

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Bruno Damasceno de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE APARATOS DE EXPRESSÃO *IN TANDEM* DE ENZIMAS
DA VIA DE SÍNTESE DE CAROTENOIDES EM LEVEDURAS DE INTERESSE
INDUSTRIAL**

Porto Alegre

2024

Bruno Damasceno de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE APARATOS DE EXPRESSÃO *IN TANDEM* DE ENZIMAS
DA VIA DE SÍNTESE DE CAROTENOIDES EM LEVEDURAS DE INTERESSE
INDUSTRIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Área de habilitação: Biotecnologia Molecular

Orientação: Prof. Dr. Diego Bonatto

Aprovado em: 14/08/2024

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Bruno Damasceno
DESENVOLVIMENTO DE APARATOS DE EXPRESSÃO IN TANDEM
DE ENZIMAS DA VIA DE SÍNTESE DE CAROTENOIDES EM
LEVEDURAS DE INTERESSE INDUSTRIAL / Bruno Damasceno de
Oliveira. -- 2024.
45 f.
Orientador: Diego Bonatto.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Biologia sintética. 2. Engenharia metabólica. 3.
Biossíntese de carotenoides. 4. Dispositivo de
expressão policistrônico. 5. Leveduras industriais. I.
Bonatto, Diego, orient. II. Título.

Bruno Damasceno de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE APARATOS DE EXPRESSÃO *IN TANDEM* DE ENZIMAS
DA VIA DE SÍNTESE DE CAROTENOIDES EM LEVEDURAS DE INTERESSE
INDUSTRIAL**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 14/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Bonatto - Centro de Biotecnologia -
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira - Centro de Biotecnologia -
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub - Departamento de Tecnologia dos Alimentos -
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Jane, por ter tornado possível o impossível. Você é uma pessoa que move montanhas para atingir seus objetivos. Sempre será minha inspiração. Sou eternamente grato por tudo que você fez por nós. Eu te amo.

Ao meu irmão, Eduardo, por ser minha companhia de vida. Uma das minhas maiores felicidades é te acompanhar crescer. Eu admiro a pessoa que tu tem se tornado a cada ano que passa. Sempre foi e sempre será minha referência.

Ao Tuco por todos os passeios que clarearam a minha mente. Você chegou na minha vida quando eu comecei a graduação e foi essencial durante esse período. Estar ao teu lado trouxe uma paz reconfortante que só você poderia proporcionar.

À Sol por ter iluminado a minha vida. Foi lindo te conhecer e espero te ver cada vez melhor. Saiba que um futuro brilhante te aguarda. Sou grato pela nossa conexão, a gente se entende como ninguém. Como tu mesma diz: É só a gente no mundo!

Ao Chat: Enrico, Ella, Deniel, Mel e Nayara por estarem presentes em um momento muito delicado, vocês foram essenciais para seguir em frente. Foi incrível conhecer pessoas tão diferentes da minha realidade e compreender que as possibilidades da vida são inimagináveis. Agradeço por todos os rounds de pomodoro que fizemos juntos. Vocês sempre terão um espaço no meu coração.

Ao Paraíso Tropical: Alexandre, Alice, Esther, Fábio, Fernanda, Gabrielly, Laura, Lucas, Luiza, Mariah, Martins, Náthali e Pedro. Nós formamos uma rede de apoio ao longo desses anos e eu agradeço por todos os momentos que passamos juntos. Vocês tornaram a graduação um período leve e afetuoso, que será lembrado com muito carinho. Cada um de vocês é especial à sua maneira e marcou momentos importantes dessa jornada. Sou grato por serem exatamente do jeitinho que são.

A todos os membros do LBCM por sempre serem atenciosos e receptivos. Ao professor e orientador, Diego Bonatto, por todos os ensinamentos e, principalmente, por dispor dessa oportunidade. À Sofia por toda companhia durante esses meses e por ter me ensinado tanto. À Isabella pelo apoio e por ser uma referência.

A todos, minha gratidão!

RESUMO

Os carotenoides são pigmentos tetraterpenos sintetizados por organismos fotossintéticos e por alguns fungos e bactérias heterotróficos. Nos seres humanos, os carotenoides são obtidos pela dieta e desempenham papéis importantes, como os de antioxidantes, de precursores de provitamina A e de fotoprotetores. Os carotenoides comercialmente relevantes incluem o β -caroteno, o licopeno e a zeaxantina, dentre outros. Por sua vez, o desenvolvimento de biologia sintética e engenharia metabólica possibilitou a síntese microbiana de carotenoides, por exemplo, utilizando microrganismos para obter metabólitos provenientes da introdução de genes carotenogênicos heterólogos. Apesar de *Saccharomyces cerevisiae* não acumular naturalmente carotenoides, exemplos bem-sucedidos descritos na literatura a definem como um modelo potencial para produção de carotenoides. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver linhagens de *S. cerevisiae* com aparatos de expressão de sequências codificadoras de enzimas da via de síntese de carotenoides. Para isso, foram obtidas as sequências codificadoras dos genes *CrtE*, *CrtI* e *CrtYB* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *HMG1* de *S. cerevisiae*, que codificam enzimas essenciais para a geração de precursores para a biossíntese de carotenoides. Por fim, foi obtida a sequência curta intergênica IGG6 de *Glarea lozoyensis*, que possibilita o reinício da tradução proteica em mRNA derivado de genes policistrônicos, favorecendo a formação de múltiplas proteínas de forma similar àquela observada para operons procariotos. Uma vez obtidas as sequências, procedeu-se com a construção do dispositivo de expressão policistrônico denominado *BetaCar_PC_yeast*. Os resultados obtidos demonstram a confirmação por eletroforese da amplificação da concatenação do construto contendo os fragmentos *CrtE-HMG1-CrtIA*, bem como do construto contendo os fragmentos *CrtIB-CrtYB*. Por conseguinte, as perspectivas futuras direcionam para a concatenação de ambos os construtos gerados, para geração do construto final *CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB*. Depois, pretende-se efetuar a clonagem em vetor de expressão, gerando linhagens de *S. cerevisiae* com múltiplas cópias dos aparatos de expressão policistrônicos.

Palavras-chaves: Carotenoides; Dispositivo de expressão policistrônico; Leveduras industriais.

ABSTRACT

Carotenoids are tetraterpene pigments synthesized by photosynthetic organisms, heterotrophic fungi, and bacteria. In humans, carotenoids are obtained from the diet and play important roles as antioxidants, pro-vitamin A, and photoprotectants. Commercially relevant carotenoids include β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. In turn, the development of synthetic biology and metabolic engineering has enabled the microbial synthesis of carotenoids, for example, by using microorganisms to obtain secondary metabolites from the introduction of heterologous carotenogenic genes. Although *Saccharomyces cerevisiae* does not naturally accumulate carotenoids, it has been shown to be a potential microbial host based on successful examples in the literature as a model for carotenoid production. The aim of this study was to develop *Saccharomyces cerevisiae* strains using an expression apparatus for coding sequences for enzymes in the carotenoid synthesis pathway. To do this, we obtained the coding sequences of *CrtE*, *CrtI*, and *CrtYB* from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *HMG1* from *S. cerevisiae*, which encode enzymes essential for the generation of precursors for carotenoid biosynthesis. Finally, we obtained the short intergenic sequence IGG6 from *Glarea lozoyensis*, which enabled the restart of protein translation in mRNA derived from polycistronic genes, favoring the formation of multiple proteins in a manner similar to that observed for prokaryotic operons. Once the sequences of the DNA parts were obtained, a polycistronic expression device called "*BetaCar_PC_yeast*" was constructed. The results obtained were confirmed by electrophoresis of the amplified construct containing the *CrtE-HMG1-CrtIA* fragments, and the construct containing the *CrtIB-CrtYB* fragments. Future proposed works include the concatenation of both constructs generated, resulting in the final *CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB* construct.

Keywords: Carotenoids; Polycistronic expression device; Industrial yeasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da rota de biossíntese de carotenoides em bactérias, fungos, cianobactérias, algas e plantas.....	12
Figura 2. Representação dos dois principais grupos de carotenoides: carotenos e xantofilas. Exemplos das moléculas de carotenoides para ilustrar as estruturas desses compostos.....	13
Figura 3. Representação da conversão metabólica de β -caroteno e retinoides.....	16
Figura 4. Ciclo visual, o qual ocorre em células de epitélio pigmentar da retina (EPR) e de fotorreceptores (F).....	18
Figura 5. Representações do construto.....	30
Figura 6. Eletroforese das reações de amplificação dos fragmentos de DNA usados para a construção do dispositivo poliestrônico.....	32
Figura 7. Eletroforese da amplificação da concatenação de fragmentos.....	34
Figura 8. Eletroforese das amplificações de concatenações de fragmentos.....	36
Figura 9. Eletroforese das amplificações de concatenações de fragmentos.....	38
Figura 10. Eletroforese das amplificações de concatenações de fragmentos.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Segmentos de DNA usados para a montagem <i>in silico</i> dos dispositivos de expressão policistrônicos da rota de biossíntese de carotenóides em leveduras.....	28
Tabela 2. Oligonucleotídeos gerados a partir da concatenação dos diferentes segmentos de DNA referentes ao dispositivo de expressão policistrônico da rota de biossíntese de carotenóides.....	28
Tabela 3. Segmentos de DNA amplificados por meio de PCR de alta fidelidade e respectivos oligonucleotídeos, bem como a canaleta de aplicação na eletroforese (Figura 6) e respectivos tamanhos de banda esperados.....	31
Tabela 4. Valores quantificados dos amplicons, bem como respectivo volume utilizado na reação de concatenação do construto <i>CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB</i> ...	33
Tabela 5. Valores quantificados dos amplicons, bem como respectivo volume utilizado nas reações de concatenação dos construtos <i>CrtE-HMG1-CrtIA</i> e <i>CrtIB-CrtYB</i>	35
Tabela 6. Valores quantificados dos amplicons, bem como respectivo volume utilizado nas reações de concatenação dos construtos <i>CrtE-HMG1</i> , <i>HMG1-CrtIA</i> , <i>CrtIA-CrtIB</i> e <i>CrtIB-CrtYB</i>	37
Tabela 7. Construtos amplificados por meio de PCR de alta fidelidade e respectivos oligonucleotídeos, bem como canaleta de aplicação na eletroforese (Figura 9) e respectivos tamanhos de banda esperados.....	37
Tabela 8. Construtos amplificados por meio de PCR de alta fidelidade e respectivos oligonucleotídeos, bem como canaleta de aplicação na eletroforese (Figura 10) e respectivos tamanhos de banda esperados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ROS: *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

$^1\text{O}_2$: Oxigênio singlete

OH*: Radical hidroxila

O_2^{*-} : Radicais superóxidos

BCO1: Enzima β -caroteno 15,15'-oxigenase

PBP4: *Retinol binding protein 4* (Proteína-4 de ligação ao retinol)

RA: *Retinoic acid* (Ácido retinóico)

CRABP II: *Cellular retinoic acid binding protein 2* (Proteína de ligação ao ácido retinóico celular)

