Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Oceanografia - IO

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura



# PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA CIANOBACTÉRIA Synechococcus elongatus PCC 7942 UTILIZANDO INTENSIDADE LUMINOSA E CAMPOS MAGNÉTICOS COMO INDUTORES ALTERNATIVOS

ARTHUR CÁSSIO DE SOUSA CARDOSO

**RIO GRANDE, RS** 

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Oceanografia - IO

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Produção de proteínas recombinantes na cianobactéria *Synechococcus elongatus* PCC 7942 utilizando intensidade luminosa e campos magnéticos como indutores alternativos

#### Arthur Cássio de Sousa Cardoso

Tese de conclusão de doutorado apresentada por Arthur Cássio de Sousa Cardoso como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Aquicultura pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. Luis Fernando Marins Co-orientadora: Dra. Lucielen O. Santos

#### **RIO GRANDE, RS**

## Ficha Catalográfica

Γ

C268p Cardoso, Arthur Cássio de Sousa. Produção de proteínas recombinantes na cianobactéria <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 utilizando intensidade luminosa e campos magnéticos como indutores alternativos / Arthur Cássio de Sousa Cardoso. – 2024. 106 f.
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2024.
Orientador: Dr. Luis Fernando Marins. Coorientadora: Dra. Lucielen Oliveira dos Santos.
<ol> <li>Aplicações biotecnológicas 2. Campos magnéticos 3. Expressão gênica 4. Fotossistema II 5. Intensidade luminosa I. Marins, Luis Fernando II. Santos, Lucielen Oliveira dos III. Título.</li> </ol>
CDU 639.3
Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



DE DEFESA DA 85<sup>a</sup> TESE DE DOUTORADO EM AQUICULTURA No dia vinte oito de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, às oito horas e trinta minutos, reuniu-se a Banca Examinadora de Tese de Doutorado em Aquicultura, de **ARTHUR CÁSSIO DE SOUSA CARDOSO**, orientado pelo Prof. Dr. Luis Fernando Marins (Orientador) e composta pelos seguintes membros: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucielen Santos (Coorientadora - EQA/FURG), Prof. Dr. Fabio Roselet (IO/FURG), Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Volcan Almeida (UFPel) e o Prof. Dr. Tony Silveira (UFPel). Título da Tese: "**PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA CIANOBACTÉRIA** 

Synechococcus elongatus PCC 7942 UTILIZANDO INTENSIDADE LUMINOSA E CAMPOS MAGNÉTICOS COMO INDUTORES ALTERNATIVOS". Dando início à defesa, o Coordenador Adjunto do PPGAq Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Luis Fernando Marins, que na qualidade de orientador, passou a palavra para o candidato apresentar a Tese. Após ampla discussão entre os membros da Banca e o candidato, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da Tese, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. O candidato ARTHUR CÁSSIO DE SOUZA CARDOSO foi considerado APROVADO, devendo a versão definitiva da Tese ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pelo candidato e pelo Coordenador do PPGAq.



Verifique em https://validar.iti.gov.br

<i>,</i>	
SUMÁRIO	
	VI
	X
I. INTRODUÇAO GERAL	11
1.1 Aquicultura fotossintètica	11
1.2 Proteínas recombinantes (PRs) na aquicultura	13
1.2.1 Proteínas recombinantes para o crescimento	14
1.2.2 Hormônios recombinantes para indução reprodutiva	14
1.2.3 Proteínas recombinantes como tratamento terapêutico	15
1.2.4 Probióticos recombinantes na nutrição	16
1.3 Cianobactérias como biofábricas	17
1.4 Alternativas de incremento da produção de PRs em cianobactérias	19
1.4.1 Engenharia de promotores e intensidades luminosas	20
1.4.2 Aplicação de campos magnéticos	22
1.5 Proteínas fluorescentes (PFs) como ferramentas de avaliação de promotores	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	27
4. CAPÍTULO 1	42
5. CAPÍTULO 2	66
6. CAPÍTULO 3	88
7. DISCUSSÃO GERAL	100
8. CONCLUSÕES GERAIS	104
9. ESTUDOS FUTUROS	105
10. REFERÊNCIAS GERAIS	106

#### **1 AGRADECIMENTOS**

2 Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram para o sucesso
3 deste trabalho de pesquisa e para a conclusão desta tese de doutorado.

Primeiramente gostaria de agradecer e dedicar esta tese à minha família, meus pais,
irmãos e sobrinhos, dos quais sinto saudades todos os dias e que me fortaleceram todos os dias
para continuar firme. Tudo isso é por vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por
financiar minha bolsa e oferecer todo o apoio necessário.

9 Agradeço todo suporte e aprendizado do Programa de Pós-graduação em Aquicultura
10 da FURG (professores e colegas).

Sou grato ao meu orientador Luis Fernando Marins, pela orientação, apoio e paciência
ao longo de todo o processo. Sua *expertise*, *insights* e dedicação foram fundamentais para o
desenvolvimento deste trabalho. Sempre falo que quando tudo estava dando errado, depois de
uma conversa com o Luf, parecia que ia salvar o mundo!

Agradeço à minha coorientadora Lucielen Santos, por todo ensinamento e por nos
apresentar essa ferramenta promissora que são os campos magnéticos.

Agradeço o apoio dos meus colegas e amigos de laboratório, que compõe o grupo de
pesquisa LEGENE, que compartilharam seus conhecimentos, experiências e momentos de
descontração, tornando esta jornada mais leve e enriquecedora.

À pessoa que mais me fortaleceu com seu amor, carinho e companheirismo em todos
esses anos. Guilherme nunca saiu do meu lado nos momentos leves e nos mais difíceis desse
doutorado. Sempre com palavras de conforto e acreditando em mim.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, Fábio Roselet, Daniela
Almeida e Tony Silveira, por dedicarem seu tempo para avaliação deste trabalho e contribuir
grandemente para a finalização dessa jornada.

26 Este trabalho não teria sido concluído sem o apoio e contribuição de todos vocês.
27 Obrigado por fazerem parte desta jornada e por tornarem este sonho uma realidade.

1 Gratidão a todos!

#### 1 RESUMO GERAL

2 Cianobactérias emergem como alternativas importantes na exploração de matérias-primas 3 acessíveis na aquicultura sustentável, contribuindo para a captura de dióxido de carbono 4 atmosférico e utilizando-o como fonte de carbono inorgânico para aumentar a biomassa. As cianobactérias, particularmente, são destacadas por sua habilidade natural de integrar DNA 5 6 exógeno em seu genoma, tornando-se biofábricas interessantes para a produção de proteínas 7 recombinantes (PRs). No entanto, o baixo rendimento dessas biofábricas ainda é um dos 8 obstáculos para o seu desenvolvimento nos processos biotecnológicos. Dessa forma, a presente 9 tese teve como objetivo principal aprimorar a eficiência da cianobactéria Synechococcus 10 elongatus PCC 7942 para produzir PRs utilizando diferentes estratégias de incremento de 11 produção. No primeiro estudo, foi avaliado o desempenho do promotor comercial induzível 12 por níquel (PnrsB) com o promotor livre de indutor PpsbA2 na expressão da proteína repórter 13 ZsGreen1, sob influência do campo magnético de 30 mT (CM30). Como resultado foi 14 demonstrado que a produção de PRs em S. elongatus PCC 7942 pode ser melhorada com o uso 15 do promotor nativo PpsbA2 associada à aplicação de CM30. No segundo estudo foram testadas 16 diferentes intensidades de luz e tempo de exposição em culturas com dois promotores nativos 17 relacionados ao fotossistema II de cianobactéria (PpsbA1 e PpsbA2). Foi observado também, 18 que, um menor tempo de exposição pode levar à maior produção de PR com esses promotores. 19 De forma geral, o promotor PpsbA2 demonstrou ser mais eficiente em relação ao PpsbA1. Esse promotor, quando induzido por 6 h e intensidade de luz mais alta (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), resultou 20 21 na produção de quantidades maiores da proteína de interesse. O terceiro estudo abordou uma 22 estratégia inovadora para aprimorar processos biotecnológicos usando microrganismos 23 fotoautotróficos, utilizando os CM para incrementar a produção de PRs. Nesse estudo, as 24 melhores condições definidas no segundo estudo foram usadas na produção de PRs com 25 promotor PpsbA2, observando-se aumento significativo nos níveis de transcrição em 45% e 26 fluorescência em 25-28% sob a aplicação do CM de 30 mT nas culturas. A utilização de 27 cianobactérias associada à aplicação de CM como uma abordagem não tóxica, econômica e 28 ambientalmente sustentável parece ser uma ferramenta promissora para melhorar o rendimento 29 de produção de PRs com promotores nativos. Esta tese abre caminho para uma exploração mais 30 aprofundada dos mecanismos moleculares afetados pelos CM, potencializando a produção de 31 biomoléculas por meio de cianobactérias, com potencial aplicação comercial e na aquicultura.

- 1 Palavras-chave: aplicações biotecnológicas, campos magnéticos, expressão gênica,
- 2 fotossistema II, intensidade luminosa.

#### 1 ABSTRACT

2 Cyanobacteria emerge as significant alternatives in exploring readily available raw materials 3 in sustainable aquaculture, contributing to the sequestration of atmospheric carbon dioxide and 4 utilizing it as an inorganic carbon source to boost biomass. Cyanobacteria, in particular, stand 5 out for their natural ability to integrate exogenous DNA into their genome, making them 6 intriguing biofactories for recombinant proteins (RPs) production. However, the low yield of 7 these biofactories remains a major obstacle to their development in biotechnological processes. 8 Thus, this thesis aimed to enhance the efficiency of the cyanobacterium Synechococcus 9 elongatus PCC 7942 in producing RPs using different production enhancement strategies. In 10 the first study, the performance of the commercially inducible nickel promoter (PnrsB) was 11 evaluated against the inducer-free promoter PpsbA2 in expressing the reporter protein 12 ZsGreen1, under the influence of a 30 mT magnetic field (MF30). The results demonstrated 13 that RP production in S. elongatus PCC 7942 can be enhanced using the native promoter 14 PpsbA2 associated with MF30 application. The second study tested different light intensities 15 and exposure times in cultures with two native promoters related to the photosystem II of 16 cyanobacteria (PpsbA1 and PpsbA2). As a result, it was observed that a shorter exposure time 17 could lead to higher RP production with these promoters. Overall, the PpsbA2 promoter proved to be more efficient than PpsbA1. This promoter, when induced for 6 hours at a higher light 18 intensity (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), resulted in higher production of the target protein. The third study 19 20 addressed an innovative strategy to improve biotechnological processes using photoautotrophic 21 microorganisms, utilizing MFs to increase RP production. In this study, the best conditions 22 defined in the second study were used in RP production with the PpsbA2 promoter, resulting 23 in a significant increase in transcription levels by 45% and fluorescence by 25-28% under the 24 application of a 30 mT MF in cultures. The use of cyanobacteria combined with MF application 25 as a non-toxic, cost-effective, and environmentally sustainable approach appears to be a 26 promising tool to enhance RP production with native promoters. This thesis paves the way for 27 a deeper exploration of the molecular mechanisms affected by MFs, enhancing biomolecule production through cyanobacteria, with potential commercial and aquaculture applications. 28 29

30 Keywords: biotechnological applications, magnetic fields, gene expression, photosystem II,
 31 light intensity.

#### 1 1. INTRODUÇÃO GERAL

#### 2 1.1 Aquicultura fotossintética

3 Os organismos fotossintéticos vêm cada vez mais demonstrando seu potencial dentro da aquicultura. É notável a grande quantidade de informações acerca das vantagens da 4 5 produção e utilização de macroalgas, microalgas e cianobactérias dentro e fora do mercado 6 aquícola, seja pelo seu potencial nutricional e nutracêutico como ingrediente na formulação de 7 rações (Mokolensang et al., 2023; Oviedo-Olvera et al., 2023; Tham et al., 2023) ou na 8 composição da alimentação humana (Leandro et al., 2020; Grahl et al., 2020), seja como fonte 9 de compostos bioativos importantes, como para a indústria cosmética, cosmecêutica e 10 biomédica (Tseng et al., 2021; Castro et al., 2023), na biorremediação de efluentes (Oliveira et 11 al., 2023) ou na produção de biocombustíveis emergentes (Marangon et al., 2023).

12 Com o crescimento acelerado da população humana e a crescente preocupação com as 13 mudanças climáticas, pontos como o fornecimento alternativo de alimento e a geração de 14 biocombustíveis emergentes passaram a fazer parte das discussões a respeito da produção 15 desses microrganismos, uma vez que eles apresentam características vantajosas buscar a 16 minimização dessas problemáticas (Koyande et al., 2019; Chew et al., 2021). Microalgas e 17 cianobactérias são atualmente duas das principais alternativas na exploração de matérias-18 primas inéditas e baixo custo na aquicultura sustentável, sendo fortemente indicada a sua 19 produção em grande escala aos poderes políticos, como recurso alternativo energético e de 20 alimento funcional (Phukan et al., 2020). O conceito de economia circular se baseia na 21 reutilização dos resíduos de um sistema para ser utilizado como recurso de um sistema futuro 22 (Pomoni et al., 2024) e reforça a ideia de produção desses microrganismos, pois se alinha à 23 redução das emissões de resíduos e gases poluentes, à medida que contribui nas demandas da 24 sociedade, como já exposto anteriormente (Figura 1) (Ahmad e Ashraf, 2023).

Investir na indústria fotossintética está diretamente alinhada com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) firmados na Agenda 2030 na Cúpula das Nações Unidas sobre o Desenvolvimento Sustentável, mais precisamente a ODS de número 13 que estipula metas de Ação contra a Mudança Global do Clima (ONU, 2016). No Brasil, já existem políticas voltadas ao setor agropecuário, que têm como objetivo a adaptação dessas atividades às mudanças climáticas (Brasil, 2016). No entanto, ainda é insuficiente a atenção que é dada de

- 1 fato para a adaptação dos sistemas de produção para lidar com as mudanças no clima causadas
- 2 por essas atividades (EMBRAPA, 2018).



Figura 1. Contribuição da aquicultura fotossintética na economia circular e nos Objetivos de Desenvolvimento
Sustentável (ODS), a partir do reaproveitamento de resíduos como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e da indústria, para
a produção de microalgas e cianobactérias na aquicultura e consequentemente na produção coprodutos de interesse
para a sociedade.

8 Um dos principais papéis das microalgas e cianobactérias dentro da aquicultura é 9 promover, além de todos os benefícios que sua produção traz uma agricultura mais sustentável, 10 reduzindo os impactos ambientais negativos associados ao setor. O cultivo desses 11 microrganismos proporciona a captura do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) disponível na atmosfera e 12 o aproveita como fonte de carbono para o aumento de biomassa, por meio da fotossíntese ou 13 outras vias metabólicas (Kassim e Meng, 2017), podendo ser mais eficiente na fixação desse 14 gás quando comparado ao cultivo de plantas superiores (Zhou et al., 2017). Outra característica 15 interessante é a sua capacidade de biossorção que colabora para o seu desenvolvimento, 16 aproveitando o excesso de nitrogênio e fósforo inorgânicos presentes em águas residuais, 17 possibilitando o emprego desses microrganismos como ferramenta de tratamento de águas 18 residuais domésticas, industriais e agrícolas (Ali et al., 2022), além de sua capacidade de 19 biodessalinização podendo auxiliar também nos processos de dessalinização em regiões com 20 escassez de água doce (Esmaeli et al., 2023).

1 Dessa forma, a produção desses organismos fotossintéticos tem representado grande 2 importância comercial, principalmente em um momento em que a sociedade passa por 3 mudanças quanto aos hábitos de vida (Ariede et al., 2020). Essas mudanças levaram os 4 consumidores a priorizarem produtos produzidos de maneira sustentável e aliados às causas 5 ecológicas, ao invés de produtos à base de ingredientes sintéticos. Esse movimento tem 6 resultado em um aumento nas pesquisas que buscam a descoberta de novas moléculas bioativas 7 e biodegradáveis, principalmente aplicáveis na indústria alimentar e cosmética (Zanella e 8 Vianello, 2020; Vega et al., 2020).

9 O último relatório da FAO (2022) também traz à discussão a necessidade de se produzir
10 de maneira mais sustentável, inclusiva e equitativa. A chamada "Transformação Azul" que é
11 abordada no relatório, faz referência às ações que podem ser construídas de forma coletiva,
12 para produzir, gerir, comercializar e consumir alimentos aquáticos de forma ambientalmente
13 mais consciente, a fim de alcançar e contribuir nos ODS da ONU.

14

#### 15 1.2 Proteínas recombinantes (PRs) na aquicultura

A demanda de fornecimento de proteína de boa qualidade levou ao desenvolvimento da aquicultura em muitos países, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias e ferramentas, além do aperfeiçoamento das já existentes, para auxiliar nesse processo de crescimento (FAO, 2022). Pesquisas nas áreas da engenharia genética e biotecnologia podem contribuir no fortalecimento dos sistemas de produção, com soluções tecnológicas em diversas áreas (Mihr e Dalmo, 2005; Mokrani e Liu, 2024; Marín-Nahuelpi et al., 2024).

23 Uma dessas novas ferramentas tem sido a tecnologia do DNA recombinante. 24 Desenvolvida em 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer. Essa técnica baseia-se na utilização 25 de enzimas de restrição para clivar fragmentos específicos do DNA e na inserção subsequente 26 de genes que codificam proteínas de interesse no sítio de restrição utilizado. Como resultado, 27 é possível obter uma molécula recombinante e propagá-la em hospedeiros, ou biofábricas, que 28 atuarão como fábricas biológicas para produzir uma proteína de interesse (Glick et al., 2010). 29 Essa técnica tem se mostrando uma importante ferramenta molecular para a aquicultura, 30 auxiliando no desenvolvimento e produção de PRs que podem ser utilizadas para atenuar problemáticas em quatro principais áreas: 1) crescimento; 2) reprodução; 3) sanidade e 4)
 nutrição (Mohammadzadeh et al., 2022).

3

#### 4 1.2.1 Proteínas recombinantes para o crescimento

Boas taxas de crescimento e ganho de peso são parâmetros econômicos mais
importantes na produção aquícola e, com isso, muitas técnicas são implementadas para essa
finalidade. O uso de Proteínas recombinantes (PRs) para o crescimento se sobressai em relação
a técnicas como a seleção de espécimes para o melhoramento genético, por exemplo,
principalmente em relação ao tempo gasto entre as gerações para chegar a um bom resultado,
podendo levar de quatro a dez gerações (Lallias et al., 2017; Sun et al., 2022).

11 Entre vários relatos na literatura dos efeitos positivos da administração de PRs para o 12 crescimento (Mohammadzadeh et al., 2022). Sudo et al., (2022) produziram o hormônio do 13 crescimentorecombinante (rGH) para a enguia-japonesa (Anguilla japonica), e verificaram que 14 a adição desse hormônio resultou em efeitos satisfatórios nos promotores de crescimento nas 15 larvas dos animais testados. Quando acrescido de peptídeos C-terminais de gonadotrofina 16 coriônica humana (CTP), responsáveis em prolongar a meia-vida desse hormônio, o aumento 17 na promoção do crescimento foi ainda maior. Huang et al. (2020) expressaram o peptídeo 18 piscina 4 (TP4) de tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus) na levedura Pichia pastoris, e 19 forneceram na dieta do robalo asiático (Lates calcarifer). Esses autores obtiveram resultados 20 significativos quanto ao crescimento e ganho de peso, além melhorias nas funcões 21 imunológicas.

