

PATRÍCIA LIUS MELO ALVES

“DESENVOLVIMENTO DE ENZIMAS DESSATURASES DE ÁCIDO GRAXO EM *PICHIA PASTORIS*”

RESUMO

Os ácidos graxos polinsaturados linoleico (omega-6) e α -linolenico (omega-3) são essenciais para numerosas funções celulares, desempenhando papéis importantes como componentes estruturais de membrana, e atuando como precursores na síntese de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA). A biossíntese destes ácidos graxos poli-insaturados envolve processos que alternam dessaturação e alongação catalisados por uma série de enzimas. Enzimas omega-3 dessaturase desempenham um papel importante na conversão de ácidos graxos omega-6 em ácidos graxos omega-3. Neste trabalho nos reportamos a seleção *in silico* de seis enzimas dessaturases de ácidos graxos que segundo estudos, possuem a capacidade de converter o Ácido Graxo omega-6 em omega-3. Após a seleção, foi realizada a clonagem, expressão heteróloga em levedura *Pichia pastoris* e ensaios enzimáticos utilizando as linhagens recombinantes em matriz lipídica. Para a seleção dos genes foram aplicadas buscas nas bases de dados para detecção de sequências genéticas que apresentem os domínios de FAD (Fatty Acid Desaturase). A clonagem dos genes foi realizada por Ensaio de Gibson no vetor pPink_HC e a expressão das proteínas foi realizada na levedura *Pichiapink* Cepa 2. Neste trabalho foi possível produzir dessaturases recombinantes como componente de membrana celular. De acordo com as análises *in vitro* e *in vivo* de Ácidos Graxos, é possível inferir que os genes recombinantes derivados das linhagens de *P. hirtus*, *P. pastoris* e *R. kratochvilovae* foram capazes de atingir o objetivo do projeto de dessaturar o substrato C18:2 (omega-6) convertendo seu conteúdo em C18:3 (omega-3).

Prospectar e estudar genes que possam ser associados às mudanças de perfil de ácidos graxos em microrganismos contribui para melhor entendimento de suas estruturas, funções e evolução. Este trabalho foi capaz de prover uma base para futuros estudos que visem aplicação de engenharia metabólica microbiana para conversão ou produção de ácidos graxos poli-insaturados específicos.

Palavras-chave: ácido graxo; enzima dessaturases; omega-3; omega-6; *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

Polyunsaturated fatty acids linoleic (omega-6) and α -linolenic (omega-3) are essential for numerous cellular functions, playing important roles as organic membrane components, and contained as precursors in the synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids such as arachidonic (AA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The biosynthesis of these polyunsaturated fatty acids involves processes that alternate desaturation and elongation catalyzed by a series of enzymes. Omega-3 desaturase enzymes play an important role in converting omega-6 fatty acids to omega-3 fatty acids. In this work, we report the *in-silico* selection of six fatty acid desaturase enzymes that,

according to studies, can convert omega-6 fatty acid into omega-3 fatty acid. After selection, cloning, heterologous expression in *Pichia pastoris* yeast and enzymatic assays were performed using the recombinant strains in a fatty acid substrate. For gene selection, database searches were applied to detect gene sequences that present FAD (Fatty Acid Desaturase) domains. Gene cloning was performed by Gibson Assay in the pPink_HC vector and protein expression was performed in Pichiapink strain 2 yeast. In this work it was possible to produce recombinant desaturases as a cell membrane component. According to the in vitro and in vivo analysis of Fatty Acids, it is possible to infer that the recombinant genes derived from the *P. hirtus*, *P. pastoris* and *R. kratochvilovae* strains were able to achieve the project's objective of desaturating the C18:2 (omega-6) convert into C18:3 (omega-3). Prospecting and studying genes that may be associated with changes in the profile of fatty acids in microorganisms contributes to a better understanding of their structures, functions and evolution. This work was able to provide a basis for future studies aimed at applying microbial metabolic engineering for the conversion or production of specific polyunsaturated fatty acids.

Keywords: fatty acid; desaturase enzyme; omega-3; omega-6; *Pichia pastoation*.