RAR: *Retinoic acid receptor* (Receptores de ácido retinóico)

RXR: *Retinoid X receptor* (Receptores X retinoides)

RAREs: *Retinoic acid response elements* (Elementos de resposta ao ácido retinóico)

EPR: Epitélio pigmentar da retina

F: Fotorreceptores

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)

CrtE: Sequência codificadora para geranylgeranyl difosfato sintase

CrtI: Sequência codificadora para fitoeno dessaturase

CrtYB: Sequência codificadora para fitoeno sintase

HMG-CoA: Hidroximetilglutaril-CoA

HMG1: Sequência codificadora para hidroximetilglutaril-CoA redutase

IGG1: *Short intergenic sequences* (Sequências curtas intergênicas)

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

YEPD: *Yeast extract peptone dextrose* (Extrato de levedura, peptona e dextrose)

NaCl: Cloreto de sódio

RPM: Rotações por minuto

LBA: Meio Luria-Bertani com ampicilina

HF: *High fidelity* (Alta fidelidade)

TAE: Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Carotenoides.....	12
1.2 Atividade antioxidante dos carotenoides.....	14
1.3 Atividade provitamina A dos carotenoides.....	15
1.4 Ciclo visual.....	17
1.5 Produção de carotenoides.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	22
3.1 Geração de aparatos de expressão policistrônicos a partir de bioinformática e biologia sintética.....	22
3.2 Linhagens de microrganismos, condições de cultivo, procedimentos de transformação plasmidial e geração de leveduras poliplóides.....	23
3.3 Transformação e isolamento de vetores de <i>Escherichia coli</i>	23
3.4 Clonagem por concatenação de fragmentos de DNA para obtenção do construto <i>BetaCar_PC_yeast</i>	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Projeto dos aparatos de expressão policistrônicos para a rota de biossíntese de carotenoides.....	27
4.2 Montagem <i>in vitro</i> dos aparatos de expressão policistrônicos para a rota de biossíntese de carotenoides.....	31
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carotenoides

Os carotenoides são um grupo de compostos tetraterpenos derivados da ligação de duas unidades C_{20} de geranylgeranyl-difosfato para gerar a cadeia C_{40} de fitoeno, a partir da qual as diversas variações são originadas (Figura 1) (Britton, 2022). Sendo assim, essa cadeia tetraterpena $C_{40}H_{56}$ atua como um esqueleto comum para esses compostos, de forma que modificações como hidrogenação, ciclização, oxidação e demais processos são responsáveis por gerar diferentes moléculas. Bancos de dados categorizam mais de 1200 estruturas de carotenoides descritos (Xie *et al.*, 2024).

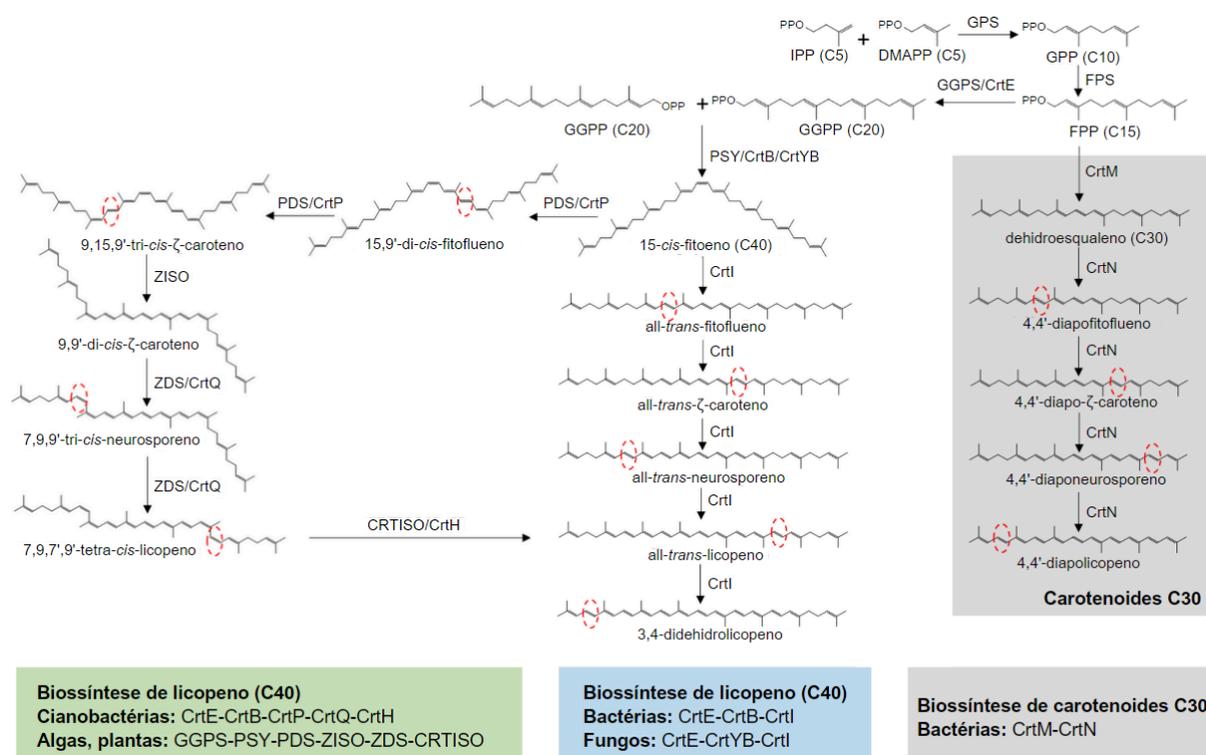


Figura 1. Representação da rota de biossíntese de carotenoides em bactérias, fungos, cianobactérias, algas e plantas. (adaptado de Liang; Zhu; Jiang, 2018).

Os carotenoides são divididos em dois grupos principais: (i) os carotenos que são compostos por hidrogênio e carbono formando uma cadeia poli-insaturada de hidrocarboneto, podendo-se destacar β -caroteno, α -caroteno e licopeno e (ii) as

xantofilas que são derivadas dos carotenos pela adição de grupos funcionais contendo oxigênio, como hidroxilas, carbonilas e aldeídos, podendo-se destacar zeaxantina, luteína e astaxantina (Figura 2) (Maoka, 2020). A composição desses grupos se relaciona às propriedades de polaridade, de forma que os carotenos são facilmente solúveis em solventes hidrofóbicos, tal como hidrocarbonetos como hexano e tolueno, enquanto as xantofilas desempenham melhor dissolução em solventes mais hidrofílicos, assim como metanol e etanol.

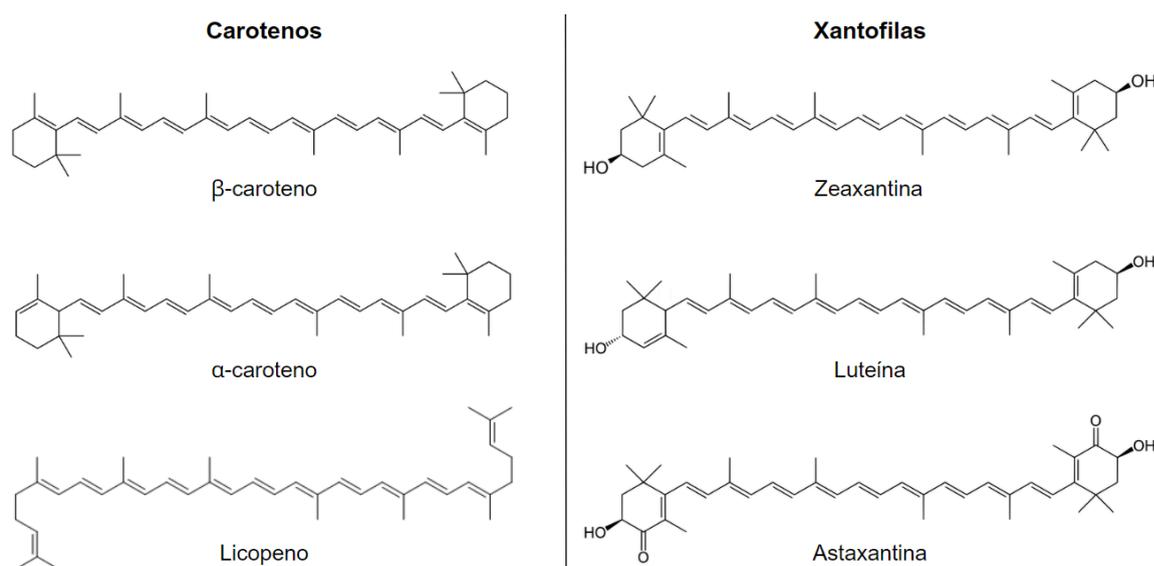


Figura 2. Representação dos dois principais grupos de carotenoides: carotenos e xantofilas. Exemplos das moléculas de carotenoides para ilustrar as estruturas desses compostos.

As atividades biológicas e as propriedades físico-químicas atribuídas aos carotenoides estão diretamente relacionadas à sua estrutura. A estrutura molecular central é composta por unidades de isopreno com ligações duplas conjugadas que tornam possível a absorção de luz no espectro visível, característica essencial para desempenhar sua função biológica como pigmento (Macernis *et al.*, 2022). A absorção de luz ocorre principalmente em comprimentos de onda da região azul do espectro, portanto as cores resultantes variam entre tonalidades de amarelo, laranja e vermelho características (Sandmann, 2022).

Carotenoides são sintetizados por todos os organismos fotossintéticos e por alguns fungos e bactérias heterotróficos (Stra *et al.*, 2023). Nas plantas, os cloroplastos produzem e armazenam carotenoides, os quais estão presentes em membranas dos plastídios de uma célula vegetal. A localização está relacionada com desempenhos de captação de luz durante a fotossíntese, bem como de fotoproteção dissipando energia excessiva que pode causar danos. Nos animais, em virtude de não haver síntese, a obtenção de carotenoides ocorre em decorrência da ingestão de alimentos. Isso permite a biodisponibilidade desse composto, isto é, que uma quantidade do nutriente ingerido proveniente da dieta esteja disponível para utilização no metabolismo (Rocha *et al.*, 2023).

1.2 Atividade antioxidante dos carotenoides

A dieta com carotenoides pode promover benefícios à saúde. Dentre os efeitos resultantes, pode-se destacar a atuação como antioxidantes biológicos ao regular o estresse oxidativo. No corpo humano, são produzidas uma série de espécies reativas de oxigênio (ROS), como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxila (OH^*) e radicais superóxidos (O_2^{*-}). Os antioxidantes podem reagir com radicais livres por três mecanismos principais: (i) adição radical, (ii) abstração de átomos de hidrogênio e (iii) produção de cátions radicais por transferência de elétrons (Dewanjee *et al.*, 2021).