22

#### 23 1.2.2 Hormônios recombinantes para indução reprodutiva

24 O estabelecimento de uma espécie para a produção na aquicultura depende em grande 25 parte da sua capacidade de reprodução nos ambientes de confinamento. Muitas espécies 26 dependem de estímulos ambientais para a maturação completa das gônadas, sendo prejudicadas 27 pela falta desses estímulos em sistemas fechados, fazendo-se necessário o uso de indutores 28 hormonais (Mylonas et al., 2010). O principal indutor hormonal exógeno natural utilizado 29 ainda tem sido o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) (Hilsdorf et al., 2021). No entanto, tem crescido a busca por indutores sintéticos alternativos, uma vez que existem várias 30 31 desvantagens quanto ao uso do CPE (Mylonas et al., 2017).

1 Um dos objetivos para a produção dos hormônios reprodutivos recombinantes é o 2 estudo de processos fisiológicos. Esses hormônios já foram usados para o estudo do 3 envolvimento dos fatores de crescimento em processos reprodutivos (Zapater et al., 2021). 4 Além disso, a quantificação dos hormônios reprodutivos recombinantes pode ser chave para o 5 desenvolvimento de novos imunoensaios para entender as mudancas no conteúdo hormonal 6 durante períodos reprodutivos críticos (Molés et al., 2020). Ainda, esses hormônios 7 recombinantes também podem ser utilizados em terapias hormonais mais eficazes, em casos 8 de hormônios livres de contaminação; na sincronização da produção de gametas de qualidade 9 e no tratamento de distúrbios reprodutivos de novas espécies (Mohammadzadeh et al., 2020; 10 Mohammadzadeh et al., 2022).

11 As gonadotrofinas recombinantes são uma alternativa eficaz aos hormônios derivados 12 de hipófise de peixes, as quais oferecem vantagens como (i) ser uma fonte renovável de 13 proteína com uniformidade entre os lotes produzidos; (ii) possibilidade de melhoramento da 14 eficácia com a alteração das sequências codificadoras dessas gonadotrofinas; (iii) facilidade na 15 purificação e livre da contaminação cruzada por outras glicoproteínas (Molés et al., 2020; 16 Adams e Boime, 2008). Diversas gonadotrofinas recombinantes já foram produzidas e têm 17 demonstrado possuir bioatividade eficaz, sendo testadas em tecidos de gônadas cultivadas in 18 vitro ou através de injeções intracelomático ou intramusculares in vivo (Molés et al., 2020; 19 Mohammadzadeh et al., 2020; Kazeto et al., 2021; Nocillado et al., 2022; Mohammadzadeh et 20 al., 2022).

#### 22 1.2.3 Proteínas recombinantes como tratamento terapêutico

23 O aumento do fornecimento de organismos aquáticos pela aquicultura, bem como a 24 ampliação da escala de produção nos sistemas de cultivos, ainda têm sido dificultados pela 25 ocorrência de doenças (Mishra et al., 2023). Essas doenças causadas, muitas vezes, por 26 microrganismos oportunistas, afetam a homeostase nos ambientes de confinamento, levando 27 os produtores a recorrerem a tratamentos com a aplicação de antibióticos (Sahoo et al., 2016). 28 A utilização de tratamentos de patógenos à base de antibióticos na aquicultura é um assunto 29 bastante discutido, sendo essa prática desencorajada fortemente devido aos inúmeros riscos 30 associados ao uso indiscriminado desses fármacos (Chattopadhyay et al., 2014). O uso das PRs 31 terapêuticas se mostra como alternativa a esses tratamentos (Maiti et al., 2020).

32 Duas proteínas do capsídeo de dois vírus causadores da doença da cauda branca (DCB)
 33 em camarões, nodavirus (MrNV) e vírus extra-pequeno (VEP) recombinantes, foram

<sup>21</sup> 

1 produzidas em E. coli BL21. Kumar et al. (2021) ofertaram na alimentação de juvenis de 2 Macrobrachium rosenbergii e, após desafio viral, obtiveram bons resultados de sobrevivência, 3 demonstrando que essas PRs são eficazes contra WTD em camarões de água doce. Um 4 aumento significativo de aproximadamente 68% na sobrevivência de Micropterus salmoides 5 foi identificada, após desafio, com a administração da proteína G recombinante do rhabdovirus 6 (MSRV) (Yang et al., 2024). Hepcidina recombinante, um peptídeo antimicrobiano, foi 7 administrado na ração de carpas-capim (Ctenopharyngodon idella), levando a um efeito 8 protetor contra infecção bacteriana, regulando a expressão positiva de genes imunológicos 9 (Chen et al., 2020).

10 São muitos os estudos que demonstram a eficiência das PRs como tratamento 11 terapêutico na aquicultura. Segundo Chen et al. (2020), é necessário que sejam implementadas 12 alternativas de proteção que garantam o fortalecimento da imunidade dos organismos 13 produzidos, com os aditivos alimentares recombinantes, a fim de reduzir a poluição aquática 14 por antibióticos, tornando a indústria mais sustentável.

15

#### 16 1.2.4 Probióticos recombinantes na nutrição

Na aquicultura, os probióticos podem ser definidos como microrganismos que são
ofertados como alimento, para proporcionar saúde ao seu hospedeiro (El-Saadony et al., 2021).
Muitos desses microrganismos podem ser utilizados como biofábricas microbianas, para a
expressão de PRs (Rettenbacher et al., 2022), e atuar como probióticos geneticamente
modificados contribuindo nos processos fisiológicos e nutricionais desses animais (Santos et
al., 2020).

23 Santos et al. (2019) manipularam geneticamente uma cepa de Bacillus subtilis para 24 expressar a enzima fitase recombinante, a qual foi utilizada como aditivo probiótico para o 25 zebrafish (Danio rerio) alimentado com uma dieta rica em farelo de soja. Como resultado, este 26 probiótico foi capaz de atenuar as respostas inflamatórias decorrentes do alto teor de material 27 vegetal presente na ração, e contribuiu nas respostas do sistema imunológico. Em outro 28 trabalho, esses mesmos autores também avaliaram esse probiótico em relação aos parâmetros 29 zootécnicos do zebrafish alimentado com ração com alto teor vegetal, demonstrando melhorias 30 significativas sobre esses parâmetros e de genes relacionados ao metabolismo (Santos et al. 31 2020).

32 Essa cepa probiótica recombinante também foi suplementada na alimentação do 33 camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Medeiros et al. (2023) verificaram que a 1 inclusão desse probiótico tornou mais biodisponível o fósforo presente nos ingredientes de origem vegetal, verificando o aumento desse mineral no tecido muscular do camarão. Estes 2 3 autores, em outro trabalho, também avaliaram a eficiência de outros probióticos, chamados não 4 convencionais, como alternativa na nutrição aquícola. Ao suplementar a dieta do camarão-5 branco-do-Pacífico com a cianobactéria Synechococcus elongatus PCC 7942 expressando uma 6 β-glicosidase recombinante, verificaram melhorias quanto à deposição de lipídios no músculo 7 e hepatopâncreas, além do aumento na expressão de genes do sistema imune e do metabolismo 8 de carboidratos e aminoácidos (Medeiros et al., 2022).

9

#### 10 1.3 Cianobactérias como biofábricas

11 A engenharia de PRs envolve a inserção de genes exógenos no genoma de determinada 12 espécie (geralmente microrganismos) por meio de técnicas moleculares. Como resultado esse 13 gene será responsável por codificar uma proteína de interesse. Assim, a espécie-alvo 14 transforma-se em uma biofábrica para a produção de proteínas específicas (Priyadharsini et al., 15 2022). Dentre as opções de microrganismos fotossintéticos como plataformas de expressão de 16 PRs, as cianobactérias se destacam, pela facilidade e competência natural para integrar DNA 17 exógeno em seu genoma sem efeitos adversos, por meio de recombinação homóloga (Clerico 18 et al., 2007).

19 As cianobactérias constituem um grupo diversificado de microrganismos procariontes 20 encontrados em vários ecossistemas da Terra. São também conhecidas como "bactérias 21 fotossintetizantes", "Schizophyceae", "Cyanophyta", "Cyanophyceae" ou "algas verde-22 azuladas" devido à presença do pigmento ficocianina, que confere a cor azul-esverdeada 23 (Figura 2a). Sua identificação é facilitada em relação às demais microalgas, pois, sendo 24 procariontes, não possuem núcleo celular nem outras organelas celulares como cloroplastos. 25 Dessa forma, o processo de fotossíntese ocorre em tilacoides simples com a clorofila (Vidal et 26 al., 2021). Sob uma perspectiva ecológica, desempenham um papel crucial como produtores 27 primários, contribuindo para a ciclagem de carbono e a fertilização do solo e da água por meio 28 da fixação de nitrogênio (N<sub>2</sub>). Além disso, servem como fonte de alimento para uma variedade 29 de animais (Beck et al., 2012; Carpenter et al., 2004; Montoya et al., 2004).

Acredita-se que esses microrganismos desenvolveram a habilidade de fotossíntese
 oxigênica antes dos eucariontes, há 2,5-3,5 bilhões de anos. Essa habilidade posteriormente foi

1 transferida para os eucariontes por meio da endossimbiose de uma cianobactéria ancestral, 2 resultando no surgimento de algas e plantas eucarióticas (Margulis, 1970). Nas aplicações 3 comerciais de bioprocessos, as cianobactérias se destacam como os únicos microrganismos 4 procariontes capazes de realizar fotossíntese utilizando CO<sub>2</sub> e energia solar (Gao et al., 2016). 5 Elas apresentam características atrativas para a produção de PR, tais como elevadas taxas de 6 crescimento, fácil manutenção em condições ambientais dinâmicas, estrutura celular simples, 7 ausência de patógenos em comum com humanos, viabilidade para tratamento genético e 8 facilidade de manipulação genética, como já mencionado (Hays e Ducat, 2015; Luan et al., 9 2019 Torres-Tiji, et al., 2020).

10 A caracterização genética de algumas linhagens de cianobactérias abriu novas 11 possibilidades para o uso eficiente destes microrganismos como biofábricas (Wang et al. 2012; 12 Goodchild-Michelman et al. 2023). Formighieri e Melis (2014, 2015), utilizando ferramentas 13 da engenharia genética, produziram de forma heteróloga um monoterpeno de alto valor 14 comercial, o β-fandandreno (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>), na cianobactéria Synechocystis, permitindo obter maiores 15 rendimentos deste produto a partir da fotossíntese desta cianobactéria. Em Synechococcus 16 elongatus, Atsumi et al. (2009) e Englund et al. (2016) obtiveram maior produção de etanol e 17 isobutanol, enquanto Azevedo et al. (2019) utilizaram essa espécie para expressão de β-18 glicosidase recombinante melhorada para auxiliar na produção de etanol de segunda geração 19 (2G). Na área da saúde, Roulet et al. (2018) desenvolveram uma plataforma para expressão de 20 policetídeos heterólogos em S. elongatus, demonstrando o potencial desta espécie como uma 21 plataforma versátil para biossíntese heteróloga de biomoléculas.

S. elongatus (Nägeli, 1849) PCC 7942 (Figura 2b) tem se destacado como modelo na 22 23 produção fotossintética de metabólitos, tanto em condições naturais quanto por modificações 24 genéticas ou de vias metabólicas, uma vez que possui capacidade natural de integrar genes 25 exógenos, genoma pequeno e totalmente sequenciado (aproximadamente 2,7 Mb) (Azevedo et 26 al., 2019; Jaiswal et al., 2022; Wu et al., 2023). A plasticidade genética facilitou os estudos de 27 manipulação genética, sendo pioneira na produção de PRs, como evidenciado por Shestakov e 28 Khyen (1970). Nessa espécie, são identificados três sítios neutros (NS), locais para onde as 29 sequências de genes externos são direcionadas e inseridas por recombinação homóloga, sem 30 efeitos adversos para essa cianobactéria (Clerico et al., 2007). Além disso, as características 31 genéticas de S. elongatus PCC 7942 permitiram o desenvolvimento de diversos vetores de 32 expressão replicativos ou integrativos para a produção de PRs, bem como diferentes

- 1 procedimentos e metodologias de adição de DNA exógeno (Vioque, 2007; Almeida et al.,
- 2 2017).





4 Figura 2. A: Diagrama de uma célula de Cianobactéria. Membrana externa: camada mais externa que envolve a 5 célula. Tilacoides: membranas internas onde ocorre a fotossíntese. DNA cromossômico: material genético da 6 célula, normalmente localizado no centro. Ribossomos: pequenas estruturas que sintetizam proteínas. 7 Carboxissomos: microcompartimentos que contêm enzimas para a fixação de CO<sub>2</sub>. Carboxissomos: 8 microcompartimentos que contêm enzimas para a fixação de CO2. Camada de peptidoglicano: estrutura rígida que 9 oferece suporte à célula. Bainha de mucilagem: camada externa viscosa para proteção e adesão. Cápsula: camada 10 protetora externa. Revestimento de mucoproteína: camada que ajuda na proteção e interação da célula com seu 11 ambiente. Ficobilissomos: complexos de pigmentos que capturam luz para a fotossíntese. Vesículas de gás: 12 estruturas que permitem à célula flutuar ou afundar ajustando sua flutuabilidade. Gotícula lipídica: reserva de 13 lipídios na célula; B: Micrografia de Cianobactérias: Imagem real ao microscópio mostrando cianobactérias 14 individuais, cada uma correspondendo ao diagrama mostrado em A. A escala na micrografia indica que cada 15 cianobactéria tem aproximadamente 25 micrômetros de comprimento. Espécie: Synechococcus elongatus PCC 16 7942 (Adaptado de Noreña-Caro e Benton, 2018; Algaebase).

17

### 18 1.4 Alternativas de incremento da produção de PRs em cianobactérias

Apesar de todo potencial das cianobactérias como biofábricas para expressão de PRs e
síntese de compostos bioativos que podem ser empregados em diversos setores da indústria,
quando comparada às demais plataformas tradicionais de expressão de PR, como as bactérias
e leveduras, a produtividade das cianobactérias ainda é inferior (Li et al., 2018). Apesar disso,
sua utilização apresenta os menores custos de produção em pequena e larga escala, menor

tempo de cultivo, além de produzir uma proteína de qualidade com precisão de dobramento
como destacado por Goshtasbi et al. (2023). Também, é possível a extração de diversos
compostos bioativos acumulados por estes microrganismos como metabólitos secundários,
aproveitando assim todo o potencial desta biofábrica (Nascimento et al., 2023).

5 Os processos de otimização desta plataforma são imperativos para o desenvolvimento 6 e produção de altos rendimentos de produtos alvo que vão além da escala laboratorial. Muitas 7 são as estratégias e metodologias que visam o aumento da expressão de PRs em cianobactérias 8 (Cui et al., 2023). No entanto, poucos estudos buscam de forma integrada metodologias para 9 este aumento. Goodchild-Michelman et al. (2023) destacam que, para o desenvolvimento das 10 cianobactérias como biofábricas, é importante haver essa integração entre metodologias para 11 que a escala de produção ultrapasse a bancada de laboratório e chegue até a escala industrial. 12 Além disso, também destacam que tais ferramentas podem ser aplicadas igualmente a outras 13 espécies com potencial biotecnológico.

14

#### 15 1.4.1 Engenharia de promotores e intensidades luminosas

Al-Haj et al. (2016) afirmaram que, para desbloquear o potencial das cianobactérias
como biofábricas, é necessário aliar a utilização de ferramentas de engenharia genética com
outras metodologias. Por exemplo, a utilização da engenharia de promotores, onde é estudada
a inclusão de promotores induzíveis ou constitutivos que possuam altas taxas de transcrição,
visando a superexpressão de proteínas heterólogas (Madhavan et al., 2021; Li et al., 2018).

21 A luz desempenha um papel essencial para o crescimento e metabolismo dos 22 microrganismos fotossintéticos (Li et al., 2021). Sob diferentes intensidades de luminosidades, 23 os microrganismos fotoautotróficos podem ter diferentes respostas em relação ao crescimento 24 celular, metabolismo e regulação do DNA, e na competência natural de cianobactéria (Taton 25 et al., 2020; Winayu et al., 2024). Assim como nas plantas, as cianobactérias possuem quatro 26 complexos proteicos supramoleculares nos tilacoides para armazenamento fotossintético de 27 energia, fotossistema I (FSI), fotossistema II (FSII), complexo citocromo b<sub>6</sub>f (Cit bf) e 28 complexo ATP sintase (Figura 3a). Durante o processo de fotossíntese, os fotossistemas 29 operam de forma simultânea, e o fluxo de elétrons entre os FSII e FSI é intermediada pelo 30 complexo citocromo b<sub>6</sub>f (Cit bf), com o auxílio de dois carreadores móveis: a plastoquinona 31 (PQ) e plastocianina (PC). O fluxo de elétrons do FSII até o FSI gera um gradiente de prótons (H<sup>+</sup>) no interior dos tilacóides, impulsionando a síntese de ATP no complexo ATP sintase
 (Figura 3b) (Hall e Rao, 1999).

3 O FSII é o componente do aparato fotossintético encarregado de catalisar a extração de elétrons, iniciada pela luz, da água, transferindo-os para moléculas transportadoras móveis de 4 elétrons, conhecidas como plastoquinonas. Essas plastoquinonas (QA e QB) estão presentes 5 6 nas subunidades proteicas D1 e D2, desempenhando um papel crucial na formação do núcleo 7 do FSII (Figura 3c) (Hall e Rao, 1999). A proteína D1 em cianobactérias pode ser codificada 8 por uma família de genes psbA com dois a seis membros, dependendo da espécie (Mulo et al., 9 2009). Em S. elongatus PCC 7942, podem ser encontradas três famílias multigênicas do gene 10 *psbA* que codificam duas formas distintas dessa proteína, D1:1 e D1:2. A subunidade D1:1 é 11 codificada pelo gene psbA1, com maiores níveis de transcrição sob pouca luz (~125 µmol. m<sup>-</sup> <sup>2</sup>. s<sup>-1</sup>), e a subunidade D1:2 é codificada pelos genes *psbA2* e *psbA3*, induzidos em condições 12 13 de estresse, havendo um aumento na transcrição desses genes (Mulo et al., 2012).

14



**Figura 3.** Diagrama mostrando onde acontece o processo de fotossíntese nas cianobactérias e a localização dos complexos proteicos que formam o aparato fotossintético. Em (**A**) é mostrado que o processo de fotossíntese ocorre nos tilacoides, onde estão localizados os quatro complexos proteicos supramoleculares: fotossistema I (FSI), fotossistema II (FSII), complexo citocromo  $b_6f$  (Cit bf) e complexo ATP sintase. Em (**B**) é mostrado como acontece o processo de transporte de elétrons e conservação da energia da luz em ATP. Em (**C**) é ampliado a estrutura que corresponde o fotossistema II, mostrando as duas subunidades proteicas D1 e D2, e a família de

genes que forma essas subunidades, com destaque para a família *psbA* (Adaptado de: Hopkins, 2000; Grupo
Agrisera).

