competidoras também poderia ser aplicada, visando aumentar a disponibilidade de precursores para a produção de AH, para o que se poderiam aplicar técnicas como CRISPRi (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats interference), utilizada para atenuar a via das pentoses em *B. subtilis* (Westbrook et al., 2016). Alternativamente, podem-se criar interruptores genéticos para ativar ou desativar a função de alguma enzima que possa interferir na síntese de AH.

Avaliar a produção de AH das cepas EMB 102, EMB 103 e EMB 104 em biorreator também seria interessante, pois a produção de AH necessita de oxigênio disponível e avaliar essas cepas em condições que podem ser controladas, como aeração e pH, poderia fornecer informações para melhorar o processo de produção de AH em *O. polymorpha*, haja vista que este trabalho realizou todos os crescimentos em frascos, sem controle de aeração ou ajuste de pH ao longo do cultivo.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, J.A.S. de;, Rovida, A.F. da S., Pamphile, J.A., 2015. FUNGOS DE INTERESSE: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. *Revista UNINGÁ Review* 21, 55–59.
- Adrio, J.L., Demain, A.L., 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6, 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0133-0>
- Almeida, J.R.M. de, Collares, D.G., Barbosa, P.F.D., 2015. BIOPROSPECÇÃO MICROBIANA.
- Bononi, V.L., Capelari, M., Maziero, R., Trufem, S.F.B., 1995. Cultivo de cogumelos comestíveis. *Ícone*.
- Lai, Y., Wang, L., Qing, L., Chen, F., 2011. Effects of cyclic AMP on development and secondary metabolites of *Monascus ruber* M-7. *Lett Appl Microbiol* 52, 420–426. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03022.x>
- Mulder, K.C.L., Mulinari, F., Franco, O.L., Soares, M.S.F., Magalhães, B.S., Parachin, N.S., 2015. Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnol Adv* 33. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.001>
- Santos, S.C. dos, Castro, D.C.Ma. de, Assunção, P.S. de, Santos, T.L. dos, Quintella, C.M., 2018. MAPEAMENTO TECNOLÓGICO DE PROCESSOS MICROBIANOS APLICADOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS. *Cadernos de Prospecção* 11, 1740. <https://doi.org/10.9771/cp.v12i5.25240>
- Teresa, P., Armando, M., Javier, B.-G., 2015. Amplification of *laeA* Gene in *Aspergillus terreus*: A Strategy to Generate Lovastatin-Overproducing Strains for Solid-State Fermentation. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4, 537–555.
- Wagner, J.M., Alper, H.S., 2016. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology* 89, 126–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>