A estrutura molecular dos carotenoides é composta por uma série de ligações duplas conjugadas ao longo das cadeias de polieno. Essa conformação torna a molécula altamente reativa e enriquecida com elétrons, permitindo que carotenoides sejam muito eficazes na absorção de energia de radicais livres tornando-os estabilizados (Black *et al.*, 2020). Portanto, os diferentes mecanismos de atividade antioxidante podem ocorrer simultaneamente com base nos atributos

estruturais dos carotenoides, como terminais cíclicos ou acíclicos, presença de grupos polares ou apolares, bem como fatores do ambiente da reação e a natureza das espécies radicais (Young; Lowe, 2018).

Um exemplo da atividade antioxidante de carotenoides é observado nos mecanismos de ação contra $^1\text{O}_2$, a partir da desativação física e da reação química:



Na reação física (i), $^1\text{O}_2$ é convertido ao estado fundamental ($^3\text{O}_2$) pela transferência de energia para a molécula carotenoide (^1CAR). Então, a molécula resultante em estado tripleto ($^3\text{CAR}^*$) retorna ao ^1CAR original após liberar sua energia excitada para o ambiente exógeno como energia térmica. Desse modo, carotenoides podem converter o excesso de energia do oxigênio singlete em calor, levando à desativação do $^1\text{O}_2$. Na reação química (ii), o $^1\text{O}_2$ reage com carotenoides gerando produtos oxigenados. Por exemplo, a adição de $^1\text{O}_2$ às posições 5 e 8 do β -caroteno gera o 5,8-endoperóxido de β -caroteno. A constante da extinção física é cerca de 1.000 vezes maior em relação a da reação química, isto é, uma molécula carotenoide pode extinguir fisicamente cerca de 1.000 moléculas de $^1\text{O}_2$ com eficiência antes de ser consumida pela reação química com $^1\text{O}_2$ (Terao, 2023).

1.3 Atividade provitamina A dos carotenoides

Nos seres humanos, uma das principais funções biológicas dos carotenoides dietéticos é a atividade provitamina A. A vitamina A é um micronutriente lipossolúvel que desempenha papéis funcionais no organismo humano. Estruturalmente é caracterizada como molécula de all-trans-retinol, apesar de a vitamina A também ser um termo empregado para definir moléculas derivadas de all-trans-retinol, incluindo ésteres retinílicos, retinaldeído e ácido retinóico (Blaner, 2020). A vitamina A é essencial para a sobrevivência humana em todas as fases da vida, em decorrência de apresentar funções essenciais para o endosso do

amplo desenvolvimento embrionário, a divisão e a diferenciação celular, a manutenção da função visual, o sistema de defesa dos linfócitos, dentre outras atuações (de Souza Mesquita *et al.*, 2021).

Os carotenoides que contêm um anel de ionona na extremidade terminal podem desempenhar atividade provitamina A. Por exemplo, dentre os precursores da vitamina A pode-se destacar α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina. Os carotenoides são parcialmente convertidos em vitamina A durante a absorção no intestino delgado. A reação de conversão tem início quando a enzima β -caroteno 15,15'-oxigenase (BCO1) catalisa a clivagem central dos carotenoides para produzir duas moléculas de retinaldeído (Figura 3) (Kim; Jang; Lee, 2021). As moléculas de retinaldeído geradas podem ser reduzidas a retinol ou oxidadas a ácido retinóico.

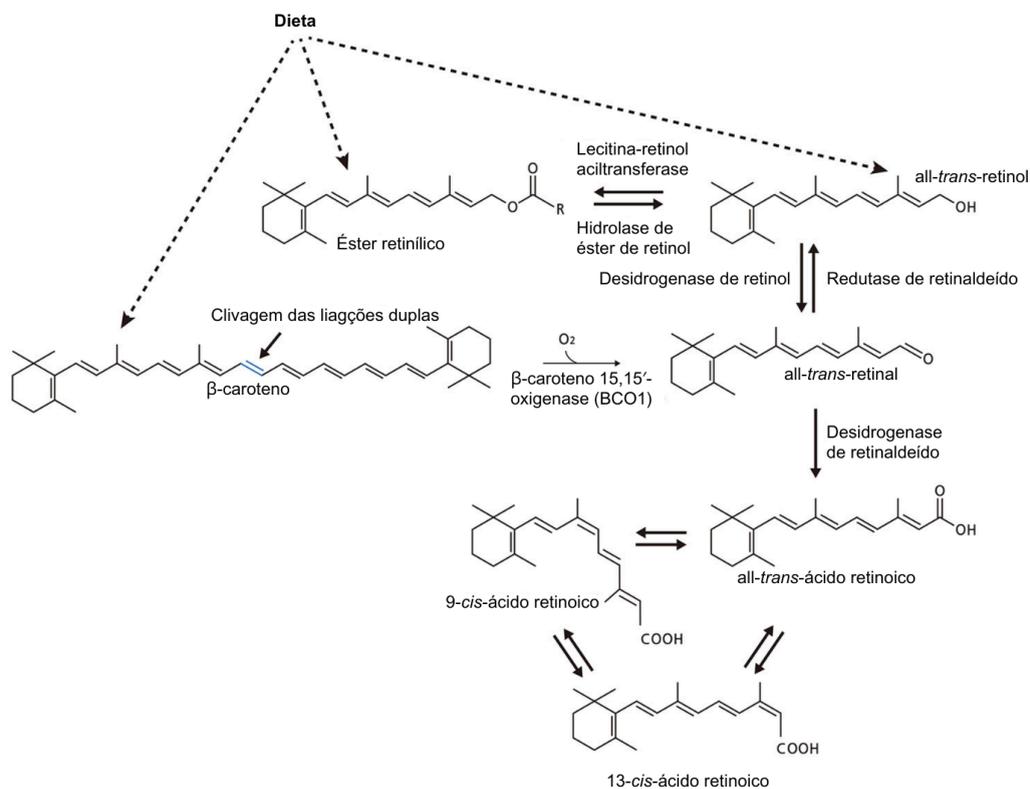


Figura 3. Representação da conversão metabólica de β -caroteno e retinoides. (adaptado de Kim; Jang; Lee, 2021).

A reação de redução ocorre quando o retinaldeído é submetido à ação de redutases de retinaldeído resultando na conversão a retinol. Dessa forma, o retinol pode entrar em contato com a circulação na corrente sanguínea após ser integrado com a proteína-4 de ligação ao retinol (PBP4) no fígado (Harrison, 2019).

A reação oxidativa realizada por desidrogenases de retinaldeído converte o retinaldeído em ácido retinóico (RA) (Belyaeva *et al.*, 2019). Após entrar em contato com células de resposta, o RA é transportado do citosol pela proteína de ligação ao RA celular (CRABP II) para o núcleo. No núcleo, se liga aos receptores de RA (RAR) e receptores X retinóides (RXR), formando heterodímeros. Na ausência de RA, os RAR-RXRs associam-se aos elementos de resposta RA (RAREs) dos genes-alvos e reprimem a expressão gênica por meio do recrutamento de co-repressores. Na presença de RA, ele se liga ao RAR-RXR e, por meio da associação direta com os RAREs, inicia a transcrição dos genes-alvo, desassociando os co-repressores e recrutando coativadores como receptores de esteróides (Shannon *et al.*, 2020).

1.4 Ciclo visual

A vitamina A tem participação importante na manutenção da função visual a partir de sua forma derivada como cromóforo 11-cis-retinal. O ciclo visual é um processo muito eficiente, cuja ativação seguida pela restauração do pigmento visual ao estado inicial ocorre muito rapidamente. A percepção visual em humanos é iniciada nos segmentos externos dos fotorreceptores da retina, quando a luz entra no olho e ativa os pigmentos visuais. O que induz uma mudança conformacional na proteína opsina e aciona a cascata de fototransdução que, por fim, leva à sensação visual (Choi *et al.*, 2021).

A primeira etapa da visão ocorre quando o 11-cis-retinal ligado à rodopsina é fotoisomerado ao absorver um fóton. A fotoisomerização altera a conformação da estrutura terciária na proteína da membrana da opsina, gerando um impulso nervoso. Após a geração do impulso nervoso, o pigmento rodopsina foto excitado é hidrolisado em all-trans-retinal e opsina (Das *et al.*, 2024). Para manter a sensibilidade visual normal, o all-trans-retinal deve ser convertido novamente em 11-cis-retinal por meio de uma série de reações enzimáticas que compreendem o

ciclo retinoide (Figura 4), que ocorre em um sistema de duas células composto por fotorreceptores e o epitélio pigmentar da retina (EPR) (Palczewski; Kiser, 2020).

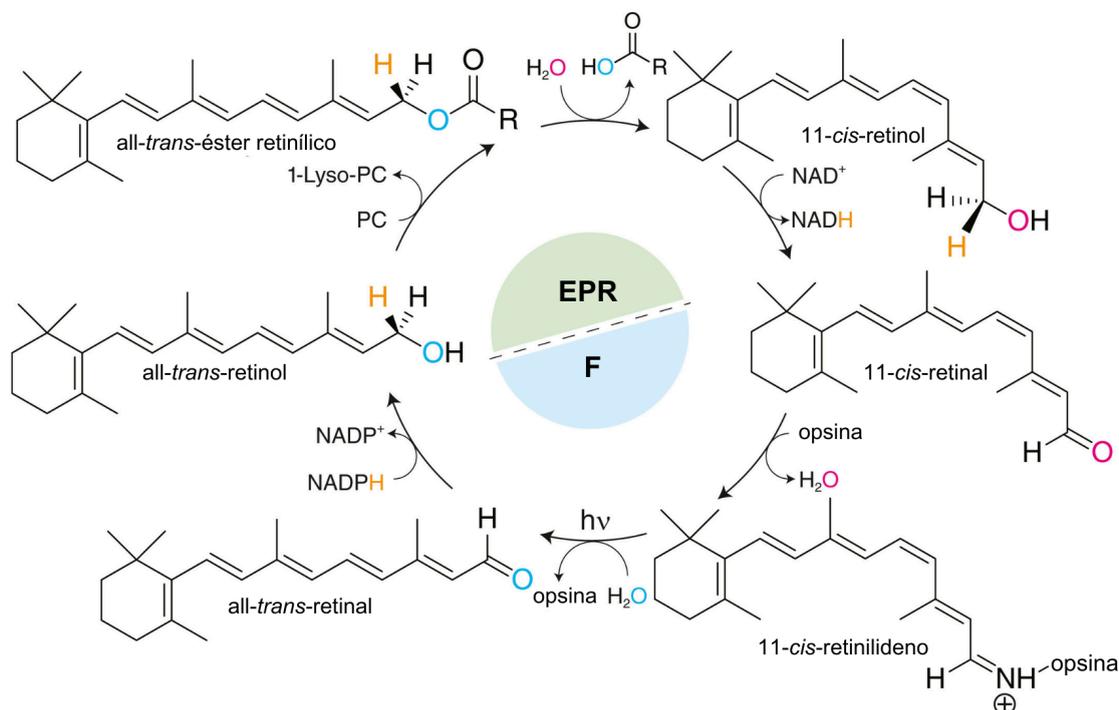


Figura 4. Ciclo visual, o qual ocorre em células de epitélio pigmentar da retina (EPR) e de fotorreceptores (F). (adaptado de Palczewski; Kiser, 2020).