3

4 Levando em consideração a importância da luz para a manutenção desses 5 microrganismos, uma estratégia interessante para a produção de PRs em cianobactérias seria 6 aproveitar da capacidade dessas bactérias de realizar fotossíntese e associar a utilização de 7 promotores nativos do aparato fotossintético à uma determinada faixa de luz ideal para o seu 8 crescimento e expressão de uma PR de interesse. Sengupta et al. (2020) obtiveram aumento de 9 40 % no rendimento na produção fotoautotrófica de ácido succínico utilizando intensidade luminosa de 300 µmoles de fótons. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> para induzir o promotor do gene *psbA3* da proteína 10 11 D1:2 do fotossistema II, em S. elongatus PCC 1180. Li et al. (2018) utilizaram promotores 12 endógenos do fotossistema, *psbA1*, *psbA2* e *psbA3*, para expressar a enzima  $\beta$ -galactosidase 13 em Synechococcus elongatus UTEX 2973 e verificaram que estes promotores podem variar 14 sua força de expressão sob diferentes intensidades de luz, e destacam ainda que estes fortes 15 promotores nativos pode ser usados como substitutos aos promotores indutivos, a fim de evitar 16 a toxicidade dos produtos químicos utilizados no processo de indução.

17

#### 18 1.4.2 Aplicação de campos magnéticos

19 Outra estratégia que tem se mostrado eficiente em processos biotecnológicos é a 20 aplicação de campos magnéticos (CM) (Figura 4) (Sincak et al., 2023; Font et al., 2023). Um 21 CM é gerado a partir do movimento de cargas elétricas, podendo ser gerado por ímãs ou 22 corrente elétrica, e essa ferramenta pode influenciar de forma positiva ou negativa os sistemas 23 biológicos, dependendo do seu estado fisiológico (Halliday et al., 2012; Santos et al., 2022). 24 Segundo Santos et al. (2017), os efeitos causados pelos CM podem ser explicados por três 25 diferentes mecanismos: 1) indução magnética; 2) efeito magnetomecânico e 3) interação 26 eletrônica.

O primeiro mecanismo, indução magnética, diz respeito sobre a capacidade de influência dos CM sobre íons presentes em soluções, por exemplo, os eletrólitos formados por minerais que possuem uma carga elétrica, resultando na formação de campos e correntes elétricas. O segundo, efeito magnetomecânico, é relacionado aos CM estáticos uniformes, os quais produzirão forças de rotação sobre moléculas específicas ou materiais ferromagnéticos, fazendo com que se alinhem às direções do campo aplicado. Já o terceiro mecanismo proposto, interação eletrônica, promove alterações sobre moléculas de radicais livre, que terão os níveis
 de energia e rotação spin dos elétrons alterados (Repacholi e Greenebaum, 1999).

3 Sendo ainda pouco explorada para a otimização da expressão de PRs, esta metodologia tem se mostrado como tecnologia viável economicamente (Deamici et al. 2022), além de 4 oferecer ausência de toxicidade às células e inexistência da geração de poluentes secundários 5 6 (Tu et al., 2015). Madjid Ansari et al. (2017) utilizando CM de frequência extremamente baixa 7 (ELF-MF) com intensidade de 30 - 100 mT e frequência de 2,8 Hz, obtiveram aumento na produção de glicose oxidase recombinante, uma flavoproteína, na levedura P. pastoris. Da 8 9 mesma forma, Rashidieh et al. (2022), utilizando ELF-MF de 55 mT e frequência variando de 10 2,5 a 2,8 Hz, alcançaram melhora significativa na expressão da proteína Cluster de 11 Diferenciação 22 (CD22), uma proteína de membrana eucariótica em E. coli. Além disso, a 12 aplicação de CM também pode promover um aumento de produtividade de biomassa e 13 produção de biocompostos em microrganismos fotossintéticos (Deamici et al. 2016, 2023, Tu 14 et al. 2015, Huo et al. 2020, Bauer et al. 2023).



15

Figura 4. Aplicações de campos magnéticos em diferentes fotobiorreatores no cultivo de microalgas e
cianobactérias. A: frascos Erlenmeyer; B: biorreator de roda vertical; C: biorreator Bioflow; D: biorreator Airlift
com sistema online; E: biorreator tubular horizontal; F: biorreator tubular (Santos et al., 2022).

#### 19 1.5 Proteínas fluorescentes (PFs) como ferramentas de avaliação de promotores

20 As proteínas fluorescentes (PFs) são um grupo de biomoléculas que possuem a 21 capacidade única de emitir luz quando excitadas sob determinados comprimentos de onda

1 (Luckyanov, 2022). Essa propriedade torna essas proteínas excelentes marcadores repórter 2 regularmente usados para monitorar diversos aspectos dos sistemas biológicos, como exemplo 3 em estudos que avaliam a eficiência de promotores na produção de PRs, oferecendo uma 4 variedade de aplicações em biologia molecular, genética e bioquímica (Heng e Foo, 2022; Yu 5 et al., 2024; Stepanenko et al., 2021). Duas principais vantagens podem ser descritas em relação 6 a essas PFs. A primeira refere-se ao uso de corantes sintéticos, pois essas proteínas podem ser 7 integradas ao genoma do modelo de estudo de forma eficiente através de técnicas moleculares 8 (Márta et al., 2022). A segunda é a possibilidade de observação em tempo real do local de 9 fluorescência, possibilitando o acompanhamento direto e não invasivo do comportamento das 10 proteínas (Bansal et al., 2013).

11 As PFs tornaram-se importantes ferramentas de visualização de sistemas vivos, desde 12 células até animais inteiros, e isso se deve em grande parte à capacidade de codificação genética 13 e à maturação independente dos cromóforos (Piper et al., 2013; Stepanenko et al., 2013). Os 14 cromóforos são estruturas formadas por polipeptídeo, e a proteína verde fluorescente (GFP) 15 forma seu cromóforo a partir de três aminoácidos (S65, Y66 e G67), que precisam passar por 16 transformações como: 1) dobramento da proteína, crucial para a funcionalidade da proteína e 17 formação da estrutura tridimensional; 2) ciclização, etapa em que ocorre a formação do 18 cromóforo, a formação do anel imidazolina; 3) oxidação, etapa em que ocorrem modificações 19 químicas na conformação estrutural do cromóforo e 4) desidratação, etapa em que há perda de 20 água, contribuindo para a estabilidade da proteína (Barondeau et al., 2003; Kong et al., 2020). 21 Diferentes PFs possuem tempos de maturação diferentes do cromóforo, o que irá determinar 22 os comprimentos de onda de leitura (excitação e emissão).

23 Existe atualmente uma variedade de cores de PFs, e à medida que os estudos nessa área 24 de pesquisa avançam, novas variantes estão surgindo (Greenwald et al., 2018; Ossa-Hernández 25 et al., 2023; Fluorescent Biosensor Database, 2024 (FBDB)). A GFP foi descoberta por 26 Shimomura et al. (1962), sendo uma proteína derivada da água-viva Aequorea victoria, e desde 27 então, tem sido alvo de estudo para ser utilizada como ferramenta nos campos da biologia e 28 biomedicina. Prasher et al. (1992) elucidaram a estrutura primária da GFP, possibilitando a 29 manipulação genética em células eucariontes e procariontes, em estudos posteriores (Chalfie 30 et al., 1994). Foi somente após a elucidação da estrutura terciária da GFP selvagem e da 31 mutante (S65T) que se deu início a uma série de estudos que possibilitaram a expansão das 32 variedades de cores de PFs hoje conhecidas (Ormo et al., 1996; Yang et al., 1996).

1 Entre as novas descobertas de PFs, seis homólogos da GFP de A. victoria foram isolados 2 e caracterizados por Matz et al. (1999), sendo: ciano (AmCyan) do coral Anemonia majano, 3 vermelha (DsRed) do coral Discosoma sp., amarela (ZsYellow/ zFP538) e verde (ZsGreen/ 4 zFP506) do coral Zoanthus sp. Os homólogos zFP506 e zFP538 demonstraram bons resultados 5 quanto à estabilidade em relação a proteínas como EGFP (do inglês: Enhanced Green 6 Fluorescent Protein), tornando-se promissores para aplicações como marcadores in vivo. Após 7 sua descoberta, essas proteínas passaram por modificações para possuir maior solubilidade, 8 emissão mais brilhante de luminescência e rápida maturação dos cromóforos, como é o caso 9 da ZsGreen1, que é a variante da GFP 4 vezes mais brilhante disponível comercialmente (Takara Bio Inc., 2024). Saito et al. (2016) geraram e validaram uma nova linhagem de 10 11 camundongos com a proteína repórter ZsGreen no cérebro, e destacam os benefícios do seu 12 uso em projetos experimentais. A facilidade de visualização dessa proteína, a possibilidade de 13 combinação com outros protocolos de coloração de células e o uso como marcador em 14 aplicações histológicas evidenciam a ZsGreen como uma proteína repórter confiável, sendo 15 uma boa alternativa para substituir os procedimentos convencionais de coloração.

## 1 **2. OBJETIVOS**

## 2 2.1 Objetivo geral

Aprimorar a eficiência da cianobactéria *Synechococcus elongatus* PCC 7942 como
biofábrica para produzir proteínas recombinantes (PRs) através de estratégias de incremento
de produção.

## 6 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho de diferentes promotores sob influência de campo magnético
  para a produção de PRs.
- 9 Explorar o efeito de diferentes intensidades de luz e tempo de indução na produção de
  10 PRs promotores nativos do fotossistema II de cianobactérias.
- Incrementar a produção de PRs na cianobactéria *S. elongatus* PCC 7942, com aplicação
   de campos magnéticos.

## 1 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Adams, T.E., Boime, I. 2008. The Expanding Role of Recombinant Gonadotropins in Assisted
Reproduction. Reproduction in Domestic Animals, 43 (2), 186-192.
https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01160.x

5 Agrisera Group. 2024. Disponível em: < <u>https://www.agrisera.com/en/catalog-and-flyers</u>>.

Ahmad, A., Ashraf, S.S. 2023. Sustainable food and feed sources from microalgae: Food
security and the circular bioeconomy. Algal Research, 74, 103185.
https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103185

9 Al-Haj, L., Lui., Y.T., Abed, R.M.M., Gomaa, M.A., Purton, S. 2016. Cyanobacteria as Chassis
10 for Industrial Biotechnology: Progress and Prospects. Life, 6:4, 42.
11 https://doi.org/10.3390/life6040042

Ali, S.S., El-Sheekh, M., Manni, A., Ruiz, H.A.R., et al. 2022. Microalgae-mediated
wastewater treatment for biofuels production: A comprehensive review. Microbiological
Research, 265, 127187. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127187

Almeida, D.V., Martens, S.B.B., Lanes, C.F.C., Marins, L.F. 2017. Improved genetic
transformation of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 using linear DNA fragments in
association with a DNase inhibitor. Biotechnology Research and Innovation, 1(1): 123-128.
https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.09.001

Ariede, M.B., Morocho-Jácome, A.L., Candido, T.M., Lourenço, F.R., Kato, E.T.M., Lima,
F.V., Rosado, C., Velasco, M.V.R., Carvalho, J.C.M., Baby, A.R. Is the *Botryococcus braunii*Dry Biomass an Adjuvant for Anti-UVB Topical Formulations? Scientia Pharmaceutica, 2020;
88(2), 22. https://doi.org/10.3390/scipharm88020022

Atsumi, S., Higashide, W., Liao, J.C. 2009. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide
to isobutyraldehyde. Nat. Biotechnol., 27, 1177-1180. https://doi.org/10.1038/nbt.1586

25 Azevedo, R., Lopes, J.L., de Souza, M.M., Quirino, B.F., Cançado, L.J., Marins, L.F. 2019.

26 Synechococcus elongatus as a model of photosynthetic bioreactor for expression of

27 recombinant β-glicosidases. Biotechnol Biofuels 12, 174. https://doi.org/10.1186/s13068-019-

28 1505-9

- 1 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano ABC Agricultura de baixa
- 2 emissão de carbono. Brasília, DF, 2016 Disponível em: <a href="https://www.gov.br/agricultura/pt-">https://www.gov.br/agricultura/pt-</a>
- 3 br/assuntos/sustentabilidade/planoabc-abcmais>. Acesso em: 10 Nov. 2023.
- Bansal, L., Nelson, R., Yang, E., Jayaraman, A., Hahn, J. 2013. Experimental design of systems
  involving multiple fluorescent protein reporters. Chem Eng Sci 101:191–198
- 6 Bauer, L.M., da Gloria Esquível, M., Costa, J.A.V., da Rosa, A.P.C., Santos, L.O. 2023.
- 7 Influence of Cell Wall on Biomolecules Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* Strains
- 8 Exposed to Magnetic Fields. Curr Microbiol. 4;80(3):96. https://10.1007/s00284-023-03189-0
- Barondeau, D.P., Putnam, C.D., Kassmann, C.J., Tainer, J.A., Getzoff, E.D. 2003. Mechanism
  and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped
  intermediate structures. Proc Natl Acad Sci U S A., 100(21):12111-6. doi:
  https://10.1073/pnas.2133463100
- Beck, C., Knoop, H., Axmann, I.M., Steuer, R., 2012. The diversity of cyanobacterial
  metabolism: Genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. BMC Genomics 13,
  1–17. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-56
- Castro, V., Oliveira, R., Dias, A.C.P. 2023. Microalgae and cyanobacteria as sources of
  bioactive compounds for cosmetic applications: A systematic review. Algal Research, 76,
  103287. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103287
- 19 Carpenter, E.J., Subramaniam, A., Capone, D.G., 2004. Biomass and primary productivity of
- 20 the cyanobacterium *Trichodesmium* spp. in the tropical N Atlantic ocean. Deep. Res. Part I
- 21 Oceanogr. Res. Pap. 51, 173–203. https://doi.org/10.1016/j.dsr.2003.10.006
- 22 Chattopadhyay, M.K. 2014. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. Front.
- 23 Microbiol., 5, 334. https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2014.00334
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. 1994. Green fluorescent
  protein as a marker for gene expression. Science 263:802–805.
- 26 Chen, T., Zhou, J., Qu, Z., et al. 2020. Administration of dietary recombinant hepcidin on grass
- 27 carp (Ctenopharyngodon idella) against Flavobacterium columnare infection under cage

- aquaculture conditions. Fish & Shellfish Immunology, 99, 27-34. https://doi org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fsi.2020.01.042
- Chew, K.W., Khoo, K.S., Foo, H.T., et al. 2021. Algae utilization and its role in the
  development of green cities. Chemosphere, 268, 129322.
  https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129322
- 6 Clerico, E., Ditty, J., Golden, S. 2007. Specialized Techniques for Site-Directed Mutagenesis
  7 in Cyanobacteria. Methods in molecular biology, 362, 155-171. https://doi.org/10.1007/978-18 59745-257-1\_11
- 9 Cui, J., Sun, H., Chen, R., Sun, J., Mo, G., Luan, G., Lu, X. (2023). Multiple routes toward
- 10 engineering efficient cyanobacterial photosynthetic biomanufacturing technologies. Green
- 11 Carbon, 1 (2), 210-226. https://doi.org/10.1016/j.greenca.2023.11.004
- Deamici, K.M., Costa, J.A.V., Santos, L.O. 2016. Magnetic fields as triggers of microalga
  growth: evaluation of its effect on *Spirulina* sp. Bioresour Technol 220:62–67. https://doi
  org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.biortech.2016.08.038
- Deamici, K.M., Dziergowska, K., Silva, P.G.P., Michalak, I., Santos, L.O., Detyna, J., Kataria,
  S., Brestic, M., Sarraf, M., Islam, M. 2022. Microalgae Cultivated under Magnetic Field
  Action: Insights of an Environmentally Sustainable Approach Sustainability 14:13291.
  https://doi.org/10.3390/su142013291
- EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ação contra a mudança global do
  clima: Contribuições da EMBRAPA, 2018. Disponível em:
  <a href="https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183492/1/ODS-13.pdf">https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183492/1/ODS-13.pdf</a>>. Acesso em:
  10 Nov. 2023.
- 23 Englund, E., Liang, F., Lindberg, P. 2016. Evaluation of promoters and ribosome binding sites
- 24 for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC
- 25 6803. Sci. Rep., 6, 36640. https://doi.org/10.1038/srep36640
- 26 El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Patra, A.K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A.O., Dhama,
- 27 K., Abdel-Latif, H.MR. 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview.
- 28 Fish & Shellfish Immunology, 117: 36-52. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007

- Esmaeli, A., Moghadam, H.A., Golzary, A. 2023. Application of marine microalgae in
   biodesalination and CO<sub>2</sub> biofixation: A review. Desalination, 567, 116958.
   https://doi.org/10.1016/j.desal.2023.116958
- FAO. 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul.
  Roma, FAO. https://doi.org/10.4060/cc0461es
- Font, Y.S., Diaz, Y.O., Cuypers, A., Alemán, E.I., Vandamme, D. 2023. The effect of magnetic
  feld treatment on the cultivation of microalgae: An overview of involved mechanisms. Journal
  of Applied Phycology, 35, 1525-1536. https://doi.org/10.1007/s10811-023-02994-1
- 9 Formighieri, C., Melis, A. 2014. Regulation of β-phellandrene synthase gene expression,
  10 recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in
  11 *Synechocystis* transformants. Plant., 240, 309-324. https://doi.org/10.1007/s00425-014-2080-8
- Formighieri, C., Melis, A. 2015. A phycocyanin phellandrene synthase fusion enhances
  recombinant protein expression and β-phellandrene (monoterpene) hydrocarbons production
  in *Synechocystis* (cyanobacteria). Met. Eng., 32: 116–124. https://doi.org/
- 15 Fluorescent Biosensor Database. Disponível em: <a href="https://biosensordb.ucsd.edu/index.php">https://biosensordb.ucsd.edu/index.php</a>>.
  16 Acesso em: 18 de fev. de 2024.
- 17 Grupo Agrisera. 2024. Disponível em: < https://www.agrisera.com/en/catalog-and-flyers>.
  18 Acesso em: 17 de fev. de 2024.
- Greenwald, E.C., Mehta, S., Zhang, J. 2018. Genetically encoded fluorescent biosensors
  illuminate the spatiotemporal regulation of signaling networks. Chem. Rev. 118, 11707–11794.
- Gao, X., Sun, T., Pei, G., Chen, L. Zhang, W. 2016. Cyanobacterial chassis engineering for
  enhancing production of biofuels and Chemicals. Applied Microbiology and Biotechnology,
  100, 3401-3413. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7374-2
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L. 2010. Molecular biotechnology: principles and
  applications of recombinant DNA, 4th ed., Washington, DC 20036-2904, USA
- 26 Goodchild-Michelman, I.M., Church, G.M., Schubert, M.G., Tang, T. 2023. Light and carbon:
- 27 Synthetic biology toward new cyanobacteria-based living biomaterials. Materials Today Bio,
- 28 19, 100583. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100583

- Goshtasbi, H., Okolodkov, Y.B., Movafeghi, A. et al. 2023. Harnessing microalgae as
   sustainable cellular factories for biopharmaceutical production. Algal Research, 74, 103237.
- 3 https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103237
- 4 Grahl, S., Strack, M., Mensching, A., Morlein, D. 2020. Alternative protein sources in Western
- 5 diets: Food product development and consumer acceptance of spirulina-filled pasta. Food
- 6 Quality and Preference, 84, 103933. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103933
- Guiry, M.D., Guiry, G.M. 2020. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National
  University of Ireland, Galway. Disponível em: <a href="https://www.algaebase.org">https://www.algaebase.org</a>>. Acesso em: 25
  de fev. de 2024
- 10 Hall, D.O., Rao, K.K. 1999. Photosynthesis. Cambridge University, New York
- Halliday, D., Resnick, R., Walker, J. 2012. Fundamentals of physics—electromagnetism. 9th
  edn. Wiley, Hoboken.
- Hays, S.G., Ducat, D.C. 2015. Engineering cyanobacteria as photosynthetic feedstock
  factories. Photosynthesis Research, 123, 285-295. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9980-0
- Hilsdorf, A.W.S., Hallerman, E., Valladão, G.MR., Hassemer, M.Z. et al. 2021. The farming
  and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable
  production. Reviews in Aquaculture, 14 (2), 1-35. https://doi.org/10.1111/raq.12638
- Huang, H., Su, B., Tsai, T., et al. 2020. Dietary supplementation of recombinant tilapia piscidin
  4-expressing yeast enhances growth and immune response in *Lates calcarifer*. Aquaculture
  Reports, 16, 100254. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100254
- 21 Huo, S., Chen, X., Zhu, F., Zhang, W., Chen, D., Jin, N., Cobb, K., Cheng, Y., Wang, L., Ruan, 22 R. 2020. Magnetic field intervention on growth of the filamentous microalgae Tribonema sp. 23 in starch wastewater for algal biomass production and nutrients removal: Influence of ambient 24 temperature and operational strategy. Bioresour Technol. 303:122884. 25 https://10.1016/j.biortech.2020.122884
- Hopkins, W.G. 2000. Introduction to Plant Physiology. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons,
  Inc., 512p.

