

KAREN LOPES ALMEIDA

Expressão heteróloga de genes *rhlA* envolvidos na síntese de 3-(3-hidroxi)alcanoil-(3-oxo)alcanoato, o precursor de ramnolipídeos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão Original.

São Paulo

2018

RESUMO

ALMEIDA, K. L. **Expressão heteróloga de genes *rhlA* envolvidos na síntese de 3-(3-hidroxicanoiloxi)-canoato, o precursor de ramnolipídeos**. 2018. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os ramnolipídeos (RLs) são biossurfactantes glicolipídeos que podem ser produzidos por diferentes espécies bacterianas. *P. aeruginosa* produz RLs ricos em 3-hidroxicanoato, já o RL produzido por *B. thailandensis* apresenta elevada proporção de 3-hidroxitetradecanoato. A enzima RhlA sintetiza o 3-(3-hidroxicanoiloxi)canoato (HAA), porção lipídica de RLs, e apresenta diferenças estruturais nas espécies de *P. aeruginosa* e *B. thailandensis*. Esse trabalho concentrou-se na clonagem e expressão heteróloga dos genes *rhlA* da linhagem *P. aeruginosa* LFM634 e *Burkholderia thailandensis* E264. Os HAAs e RLs produzidos pelas linhagens recombinantes foram caracterizados. Além disso, genes quiméricos foram sintetizados com a finalidade de modificar a especificidade das enzimas RhlAs. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a expressão de genes *rhlA* de diferentes espécies modificou a composição dos HAAs e/ou RLs produzidos em *P. aeruginosa*, *B. thailandensis* e *E. coli*. Os dados indicam que a enzima RhlA desempenha um papel importante na composição dos HAAs produzidos, porém o metabolismo bacteriano também é responsável pela composição desses tensoativos. Além disso, os resultados sugerem que a enzima RhlB, responsável pela ligação de ramnose ao HAA, também apresenta diferenças de especificidade. Quando as enzimas quiméricas foram avaliadas, detectou-se um comportamento semelhante à RhlA de *B. thailandensis* indicando que a estrutura de RhlA de *P. aeruginosa* é muito específica para funcionar adequadamente junto com a enzima RhlB. Por fim, as propriedades tensoativas demonstraram diferenças quando há modificações na composição dos 3-hidroxiácidos incorporados aos RLs.

Palavras-chave: Ramnolipídeo. Biossurfactante. Gene *rhlA*. *Pseudomonas*. *Burkholderia*.

ABSTRACT

ALMEIDA, K. L. **Heterologous expression of *rhlA* genes involved in synthesis of 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)-alkanoate, the precursor of rhamnolipids.** 2018. 114 f. Ph. D. these (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Rhamnolipids (RLs) are glycolipid biosurfactants that can be produced by different bacterial species. *P. aeruginosa* produces RLs rich in 3-hydroxydecanoate, whereas the RL produced by *B. thailandensis* presents a high proportion of 3-hydroxytetradecanoate. RhlA enzyme synthesizes 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoate (HAA), lipid portion of RLs, and presents structural differences in *P. aeruginosa* and *B. thailandensis*. HAAs and RLs produced by the recombinant strains were characterized. In addition, chimeric genes were synthesized for the purpose of modifying the specificity of the RhlAs enzymes. The results obtained in this study demonstrated that the expression of *rhlA* genes from different species modified the composition of HAAs and/or RLs produced by *P. aeruginosa*, *B. thailandensis* and *Escherichia coli*. The data also strongly suggest that the composition of the RLs produced depends on the 3-hydroxiacids supplies by the cellular metabolism. Furthermore, the results suggest that the RhlB enzyme that binds to the molecule of HAA a d-TDP-L-rhamnose, also exhibits differences in specificity. When the chimeric enzymes were evaluated, a RhlA-like behavior of *B. thailandensis* was detected indicating that the RhlA structure of *P. aeruginosa* is very specific to function properly together with the RhlB enzyme. Finally, the results also indicate differences in the tensoactive properties of the RLs with different compositions.

Keywords: Rhamnolipid. Biosurfactant. *rhlA* gene. *Pseudomonas*. *Burkholderia*.