No ciclo retinoide, o produto hidrolisado **all-trans-retinal** é primeiro reduzido a **all-trans-retinol** pelas enzimas **retinol desidrogenases** dependentes de **NADPH**. Em seguida, o **trans-retinol** é transportado para o EPR, onde é esterificado em **trans-éster-retinílico** pela **lecitina-retinol aciltransferase**. O **trans-éster-retinílico** é isomerizado e hidrolisado em **11-cis-retinol** pela **retinoide isomerohidrolase EPR65**, uma proteína de 65 kDa específica do epitélio pigmentar da retina (Tworak *et al.*, 2023). O produto isomerizado **11-cis-retinol** é finalmente oxidado a **11-cis-retinal** pela **retinol-desidrogenase** no EPR e, em seguida, sofre condensação com a proteína **opsina** para regenerar os pigmentos visuais sensíveis à luz, como a **rodopsina**.

1.5 Produção de carotenoides

A obtenção de β -caroteno por extração de matéria vegetal é baseada em processos físico-químicos. Esse procedimento utiliza como matéria-prima plantas ou algas, as quais sintetizam e acumulam β -caroteno nos cloroplastos das células vegetais. Há diversas metodologias aplicadas para a extração da estrutura celular, como transesterificação, tratamento térmico, choque osmótico, homogeneização e uso de solventes fortes. Entretanto, do total de β -caroteno produzido entre os diferentes métodos, somente 2 % provêm de recursos biológicos naturais (Singh; Sambyal, 2022). As limitações desse método são: alto custo, determinantes geográficos, variabilidade climática, sazonalidade da matéria-prima e baixo rendimento. Por exemplo, é necessário processar vários quilos de material vegetal para obter somente gramas de β -caroteno, levando ao desperdício de biomassa e a um alto custo de processamento (Bogacz-Radomska; Harasym, 2018).

Os carotenoides comerciais geralmente são produzidos por meio de síntese química. Em decorrência do β -caroteno ser um composto de cadeia C_{40} , é possível empregar vários métodos baseados na ligação de moléculas pequenas com finalidade de gerar a cadeia C_{40} resultante (Pourkarimi *et al.*, 2020). Dentre os processos de síntese química de β -caroteno podem ser utilizados reações de desidratação e eliminação, reação de condensação seletiva de compostos de carbonila, reação de homodimerização e reação de acoplamento seletivo de Csp^2 - Csp^2 . Mais de 90 % da produção de β -caroteno é realizada por síntese química, no entanto, a fabricação utiliza recursos não renováveis e pode gerar resíduos de substâncias tóxicas, resultando em impactos nocivos ao meio ambiente (Fan *et al.*, [s. d.]).

Sendo assim, a produção de carotenoides por meio de microrganismos é uma estratégia promissora para superar as limitações decorrentes de métodos tradicionais de extração vegetal e síntese química. Os microrganismos, como as leveduras, dispõem de um processo de fermentação controlado, podendo minimizar o tempo de processamento. Além disso, a capacidade do microrganismo de digerir resíduos agroindustriais reduz o custo total de produção (Foong *et al.*, 2021). O desenvolvimento de condições personalizadas para fermentação e a aplicação de

substratos de baixo custo representam qualidades chamativas para utilização de modelos biotecnológicos.

A *S. cerevisiae* é uma levedura empregada industrialmente para produção de biocombustíveis, proteínas recombinantes, ácidos orgânicos e produtos químicos. Sendo assim, utilizar *S. cerevisiae* como um hospedeiro microbiano pode ser uma alternativa viável para aplicação na síntese β -caroteno, tanto que várias estratégias de engenharia metabólica foram testadas nesse modelo para aprimorar a produção de carotenoides (Zhao *et al.*, 2021). Apesar de a *S. cerevisiae* não acumular naturalmente carotenoides, seu uso para a produção de β -caroteno apresenta vantagens: (i) tem excelentes ferramentas de edição de genoma; (ii) é adequada para cultivos em larga escala; (iii) já foi projetada para produção de alto nível de compostos isoprenoides; (iv) tem estabelecido um processo comercial para a produção de licopeno e (v) trabalhos descritos na literatura de produção de β -caroteno a partir de *S. cerevisiae* em que, por exemplo, linhagens expressando enzimas da via de biossíntese acumularam 46,5 mg de β -caroteno/g de célula seca em meio à base de nitrogênio com 1% de azeite de oliva (Fathi *et al.*, 2021).

O desenvolvimento contínuo da biologia sintética e da engenharia metabólica tornou possível um cenário de expansão de ferramentas para síntese microbiana de carotenoides. Dentre as diferentes abordagens estabelecidas, destaca-se o emprego de microrganismos para obtenção de quantidades significativas de metabólitos secundários provenientes da introdução de genes carotenogênicos heterólogos (López *et al.*, 2020). Dessa forma, a integração genômica de aparatos de expressão sugere uma estratégia conveniente para gerar linhagens recombinantes com estabilidade razoável e com expressão gênica resultando em produtos de interesse.

Portanto, o projeto tem como finalidade o desenvolvimento, utilizando o microrganismo modelo *S. cerevisiae*, de estratégias para promover a produção de carotenoides. Para tal, planeja-se elaborar aparatos para a expressão *in tandem* de seqüências codificadoras para enzimas da via de síntese de carotenoides. Sendo assim, será realizada a inserção desses aparatos em leveduras modelos, de forma a possibilitar a avaliação do impacto fisiológico desempenhado pela presença dessa construção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com aparatos de expressão de sequências codificadoras para enzimas da via de síntese de carotenoides.

2.1.1 Objetivos específicos

2.1.1.1 Desenhar e gerar *in vitro* aparatos de expressão policistrônicos para a expressão *in tandem* de sequências codificadoras para enzimas da via de síntese de carotenoides, como β -caroteno, licopeno e astaxantina (mas não restrito apenas a esses).

2.1.1.2 Gerar linhagens de leveduras poliplóides industriais (por exemplo, leveduras de panificação) contendo múltiplas cópias dos aparatos de expressão policistrônico introduzidos por técnicas de edição gênica.

2.1.1.3 Analisar o impacto fisiológico da presença de múltiplas cópias dos aparatos de expressão policistrônico para enzimas da via de formação de carotenoides em leveduras poliplóides industriais.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Geração de aparatos de expressão policistrônicos a partir de bioinformática e biologia sintética.

As sequências de DNA correspondentes às diferentes partes dos aparatos de expressão policistrônicos como promotores, terminadores, origens de replicação, marcas de seleção, sequências codificadoras para enzimas da via de biossíntese de carotenoides (entre outras), assim como vetores para integração em múltiplas cópias para as linhagens de leveduras deste projeto foram obtidas do banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (<https://www.yeastgenome.org/>), *iGEM Parts-Yeast* (<https://parts.igem.org/Yeast>) e *addgene* (<https://www.addgene.org/>), mas não limitados somente a esses. Essas sequências foram usadas *in silico* para a geração de oligonucleotídeos contendo extremidades complementares para posterior amplificação por PCR de alta fidelidade e concatenação *in vitro* e *in vivo* por diferentes técnicas, como a técnica de Gibson (Gibson *et al.*, 2009) ou IVA (García-Nafría; Watson; Greger, 2016). Da mesma forma, as sequências codificadoras para a biossíntese de carotenoides oriundas de leveduras vermelhas foram obtidas e otimizadas para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* por meio de empresas que realizam síntese de genes e diferentes segmentos de DNA.

O projeto dos vetores contendo os aparatos de expressão policistrônico para enzimas da via de biossíntese de carotenoides será feito *in silico* usando o software SnapGene (<https://www.snapgene.com/>). Para todos os vetores obtidos *in silico* pelo método de Gibson e/ou IVA foram gerados oligonucleotídeos com sobreposição de extremidades que foram sintetizados por diferentes empresas na concentração de 100 µM e purificação padrão. Os procedimentos básicos para a manipulação de ácidos nucléicos (digestão com enzimas de restrição, análise e isolamento de fragmentos de DNA em géis de agarose, formulação de tampões, entre outros) foram realizados de acordo com os protocolos descritos no *Current Protocols in Molecular Biology* (<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/>).

3.2 Linhagens de microrganismos, condições de cultivo, procedimentos de transformação plasmidial e geração de leveduras poliplóides

Neste trabalho foram usadas linhagens de leveduras de uso laboratorial, como BY4741 (MATa, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*), BY4742 (MATα, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*) e BY4743 (MATa/α, *his3Δ1/his3Δ1*, *leu2Δ0/leu2Δ0*, *LYS2/lys2Δ0*, *met15Δ0/MET15*, *ura3Δ0/ura3Δ0*). Para a manutenção das diferentes linhagens de leveduras foi utilizado o meio completo YEPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de bacto-peptona e 20 g/L de glicose. Para o meio sólido foi adicionado 20 g/L de bacto-ágar). Os meios YEPD líquido e sólido foram acrescidos de diferentes antibióticos para a seleção e crescimento de células de leveduras transformadas com plasmídeos, conforme os protocolos descritos no *Current Protocols in Molecular Biology* (<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/>)

A linhagem de *Escherichia coli* utilizada foi a Stable Competent (New England Biolabs, catálogo número C3040H), cujo genótipo é: F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zff::Tn10 (TetR)/Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC). Para o cultivo, foi utilizado meio líquido LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl), adicionados com 15 g/L de bacto-ágar para a formulação de LB sólido. Os meios LB líquido e sólido foram acrescidos de ampicilina e outros antibióticos para seleção e crescimento de células transformadas com as construções moleculares, conforme descrito no *Current Protocols in Molecular Biology* (<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/>). O método de choque térmico foi usado para transformar *E. coli* (<https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>). Por sua vez, o método de eletroporação rápida foi empregado para as diferentes linhagens de leveduras (Kumar, [s. d.]

3.3 Transformação e isolamento de vetores de *Escherichia coli*

A linhagem *E. coli* Stable Competent foi utilizada para transformações com cada vetor dos diferentes fragmentos de betacar. Primeiramente, foi aplicado 1 µL de vetor nas células competentes, as quais foram mantidas em gelo durante 30 min.

Após o tempo, as células foram submetidas ao choque térmico, expondo-as a 42 °C por 30 s e, imediatamente, acondicionadas em gelo por 5 min. Então, foram adicionados 950 µL do meio de recuperação NEB 10-beta/Stable Outgrowth Medium, e as células foram incubadas a 30 °C por 1 h, com leve agitação esporádica. As células foram semeadas em meio LB com ampicilina 1× para selecionar as transformantes. As placas foram incubadas por cerca de 16 h em estufa a 37 °C.