- 1 Heng, Y.C., Foo, J.L. 2022. Development of destabilized mCherry fluorescent proteins for
- 2 applications in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Notes, 3:108-112.
- 3 <u>https://doi.org/10.1016/j.biotno.2022.12.001</u>
- 4 Jaiswal, D., Sahasrabuddhe, D., Wangikar, P.P. 2022. Cyanobacteria as cell factories: the roles
- 5 of host and pathway engineering and translational research. Current Opinion in Biotechnology
- 6 73:314-322. https://doi:10.1016/j.copbio.2021.09.010
- Kong, J., Wang, Y., Qi, W., Huang, M., Su, R., He, Z. 2020. Green fluorescent protein inspired
  fluorophores. Advances in Colloid and Interface Science, 285:102286.
  https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102286
- Kassim, M.A., Meng, T.K. 2017. Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) biofixation by microalgae and its
  potential for biorefinery and biofuel production. Science of the Total Environment, 584-585,
- 12 1121-1129. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.172
- Kazeto, Y., Suzuki, H., Ozaki, Y., Gen, K. 2021. C-terminal peptide (hCTP) of human
  chorionic gonadotropin enhances in vivo biological activity of recombinant Japanese eel
  follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone produced in FreeStyle 293-F cell lines.
  General and Comparative Endocrinology, 306, 113736.
  https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113731
- Koyande, A.K., Chew, K.W, Rambabu, K., et al. 2019. Microalgae: A potential alternative to
  health supplementation for humans. Food Science and Human Wellness, 8:1, 16-24.
  https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001
- Kumar, S.N., Rai, P., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2021. Recombinant viral proteins
  delivered orally through inactivated bacterial cells induce protection in *Macrobrachium rosenbergii* (de man) against white tail disease. Journal Fish Disease, 44, 601-612.
  https://doi.org/10.1111/jfd.13305
- Lallias, D., Quillet, E., Bégout, M-L., Aupérin, B., Khaw, H.L., Millot, S., et al. 2017. Genetic
  variability of environmental sensitivity revealed by phenotypic variation in body weight and
  (its) correlations to physiological and behavioral traits. PLoS ONE 12(12), e0189943.
  https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189943

- Leandro, A., Pereira, L., Gonçalves, A.M.M. 2020. Diverse Applications of Marine
   Macroalgae. Marine Drugs, 18(1), 17. https://doi.org/10.3390/md18010017
- 3 Li, S., Sun, T., Xu, C., Chen, L., Zhang, W. 2018. Development and optimization of genetic
- 4 toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. Metabolic
- 5 Engineering, 48, 163-174. <u>https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.06.00</u>
- 6 Li, S., Huang, J., Ji, L., Chen, C., et al. 2021. Assessment of light distribution model for marine
- 7 red microalga *Porphyridium purpureum* for sustainable production in photobioreactor. Algal
- 8 Research, 58, 102390. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102390
- 9 Luan, G., Zhang, S., Lu, X. 2019 Engineering cyanobacteria chassis cells toward more efficient
- 10 photosynthesis. Current Opinion in Biotechnology, 62,
- 11 https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.07.004
- Lukyanov, K.A. 2022. Fluorescent proteins for a brighter science. Biochemical and
  Biophysical Research Communications, 633(10):29-32.
  https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.08.089
- 15 Márta, K., Booth, D., Csordás, G., Hajnóczky, G. 2022. Fluorescent protein transgenic mice
- 16 for the study of Ca2+ and redox signaling. Free Radical Biology and medicine, 181: 241-250.
  17 https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.011
- Matz, M.V. et al. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nature
  Biotechnol. 17, 969–973.
- 20 Madhavan, A., Arun, K.B., Sindhu, R., Krishnamoorthy, J. et al. 2021. Customized yeast cell
- 21 factories for biopharmaceuticals: from cell engineeringto process scale up. Microbial Cell
- 22 Factories, 20, 124. https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z
- 23 Margulis, L. 1970. Origin of Eukaryotic Cells. Yale University Press, New Haven.
- Madjid Ansari, A., Majidzadeh-A, K., Darvishi, B., Sanati, H., Farahmand, L., Norouzian, D.
  2017. Extremely low frequency magnetic field enhances glucose oxidase expression in *Pichia*
- 26 pastoris GS115. Enzyme and Microbial Technology 98, 67-75.
- 27 https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.011

1-6.

- 1 Maiti, B., Dubey, S., Munang'andu, H.M., Karunasagar, I., Karunasagar, I. Evensen, Ø. 2020.
- 2 Application of Outer Membrane Protein-Based Vaccines Against Major Bacterial Fish
- 3 Pathogens in India. Front. Immunol., 11, 1362. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01362

Marangon, B.B., Magalhães, I.B., Pereira, A.S.A.P., et al. 2023. Emerging microalgae-based
biofuels: Technology, life-cycle and scale-up. Chemosphere, 326, 138447.
https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138447

Marín-Nahuelpi, R., Garcia, B.F., et al. 2024. GWAS meta-analysis of resistance against
Piscirickettsia salmonis in Atlantic salmon. Aquaculture, 579, 740249. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aquaculture.2023.740249

10 Medeiros, L., Azevedo, R., Riet, J. et al. 2022. Dietary supplementation of Synechococcus 11 elongatus PCC 7942 expressing a heterologous  $\beta$ -glucosidase on the expression of genes related to digestion, immune system, and antioxidant defenses of the shrimp Litopenaeus 12 13 J. Phycol., 34, 2089-2098. https://doivannamei. Appl. org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10811-022-02748-5 14

- Medeiros, L., Nornberg, B., Azevedo, R. et al. 2023. Dietary addition of recombinant Bacillus
  subtilis expressing a fungal phytase increases phosphorus fixation in muscle of Pacific white
  shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquacult. Int., 31, 1729-1742. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10499-023-01049-z
- Mishra, S., Seshagiri, B., Rathod, R., et al. 2023. Recent advances in fish disease diagnosis,
  therapeutics, and vaccine development, in: Frontiers in Aquaculture Biotechnology, 115-145.
  https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91240-2.00011-7
- Mohammadzadeh, S., Ahmadifar, E., Masoudi, E., et al. 2022. Applications of recombinant
  proteins in aquaculture. Aquaculture, 561, 738701.
  https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.73870
- Mohammadzadeh, S., Moradian, F., Yeganeh, S., Falahatkar, B., Milla, S. 2020. Design,
  production and purification of a novel recombinant gonadotropin-releasing hormone associated
  peptide as a spawning inducing agent for fish. Protein Expression and Purification, 166,
- 28 105510. https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.pep.2019.105510

- 1 Mokolensang, J.F, Manu, L, Gunawan, W.B, Simatupang, H.F, et al. 2023. Incorporation of
- 2 macroalgae to fish feed lowers allergenic properties in fish: An opinion study. Journal of
- 3 Agriculture and Food Research, 14, 100777. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100777
- 4 Mokrani, A., Liu, S. 2024, Harnessing CRISPR/Cas9 system to improve economic traits in
- 5 aquaculture species. Aquaculture, 579, 740279.
- 6 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740279
- 7 Molés, G., Hausken, K., Carrilo, M., Zanuy, S., Levavi-Sivan, B., Gómez, A. 2020. Generation
- 8 and use of recombinant gonadotropins in fish. General and Comparative Endocrinology, 299,
- 9 113555. https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ygcen.2020.113555
- 10 Montoya, J.P., Holl, C.M., Zehr, J.P., Hansen, A., Villareal, T.A., Capone, D.G., 2004. High
- 11 rates of N<sub>2</sub> fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. Nature 430,
- 12 1027–1031. https://doi.org/10.1038/nature02824
- Myhr, A.I., Dalmo, R.A. 2005. Introduction of genetic engineering in aquaculture: Ecological
  and ethical implications for science and governance. Aquaculture, 250 (3-4), 542-554.
  https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.032
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal
  manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165 (3), 516534. https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ygcen.2009.03.007
- Mylonas, C.C., Duncan, N.J., Asturiano, J.F. 2017. Hormonal manipulations for the
  enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality.
  Aquacultures, 472, 21-44. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021
- Mulo, P., Sakurai, I., Aro, E. 2012. Strategies for psbA gene expression in cyanobacteria, green
  algae and higher plants: From transcription to PSII repair. Biochimica et Biophysica Acta
- 24 (BBA) Bioenergetics 1817:247-257. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.04.011
- Mulo, P., Sicora, C., Aro, E.M. 2009. Cyanobacterial psbA gene family: optimization of
  oxygenic photosynthesis. Cellular and Molecular Life Sciences, 66(23):3697-710. doi:
  https://10.1007/s00018-009-0103-6

- 1 Nascimento, R.R.C., Moreno, M.R., Azevedo, R.S., Costa, J.A.V., Marins, L.F., Santos, L.O.
- 2 2023. Magnetic Fields as Inducers of Phycobiliprotein Production by *Synechococcus elongatus*
- 3 PCC 7942. Current Microbiology, 80, 242. https://doi-
- 4 org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00284-023-03348-3
- 5 Nägeli, C., 1849. Gattungen einzelliger Algen, Neue Denkschriften der Allg. Schweizerischen
  6 Gesellschaft für die Gesammten Naturwissenschaften.
- Nocillado, J., Palma, P., Wang, T., et al. 2022. Intracellular production of recombinant GnRH1
  in yeast, *Pichia pastoris*, and its potential as oral treatment to advance gonadal development in
  juvenile orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Aquaculture, 554. 738115.
  https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.73811

Oliveira, A.S., Alves, M., Leitão, F., Tacão, M., et al. 2023. Bioremediation of coastal
aquaculture effluents spiked with florfenicol using microalgae-based granular sludge – a
promising solution for recirculating aquaculture systems. Water Research, 233, 119733.
https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119733

- ONU Organização das Nações Unidas. Take urgent action to combat climate change and its
  impacts, 2016. Disponível em: < https://sdgs.un.org/goals/goal13>. Acesso em: 10 Nov. 2023.
- 17 Oviedo-Olvera, M.V., Feregrino-Pérez, A.A., Nieto-Ramírez, M.I., Tovar-Ramírez, M.M.,

Aguirre-Becerra, H., Garcia-Trejo J.F. 2023. Prebiotic emergent sources for aquaculture:
Microalgae and insects. Aquaculture and Fisheries, 2468-550X.
https://doi.org/10.1016/j.aaf.2023.06.007

Ossa-Hernández, N., Marins, L.F., Almeida, R.V. Almeida, D.V. 2023. Red Fluorescent
Protein Variant with a Dual-Peak Emission of Fluorescence. Mar Biotechnol, 25, 1099-1109.

- $\label{eq:linear} \textbf{23} \qquad https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10126-023-10262-z$
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. 1996. Crystal
  structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Science, 273(5280):1392-5.
  https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392
- 27 Piper, S.K., Habermehl, C., Schmitz, C.H., Kuebler, W.M., Obrig, H., Steinbrink, J., et al.
- 28 2013. Towards Whole-Body Fluorescence Imaging in Humans. PLoS ONE 8(12): e83749.
- 29 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083749
- 1 Pomoni, D.I., Koukou, M.K., Vrachopoulos, M.G., Vasiliadis, L. 2024. Circular economy: A
- 2 multilevel approach for natural resources and wastes under an agri-food perspective. Water-
- 3 Energy Nexus. https://doi.org/10.1016/j.wen.2023.12.003
- Phukan, M.M., Hazarika, N., Bora, P. et al. 2020. Leveraging microalga feedstock for biofuel
  production and wasteland reclamation using remote sensing and ex situ experimentation.
- 6 Renewable Energy, 159, 973-981. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.06.047
- 7 Priyadharsini, P. Nirmala, N., Dawn, S.S., et al. 2022. Genetic improvement of microalgae for
- 8 enhanced carbon dioxide sequestration and enriched biomass productivity: Review on CO<sub>2</sub> bio-
- 9 fixation pathways modifications. Algal Research, 66, 102810.
  10 https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102810
- Prasher, D.C. 1992. Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary
  structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene 111:229–233
- Rashidieh, B., Ansari, A.M., Behdani, M., Darvishi, B., Habibi-Anbouhi. 2022. Extremely low
  frequency magnetic field enhances expression of a specific recombinant protein in bacterial
- 15 host. Analytical Biochemistry, 652, 114745. https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114745
- Repacholi, M.H., Greenebaum, B. 1999. Interaction of static and extremely low frequency
  electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs.
  Bioelectromagnetics, 20, 133-160. https://doi.org/10.1002/(sici)1521-186x(1999)20:3
- 19 Rettenbacher, L.A., Arauzo-Aguilera, K., Buscajoni, L., Castillo-Corujo, A., Ferrero-Bordera,
- 20 B., Kostopoulou, A., et al. 2022. Microbial protein cell factories fight back? Trends Biotechnol,
- 21 40 (5), 576-590. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.10.003
- 22 Roulet, J., Taton, A., Golden, J.W., Arabolaza, A., Burkart, M.D., Gramajo, H. 2018.
- 23 Development of a cyanobacterial heterologous polyketide production Platform. Met. Eng., 49,
- 24 94-104. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.013
- 25 Sahoo, P., Swaminathan, T.R., Abraham, T.J., Kumar, R., Pattanayak, S., Mohapatra, A., et al.
- 26 2016. Detection of goldfish haematopoietic necrosis herpes virus (Cyprinid herpesvirus-2) with
- 27 multi-drug resistant Aeromonas hydrophila infection in goldfish: first evidence of any viral
- disease outbreak in ornamental freshwater aquaculture farms in India. Acta Tropica. 161, 8-17.
- 29 https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.004

1 Santos, K.O., Costa-Filho, J., Riet, J., Spagnol, K.L., Nornberg, B.F., Kutter, M.T., Tesser, 2 M.B., Marins, L.F. 2019. Probiotic expressing heterologous phytase improves the immune 3 system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed with a diet rich in soybean meal. 4 Fish & Shellfish Immunology, 93, 652-658. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fsi.2019.08.030 5

Santos, K.O., Costa-Filho, J., Spagnol, K.L., Nornberg, B.F., Lopes, F.M., Tesser, M.B.,
Marins, L.F. 2020. The inclusion of a transgenic probiotic expressing recombinant phytase in
a diet with a high content of vegetable matter markedly improves growth performance and the
expression of growth-related genes and other selected genes in zebrafish. Aquaculture,
519,734878. https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aquaculture.2019.734878

Santos, L.O., Deamici, K.M., Menestrino, B.C. et al. 2017. Magnetic treatment of microalgae
for enhanced product formation. World J. Microbiol. Biotechnol. 33, 1-6. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11274-017-2332-4

Silva, P.G.P., Machado, B.R., et al. 2022. Update on the application of magnetic fields to
microalgal cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 38, 211. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11274-022-03398-y

Sengupta, S., Jaiswal, D., Sengupta, A. et al. 2020. Metabolic engineering of a fast-growing
cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for photoautotrophic production of
succinic acid. Biotechnology for Biofuels 13, 89. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01727-7

Shestakov, S.V., Khyen, N.T. 1970. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. MGG Mol. Gen. Genet. 107, 372-375.
https://doi.org/10.1007/BF00441199

Sincak, M., Luptakova, A., Matusikova, I., et al. 2023. Application of a Magnetic Field to
Enhance the Environmental Sustainability and Efficiency of Microbial and Plant
Biotechnological Processes. Sustainability, 15 (19), 14459.
https://doi.org/10.3390/su151914459

Sun, C., Dong, J., Li, W., Tian, Y., Hu, J., Ye, X. 2022. Response to four generations of
selection for growth performance traits in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). Aquaculture, 548
(1):737590. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737590

- Sudo, R., Kawakami, Y., Nomura, K., Tanaka, H., Kazeto, Y. 2022. Production of recombinant
   Japanese eel (*Anguilla japonica*) growth hormones and their effects on early-stage larvae.
   General and Comparative Endocrinology, 317, 113977. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ygcen.2022.113977
- 5 , 737590. https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aquaculture.2021.737590
- 6 Saito, K., He, Y., et al. 2016. Visualizing estrogen receptor-α-expressing neurons using a new
  7 ERα-ZsGreen reporter mouse line. Metabolism, 65(4):522-532.
  8 https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.011
- 9 Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Kuznetsova, I.M., Verkhusha, V.V., Turoverov, K.K.
- 10 2013. Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore
- 11 formation. Int Rev Cell Mol Biol 302:221-278
- Stepanenko, O.V., Sulatsky, M.I. et al. 2021. New findings on GFP-like protein application as
  fluorescent tags: Fibrillogenesis, oligomerization, and amorphous aggregation. International
  Journal of Biological Macromolecules,192:13041310.https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.107
- 16 Takara Bio. Inc. Disponível em: <a href="https://www.takarabio.com/products/gene-fluorescent-proteins/fluorescent-protein-plasmids/cyan-and-green-fluorescent-fluorescent-protein-plasmids/cyan-and-green-fluorescent-protein-plasmids/cyan-and-green-fluorescent-plasmids/cyan-plasmids/cyan-plasmids/cyan-green-fluorescent-plasmids/cyan-green-fluorescent-plasmids/cyan-green-fluorescent-plasmids/cyan-green-fluorescent-plasmids/cyan-green-fluorescent-plasmids/cyan-green-green-green-green-green-green-green-green-green-green-gr
- 18 proteins/zsgreen1-fluorescent-protein>. Acesso em: 18 de fev. de 2024.
- Taton, A., Erikson, C., Yang, Y. et al. (2020) The circadian clock and darkness control natural
  competence in cyanobacteria. Nat Commun 11, 1688. https://doi.org/10.1038/s41467-02015384-9
- Tham, P.E., Lim, H.R., Chew, K.W., et al. 2023. Insights of microalgae-based aquaculture
  feed: A review on circular bioeconomy and perspectives. Algal Research, 74, 103186.
  https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103186
- 25 Torres-Tiji, Y., Fields, F.J., Mayfield, S.P. 2020. Microalgae as a future food source.
  26 Biotechnology Advances, 41, 107536. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536
- Tseng, C., Yeh, H., Liao, Z., Hung, S., et al. 2021. An in vitro study shows the potential of
   *Nostoc commune* (Cyanobacteria) polysaccharides extract for wound-healing and anti-allergic

- use in the cosmetics industry. Journal of Functional Foods, 87, 104754.
   https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104754
- Tu, R., Jin, W., Xi, T., Yang, Q., Han, S.F., Abomohra, Ael-F. 2015. Effect of static magnetic
  field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater.
  Water Res., 86, 132-8. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.07.039
- Vidal, L., Ballot, A., Azevedo, S., Padisák, J., Welker, M. Introduction to cyanobacteria. In
  Toxic Cyanobacteria in Water, 2nd ed.; Chorus, I., Welker, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton,
  FL, USA, 2021; pp. 163–211. ISBN 978-1-003-08144-9.
- 9 Vega, J., Bonomi-Barufi, J., Gómez-Pinchetti, J.L., Figueroa, F.L. 2020. Cyanobacteria and
  10 Red Macroalgae as Potential Sources of Antioxidants and UV Radiation-Absorbing
  11 Compounds for Cosmeceutical Applications. Marine Drugs., 18(12), 659.
  12 https://doi.org/10.3390/md18120659
- Vioque, A. 2007. Transformation of Cyanobacteria. In: León, R., Galván, A., Fernández, E.
  (eds) Transgenic Microalgae as Green Cell Factories. Advances in Experimental Medicine and
  Biology, vol 616. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8\_2
- Wang, B., Wang, J., Meldrum, D.R. 2012. Application of synthetic biology in cyanobacteria
  and algae. Frontiers in Microbiology, 3, 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00344
- 18 Winayu, B.N.R., Lin, Y., Hsueh, H., Chu, H. 2024. Importance of lighting color and period for
- 19 CO<sub>2</sub> fixation and C-phycocyanin production during *Thermosynechococcus* sp. CL-1 growth.
- 20BiocatalysisandAgriculturalBiotechnology55:103003.21https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.103003
- Wu, Y., Sun, J., Xu, X., Mao, S., Luan, G., Lu, X. 2023. Engineering cyanobacteria for
  converting carbon dioxide into isomaltulose. Journal Biotechnology 364:1-4.
  https://doi:10.1016/j.jbiotec.2023.01.007
- Yang, M., Liang, J., Luo, S., et al. 2024. Oral vaccination with recombinant Saccharomyces 25 26 cerevisiae expressing Micropterus salmoides rhabdovirus G protein elicits protective immunity 27 & Shellfish Immunology, 109364. in largemouth bass. Fish 145, 28 https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109364

- 1 Yang, F, Moss LG, Phillips Jr GN. The molecular structure of green fluorescent protein. Nat
- 2 Biotechnol 1996; 14:1246-51. https://doi.org/10.1038/nbt1096-1246.
- Yu, X., Li, C., Wanga, B., et al. 2024. Protein-mediated fluorescent probes for bioimaging and
  biosensing: From fundamentals to applications. TrAC Trends in Analytical Chemistry,
- 5 170:117462. https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117462
- 6 Zanella, L., Vianello, F. 2020. Microalgae of the genus Nannochloropsis: Chemical
  7 composition and functional implications for human nutrition. Journal of Functional Foods, 68,
  8 103919. https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103919
- 9 Zapater, C., Rocha A., Molés, G., Mascoli, A., Ibañez, S., Zanuy, S., Gómez, A. 2021.
  10 Functional Activity of Recombinant Forms of Amh and Synergistic Action with Fsh in
  11 European Sea Bass Ovary. International Journal of Molecular Sciences, 22 (18), 10092.
  12 https://doi.org/10.3390/ijms221810092
- Zhou, W., Wang, J. Chen, P., Ji, C. et al. 2017. Bio-mitigation of carbon dioxide using
  microalgal systems: Advances and perspectives. Renewable and Sustainable Energy Reviews,
  76, 1163-1175. https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.065
- 16

# **4. CAPÍTULO 1**

2	
3	Incremento da produção de proteína recombinante em Synechococcus elongatus PCC
4	7942 utilizando promotores nativos e campos magnéticos
5	
6	
7	
8	Artigo publicado na revista
9	Current Microbiology
10	

1	
2	Incremento da produção de proteína recombinante em Synechococcus elongatus PCC
3	7942 utilizando promotores nativos e campos magnéticos
4	
5	Arthur C. S. Cardoso <sup>1</sup> , Raíza S. Azevedo <sup>1</sup> , Rayanne J. Brum <sup>1</sup> , Lucielen O. Santos <sup>2</sup> , Luis F.
6	Marins <sup>1,*</sup>
7	
8	<sup>1</sup> LEGENE - Grupo de Pesquisa em Engenharia Genética e Biotecnologia, Laboratório de
9	Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande
10	(FURG), Rio Grande, RS, Brasil
11	
12	<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio
13	Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil
14	
15	*Autor correspondente: Luis Fernando Marins, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto
16	de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália Km 8, CEP 96203-
17	900, Rio Grande, RS, Brazil.
18	E-mail: luf@furg.br
19	

### 1 Resumo

A cianobactéria Synechococcus elongatus PCC 7942 apresenta um potencial significativo 2 3 como biofábrica para a produção de proteínas recombinantes (PRs) devido à sua capacidade de 4 aproveitar a energia luminosa e utilizar o CO<sub>2</sub>. Este estudo teve como objetivo aprimorar a 5 produção de PRs por meio da integração de promotores nativos e da aplicação de campo 6 magnético (CM) em S. elongatus PCC 7942. O promotor Ppsba2, que responde a condições de estresse, foi escolhido para a integração do gene ZsGreen1. Os resultados indicaram uma 7 8 integração bem-sucedida do gene, confirmando estudos anteriores que não mostraram 9 alterações no crescimento em cepas transgênicas. A exposição a 30 mT (CM30) demonstrou 10 aumento na transcrição de ZsGreen1 sob o promotor Ppsba2, revelando a influência do CM na 11 maquinaria fotossintética das cianobactérias. Esse aprimoramento provavelmente é atribuído a 12 mudanças induzidas por estresse na expressão gênica e atividade enzimática. O CM30 13 impactou positivamente o fotossistema II sem interromper a cadeia de transporte de elétrons, 14 alinhando-se com a teoria do "mecanismo quântico". Notavelmente, os níveis de fluorescência e a expressão gênica com a aplicação de CM30 foram significativamente diferentes das 15 16 condições de controle. Este estudo destaca a eficácia do uso de promotores nativos e CM para 17 aprimorar a produção de PRs em S. elongatus PCC 7942. Os promotores nativos eliminam a 18 necessidade de indutores exógenos dispendiosos e o potencial estresse celular causado por agentes indutores químicos. Além disso, o estudo amplia o escopo da otimização da produção 19 20 de PRs em microrganismos fotoautotróficos, fornecendo informações valiosas para aplicações 21 biotecnológicas.

22

23 Palavras-chave: aplicações biotecnológicas, campos magnéticos, expressão gênica,
24 fotossistema II, resposta ao estresse.

### 1 1. Introdução

2 Estudos sobre a produção de proteínas recombinantes (PRs) têm sido um campo em 3 constante crescimento desde a descoberta e desenvolvimento da técnica de DNA recombinante 4 em 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer. Essa técnica utiliza enzimas que clivam ácidos 5 nucleicos, ligando um gene exógeno a um vetor de expressão e propagando essa nova molécula 6 em um hospedeiro, que pode ser de origem procariótica ou eucariótica [1, 2]. Atualmente, essa técnica tem contribuído para a expansão do mercado de PR devido ao seu uso crescente em 7 8 terapias farmacêuticas, utilização na pecuária e aquicultura, e produção de enzimas industriais 9 [3, 4, 5, 6]. Os Estados Unidos e União Europeia já aprovaram e comercializaram essas 10 tecnologias. Confirmado esse crescimento, o último relatório que avalia a contribuição das PRs 11 para o mercado financeiro projeta um crescimento de 9,92% (CAGR, do inglês: Compound 12 Annual Growth Rat) neste setor nos próximos cinco anos, atingindo cerca de US\$ 1,064 bilhão 13 [7]. Avanços na pesquisa de manipulação genética e melhorias nas biofábricas usadas como 14 hospedeiros têm contribuído para a maturidade desse setor [8].

15 A escolha da biofábrica a ser utilizada depende principalmente da PR a ser produzida. 16 Algumas podem ter uma taxa de crescimento rápida, como Escherichia coli [2], enquanto 17 outras podem realizar modificações pós-traducionais, como a levedura Pichia pastoris [6]. 18 Existem também aquelas que combinam essas características com o consumo de dióxido de 19 carbono (CO<sub>2</sub>) para produzir coprodutos de base biológica, com um baixo custo de 20 manutenção, como microalgas e cianobactérias [4]. A geração e emissão cada vez mais 21 volumosas de CO<sub>2</sub> na maioria dos setores de energia e indústria têm contribuído para o 22 aquecimento global, mesmo após uma leve redução em 2020 (5,4% menor em comparação 23 com 2019) devido à pandemia de COVID-19, mas aumentando novamente a partir de 2021 como resultado da recuperação econômica [9]. Nesse contexto, microalgas e cianobactérias 24 25 têm desempenhado um papel importante, pois são capazes de realizar o biosequestro eficiente 26 desse gás [10, 11] e utilizá-lo como fonte de carbono, por exemplo, para produzir PRs [12, 13, 27 14].

28 Dentre os modelos fotossintéticos, as cianobactérias são os únicos microrganismos 29 procariontes capazes de realizar a fotossíntese utilizando CO<sub>2</sub> e energia solar, com uma 30 eficiência fotossintética superior à das plantas terrestres [15]. Elas possuem propriedades 31 atraentes para a produção de PRs por fotossíntese, como altas taxas de crescimento, fácil 32 manutenção em condições ambientais dinâmicas, estrutura celular simples, ausência de 1 patógenos em comum com humanos, manipulação genética viável e capacidade natural de 2 integrar DNA exógeno em seu genoma por meio de recombinação homóloga [16, 17, 18, 19]. 3 A caracterização genética de algumas cepas de cianobactérias permitiu a ampliação do uso 4 desses microrganismos como biofábricas eficientes [20]. Por exemplo, Synechococcus 5 elongatus PCC 7942 tem servido como modelo para a produção fotossintética de metabólitos 6 em condições naturais por meio de modificações genéticas ou engenharia de vias metabólicas 7 [21, 22, 23], sendo uma espécie pioneira em estudos de manipulação genética para a produção 8 de PRs [24].

9 No entanto, semelhante a outras espécies de cianobactérias e biofábricas disponíveis, o 10 baixo rendimento na produção de PRs permanece como uma das principais limitações, 11 exigindo a busca por estratégias para otimizar essa produção [4, 22, 6, 2]. No campo da 12 tecnologia de PRs, o gene alvo é clonado a jusante de um forte promotor que, quando induzido, 13 direciona a expressão da proteína desejada. A engenharia de promotores tem sido uma das 14 estratégias utilizadas para otimizar a produção de PRs. Nesse contexto, a inclusão de 15 promotores induzíveis ou constitutivos com altas taxas de transcrição é estudada para alcançar 16 a superexpressão de proteínas heterólogas [8]. Promotores sem necessidade de indução têm se 17 mostrado uma boa alternativa aos promotores que requerem indutores, principalmente porque 18 são uma opção econômica e viável para a produção em larga escala. O uso do indutor mais 19 popular, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), pode adicionar um custo extra à 20 produção e levar à toxicidade e estresse fisiológico nas células. Isso limita seu uso na produção 21 de proteínas terapêuticas, por exemplo [25]. Um exemplo desses promotores inclui genes 22 relacionados ao fotossistema do aparato fotossintético, como demonstrado por Sengupta et al. 23 [27], que alcançaram aumento de 40% no rendimento da produção fotoautotrófica de ácido 24 succínico usando o promotor do gene psbA3 do D1:2 do fotossistema II em S. elongatus PCC 25 1180, recomendando o uso de promotores nativos em relação aos promotores induzíveis.

26 Outra estratégia que se mostrou eficiente, mas ainda é relativamente inexplorada, é a 27 aplicação de campos magnéticos (CM) para aprimorar a expressão de genes-alvo. Madjid 28 Ansari et al. [28] utilizaram CM de frequência extremamente baixa para aumentar a produção 29 de glicose oxidase, uma flavoproteína, na levedura P. pastoris. Da mesma forma, Rashidieh et 30 al. [29] conseguiram melhoria significativa na expressão da proteína Cluster de Diferenciação 31 22 (CD22), uma proteína de membrana eucariótica, em E. coli. Além disso, a aplicação de CM 32 também pode aumentar a produtividade de biomassa e a produção de biocompostos em 33 microrganismos fotossintéticos [30, 31, 32, 33, 34]. Atualmente, essa abordagem tem sido

1 empregada como uma tecnologia voltada para a redução de custos e para garantir a viabilidade 2 econômica de processos biotecnológicos [35], não oferecendo toxicidade às células e ausência 3 de poluentes secundários [32]. Recentemente, a aplicação de CM em culturas demonstrou 4 efeitos positivos no aparato fotossintético de microrganismos fotossintéticos, como 5 cianobactérias [36]. Portanto, é interessante combinar a tecnologia de DNA recombinante por 6 meio de promotores do fotossistema com a aplicação de CM, o que pode se tornar uma 7 inovação na produção de PRs em cianobactérias. Assim, o objetivo deste estudo foi 8 desenvolver uma plataforma eficiente de expressão com base na cianobactéria Synechococcus 9 elongatus PCC 7942, utilizando um promotor nativo da proteína D1:2 relacionada ao 10 fotossistema associando CM para a produção de uma PR verde fluorescente.

11

### 12 2. Material e Métodos

13

# 14 2.1 Cepas e condições de cultivo

15 As construções genéticas utilizadas neste estudo foram replicadas nas células de 16 Escherichia coli One Shot TOP10 Electrocomp (Invitrogen), cultivadas à 37 °C em meio Luria-17 Bertani (LB) [37], suplementado com 100 µg/mL de espectinomicina e agitadas a 220 rpm. O cultivo de Synechococcus elongatus PCC 7942 (Thermo Fisher Scientific) foi realizado em 18 19 meio BG-11 [38] à 34 °C sob luz fluorescente branca com intensidade de 100 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. As culturas transgênicas de S. elongatus PCC 7942 foram suplementadas com 10 µg/mL de 20 21 espectinomicina, e a densidade óptica (OD) foi monitorada medindo a absorbância a 750 nm 22 em espectrofotômetro (BioMate 3, Thermo Scientific).

23

### 24 2.2 Construção dos vetores

O vetor de expressão base usado para as construções genéticas neste estudo foi o pSyn\_1 do kit GeneArt® *Synechococcus Engineering* (Invitrogen). Esse vetor possui um promotor induzível por níquel, PnrsB, que controla a expressão do gene que codifica a subunidade adaptadora da bomba de efluxo Resistance Nodulation Division (RND) de *Synechocystis* sp. PCC 6803. 1 Inicialmente, foi utilizado um plasmídeo previamente construído, onde o promotor do 2 gene psba2 relacionado à proteína D1:2 do fotossistema II de Synechocystis sp. foi clonado no 3 vetor comercial pZsGreen-1 (Clontech), que contém o gene que codifica a proteína verde 4 fluorescente do coral Zoanthus sp. (ZsGreen1). Esta construção, chamada pSonda-ZsGreen, 5 serviu como um molde para a PCR para isolar o fragmento psbA2-ZsGreen1 (Fig. 1a), usando 6 os iniciadores listados na Tabela 1. Esse fragmento foi digerido juntamente com o vetor 7 comercial pSyn 1 usando as enzimas de restrição EcoRI e KpnI, e então ligados com a DNA ligase T7 (Biolabs). Como resultado, a construção híbrida contendo ambas as regiões 8 9 promotoras PnrsB e PpsbA2 foi nomeado psbA2-ZsGreen1 (Fig. 1b).

10 Uma segunda construção foi gerada usando o vetor pSyn\_1, onde o psbA2-ZsGreen1 11 foi usado como modelo para amplificar o gene que codifica a proteína ZsGreen1 (Figura 1c). 12 Os iniciadores utilizados estão listados adiante (Tabela 1). O vetor pSyn 1 e o inserto ZsGreen1 13 foram digeridos com as enzimas BamHI e KpnI (Biolabs) e ligados usando a DNA ligase T7 14 (Biolabs), resultando na construção denominada pnrsB-ZsGreen1, contendo apenas o promotor PnrsB desse vetor comercial, e usado como controle negativo (Figura 1c). Todos os fragmentos 15 de DNA foram purificados (kit Illustra GFX PCR DNA e purificação de bandas de gel, GE 16 17 HealthCare), quantificados (Fluorímetro Qubit, Life Technologies), e os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo dos fabricantes. 18



**20 Figura 1.** Construção do vetor de expressão para a proteína fluorescente ZsGreen1. O vetor de expressão pSyn\_1

21 foi projetado para proporcionar a expressão de proteínas em Synechococcus elongatus. Ele possui uma região

1 promotora fortemente induzida por níquel, PnrsB, flanqueando o local de clonagem múltipla (MCS), onde o 2 segundo promotor PosbA2 e o gene que codifica para a proteína ZsGreen1 foram inseridosrelacionado ao 3 fotossistema II de Synechocystis sp. PCC 6803 e o gene que codifica para a proteína ZsGreen1 foram inseridos. 4 A: O fragmento psbA2-ZsGreen1 foi isolado por PCR da construção pSonda-ZsGreen que faz parte do banco de 5 construções do grupo de pesquisa LEGENE; B: Após isolado o fragmento contendo o promotor e o gene de 6 interesse, enzimas de restrição foram utilizdas para cortar este fragmento, juntamente com o vetor de clonagem 7 pSyn 1, gerando extremidades coesivas para então serem ligadas utilizando a enzima T7 Ligase, resultando na 8 construção psbA2-ZsGreen1, contendo dois promotores (psbA2 e pnrsB); C: A construção psbA2-ZsGreen1 foi 9 utilizada de molde para isolar o gene da proteína fluorescente ZsGreen1 (inserto) por PCR, e feito o corte com 10 enzimas de restrição do inserto juntamente com o vetor de clonagem pSyn\_1, ligado com a enzima T7 Ligase, 11 resultou na construção pnrsB-ZsGreen1, contendo apenas o promotor pnrsB.

12

## 13 2.3 Transformação de S. elongatus

As construções produzidas foram transformados em *S. elongatus* PCC 7942 seguindo
 o protocolo fornecido no kit Gene Art *Synechococcus* Engineering (Invitrogen). Como controle
 negativo, foi utilizado um inóculo de *S. elongatus* PCC 7942 selvagem transformado sem as
 construções genéticos. Ao final do processo de transformação, as amostras foram semeadas em
 meio BG-11 suplementado com 1,5% de ágar e 10 μg. mL<sup>-1</sup> de espectinomicina.