Após a incubação, preparou-se o inóculo, no qual as colônias transformadas com crescimento foram inoculadas em tubos de ensaio com meio LBA 1× líquido, e incubados por cerca de 16 h a 37 °C, a 180 RPM em shaker. Então, o isolamento do vetor foi efetuado por extração a partir dos inóculos cultivados, utilizando o kit *Zyppy Plasmid Miniprep* (Zymo Research, catálogo número D4020). As centrifugações foram feitas a 16.000 × *g*. Inicialmente, em 600 µl de cultura bacteriana, foi adicionado 100 µl de 7X Lysis Buffer para lisar as células. Em seguida, foi adicionado 350 µl de Neutralization Buffer para neutralização, e a centrifugação foi feita por 4 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna Zymo-Spin™ IIN posicionada em um tubo de coleta, seguido de centrifugação por 15 s. Após o descarte do fluxo, foi adicionado 200 µl de Endo-Wash Buffer à coluna, seguido de centrifugação por 30 s. Foi adicionado 400 µl de Zyppy™ Wash Buffer à coluna, seguido de centrifugação por 1 min. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga e, em seguida, foi adicionado 30 µl de Zyppy™ Elution Buffer diretamente à matriz da coluna, seguido de centrifugação por 30 s para eluir o DNA do plasmídeo. As extrações foram aplicadas em equipamento de espectrofotometria a partir de absorbâncias de 230, 260 e 280 nm, a fim de realizar medições referentes às suas qualidades biofísicas.

Por sua vez, o vetor isolado também foi analisado por métodos de biologia molecular. As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, catálogo número M0530). As quantidades dos componentes da reação foram indicadas pelo protocolo: 5 µL de 5X *Phusion* HF; 0,5 µL de dNTPs na concentração de 10 µM; 1,25 µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 µM; 1 µL de amostra de DNA e 0,25 µL de *Phusion DNA Polymerase*. Vale ressaltar que as amostras foram diluídas para ajustar a concentração ao valor recomendado de 10 ng/µL a fim de reduzir a

ocorrência de ampliações inespecíficas, visto que a leitura da espectrofotometria indicava valores de cerca de 100 ng/ μ L. Então, o volume final das reações foi de 25 μ L completado com água livre de nuclease. As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação do DNA a 98°C por 30 s, seguido de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 98°C por 10 s, um passo de anelamento a 60°C por 30 s, um passo de extensão à 72°C por 2 min, seguido por um passo de extensão final à 72°C por 5 min. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1 \times por 60 min a 60 V.

3.4 Clonagem por concatenação de fragmentos de DNA para obtenção do construto *BetaCar_PC_yeast*

Os fragmentos amplificados foram concatenados pela técnica de Gibson (Gibson *et al.*, 2009), utilizando *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix* (New England BioLabs, catálogo número E2621L), para geração do construto policistrônico "*BetaCar_PC_yeast*" (Figura 5B). Primeiramente, foi utilizado o programa *GelAnalyzer* (<http://www.gelanalyzer.com/?i=1>) para estimar a concentração dos fragmentos amplificados a partir dos resultados da eletroforese. Com os valores de concentração estimados, foi calculado os volumes de cada fragmento em relação à proporção molar sugerida pelo protocolo. Então, para a reação, foram adicionados 10 μ L de *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix*, os volumes previamente calculados de cada fragmento a serem concatenados, e completado o volume com água livre de nuclease. Por fim, a reação foi incubada à 50°C por 1 h. Após a reação de concatenação, a amostra foi submetida a uma etapa de purificação com *Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit* (5 μ g) (New England BioLabs, catálogo número T1030).

As reações de PCR para a amplificação da concatenação foram realizadas utilizando o kit *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, catálogo número M0530). As quantidades dos componentes da reação foram indicadas pelo protocolo: 5 μ L de 5X *Phusion HF*; 0,5 μ L de dNTPs na concentração de 10 μ M; 1,25 μ L de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 μ M; 1 μ L de amostra de DNA e 0,25 μ L de *Phusion DNA Polymerase*. Então, o volume final das reações foi de 25 μ L completado com água livre de nuclease. As condições de PCR

incluíram um passo inicial de desnaturação do DNA a 98°C por 30 s, seguido de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 98°C por 10 s, um passo de anelamento a 60°C por 30 s, um passo de extensão a 72°C por 2 min, seguido por um passo de extensão final a 72°C por 5 min. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1× por 60 min a 60 V.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Projeto dos aparatos de expressão policistrônicos para a rota de biossíntese de carotenoides.

Para o delineamento *in silico* do aparato de expressão policistrônica para a rota de biossíntese de carotenóides em *S. cerevisiae* foram obtidas, inicialmente, as sequências codificadoras/estruturais dos genes *CrtE*, *CrtI* e *CrtYB* da levedura produtora de carotenóides *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Tabela 1). Estas sequências codificam para as enzimas geranylgeranyl-difosfato-sintase, fitoeno-dessaturase e fitoeno-sintase, respectivamente (Chen *et al.*, 2016), essenciais para a geração dos diferentes precursores moleculares de carotenoides (Figura 1). Uma vez obtidas as sequências, os códons foram otimizados utilizando o programa *ExpOptimizer* (<https://www.novoprolabs.com/tools/codon-optimization>) selecionando-se o chassi celular *S. cerevisiae*.

Uma outro segmento de DNA essencial para a produção de carotenóides em leveduras é a sequência codificadora para a enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase de *S. cerevisiae* (*HMG1*, Tabela 1). Esta enzima realiza a conversão do HMG-CoA para mevalonato, metabólito essencial para a formação de ergosterol em leveduras e um dos precursores para a biossíntese de carotenoides nestes organismos (Jordá; Puig, 2020). Conforme descrito por Verwall *et al.* (2007), apenas a porção codificadora para o domínio catalítico da HMG1 (denominado de tHMG1, correspondendo à porção C-terminal da enzima) é necessária para promover um aumento na síntese de mevalonato e favorecer a geração de carotenóides em leveduras.

Por fim, a geração de sequências policistrônicas para a expressão de diferentes rotas metabólicas em leveduras é possível devido a caracterização prévia das chamadas sequências curtas intergênicas (IGG1) presentes no fungo filamentoso *Glarea lozoyensis* e que conecta genes em sistemas policistrônicos de expressão nesse organismo (Yue *et al.*, 2015). Posteriormente mostrou-se que a sequência original IGG1 é passível de otimização, gerando-se uma biblioteca de sequências IGGs de onde se obteve a sequência IGG6 usada neste trabalho (Yue *et al.*, 2023). A sequência IGG6 possibilita o reinício da tradução protéica em uma sequência de mRNA derivada de genes bi- ou policistrônicos, favorecendo a

formação de múltiplas proteínas de forma similar àquela observada para operons procariotos.

Tabela 1. Segmentos de DNA usados para a montagem *in silico* dos dispositivos de expressão policistrônicos da rota de biossíntese de carotenóides em leveduras.

Segmento de DNA	Organismo de origem	Código de acesso GenBank	Referência
<i>CrtE</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	MZ748349.1	(Verwaal <i>et al.</i> , 2007)
<i>CrtI</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	MZ748351.1	(Verwaal <i>et al.</i> , 2007)
<i>CrtYB</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	MZ748350.1	(Verwaal <i>et al.</i> , 2007)
<i>HMG1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M22002.1	(Verwaal <i>et al.</i> , 2007)

Uma vez obtidas as sequências, procedeu-se com a construção do dispositivo de expressão policistrônico denominado "BetaCar_PC_yeast" *in silico* (Figura 5). Para tanto, as sequências de cada segmento de DNA (Tabela 1) foram adicionadas ao programa SnapGene e, então, concatenadas utilizando a ferramenta "Gibson Assembly" implementada neste programa. Os oligonucleotídeos gerados, contendo sobreposição de bases entre os diferentes segmentos de DNA, e otimizados para uma temperatura de desnaturação de 60°C (Tabela 2), foram enviados para a síntese por empresas prestadoras deste tipo de serviço. Da mesma forma, as sequências correspondentes aos diferentes segmentos de DNA contendo os códons otimizados para *S. cerevisiae* foram encaminhadas para a síntese gênica pela empresa GenOne: Soluções em Biotecnologia (São Paulo, SP).

Tabela 2. Oligonucleotídeos gerados a partir da concatenação dos diferentes segmentos de DNA referentes ao dispositivo de expressão policistrônico da rota de biossíntese de carotenóides.

Nome	Sequência	Tamanho (Da)	Tm (°C)
BETACAR.FOR	acatccgaacataaacaaccATGGATTA CGCCAACATTTTGACCG	13735,0	61

BETACAR.REV	tgacataactaattacatgaTTATTGACC CTCCCAGCCTGAC	12776,4	60
PLEVBETA.FOR	CAGGCTGGGAGGGTCAATAAtca tgtaattagttatgtcacgcttacattcac	16345,7	61
PLEVBETA.REV	AAAATGTTGGCGTAATCCATggttg tttatgttcggatgtgatgtgag	14953,8	60
CRTEWOIGG.F OR	CAATCAAACATGGATTACGCCAA CATTTTG	9158,1	60
CrtE.REV	TGTTTGATTGTTACAGTGGGATA TCTGCCAATTTCTTCAAATTG	13861,1	60
THMG.FOR	CCCCTGTAACAATCAAACATGG ACCAATTGGTGAAAAC	11945,9	48
THMG.REV	CCATGTTTGATTGTTAGGATTTA ATGCAGGTGACGGACCC	12357,1	60
CRTIA.FOR	ATTAAATCCTAACAATCAAACATG GGTAAAGAACAGGACC	12307,1	53
CRTIA.REV	ATGTTTGATTGTTAAAATGCCAG AATACCAACAGATCTTGCAATG	13866,1	60
CRTIB.FOR	TGGCATTTTAACAATCAAACATG GGTAAAGAACAGGACC	12040,9	53
CRTIB.REV	ATGTTTGATTGTTAAAATGCCAG AATACCAACAGATCTTGCAATG	13866,1	60
CRTYB.FOR	TGGCATTTTAACAATCAAACATG TCTCCTTATCTTTTCTTCGTAT	13676,0	54
CRTYB.REV	TTATTGACCCTCCCAGCCTGAC	6606,3	60

É importante ressaltar que a sequência da fitoeno-dessaturase (*CrtI*) apresenta-se em duas cópias no dispositivo *BetaCar_PC_yeast* (Figura 5) pois, conforme demonstrado por Verwall et al. (2007), a presença de duas cópias de *CrtI* aumenta a quantidade estequiométrica da fitoeno dessaturase, direcionando o metabólito fitoeno de forma efetiva para a geração de beta-caroteno e não de outros carotenóides, como o licopeno.

4.2 Montagem *in vitro* dos aparatos de expressão policistrônicos para a rota de biossíntese de carotenoides

Os segmentos de DNA (Tabela 1) foram sintetizadas pela empresa GenOne: Soluções em Biotecnologia (São Paulo, SP). Como solução tampão foi utilizado Monarch® DNA Elution Buffer (New England Biolabs, catálogo número T1016L). Dessa forma, as amostras foram utilizadas para preparar soluções de estoque (100 ng/ μ L) e soluções de trabalho (10 ng/ μ L). Então, os vetores foram transformados em *Escherichia coli*, assim como descrito no item 3.3. As colônias com crescimento e, conseqüentemente, possíveis transformantes foram inoculadas em meio líquido seletivo. Os potenciais vetores presentes nos inóculos foram extraídos das células bacterianas, também descrito no item 3.3. Então, os potenciais vetores foram amplificados por meio de PCR de alta fidelidade utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Segmentos de DNA amplificados por meio de PCR de alta fidelidade e respectivos oligonucleotídeos, bem como a canaleta de aplicação na eletroforese (Figura 6) e respectivos tamanhos de banda esperados.

Fragmento	Oligonucleotídeos		Canaleta	Tamanho de banda esperado (em quilobase)
<i>CrtE</i>	CRTEWOIG G.FOR	CRTE.REV	1	1,150
<i>HMG1_yeast_1</i>	THMG.FOR	THMG.REV	2	1,610
<i>HMG1_yeast_2</i>	THMG.FOR	THMG.REV	3	1,610
<i>CrtIA</i>	CRTIA.FOR	CRTIA.REV	4	1,781
<i>CrtIB</i>	CRTIB.FOR	CRTIB.REV	5	1,780
<i>CrtYB</i>	CRTYB.FOR	CRTYB.REV	6	1,958

A análise de eletroforese foi realizada para verificar o resultado das reações de PCR (Figura 6). A Tabela 3 também cita a canaleta de aplicação de cada fragmento e o tamanho de banda esperado. O resultado evidencia que as bandas

apresentam tamanho semelhante aos valores esperados, indicando sucesso na amplificação dos segmentos de DNA para montagem do dispositivo de expressão “*BetaCar_PC_yeast*”.

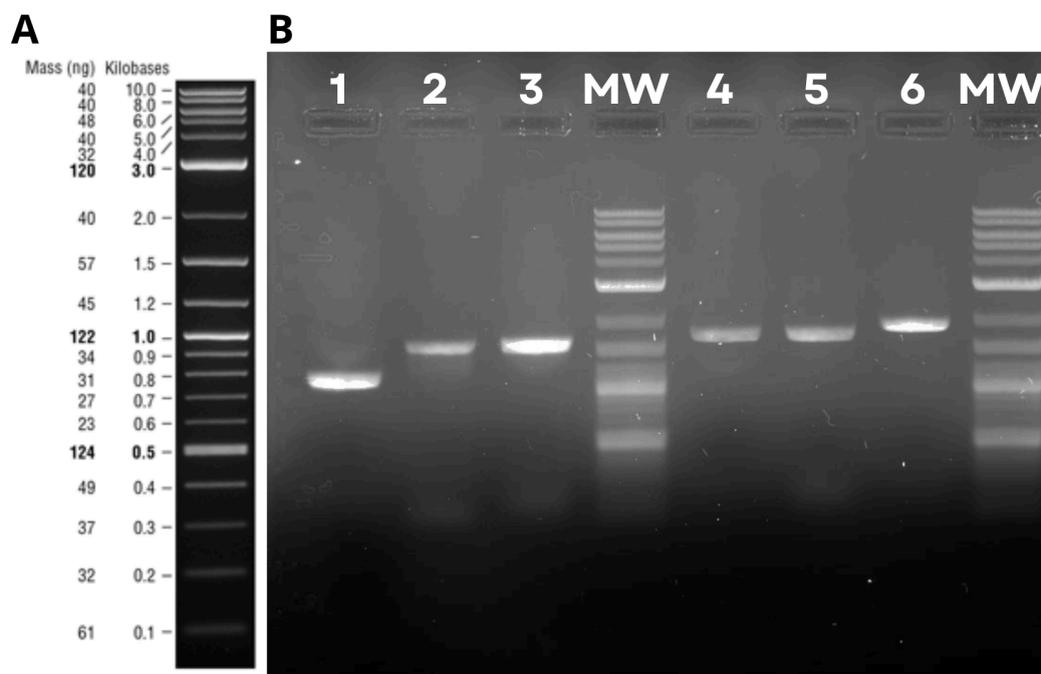


Figura 6. Eletroforese das reações de amplificação dos fragmentos de DNA usados para a construção do dispositivo policistrônico. Em (A) escala do marcador de DNA *Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder* indicando o tamanho em quilobase de cada fragmento para referência. Em (B), análise da eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) confirmando os fragmentos (canaletas 1-6). O fragmento referente a cada canaleta, bem como o tamanho de banda esperado para cada amplificação estão indicados na Tabela 3. Legenda: marcador de peso molecular (MW).

Uma vez obtidos os segmentos de DNA para a montagem *in vitro* do dispositivo de expressão, procedeu-se com as reações de concatenação de Gibson Assembly. Então, foi planejada uma concatenação diretamente a partir de todos os cinco fragmentos, resultando no construto *CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB*. Inicialmente, foi realizada a quantificação dos amplicons pelo programa *GelAnalyzer*, assim como descrito no item 3.4. Os valores de pmol quantificados para cada fragmento estão identificados na Tabela 4. A faixa recomendada para reações de 4-6 fragmentos é de 0,2-1,0 pmol em relação ao construto final. Dessa forma, a Tabela 4 informa o volume adicionado de cada fragmento para resultar em um valor dentro da faixa de concentração recomendada.

Tabela 4. Valores quantificados dos amplicons, bem como respectivo volume utilizado na reação de concatenação do construto *CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB*.

Construto	Fragmento	ng/ μ L	pmol/ μ L	Volume (μ L)
<i>CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB</i>	<i>CrtE</i>	18,0	0,02476	3,23
	<i>HMG1_yeast_1</i>	66,2	0,06675	1,20
	<i>CrtIA</i>	25,0	0,02257	3,54
	<i>CrtIB</i>	29,6	0,02673	2,99
	<i>CrtYB</i>	30,4	0,02509	3,19

Após a reação, a concatenação foi amplificada por meio de PCR de alta fidelidade utilizando os oligonucleotídeos BETACAR.FOR e BETACAR.REV. A Figura 7 apresenta a eletroforese realizada para verificar a reação de PCR. O tamanho de banda para a amplificação é de 8,181 quilobases, porém não se observa banda com tamanho semelhante ao valor esperado, é notável somente a presença de ampliações inespecíficas. Portanto, o resultado indica que não houve sucesso na concatenação.

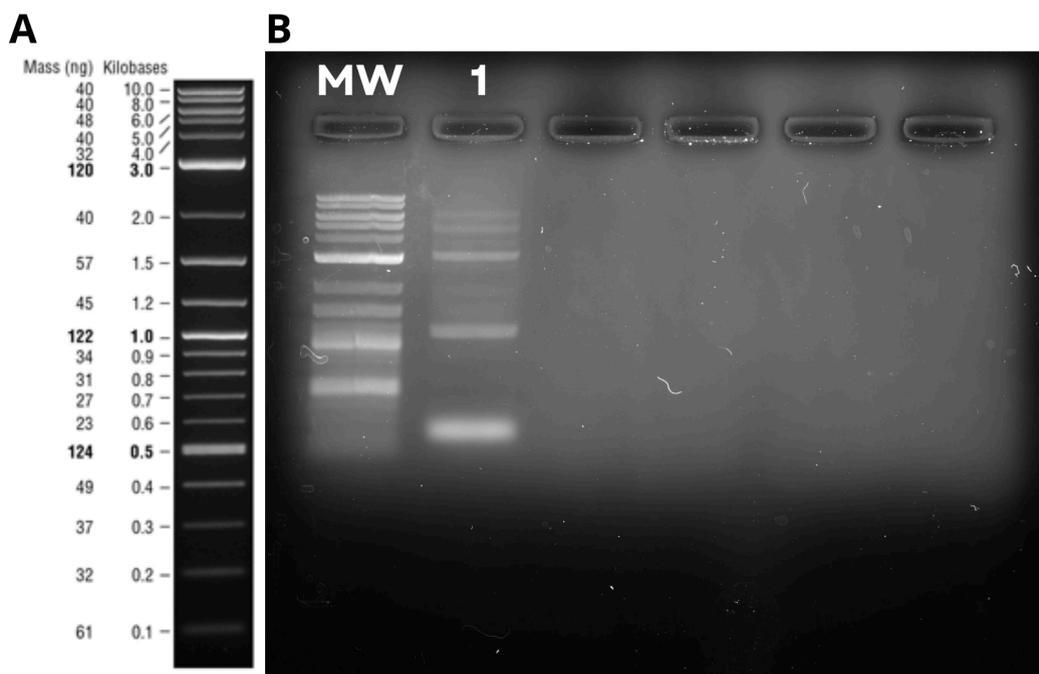


Figura 7. Eletroforese da amplificação da concatenação de fragmentos. Em (A) escala do marcador de DNA *Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder* indicando o tamanho em quilobase de cada fragmento para referência. Em (B), análise da eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) para verificar a amplificação da concatenação de *CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB* (canaleta 1). A amplificação tem tamanho de banda esperado de 8,181 quilobases. Legenda: marcador de peso molecular (MW).

Em decorrência de não ter sido possível prosseguir a concatenação direta dos cinco fragmentos, a estratégia de montagem do construto foi reavaliada. Sendo assim, planejou-se realizar sucessivas reações de Gibson, concatenando segmentos menores gradualmente até resultar no construto final. Dessa forma, esperou-se obter maiores chances de sucesso devido à menor quantidade de fragmentos de DNA por construto e menor tamanho do segmento resultante.

Para tal, foram planejadas duas concatenações: (i) a partir dos 3 primeiros fragmentos, gerando o construto *CrtE-HMG1-CrtIA*; e (ii) a partir dos 2 últimos fragmentos, gerando o construto *CrtIB-CrtYB*. Inicialmente, os amplicons foram quantificados pelo programa *GelAnalyzer*, assim como descrito no item 3.4 do tópico “Procedimento Experimental”. A quantificação em pmol de cada fragmento está identificada na Tabela 5. A faixa recomendada para reações de 2-3 fragmentos é de 0,02-0,5 pmol em relação ao construto final. Dessa forma, a Tabela 5 informa o

volume adicionado de cada fragmento para resultar em um valor dentro da faixa de concentração recomendada.

Tabela 5. Valores quantificados dos amplicons, bem como respectivo volume utilizado nas reações de concatenação dos construtos *CrtE-HMG1-CrtIA* e *CrtIB-CrtYB*.

Construto	Fragmento	ng/ μ L	pmol/ μ L	Volume (μ L)
<i>CrtE-HMG1-CrtIA</i>	<i>CrtE</i>	18,0	0,02476	4,04
	<i>HMG1_yeast_1</i>	66,2	0,06675	1,50
	<i>CrtIA</i>	25,0	0,02257	4,43
<i>CrtIB-CrtYB</i>	<i>CrtIB</i>	29,6	0,02673	3,74
	<i>CrtYB</i>	30,4	0,02509	3,98

As reações foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos BETACAR.FOR e CRTIA.REV para a primeira concatenação, e CRTIB.FOR e BETACAR.REV para a segunda concatenação. A Figura 8 apresenta a eletroforese realizada para verificar as reações de PCR. O tamanho de banda para a primeira amplificação é de 4,470 quilobases, porém, além da presença de banda com tamanho esperado, também há amplificações inespecíficas. No entanto, o tamanho de banda para a segunda amplificação é de 3,696 quilobases, e o resultado evidencia uma banda com tamanho semelhante ao valor esperado, indicando sucesso na amplificação do construto *CrtIB-CrtYB*.