19

# 20 2.4 Confirmação da integração genômica

Como modelos para a PCR de integração genômica, o DNA genômico de *S. elongatus*PCC 7942 transformado foi extraído a partir de amostras de 10 µl e aquecidas a 95 °C por 5
min, centrifugado, e o sobrenadante foi utilizado na reação. O DNA genômico de *S. elongatus*selvagem foi utilizado como controle negativo. As PCRs foram realizadas nas seguintes
condições: 94 °C por 120 s, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por
90 s, e extensão final a 72 °C por 5 min. Os iniciadores utilizados, s7942-For e s7942-Rev,
estão descritos na Tabela 1.

28

29 Tabela 1. Sequências dos iniciadores usados para PCR, RT-qPCR e identificação de integração genômica.

Iniciadores

Reverse primer (5'-3')

Amplicon (pb)

psbA2ZsGreen1	cgcactagttcccctgattctgtggataaccgt	cacggtacctcagggggggggggtgtggggaggt	702
s7942 (REC)	tgctgcgtaacatcgttggct	atgtgatcggaaccctgaccgt	1400
ZsGreen	gaccaaggagatgaccatgaagta	ccggtgatcacgaacttgtg	69
RPOD	gagcaagcaagtcagcgatttg	tgagcccgcaaccacgatc	272
RNPB	gtgaggagagtgccacagaa	taagccgggttctgttctct	224

- 1
- 2

# 3 2.5 Confirmação da fluorescência em S. elongatus

Para verificar se as colônias transgênicas de *S. elongatus* estavam produzindo a proteína
verde fluorescente (ZsGreen1), as colônias foram observadas usando uma câmera (CCD
Olympus DP72) acoplada a um microscópio de epifluorescência invertido (Olympus® IX81.).

7

# 8 2.6 Crescimento de S. elongatus PCC 7942

Para avaliar o efeito da presença das construções genéticas no crescimento de S. 9 10 elongatus PCC 7942, culturas triplicadas contendo as duas construções (psbA2-ZsGreen1 e 11 pnrsB-ZsGreen1), juntamente com a cultura de tipo selvagem (controle), foram monitoradas 12 por um espectrofotômetro (BioMate 3, Thermo Scientific) em comprimento de onda de 750 13 nm ao longo de 10 dias, com média inicial de OD 750 de 1,059 (±0,017). Além disso, a cada 14 dois dias, foram coletadas amostras de 1 mL da cultura, fixadas com 80 µL de solução de Lugol 15 [39], e contagens celulares foram realizadas usando uma câmara de Neubauer sob um microscópio vertical (Olympus CX41). 16

17

# 18 2.7 Aplicação de campo magnético (CM)

A exposição ao CM foi realizada utilizando ímãs de ferrite com intensidade média de
30 mT (CM30) (150 × 50 × 10 mm). Essa intensidade foi escolhida, pois foi observado que ela
tem uma influência positiva no Fotossistema II [36] para ensaios de fluorescência e expressão

gênica. A exposição foi conduzida por dois dias no início da fase estacionária da cultura,
quando a OD 750 atingiu 1. A intensidade do CM foi medida em vários pontos nos frascos
usados nos ensaios, utilizando medidor de CM (Global Mag, TLMP-HALL 05 K). O grupo
controle foi mantido nas mesmas condições das culturas expostas ao CM, mas apenas expostas
ao CM da Terra (0,005 mT).

Em um ensaio preliminar, as condições experimentais ideais para a exposição ao CM e
expressão da ZsGreen1 ao longo de dez dias foram analisadas. Com base nisso, foi determinado
que todas as culturas nos experimentos começariam com densidade de OD 750=1,
correspondendo ao início da fase estacionária, com amostragem para análise no segundo dia.
Este ponto de tempo correspondia aos níveis mais altos de fluorescência detectada. Essa
determinação é importante, pois, para biorreatores fotoautotróficos, é desejável que a produção
de proteínas continue mesmo após atingir a densidade celular ideal [40].

13

## 14 2.8 Medição da fluorescência de *S. elongatus* PCC 7942

15 Para avaliar a influência do CM30 no promotor do gene PpsbA2, relacionado à proteína D1:2 do Fotossistema II e, consequentemente, na produção da ZsGreen1, um ensaio em 16 17 triplicata foi conduzido seguindo as condições descritas na seção 2.7. Ao longo de dois dias, as 18 culturas transgênicas, juntamente com a cultura controle, foram cultivadas com e sem aplicação 19 de CM. A cada 24 h, a densidade óptica foi medida usando um espectrofotômetro BioMate 3 20 (Thermo Fisher Scientific), e a fluorescência foi medida usando leitor de microplacas híbrido 21 (Biotek Synergy® H1). As medições foram realizadas em placas pretas com fundo transparente, utilizando comprimento de onda de excitação de 496 nm e comprimento de onda 22 23 de emissão de 506 nm. A densidade óptica de cada cultura foi utilizada para normalizar os dados de fluorescência. 24

25

### 26 2.9 Análise da expressão gênica

Para avaliar a expressão do gene *zsgreen1*, um ensaio foi conduzido seguindo as
mesmas condições descritas na seção 2.8. Ao final do segundo dia do ensaio, foram coletados
50 ml da cultura para extração total de RNA utilizando Trizol (Invitrogen) e tratado com DNase
I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando o kit High Capacity
cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e quantificado utilizando o fluorômetro

1 Qubit (Invitrogen). A análise da expressão gênica foi realizada utilizando a PCR quantitativa 2 em tempo real (qPCR) com o kit PowerUP SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 3 sob as seguintes condições: 50 °C por 120 s, 95 °C por 120 s, seguido por 40 ciclos de 95 °C 4 por 15 s e 60 °C por 60 s. Os genes de normalização endógenos, rpod e rnpb, que codificam a 5 subunidade Delta da RNA polimerase e a subunidade R da ribonuclease P, respectivamente, 6 foram utilizados para normalizar a análise da expressão gênica. O método da curva padrão 7 relativa foi empregado para análise, com auxílio do aplicativo geNorm VBA para o Microsoft 8 Excel [41]. Todas as etapas foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, e os 9 iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

10

# 11 2.10 Análises estatísticas

12 Os dados referentes à curva de crescimento, expressão gênica e unidade de fluorescência foram submetidos a testes de normalidade utilizando os testes de Shapiro-Wilk e 13 14 Kolmogorov-Smirnov, e a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Quando as premissas de normalidade foram atendidas, foi realizada uma análise de variância 15 16 de dois fatores (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey quando diferenças significativas entre 17 os tratamentos foram identificadas para os dados de crescimento e um teste t de Student não 18 pareado para os dados de expressão gênica e unidade de fluorescência. Um nível de significância de p<0.05 foi considerado, e todas as análises estatísticas foram conduzidas 19 20 utilizando o software GraphPad Prism 9.0.

21

# 22 **3. Resultados**

23

# 24 **3.1 Integração genômica e fluorescência em** *S. elongatus* PCC 7942

Neste estudo, *S. elongatus* PCC 7942 foi transformada com as construções psbA2ZsGreen1 e pnrsB-ZsGreen1, ambos expressando a proteína fluorescente verde ZsGreen1 (Fig.
2A e B). A confirmação da integração dessas construções no genoma da cianobactéria foi
realizada por meio de PCR, resultando em um fragmento de 1,4 kb. Esse tamanho corresponde
à região entre a proteína de membrana integral que regula a condutância de cátions em *S. elongatus* PCC 7942 (Synpcc7942\_2499) e o gene de resistência a antibióticos (aadA: proteína

de resistência a aminoglicosídeos AadA) presente no vetor de expressão pSyn\_1 (Fig. 2C).
 Para identificar cepas transgênicas que expressam a proteína ZsGreen1 e apresentam
 fluorescência, as colônias foram observadas sob um microscópio de fluorescência, onde a
 emissão de fluorescência foi detectada (Fig. 2D), e colônias selecionadas foram selecionadas.



5

Figura 2. Características dos vetores de expressão pnrsB-ZsGreen1 (A) e psbA2-ZsGreen1 (B). Confirmação da
integração dos vetores pnrsB-ZsGreen1 e psbA2-ZsGreen1 no genoma de *Synechococcus elongatus* PCC 7942
(C): 1 – 3: psbA2-ZsGreen1; 4 – 6: pnrsB-ZsGreen1; 7 – 9: *S. elongatus* PCC 7942 selvagem; 10: Controle
negativo (reação sem amostra de DNA); 1 Kb Plus DNA Ladder. (D) Confirmação da presença da proteína
fluorescente verde ZsGreen1 em colônias de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 transgênicas (i: luz branca; iii:
luz UV) e não transgênicas (ii: luz branca; iv: luz UV).

12

### 13 **3.2 Efeitos da transgenia no crescimento celular**

Para avaliar se a presença de DNA exógeno afetaria o crescimento da cianobactéria, foi
realizado o monitoramento do crescimento ao longo de 10 dias, iniciando a contagem de células
no OD 750=1,059 (±0,017). Durante esse período, foi observada diferença significativa para o
OD 750 (Figura 3A) e densidade celular (células/mL) (Figura 3B), a partir do sexto dia, do
grupo pnrsB-ZsGreen1, que continha o promotor PnrsB induzido por níquel (p<0,05).</li>
Nenhuma diferença significativa (p > 0,05) foi detectada entre os grupos em relação ao grupo
de controle. Comparando o grupo psbA2-ZsGreen1, não foi identificado nenhuma diferença

- 1 significativa em relação aos demais tratamentos (p>0,05). De maneira geral, a presença das
- 2 duas construções genética não afetaram o crescimento da cianobactéria transgênica.





Figura 3. Curvas de crescimento de *Synechococcus elongatus* PCC7942. A: Avaliação do efeito da integração de duas construções pnrsB-ZsGreen1 (promotor PnrsB, induzido por níquel) e psbA2-ZsGreen1 (promotor PpsbA2,
relacionado à proteína D1:2 do fotossistema II de *Synechocystis* sp.) na OD 750 nm; B: Densidade celular
(células/mL) (b), comparados ao grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0.05;</li>
ANOVA two-way).

9

# 10 3.3 Efeito do campo magnético na expressão gênica e nos níveis de fluorescência

A análise estatística revela diferença significativa (p<0,05) na expressão do gene</li> *zsgreen1* para os dois promotores examinados quando expostos ao CM, psbA2-ZsGreen1
(Figura 4A, p=0,0076) e pnrsB-ZsGreen1 (Figura 5A, p=0,0001). Em relação aos níveis de
fluorescência, não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação à
exposição ao CM (p>0,05) para os dois promotores analisados (Figura 4B, p=0,2410; Figura
5B, p=0,6357).

7 Em resumo, é evidente que o promotor nativo não induzido PpsbA2 potencializa a
8 transcrição da proteína de interesse quando comparado ao promotor induzido por níquel PnrsB.
9 Além disso, a estratégia de exposição ao CM mostra-se eficaz na otimização da produção de
10 proteínas em ambos os promotores (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Expressão do gene *zsgreen1* no grupo contendo a construção genética psbA2-ZsGreen1, normalizado
pelos genes endógenos *rpod* e *rnpb*, que codificam a subunidade Delta da RNA polimerase e a subunidade R da
ribonuclease P, respectivamente (A), e Unidade de Fluorescência da proteína verde fluorescente ZsGreen1 (B)
sob duas condições de exposição: sem campo magnético e com campo magnético de 30 mT. O grupo psbA2ZsGreen1 possui o promotor PpsbA2, relacionado à proteína D1:2 do fotossistema II de *Synechocystis* sp.
Asteriscos indicam diferença significativa (\*\* p<0,01; teste t de Student).</li>





Figura 5. AExpressão do gene *zsgreen1* no grupo contendo a construção genética pnrsB-ZsGreen1, normalizado
pelos genes endógenos *rpod* e *rnpb*, que codificam a subunidade Delta da RNA polimerase e a subunidade R da
ribonuclease P, respectivamente (), e Unidades de Fluorescência da proteína verde fluorescente ZsGreen1 (B) sob
duas condições de exposição: sem campo magnético e com campo magnético de 30 mT. O grupo pnrsB-ZsGreen1
possui o promotor PnrsB, uma região promotora constitutiva fraca fortemente induzida por níquel. Asteriscos
indicam diferença significativa (\*\*\* p<0,001).; teste t de Student).</li>

8

### 9 4. Discussão

10 Neste estudo, foram construídos dois plasmídeos usando o vetor pSyn\_1 e 11 transformados em S. elongatus PCC 7942, denominados pnrsB-ZsGreen1 e psbA2-ZsGreen1. 12 Os promotores PnrsB e PpsbA2 foram utilizados para expressar a proteína verde fluorescente 13 ZsGreen1 nessa cianobactéria, sendo o primeiro já presente no vetor comercial utilizado, 14 enquanto o segundo promotor foi inserido no mesmo vetor por meio de técnicas de engenharia 15 genética realizadas pelo grupo de pesquisa. A inserção do segundo promotor visa otimizar a 16 produção de PR nessa biofábrica com exposição ao CM. Essa abordagem tecnológica mostrou-17 se vantajosa, pois é de baixo custo, não causa poluição secundária, além de influenciar o perfil 18 de síntese de proteínas em microrganismos, entre outras vantagens [29, 33, 35].

A cianobactéria *S. elongatus* PCC 7942 tem sido amplamente utilizada na produção de
 PR, sendo uma biofábrica de interesse na indústria devido à sua capacidade de utilizar CO<sub>2</sub> e
 aproveitar a energia luminosa para a produção biotecnológica, apresentando isso como uma

1 das principais vantagens ambientais em relação a outras biofábricas disponíveis [42, 13]. O uso 2 da engenharia genética na criação de cepas transgênicas confirmou o potencial desses 3 microrganismos como sistemas de expressão [43], enquanto a inclusão de DNA exógeno não 4 afeta seu desenvolvimento e crescimento. S. elongatus PCC 7942 foi capaz de integrar com 5 sucesso o gene da proteína ZsGreen1 em seu genoma, o que corrobora os resultados de 6 Azevedo et al. [21] e Sengupta et al. [27], que produziram cepas transgênicas para a produção 7 de β-glucosidases recombinantes e ácido succínico, respectivamente, também não observando 8 alterações no crescimento dessa espécie de cianobactéria.

9 Nas plantas, algas e cianobactérias, o fluxo fotossintético ocorre de maneira integrada 10 com a participação de quatro complexos proteicos supramoleculares, sendo dois deles o 11 fotossistema I (FSI) e o fotossistema II (FSII) [44]. O FSII é a parte do aparato fotossintético 12 responsável por catalisar a extração de elétrons da água, induzida pela luz, e transferi-los para moléculas móveis transportadoras de elétrons, as plastoquinonas, que estão presentes nas 13 14 subunidades proteicas D1 e D2 e ajudam a formar o núcleo do FSII [44]. Em relação à proteína D1, em S. elongatus PCC 7942, podem ser encontradas três famílias multigênicas do gene psba 15 16 que codificam duas formas distintas dessa proteína, D1:1 e D1:2, sendo que a última forma 17 também é codificada pelo gene psba2 [45], cujo promotor foi utilizado neste estudo.

18 Nas condições normais de cultivo, a expressão do gene psba em S. elongatus PCC 7942 é diretamente proporcional à intensidade de luz utilizada, com maior número de transcritos dos 19 genes *psba2* e *psba3* em intensidades de luz entre 125 e 750 µmol fótons m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> [46, 47]. Neste 20 estudo, trabalhamos com as condições de cultivo recomendadas pelo kit Vetor de Expressão 21 22 de Proteína de Synechococcus da GeneArt<sup>TM</sup>, que está dentro da faixa recomendada, explicando 23 a quantidade basal de transcritos da proteína ZsGreen1 e fluorescência encontrada no grupo 24 contendo o promotor do gene psba2, psbA2-ZsGreen1, sem exposição ao campo magnético 25 (30 Mt), aproveitando apenas a energia luminosa disponível. No entanto, o mesmo não foi 26 observado no grupo pnrsB-ZsGreen1, que contém o promotor induzível do gene da subunidade 27 adaptadora da bomba de efluxo RND. Nesse caso, é necessário adicionar níquel à cultura para 28 induzir a produção da proteína, o que pode representar uma desvantagem, já que o níquel pode 29 ter efeitos tóxicos para as células, possivelmente levando à morte celular [21].

Além do fator de luminosidade, de maneira geral, a exposição ao CM (30 mT)
aumentou a transcrição do gene *zsgreen1* em ambos as construções, com maior expressão
observada no grupo que contém o promotor nativo psbA2-ZsGreen1 (Figs. 4A e 5A),

1 demonstrando a influência do CM no aparato fotossintético das cianobactérias. Os efeitos 2 biológicos observados em microrganismos quando expostos ao CM ainda permanecem não 3 totalmente explicados, no entanto, algumas teorias são propostas para tentar entender esses 4 mecanismos. Propõe-se que, sob exposição ao CM, ocorra aumento nos níveis de espécies 5 reativas de oxigênio (EROs), caracterizando um estado de estresse nessas células, resultando 6 em alteração na expressão gênica, assim como na atividade enzimática e, consequentemente, 7 na expressão proteica [48]. Embora não tenhamos analisado as EROs das células de S. 8 elongatus nas condições experimentais, sabemos que condições de estresse, como mudanças 9 nas condições ambientais, podem induzir a expressão dos genes psba2 e psba3 com maior 10 intensidade [47]. Portanto, é provável que o estado de estresse e as alterações em enzimas e 11 genes envolvidos no processo de expressão proteica favoreceram a expressão da PR.

12 Outra teoria estudada para explicar esses mecanismos é a teoria do "mecanismo 13 quântico-mecânico", que se refere ao comportamento quântico de íons dentro de uma cavidade 14 proteica [49]. A fuga de íons dessas cavidades pode influenciar o funcionamento de enzimas. 15 Poucos estudos abordaram a influência da aplicação de CM no aparato fotossintético de 16 microalgas e cianobactérias. Deamici et al. [33] avaliaram a influência do CM na atividade do 17 FSII por meio da análise do rendimento quântico (F<sub>V</sub> / F<sub>M</sub>) e dos transientes de fluorescência 18 da clorofila (OJIP) na cianobactéria Arthrospira platensis. Esses autores observaram que a 19 aplicação de 30 mT influencia positivamente o FSII e não causa interrupção na cadeia de 20 transporte de elétrons (Q<sub>A</sub> e Q<sub>B</sub>), em linha com a teoria do "mecanismo quântico-mecânico". 21 Embora condições de estresse impactem negativamente a cadeia de transporte de elétrons (QA 22 e Q<sub>B</sub>) [50, 51], é provável que o estresse causado pelo CM seja diferente de outros tipos de 23 estresse causados por mudanças nas condições de cultivo, pois essas perturbações não são 24 verificadas. Portanto, o uso do promotor PpsbA2, que é mais expresso em condições de 25 estresse, torna-se interessante, pois não interfere no funcionamento do FSII, mas melhora seu 26 desempenho [36].

Quanto aos níveis de fluorescência produzidos pelas culturas, não foi observada diferença estatística nos promotores utilizados sob condições de estresse com exposição ao CM (Figura 4B e Figura 5B). Kunert et al. [52] também não observaram a mesma diferença na expressão gênica do gene repórter GFP para a espécie *Synechocystis* sp. quando mediram a emissão de fluorescência dessa proteína sob condições de estresse com limitação de ferro no meio de cultura, onde é possível que os pigmentos presentes nessas células estejam absorvendo parte da luz emitida.