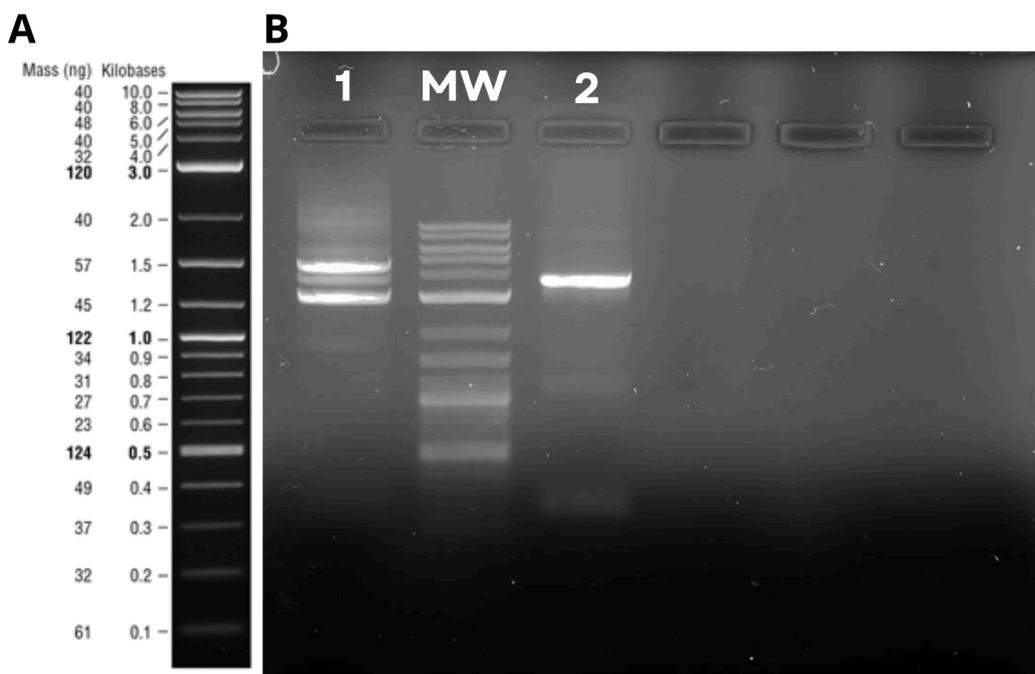


Figura 8. Eletroforese das ampliações de concatenações de fragmentos. Em (A) escala do marcador de DNA *Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder* indicando o tamanho em quilobase de cada fragmento para referência. Em (B), análise da eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) para verificar a amplificação dos construtos *CrtE-HMG1-CrtIA* (canaleta 1) e *CrtIB-CrtYB* (canaleta 2). Os tamanhos de banda esperados são de 4,470 quilobases e 3,696 quilobases para *CrtE-HMG1-CrtIA* e *CrtIB-CrtYB*, respectivamente. Legenda: marcador de peso molecular (MW).

Uma vez que não se obteve a concatenação bem-sucedida dos fragmentos *CrtE-HMG1-CrtIA*, a estratégia de montagem do construto foi novamente reavaliada. Dessa vez, planejou-se otimizar ao máximo as concatenações, preparando reações para todas as possibilidades de duplas de fragmentos. Então, os construtos gerados foram: *CrtE-HMG1*, *HMG1-CrtIA*, *CrtIA-CrtIB* e *CrtIB-CrtYB*. Inicialmente, foi realizada a quantificação dos amplicons pelo programa *GelAnalyzer*, assim como descrito no item 3.4 do tópico “Procedimento Experimental”. Os valores de pmol quantificados para cada fragmento estão identificados na Tabela 6. A faixa recomendada para reações de 2-3 fragmentos é de 0,02-0,5 pmol em relação ao construto final. Dessa forma, a Tabela 6 informa o volume adicionado de cada fragmento para resultar em um valor dentro da faixa de concentração recomendada.

Tabela 6. Valores quantificados dos amplicons, bem como respectivo volume utilizado nas reações de concatenação dos construtos *CrtE-HMG1*, *HMG1-CrtIA*, *CrtIA-CrtIB* e *CrtIB-CrtYB*.

Construto	Fragmento	ng/ μ L	pmol/ μ L	Volume (μ L)
<i>CrtE-HMG1</i>	<i>CrtE</i>	26,6	0,0365	2,19
	<i>HMG1_yeast_2</i>	25,8	0,0260	3,08
<i>HMG1-CrtIA</i>	<i>HMG1_yeast_2</i>	25,8	0,0260	3,08
	<i>CrtIA</i>	10,6	0,0096	8,36
<i>CrtIA-CrtIB</i>	<i>CrtIA</i>	10,6	0,0096	8,36
	<i>CrtIB</i>	12,2	0,0110	7,26
<i>CrtIB-CrtYB</i>	<i>CrtIB</i>	12,2	0,0110	7,26
	<i>CrtYB</i>	19,4	0,0160	5,00

As reações foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Construtos amplificados por meio de PCR de alta fidelidade e respectivos oligonucleotídeos, bem como canaleta de aplicação na eletroforese (Figura 9) e respectivos tamanhos de banda esperados.

Construto	Oligonucleotídeos		Canaleta	Tamanho de banda esperado (em quilobase)
<i>CrtE-HMG1</i>	BETACAR.FOR	THMG.REV	1	2,740
<i>HMG1-CrtIA</i>	THMG.FOR	CRTIA.REV	2	3,366
<i>CrtIA-CrtIB</i>	CRTIA.FOR	CRTIB.REV	3	3,504
<i>CrtIB-CrtYB</i>	CRTIB.FOR	BETACAR.REV	4	3,716

A análise de eletroforese foi realizada para verificar o resultado das reações de PCR (Figura 9). A Tabela 6 também cita a canaleta de aplicação de cada construto e o tamanho de banda esperado. As reações de PCR dos construtos

CrtE-HMG1, *HMG1-CrtIA* e *CrtIA-CrtIB* apresentaram ampliações inespecíficas. Entretanto, o resultado da quarta amplificação evidencia uma banda com tamanho semelhante ao valor esperado, indicando sucesso na amplificação do construto *CrtIB-CrtYB*.

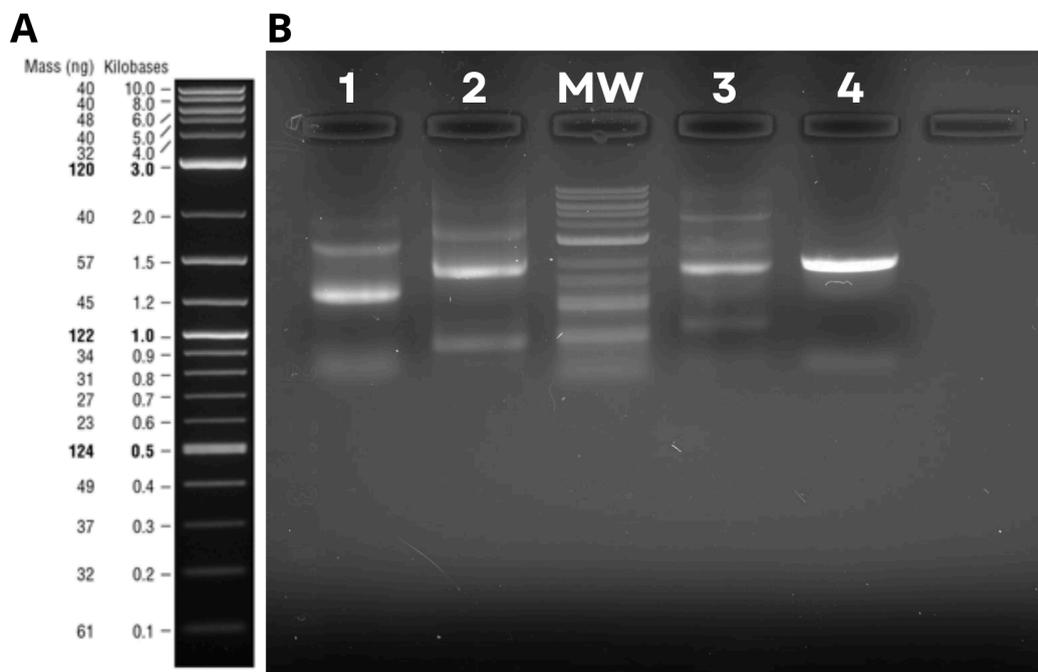


Figura 9. Eletroforese das ampliações de concatenações de fragmentos. Em (A) escala do marcador de DNA *Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder* indicando o tamanho em quilobase de cada fragmento para referência. Em (B), análise da eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) para verificar as ampliações das concatenações de fragmentos (canaletas 1-4). O construto referente a cada canaleta, bem como o tamanho de banda esperado para cada amplificação estão indicados na Tabela 7. Legenda: marcador de peso molecular (MW).

Conforme discussões prévias, os resultados das ampliações de concatenações demonstram que houve a geração bem-sucedida do construto *CrtIB-CrtYB*. No entanto, a porção inicial composta por *CrtE-HMG1-CrtIA*, apresentou ampliações inespecíficas além da banda de interesse. A fim de reduzir as ampliações inespecíficas, planejou-se empregar o método “*Band-stab PCR*” como alternativa para isolar o amplicon de interesse (Kemgang Sonfack *et al.*, 2015). Construtos de *CrtE-HMG1-CrtIA* e *CrtIB-CrtYB* previamente amplificados foram utilizados como amostra. Dessa forma, o gel de agarose contendo produto das ampliações foi exposto à transiluminação, de forma a permitir visualizar as

bandas de amplicon de interesse. Então, utilizou-se uma ponteira de micropipeta para coletar uma amostra da banda de tamanho esperado referente a cada um dos construtos. Após a coleta, as amostras foram reamplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Construtos amplificados por meio de PCR de alta fidelidade e respectivos oligonucleotídeos, bem como canaleta de aplicação na eletroforese (Figura 10) e respectivos tamanhos de banda esperados.

Construto	Oligonucleotídeos		Canaleta	Tamanho de banda esperado (em quilobase)
<i>CrtE-HMG1-CrtIA</i>	BETACAR.FOR	CRTIA.REV	1	4,470
			2	
<i>CrtIB-CrtYB</i>	CRTIB.FOR	BETACAR.REV	3	3,696
			4	

A análise de eletroforese foi realizada para verificar o resultado das reações de PCR (Figura 10). A Tabela 8 também cita a canaleta de aplicação de cada construto e o tamanho de banda esperado. É possível observar que as reações de PCR do construto *CrtE-HMG1-CrtIA* apresentaram uma redução nas amplificações inespecíficas, além de ser notável uma banda de intensidade forte na região de tamanho esperado. A análise também indica um efeito semelhante referente ao resultado das amplificações do construto *CrtIB-CrtYB*, havendo uma redução de amplificações inespecíficas e a presença do amplicon com tamanho esperado.