1 Esses resultados reforçam nossa proposta de usar indutores nativos para a expressão de 2 PR, demonstrando que a utilização do promotor nativo do gene psba2 é uma opção dentro da 3 engenharia de promotores, sem a necessidade de indutores caros ou potencialmente tóxicos. 4 Seguindo a linha de utilizar promotores nativos, Sengupta et al. [27] obtiveram bons resultados 5 na produção fotoautotrófica de ácido succínico, usando o promotor nativo do gene psbA3, da 6 proteína D1:2 do fotossistema II (PpsbA3) na cianobactéria Synechococcus elongatus PCC 7 11801. Além disso, também demonstramos o potencial do uso do CM como ferramenta para 8 incrementar a produção de PR na cianobactéria S. elongatus PCC 7942. Os efeitos positivos 9 dessa ferramenta em microalgas e cianobactérias são bem documentados [32], incluindo para 10 a espécie S. elongatus PCC 7942 [53]. No entanto, ainda há falta de estudos para a otimização 11 de PR nesses microrganismos fotoautotróficos. Reafirmando a eficiência dessa ferramenta, 12 Rashidieh et al. [29] demonstraram que é possível aumentar o rendimento na expressão 13 heteróloga da proteína de membrana CD22 em E. coli, enquanto Madjid Ansari et al. [28] 14 obtiveram aumento na produção de glicose oxidase na levedura Picchia pastoris, ambos 15 utilizando CM de baixa frequência (CM-BF).

Em resumo, este é o primeiro estudo a demonstrar que a combinação de um promotor nativo com a aplicação de CM pode otimizar a produção de PR, eliminando a necessidade de promotores exógenos que frequentemente já estão disponíveis em vetores comerciais, o que tende a aumentar o custo da produção de PR e potencialmente causar efeitos adversos nas células.

21

### 22 5. Conclusão

No presente trabalho foi demonstrada a eficácia do uso do promotor livre de indutor químico psbA2 para a produção de PR. Além disso, foi sugerido o uso de CM para aumentar o funcionamento desse promotor. A produção de PR foi maior sob condições naturais de cultivo com esse promotor, mas pode ser aumentada com a aplicação dessa tecnologia de baixo custo que não causa efeitos prejudiciais às células e não gera poluição secundária, como ocorre com promotor PnrsB, disponível no vetor comercial pSyn\_1, que possui desvantagens na indução da produção de PR, por exigir a adição de níquel ao sistema.

30

### 31 6. Referências

Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically
 functional bacterial plasmids in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the
 United States of America 70:32403244. http://doi:10.1073/pnas.70.11.3240

4 2. Kaur J, Kumar A, Kaur J (2018) Strategies for optimization of heterologous protein
5 expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. Int J Biol Macromol 106:803-822.
6 https://10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080

- 3. Das PK, Sahoo A, Veeranki VD (2022) Current status, and the developments of hosts and
  expression systems for the production of recombinant human cytokines Biotechnology
  Advances 59:107969. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107969
- 4. Banerjee A, Ward V (2022) Production of recombinant and therapeutic proteins in microalgae. Curr Opin Biotechnol 78:102784. https://doi:10.1016/j.copbio.2022.102784
- 12 5. Mohammadzadeh S, Ahmadifar E, Masoudi E, Milla S, El-Shall NA, Alagawany M, Emran
- 13 TE, Michalak I, Dhama K (2022) Applications of recombinant proteins in aquaculture.
- 14 Aquaculture 561:738701. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738701
- 15 6. Brabander P, Uitterhaegen E, Delmulle T, De Winter K, Soetaert W. (2023) Challenges and
- 16 progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review. Biotechnol
- 17 Adv 64:108121. <u>https://doi:10.1016/j.biotechadv.2023.108121</u>
- 7. Mordor Intelligence (2021) Recombinant Protein Market Industry Share, Size, Growth.
  https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/recombinant-protein-market. Acessado
  em 03 de Junho de 2023
- 8. Madhavan, A, Arun KB, Sindhu R. Krishnamoorthy J, Reshmy R, Sirohi R, Pugazhendi A,
   Awasthi MK, SZAKACS G, Binod P (2021) Customized yeast cell factories for
   biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. Microb Cell Fact 20:124.
   https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z
- 25 9. Jackson RB, Friedlingstein P, Quéré CLe, Abernethy S, Andrew RM, Canadell JG, Ciais P,
- 26 Davis SJ, Deng Z, Liu Zhu (2022) Global fossil carbon emissions rebound near pre-COVID-
- 27 19 levels. Environ Res Lett 17:031001. https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac55b6
- 10. Daneshvar E, Wicker RJ, Show PL, Bhatnagar A (2022) Biologically-mediated carbon
  capture and utilization by microalgae towards sustainable CO2 biofixation and biomass

valorization – A review. Chemical Engineering J 427:130884.
 https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130884

11. Xu P, Li J, Qian J, Wang B, Liu J, Xu R, Chen P, Zhou W (2023) Recent advances in CO2
fixation by microalgae and its potential contribution to carbon neutrality. Chemosphere
319:137987. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137987

6 12. Savakis P, Tan X, Du W, Santos FB, Lu X, Hellingwerf KJ (2015) Photosynthetic
7 production of glycerol by a recombinant cyanobacterium. Journal of Biotechnology 195:468 51. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.015

9 13. Salehizadeh H, Yam N, Farnood R (2020) Recent advances in microbial CO2 fixation and
10 conversion to value-added products. Chemical Engineering Journal 390:124584.
11 https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124584

12 14. Su HY, Wu SW, Chou HH, Lin WH, Chow TJ, Chiu HH, Fei Q, Cheng KK (2021)

Recombinant cyanobacteria cultured in CO2 and seawater as feedstock for coproduction of
acetoin and succinate by engineered *Enterobacter cloacae*. Journal of CO2 Utilization
52:101683. https://doi.org/10.1016/j.jcou.2021.101683

16 15. Dimukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM, Posewitz MC (2008) Aquatic
17 phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. Current Opinion in
18 Biotechnology 19(3):235-240. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.007

19 16. Clerico EM, Ditty JL, Golden SS. (2007) Specialized techniques for site-directed
20 mutagenesis in cyanobacteria E. Rosato (Ed.), Circadian rhythms. Methods in molecular
21 biology<sup>™</sup>, Hum. Press, 362, 155-171.

17. Hays SG, Ducat DC. (2015) Engineering cyanobacteria as photosynthetic feedstock
factories. Photosynth Res 123:285-295. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9980-0

18. Luan G, Zhang S, Lu X (2019) Engineering cyanobacteria chassis cells toward more
efficient photosynthesis. Curr Opin Biotechnol 62:1-6.
https://doi:10.1016/j.copbio.2019.07.004

27 19. Torres-Tiji Y, Fields FJ, Mayfield SP (2020) Microalgae as a future food source. Biotechnol

 28
 Adv 41:107536. https://doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107536

29 20. Wang B, Wang J, Meldrum DR (2012) Application of synthetic biology in cyanobacteria

30 and algae. Front Microbiol 3:1-15. https://10.3389/fmicb.2012.00344

- Azevedo R, Lopes JL, de Souza MM, Quirino BF, Cançado LJ, Marins LF (2019)
   *Synechococcus elongatus* as a model of photosynthetic bioreactor for expression of
   recombinant β-glucosidases. Biotechnol Biofuels 12:174. https://doi.org/10.1186/s13068-019 1505-9
- 5 22. Jaiswal D, Sahasrabuddhe D, Wangikar PP (2022) Cyanobacteria as cell factories: the roles
  6 of host and pathway engineering and translational research. Curr Opin Biotechnol 73:314-322.
  7 https://doi:10.1016/j.copbio.2021.09.010
- 8 23. Wu Y, Sun J, Xu X, Mao S, Luan G, Lu X (2023) Engineering cyanobacteria for converting
  9 carbon dioxide into isomaltulose. J Biotechnol 364:1-4.
  10 https://doi:10.1016/j.jbiotec.2023.01.007
- Shestakov SV, Khyen NT. (1970) Evidence for genetic transformation in blue-green alga
   *Anacystis nidulans*. MGG Mol Gen Genet 107:372-375.https://10.1007/BF00441199
- 25. Dvorak P, Chrast L, Nikel PI, Fedr R, Soucek K, Sedlackova M, Chaloupkova R, Lorenzo
  V, Prokop Z, Damborsky J (2015) Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. Microb Cell Fact 14:201.
  https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3
- 17 26. Khani M, Bagheri M (2020) Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of
  18 recombinant protein expression. Protein Expression and Purification 170:105593.
  19 https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105593
- 27. Sengupta S, Jaiswal D, Sengupta A, Shah S, Gadagkar S, Wangikar PP (2020) Metabolic
  engineering of a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for
  photoautotrophic production of succinic acid. Biotechnol Biofuels 13:89.
  https://doi.org/10.1186/s13068-020-01727-7
- 28. Madjid Ansari A, Majidzadeh-A K, Darvishi B, Sanati H, Farahmand L, Norouzian D
  (2017) Extremely low frequency magnetic field enhances glucose oxidase expression in *Pichia pastoris* GS115. Enzyme and Microbial Technology 98:67-75.
  https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.011
- 28 29. Rashidieh B, Ansari AM, Behdani M, Darvishi B, Habibi-Anbouhi (2022) Extremely low
- 29 frequency magnetic field enhances expression of a specific recombinant protein in bacterial
- 30 host. Analytical Biochemistry 652:114745. https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114745

- 30. Deamici KM, Costa JAV, Santos LO (2016) Magnetic fields as triggers of microalga
   growth: evaluation of its effect on *Spirulina* sp. Bioresour Technol 220:62–67. https://doi org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.biortech.2016.08.038
- 4 31. Deamici KM, Silva PGP, Costa JAV (2023) Low Electromagnetic Fields Applied to 5 *Chlorella fusca* Cultivation to Increase Production of Microalga-Based Carbohydrates.
- 6 Bioenerg Res. https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12155-022-10562-7
- 7 32. Tu R, Jin W, Xi T, Yang Q, Han SF, Abomohra Ael-F (2015) Effect of static magnetic field
- 8 on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater Water
  9 Res 86:132-8. https://10.1016/j.watres.2015.07.039
- 10 33. Huo S, Chen X, Zhu F, Zhang W, Chen D, Jin N, Cobb K, Cheng Y, Wang L, Ruan R 11 (2020) Magnetic field intervention on growth of the filamentous microalgae Tribonema sp. in 12 starch wastewater for algal biomass production and nutrients removal: Influence of ambient 13 temperature and operational strategy. Bioresour Technol. 303:122884. https://10.1016/j.biortech.2020.122884 14
- 15 34. Bauer LM, da Gloria Esquível M, Costa JAV, da Rosa APC, Santos LO (2023) Influence
- 16 of Cell Wall on Biomolecules Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* Strains Exposed to
- 17 Magnetic Fields. Curr Microbiol. 4;80(3):96. https://10.1007/s00284-023-03189-0
- 35. Deamici KM, Dziergowska K, Silva PGP, Michalak I, Santos LO, Detyna J, Kataria S,
  Brestic M, Sarraf M, Islam M (2022) Microalgae Cultivated under Magnetic Field Action:
  Insights of an Environmentally Sustainable Approach Sustainability 14:13291.
  https://doi.org/10.3390/su142013291
- 22 36. Deamici KM, Cuellar-Bermudez SP, Muylaert K, Santos LO, Costa JAV (2019) Quantum
- 23 yield alterations due to the static magnetic fields action on *Arthrospira platensis* SAG 21.99:
- 24 Evaluation of photosystem activity. Bioresource Technology 292:121945.
- 25 https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121945
- 26 37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold
- 27 Spring Harb. Lab. Press, New York. https://doi.org/10.1002/jobm.19840240107
- 28 38. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments,
- 29 strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology 111:1-61.
- 30 https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1

- 1 39. Utermöhl, H (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik.
- 2 Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte. Limnologie
- **3** 9:1-38.
- 4 40. Shabestary K, Anfelt J, Ljungqvist E, Jahn M, Yao L, Hudson EP (2018) Targeted
- 5 Repression of Essential Genes to Arrest Growth and Increase Carbon Partitioning and Biofuel
  6 Titers in Cyanobacteria. ACS Synthetic Biology, 7:1669-1675.
- 7 https://doi:10.1021/acssynbio.8b00056
- 8 41. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F
- 9 (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging
- 10 of multiple internal control genes. Genome Biol 3: research0034
- 42. Noreña-Caro D, Benton, MG (2018) Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of
  high-value chemicals. Journal of CO2 Utilization, 28:335-366.
  https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008
- 43. Brasil BSAF, de Siqueira FG, Salum TFC, Zanette CM, Spier R (2017) Microalgae and
  cyanobacteria as enzyme biofactories. Algal Research, 25:76-89.
  https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.035
- 17 44. Hall DO, Rao KK (1999) Photosynthesis. Cambridge University, New York
- 18 45. Clarke AK, Soitamo A, Gustafsson P, Oquist G (1993) Rapid interchange between two
- 19 distinct forms of cyanobacterial photosystem-II reaction-center protein-D1 in response to
- 20 photoinhibition. Proc Natl Acad Sci USA, 90:11985–11989. https://10.1073/pnas.90.24.11985
- 21 46. Kulkarni RD, Schaefer MR, Golden SS (1992) Transcriptional and posttranscriptional
- 22 components of psbA response to high light intensity in Synechococcus sp. strain PCC 7942. J
- 23 Bacteriol 174:3775-3781. https://10.1128/jb.174.11.3775-3781.1992
- 24 47. Mulo P, Sakurai I, Aro EM (2012) Strategies for psbA gene expression in cyanobacteria,
- 25 green algae and higher plants: From transcription to PSII repair. Biochimica et Biophysica Acta
- 26 1817:247-257. https://10.1016/j.bbabio.2011.04.011
- 27 48. Torres MA (2010) ROS in biotic interactions. Physiologia Plantarum 138:414-429.
- 28 https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x

49. Binghy VN (1997) Interference of Ion Quantum States Within a Protein Explains Weak
 Magnetic Fields Effect on Biosystems. Electro- and Magnetobiology 16:203-214.
 https://doi.org/10.3109/15368379709015653

50. Dao LHT, Beardall J (2016) Effects of lead on two green microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*: photosystem II activity and heterogeneity. Algal Res 16:150-159.
http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.006

51. Markou G, Depraetere O, Muylaert K (2016) Effect of ammonia on the photosynthetic
activity of *Arthrospira* and *Chlorella*: a study on chlorophyll fluorescence and electron
transport. Algal Res 16:449-457. http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.039

10 52. Kunert A, Hagemann M, Erdmann N (2000) Construction of promoter probe vectors for

11 Synechocystis sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. Journal

12 of Microbiological Methods 41:185-194. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00162-7

13 53. Nascimento RRC, Moreno MR, Azevedo RS, Costa JAV, Marins LF, Santos LO (2023)

14 Magnetic Fields as Inducers of Phycobiliprotein Production by *Synechococcus elongatus* PCC

15 7942. Curr Microbiol 80:242. https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00284-

16 023-03348-3

# **5. CAPÍTULO 2**

2	
3	Comparação de promotores relacionados ao fotossistema II na maximização da
4	produção de proteínas recombinantes em Synechococcus elongatus PCC 7942
5	
6	Artigo submetido para publicação na revista
7	Applied Biochemistry and Biotechnology
8	

1	
2	Comparação de promotores relacionados ao fotossistema II na maximização da
3	produção de proteínas recombinantes em Synechococcus elongatus PCC 7942
4	
5	Arthur C. S. Cardoso <sup>1</sup> , Raíza S. Azevedo <sup>1</sup> , Lucielen O. Santos <sup>2</sup> , Luis F. Marins <sup>1,*</sup>
6	
7	<sup>1</sup> LEGENE - Grupo de Pesquisa em Engenharia Genética e Biotecnologia, Laboratório de
8	Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande
9	(FURG), Rio Grande, RS, Brasil
10	
11	<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio
12	Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil
13	
14	*Autor correspondente: Luis Fernando Marins, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto
15	de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália Km 8, CEP 96203-
16	900, Rio Grande, RS, Brasil.
17	E-mail: luf@furg.br
18	

### 1 Resumo

2 As cianobactérias têm demonstrado um potencial significativo na biofabricação fotossintética 3 de proteínas recombinantes (PRs) com diferentes promotores. Os promotores relacionados ao 4 fotossistema têm sido explorados e sua eficiência de expressão é diretamente vinculada à 5 intensidade da luz utilizada para o crescimento das cepas. Este estudo explora o efeito de 6 diferentes intensidades de luz em dois promotores do aparato fotossintético, PpsbA1 e PpsbA2, para otimizar a produção de PRs em S. elongatus PCC 7942, assim como definir o tempo ideal 7 8 de indução desses promotores para obter o maior rendimento da PR produzida. Estes 9 promotores relacionados ao fotossistema II de cianobactérias foram utilizados para expressar a 10 proteína repórter verde fluorescente ZsGreen1, e as construções genéticas produzidas foram 11 transformadas em S. elongatus PCC 7942. Os resultados de expressão gênica e níveis de 12 fluorescência indicaram que os promotores usados respondem de diferentes maneiras sob diferentes intensidades de luz e em diferentes tempos de inducão. O promotor PpsbA2 13 14 demonstrou ser mais eficiente na produção da proteína ZsGreen1 em relação ao promotor PpsbA1. O promotor PpsbA2, quando induzido por 6 h em intensidade de luz mais alta (500 15 16 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), pode resultar em quantidades maiores da proteína de interesse, quando comparado com o promotor comercialmente utilizado PpsbA1. Essa combinação pode 17 18 melhorar o desempenho da cianobactéria S. elongatus PCC 7942 como biofábrica de proteínas recombinantes. 19

20

21 Palavras-chave: cianobactéria, promotores nativos, intensidade luminosa, expressão gênica.

### 1 1. Introdução

2 As cianobactérias têm demonstrado um grande potencial na biofabricação fotossintética 3 de biocombustíveis e biocompostos (naturais e não naturais), sendo consideradas importantes 4 biofábricas. Isso se deve principalmente à sua capacidade de absorver CO<sub>2</sub> e energia solar como 5 fontes de carbono e energia para o crescimento da biomassa e a conversão de compostos 6 orgânicos (Li et al., 2022). Esses microrganismos procarióticos são únicos com capacidade de 7 realizar a fotossíntese oxigênica, nas quais desenvolveram adaptações para aprimorar seu 8 desempenho fotossintético por meio do acúmulo de carbono inorgânico dentro das células, 9 conhecido como mecanismo de concentração de carbono (MCC) (Price et al., 2008). Outro 10 fator importante em relação às cianobactérias é a alta adaptabilidade a mudanças ambientais, 11 especialmente no que diz respeito à absorção de luz para o crescimento e síntese de moléculas 12 essenciais, sem causar fotodano às células (Ungerer et al., 2018; Battistuzzi et al., 2023).