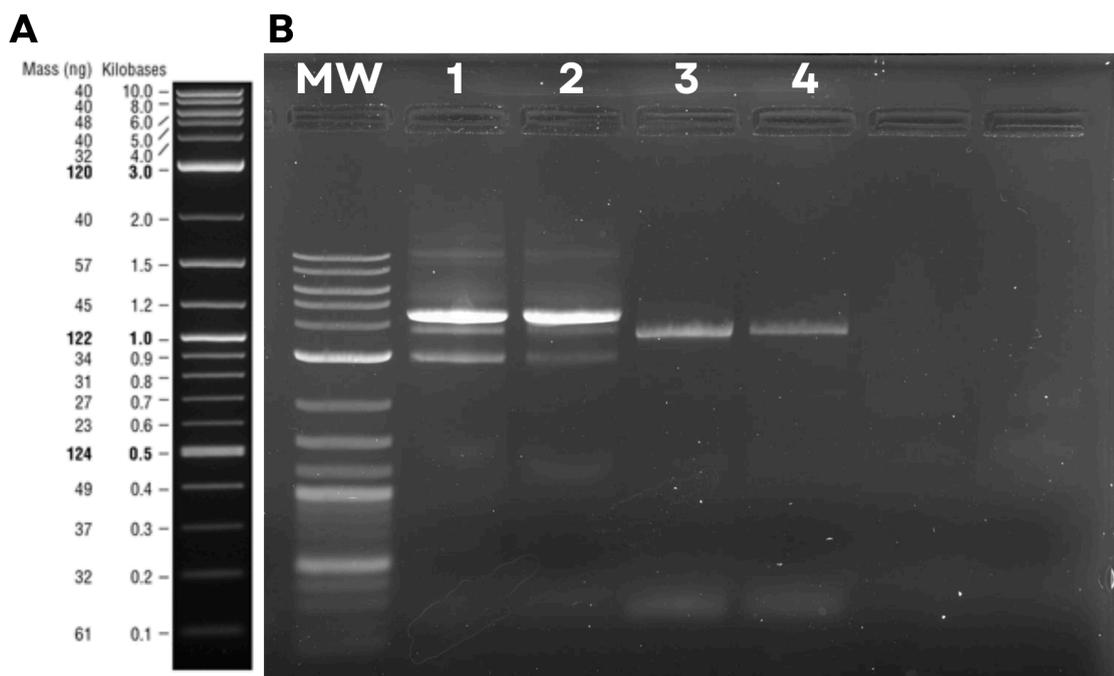


Figura 10. Eletroforese das amplificações de concatenações de fragmentos. Em (A) escala do marcador de DNA Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder indicando o tamanho em quilobase de cada fragmento para referência. Em (B), análise da eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) para verificar as amplificações das concatenações de fragmentos (canaletas 1-4). O construto referente a cada canaleta, bem como o tamanho de banda esperado para cada amplificação estão indicados na Tabela 8. Legenda: marcador de peso molecular (MW).

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a confirmação por eletroforese da amplificação dos fragmentos *CrtE*, *HMG1*, *CrtI* e *CrtYB*, os quais são sequências codificadoras de enzimas essenciais para geração de diferentes precursores moleculares de carotenóides. Além disso, os resultados corroboram o sucesso na concatenação do construto contendo os fragmentos *CrtE-HMG1-CrtIA*, bem como do construto contendo os fragmentos *CrtIB-CrtYB*. Por se tratar de concatenações cuja complexidade aumenta referente à quantidade de segmentos por construto e conseqüente tamanho resultante, não foi possível concluir todos os objetivos propostos durante o período de confecção do projeto. No entanto, a execução do presente trabalho possibilitou o exercício do pensamento científico para interpretar os dados obtidos e planejar novas estratégias a fim de alcançar os resultados desejados.

Em virtude disso, os resultados obtidos até então possibilitam direcionar as perspectivas futuras a fim de realizar reações de concatenação contendo ambos os construtos gerados, de forma a resultar no construto final *CrtE-HMG1-CrtIA-CrtIB-CrtYB*. Com o construto completo obtido, a etapa seguinte é efetuar a clonagem em vetor de expressão, gerando linhagens de *S. cerevisiae* contendo múltiplas cópias dos aparatos de expressão policistrônicos para gerar o dispositivo de expressão. Por fim, pretende-se analisar o impacto fisiológico resultante da presença do dispositivo de expressão policistrônico para enzimas da via de biossíntese de carotenóides em *S. cerevisiae*.

REFERÊNCIAS

- BELYAEVA, Olga V. *et al.* Generation of Retinaldehyde for Retinoic Acid Biosynthesis. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 5, 2019.
- BLACK, Homer S. *et al.* The Benefits and Risks of Certain Dietary Carotenoids that Exhibit both Anti- and Pro-Oxidative Mechanisms-A Comprehensive Review. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 264, 2020.
- BLANER, William S. Chapter 5 - Vitamin A and provitamin A carotenoids. *In*: MARRIOTT, Bernadette P. *et al.* (org.). **Present Knowledge in Nutrition (Eleventh Edition)**. [S. l.]: Academic Press, 2020. p. 73–91. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323661621000056>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- BOGACZ-RADOMSKA, Ludmila; HARASYM, Joanna. β -Carotene—properties and production methods. **Food Quality and Safety**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 69–74, 2018.
- BRITTON, George. Chapter One - Getting to know carotenoids. *In*: WURTZEL, Eleanore T. (org.). **Methods in Enzymology**. [S. l.]: Academic Press, 2022. (Carotenoids: Carotenoid and Apocarotenoid Analysis). v. 670, p. 1–56. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687922001641>. Acesso em: 27 jun. 2024.
- CHEN, Yan *et al.* Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 113, 2016.
- CHOI, Elliot H. *et al.* Retinoids in the visual cycle: role of the retinal G protein-coupled receptor. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 62, p. 100040, 2021.
- DAS, Udita *et al.* Photochemistry of the retinal chromophore in the process of seeing (vision). **ChemTexts**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 3, 2024.
- DE SOUZA MESQUITA, Leonardo M. *et al.* The role of vitamin A and its pro-vitamin carotenoids in fetal and neonatal programming: gaps in knowledge and metabolic pathways. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 76–87, 2021.
- DEWANJEE, Saikat *et al.* Carotenoids as Antioxidants. *In*: ZIA-UL-HAQ, Muhammad; DEWANJEE, Saikat; RIAZ, Muhammad (org.). **Carotenoids: Structure and Function in the Human Body**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 447–473. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_12. Acesso em: 24 jun. 2024.
- FAN, Jian *et al.* Multidimensional Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* for Carotenoid Overproduction. **Biodesign Research**, [s. l.], v. 6, p. 0026,
- FATHI, Zahra *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of β -carotene from hydrophobic substrates. **FEMS yeast research**, [s. l.],

v. 21, n. 1, p. foaa068, 2021.

FOONG, Lian Chee *et al.* Recent development in the production strategies of microbial carotenoids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 12, 2021.

GARCÍA-NAFRÍA, Javier; WATSON, Jake F.; GREGER, Ingo H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 27459, 2016.

GIBSON, Daniel G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009.

HARRISON, Earl H. Mechanisms of Transport and Delivery of Vitamin A and Carotenoids to the Retinal Pigment Epithelium. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s. l.], v. 63, n. 15, p. e1801046, 2019.

JORDÁ, Tania; PUIG, Sergi. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 795, 2020.

KEMGANG SONFACK, Tanedjeu *et al.* Purification of PCR Products Using Bandstab PCR Method: Application to Short 16s-23s Intergenic Spacer Region of *Lactobacillus* Spp. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 2251–2254, 2015.

KIM, Jee Ah; JANG, Ja-Hyun; LEE, Soo-Youn. An Updated Comprehensive Review on Vitamin A and Carotenoids in Breast Cancer: Mechanisms, Genetics, Assessment, Current Evidence, and Future Clinical Implications. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 3162, 2021.

KUMAR, Ravinder. Simplified protocol for faster transformation of (a large number of) *Pichia pastoris* strains. [s. l.], Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3383>. Acesso em: 3 jul. 2024.

LIANG, Ming-Hua; ZHU, Jianhua; JIANG, Jian-Guo. Carotenoids biosynthesis and cleavage related genes from bacteria to plants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 58, n. 14, p. 2314–2333, 2018.

LÓPEZ, Javiera *et al.* Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the Overproduction of β -Ionone and Its Precursor β -Carotene. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 578793, 2020.

MACERNIS, Mindaugas *et al.* Electronic and Vibrational Properties of Allene Carotenoids. **The Journal of Physical Chemistry. A**, [s. l.], v. 126, n. 6, p. 813–824, 2022.

MAOKA, Takashi. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of Natural Medicines**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 1–16, 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 3 jul. 2024.

PALCZEWSKI, Krzysztof; KISER, Philip D. Shedding new light on the generation of the visual chromophore. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 117, n. 33, p. 19629–19638, 2020.

POURKARIMI, Sara *et al.* Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 29, p. 101771, 2020.

ROCHA, Helena R. *et al.* Carotenoids Diet: Digestion, Gut Microbiota Modulation, and Inflammatory Diseases. **Nutrients**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 2265, 2023.

SANDMANN, Gerhard. Carotenoids and Their Biosynthesis in Fungi. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1431, 2022.

SHANNON, Stephen R. *et al.* Identifying vitamin A signaling by visualizing gene and protein activity, and by quantification of vitamin A metabolites. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 637, p. 367–418, 2020.

SINGH, Rahul Vikram; SAMBYAL, Krishika. An overview of β -carotene production: Current status and future prospects. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 47, p. 101717, 2022.

STRA, Alice *et al.* Carotenoid metabolism: New insights and synthetic approaches. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1072061/full>. Acesso em: 24 jun. 2024.

TERAO, Junji. Revisiting carotenoids as dietary antioxidants for human health and disease prevention. **Food & Function**, [s. l.], v. 14, n. 17, p. 7799–7824, 2023.

TWORAK, Aleksander *et al.* Rapid RGR-dependent visual pigment recycling is mediated by the RPE and specialized Müller glia. **Cell Reports**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 112982, 2023.

VERWAAL, René *et al.* High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 13, p. 4342–4350, 2007.

XIE, Zhuo-Ting *et al.* Research progress on carotenoid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 7, 2024.

YOUNG, Andrew J.; LOWE, Gordon L. Carotenoids—Antioxidant Properties. **Antioxidants**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 28, 2018.

YUE, Qun *et al.* A polycistronic system for multiplexed and precalibrated expression of multigene pathways in fungi. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 4267, 2023.

YUE, Qun *et al.* Functional Operons in Secondary Metabolic Gene Clusters in *Glarea lozoyensis* (Fungi, Ascomycota, Leotiomyces). **mBio**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. e00703, 2015.

ZHAO, Yijin *et al.* Production of β -carotene in *Saccharomyces cerevisiae* through altering yeast lipid metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 118, n. 5, p. 2043–2052, 2021.