13 A fotoinibição sob altas intensidades de luz podem ser evitadas a partir de mecanismos 14 fisiológicos desenvolvidos por estes microrganismos, permitindo a aclimatação dessas cianobactérias a mudanças no ambiente, sem comprometer sua taxa de crescimento e fixação 15 16 de CO<sub>2</sub> (Rehman et al., 2022). Esses mecanismos estão relacionados à sensibilidade do aparato 17 fotossintético em capturar e se adaptar a essas mudanças, principalmente no complexo do 18 fotossistema II (FSII) desse aparato. Nas cianobactérias, o fotossistema II é um complexo 19 responsável por catalisar a fotoxidação da água e iniciar o fluxo de elétrons a partir da absorção 20 de energia luminosa, composto por duas subunidades da proteína D1, D1:1 e D1:2, que 21 alternam no controle da operação desse complexo, sob diferentes intensidades de luz, 22 prevenindo o fotodano às células (Mulo et al., 2012; Heinz et al., 2016). Todas essas 23 características importantes demonstram cumulativamente a capacidade desses microrganismos 24 para a síntese de metabólitos secundários e compostos bioativos com aplicações em diversos 25 setores da sociedade, seja na agricultura (Oviedo-Olvera et al., 2023; Tham et al., 2023), na 26 composição de alimentos humanos (Grahl et al., 2020), na indústria cosmética (Castro et al., 27 2023), ou na produção de biocombustíveis emergentes (Marangon et al., 2023), bem como na 28 produção de proteínas recombinantes (PRs) (Banerjee e Ward, 2022).

A produção de PRs de alto valor em cianobactérias tem aumentado constantemente nos
 últimos anos. Além das características já mencionadas, a capacidade natural de algumas
 espécies de integrar genes exógenos em seu genoma e a facilidade de manipulação genética
 tornam esses microrganismos fotossintéticos plataformas atraentes na biofabricação em

biologia sintética, como exemplificado pela espécie modelo *Synechococcus elongatus* PCC
7942 (Sproles et al., 2021; Banerjee e Ward, 2022). Na biologia sintética, como parte das peças
essenciais para montar um vetor de expressão de PR, os promotores são responsáveis por
controlar a força de expressão da proteína de interesse e podem ser induzidos de várias
maneiras, incluindo o uso de luz (Goodchild-Michelman et al., 2023).

6 Promotores que controlam genes relacionados ao fotossistema têm sua força de 7 expressão diretamente vinculada à intensidade da luz utilizada para o crescimento das cepas. 8 Sengupta et al. (2020), ao produzirem ácido succínico usando o promotor PpsbA3 do gene psbA3 em S. elongatus PCC 1180, alcançaram aumento de 40% no rendimento com intensidade 9 de luz de 300 µmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Li et al. (2018) avaliaram as respostas de vários promotores do 10 fotossistema para a produção de β-galactosidase recombinante em S. elongatus UTEX 2973 e 11 12 demonstraram que esses promotores respondem de maneira diferente em baixas (50 µmol.m<sup>-2</sup>.  $s^{-1}$ ) e altas (500 µmol.m<sup>-2</sup>.  $s^{-1}$ ) intensidades de luz, recomendando fortemente o uso desses 13 14 promotores induzíveis por luz.

15 Até o momento, uma faixa de luz ideal e tempo de indução para esses promotores do 16 fotossistema ainda não foram definidos. O que se sabe é que a variação nas respostas desses 17 promotores pode estar relacionada à adaptação do aparato fotossintético, especialmente o 18 complexo do fotossistema II, como visto, por exemplo, com a expressão de diferentes 19 isoformas da proteína D1, D1:1 e D1:2, que regulam a transcrição de genes em condições de 20 intensidade de luz distintas. Em S. elongatus, a isoforma D1:1 é codificada pelo gene psbA1 21 sob condições normais de cultivo com baixa intensidade de luz, enquanto a isoforma D1:2, 22 codificada pelos genes psbA2 e psbA3, é expressa em condições de estresse celular em 23 intensidades de luz elevadas (Mulo et al., 2012).

24 Numerosas lacunas ainda precisam ser preenchidas para aumentar o rendimento de 25 produção de cianobactérias como biofábricas, em comparação com outros microrganismos 26 usados na produção de PRs, como bactérias e leveduras (Cui et al., 2023). Sproles et al. (2021) 27 relataram que a engenharia genética e o fornecimento de recursos moleculares podem aumentar o rendimento da biofabricação fotossintética, potencialmente reduzindo o atraso em 28 29 comparação com outras biofábricas usadas em aplicações biotecnológicas. Outro aspecto 30 importante é compreender como a incidência de luz afeta esses microrganismos fotossintéticos 31 na biofabricação de compostos, já que respostas variadas podem ser encontradas em diferentes 32 intensidades de luz, comprimento de onda e fotoperíodo (Winayu et al., 2024), especialmente em relação à estabilidade da transcrição gênica no aparato fotossintético (Mulo et al., 2012;
 Muramatsu e Hihara, 2012).

3 Cui et al. (2023) argumentaram que o desenvolvimento de tecnologias de biofabricação 4 fotossintética em cianobactérias é baseado em três abordagens principais: 1) triagem para 5 encontrar novas espécies que possuam características desejáveis para aplicações 6 biotecnológicas; 2) engenharia para modificar, referindo-se a estudos biotecnológicos com o 7 objetivo de otimizar a produção de metabólitos naturais e não naturais; 3) estresse para ativar, 8 relacionado à indução dessas biofábricas sob condições estratégicas para o acúmulo desses 9 metabólitos. O presente estudo está totalmente alinhado com essas três abordagens, visando 10 explorar o efeito de diferentes intensidades de luz em dois promotores do aparato fotossintético, 11 PpsbA1 e PpsbA2, para otimizar a produção de PRs em S. elongatus PCC 7942, assim como 12 definir o tempo ideal de indução desses promotores para obter o maior rendimento do PR 13 produzida.

14

### 15 2. Material e Métodos

16

# 17 2.1 Cepas e condições de cultivo

18 Neste estudo, foram utilizadas células Escherichia coli One Shot TOP10 Electrocomp (Thermo Fisher Scientific), cultivadas à 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 19 20 1989) para a replicação das construções genéticas, suplementado com 100 µg/mL de 21 espectinomicina e agitação de 220 rpm. O meio BG-11 pH 7,6 (Rippka et al., 1979) foi usado 22 no cultivo do inóculo de Synechococcus elongatus PCC 7942 (Thermo Fisher Scientific), mantido à 34 °C sem agitação sob luz fluorescente fria de 50 µmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Ao trabalhar com 23 24 cepas transgênicas, os meios de cultura foram suplementados com 10 µg/mL de 25 espectinomicina. A densidade ótica (OD) de todas as culturas foi monitorada medindo a 26 absorbância (750 nm) em espectrofotômetro (BioMate 3, Thermo Fisher Scientific).

27

#### 28 2.2 Construção do vetor

Os vetores utilizados como ponto de partida para a manipulação genética de S.
 *elongatus* PCC 7942 foram pSyn\_1 e pSyn\_6, ambos presentes no kit *Synechococcus*

GeneArt® (Thermo Fisher Scientific). A principal diferença entre esses dois vetores está nos
promotores constitutivos que controlarão a expressão da proteína de interesse. No plasmídeo
pSyn\_1, há um promotor fraco derivado da subunidade adaptadora da bomba de efluxo RND
(Resistance Nodulation Division) de *Synechocystis* sp. PCC 6803, chamado PnrsB, enquanto o
promotor no plasmídeo pSyn\_6 é o PpsbA1 de *S. elongatus*, que codifica a proteína D1:1 do
fotossistema II.

Uma nova construção foi produzida inserindo um segundo promotor no plasmídeo
pSyn\_1, o promotor PpsbA2 que codifica a proteína D1:2 do fotossistema II de *Synechocystis*sp., para expressar a proteína recombinante verde fluorescente do coral *Zoanthus* sp. (ZsGreen1
ou zoanGFP). Isso resultou em uma construção híbrida contendo ambas as regiões promotoras
PnrsB e PpsbA2, que foi nomeada psbA2-ZsGreen1.

12 A construção psbA2-ZsGreen1 foi usado como molde para isolar o fragmento da 13 proteína verde fluorescente ZsGreen1 por PCR, utilizando os iniciadores PNI - For e RRNB -14 Rev, detalhados na Tabela 1. O produto de PCR e o vetor pSyn\_6 foram digeridos usando as 15 enzimas de restrição BamHI e KpnI (Thermo Fisher Scientific) e ligados usando a DNA ligase 16 T7 (Thermo Scientific), resultando na construção denominada psbA1-ZsGreen1. Todos os 17 fragmentos de DNA foram purificados (kit de purificação de DNA GFX PCR e gel, GE HealthCare), quantificados (Fluorímetro Qubit, Thermo Fisher Scientific) e os procedimentos 18 19 foram realizados de acordo com os protocolos dos fabricantes.

20

### 21 2.3 Transformação de S. *elongatus* PCC 7942

As construções desenvolvidas foram transformados em *S. elongatus* PCC 7942
seguindo o protocolo do já citado kit *Synechococcus* Gene Art. Um inóculo de *S. elongatus*PCC 7942 selvagem transformado sem as construções genéticas foi utilizado como controle
negativo. Após a etapa de transformação, as amostras foram semeadas em ágar BG-11 a 1,5%,
suplementado com 10 µg. mL<sup>-1</sup> de espectinomicina.

27

# 28 2.4 Confirmação da integração genômica

Para a confirmação da integração genômica, o DNA genômico dos transformantes de *S. elongatus* foi extraído a partir do aquecimento a 95 °C por 5 minutos de uma amostra de 10
μL de cultivo, centrifugada e o sobrenadante foi utilizado como molde para reações de PCR.
 O DNA genômico de *S. elongatus* selvagem foi utilizado como controle negativo. As reações
 de PCR foram conduzidas nas seguintes condições: 94 °C por 120 s, seguido por 35 ciclos de
 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 90 s, com uma extensão final de 72 °C por 5 min.
 Os iniciadores utilizados, s7942 - For e s7942 - Rev, estão detalhados na Tabela 1.

6

Primers	Sequência (5'-3')	PCR amplicon (pb)
PNI - For	ctcggtctgatvttagcggggga	
RRNB - Rev	gcgctacggcgtttcacttctga	1215
s7942 - For	tgctgcgtaacatcgttggct	
s7942 - Rev	atgtgatcggaaccctgaccgt	1400
ZsGreen1 - For	gaccaaggagatgaccatgaagta	
ZsGreen1 - Rev	ccggtgatcacgaacttgtg	69
RPOD - For	gagcaagcaagtcagcgatttg	272
RPOD - Rev	tgagcccgcaaccacgatc	
RNPB - For	gtgaggagagtgccacagaa	
RNPB - Rev	taageegggttetgttetet	224

7 Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR, RT-qPCR e identificação de integração genômica.

8

9

# 10 2.5 Detecção da fluorescência de S. elongatus PCC 7942

As cepas de *S. elongatus* PCC 7942 transformadas com plasmídeos contendo o gene *zsgreen1* foram avaliadas utilizando um microscópio de epifluorescência invertido (Olympus®
IX81), equipado com uma câmera (CCD Olympus DP72).

14

# 15 2.6 Crescimento das cepas de S. *elongatus* PCC 7942

1 Para monitorar o efeito dos transgenes no crescimento das cepas de S. elongatus PCC 2 7942, foram realizados cultivos em triplicata das cepas contendo as duas construções (psbA1-3 ZsGreen1 e psbA2-ZsGreen1), juntamente com o cultivo selvagem (controle). O 4 monitoramento foi realizado a cada dois dias, utilizando espectrofotômetro (BioMate 3, 5 Thermo Fisher Scientific) a um comprimento de onda de 750 nm ao longo de 10 dias, iniciando 6 com uma média de OD<sub>750</sub> de 0.130 (±0,003). Além disso, 1 ml de cultura foi coletado, fixado 7 com 80 µL de solução de Lugol (Utermöhl, 1958), para contagem de células em câmara de 8 Neubauer, utilizando microscópio (Olympus CX41) de bancada.

9

## 10 2.7 Indução de promotores com diferentes intensidades de luz

Para avaliar a resposta dos promotores do aparato fotossintético e a expressão da
ZsGreen1 sob várias densidades de fluxo de fótons, foram realizados experimentos em
triplicata utilizando luz fluorescente fria em três intensidades diferentes: luz baixa (50 μmol.
m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), luz média (250 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) e luz alta (500 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), conforme determinado
pelos estudos de Mulo et al. (2012) para essa espécie de cianobactéria.

16 A densidade ótica inicial (OD<sub>750</sub>) do experimento foi de aproximadamente 0,5 em todas 17 as réplicas. O experimento teve início com uma etapa inicial onde todas as réplicas foram 18 mantidas durante 24 h sem exposição à luz, período necessário para a estabilização da família 19 de genes *psbA* (Mulo et al., 2012), e feito a coleta de material, constituindo assim o tratamento 20 controle. Após esse período, as culturas foram distribuídas entre os tratamentos, com duração 21 de 48 horas, e pontos de amostragem em 0, 6, 12, 24 e 48 h para análise de expressão gênica. Medidas de radiação fotossinteticamente ativa (PAR, do inglês Photosynthetically active 22 23 radiation) foram obtidas usando um medidor LI-250A acoplado a um sensor quântico esférico LI-193, para ajustar as intensidades de luz apropriadas. 24

25

### 26 2.8 Expressão gênica

Para avaliar o efeito de diferentes intensidades de luz nos dois promotores em estudo,
a expressão do gene repórter *zsgreen1* foi quantificada. O RNA total foi extraído de 30 mL de
cultura de cada réplica usando Trizol (Invitrogen) e subsequentemente tratado com DNAse I
(Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando o kit de Transcrição
Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems) e quantificado com o fluorímetro

1 Qubit (Invitrogen). A análise de expressão foi realizada por PCR quantitativo em tempo real 2 (qPCR) usando o kit PowerUP SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) nas seguintes 3 condições: 50 °C por 120 s, 95 °C por 120 s, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C 4 por 60 s. Os genes normalizadores endógenos, rpod e rnpb, responsáveis pela codificação da 5 subunidade Delta da RNA polimerase e da subunidade R da ribonuclease P, respectivamente, 6 foram utilizados para normalizar a análise de expressão gênica, e os resultados foram analisados pelo método 2<sup>-ΔΔCT</sup> (Livak e Schmittgen, 2001). Todas as etapas seguiram o 7 8 protocolo do fabricante, e os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

9

### 10 2.9 Medição da fluorescência de ZsGreen1

Os resultados da expressão gênica foram utilizados para definir o tempo de exposição
suficiente para obter os melhores resultados para a proteína ZsGreen1. Assim, o experimento
foi iniciado com o OD<sub>750</sub> de aproximadamente 0,5 nas culturas, que também foram submetidas
a 24 h de restrição de luz, e em seguida induzidas por 6 h nas três intensidades de luz estudadas:
luz baixa (50 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), luz média (250 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) e luz alta (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>).

Após a indução, as réplicas foram novamente mantidas sem exposição à luz para evitar a influência da indução externa de luz além do período de 6 h, e então a fluorescência foi monitorada por 48 h, com coletas a cada 24 h. As leituras foram realizadas usando placas pretas em um leitor de microplacas híbrido (Biotek Synergy® H1) a um comprimento de onda de excitação de 493 nm e emissão de 505 nm, sendo os valores de densidade OD<sub>750</sub> de cada cultura utilizados para normalizar os dados de fluorescência.

22

#### 23 2.10 Análise estatística

24 Os resultados correspondentes ao crescimento e fluorescência foram obtidos em 25 experimento em triplicata. Os dados de expressão de genes foram obtidos a partir de três 26 subamostras coletadas de cada réplica, totalizando n=9 em cada tratamento. Todos os dados 27 encontrados nas análises foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk e 28 Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Uma vez que as 29 premissas para a análise foram atendidas, os resultados foram testados por meio de ANOVA 30 unifatorial seguida pelo teste de comparação de médias de Dunnett, já que a média de cada 31 tratamento foi comparada apenas ao grupo controle. Os dados de crescimento são apresentado com média±desvio padrão, e os dados de expressão gênica e fluorescência como média±erro
padrão. O nível de significância considerado foi p<0,05, e todos os testes foram realizados no</li>
software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software).

4

#### 5 3. Resultados

6

### 7 3.1 Integração genômica e fluorescência em S. elongatus PCC 7942

8 Duas construções foram produzidas com diferentes promotores que controlam genes 9 envolvidos no fotossistema II, psbA1-ZsGreen1 (promotor PpsbA1) e psbA2-ZsGreen1 10 (promotor PpsbA2), ambos expressando a proteína verde fluorescente ZsGreen1 (Fig. 1a e 1d). 11 A confirmação da fluorescência das cepas transgênicas também foi observada em colônias e 12 em meio líquido, utilizando microscópio de fluorescência, com a detecção de fluorescência nas 13 células (Fig. 1b). Os resultados de PCR mostram que o gene zsgreen1 foi integrado ao genoma 14 de S. elongatus PCC 7942, confirmando a eficiência natural dessa espécie em integrar genes 15 exógenos. A confirmação mostrou um fragmento de 1,4 kb, que corresponde à região entre a 16 proteína de membrana integral que regula a condutância de cátions em S. elongatus PCC 7942 17 (Synpcc7942\_2499) e o gene que confere resistência ao antibiótico espectinomicina (gene 18 aadA: proteína de resistência aminoglicosídeo AadA), presente em ambos os vetores de 19 expressão (Fig. 1c).



2 homóloga: pUC ori: Origem de replicação bacteriana: NS1a: sítio de recombinação homóloga: aadA: gene de 3 resistência à antibiótico; pnrsB: promotor do gene da subunidade adaptadora da bomba de efluxo RND; psbA2: 4 promotor da proteína D1:2 do fotossistema II de Synechocystis sp. PCC 6803; ZsGreen1: proteína verde 5 fluorescente; rrnB: região de terminação da transcrição. B: Características da construção genética psbA2-6 ZsGreen1, onde: NS1b: sítio de recombinação homóloga; RP4/ RK2: local bom, facilita a conjugação bacteriana; 7 pUC ori: Origem de replicação bacteriana; NS1a: sítio de recombinação homóloga; aadA: gene de resistência à 8 antibiótico; pnrsB: promotor do gene da subunidade adaptadora da bomba de efluxo RND; psbA2: promotor da 9 proteína D1:1 do fotossistema II de Synechococcus elongatus; ZsGreen1: proteína verde fluorescente; rrnB: região 10 de terminação da transcrição. C: Eletroforese de confirmação da integração das construções no genoma de genoma 11 de Synechococcus elongatus PCC 7942, 1 Kb Plus DNA Ladder; 1 a 3: psbA1-ZsGreen1; 4 a 6: psbA2-ZsGreen1; 12 7 a 9: S. elongatus selvagem; 10: Controle negativo. D: Identificação de fluorescência em células de S. elongatus 13 PCC 7942 em meio líquido, cepa psbA2-ZsGreen1 (i e ii), e cepa psbA1-ZsGreen1 (iii e iv).

Figura 1. A: Características da construção genética psbA2-ZsGreen1, onde: NS1b: sítio de recombinação

14

1

#### 15 **3.2 Efeitos da transgenia no crescimento celular**

Para avaliar se a presença de DNA exógeno afetaria o crescimento das cianobactérias,
foi realizado um monitoramento de 10 dias, começando a contagem celular a partir de um
OD<sub>750</sub> de 0,130 (±0,003). Durante esse período, constatou-se que a inclusão do gene *zsgreen1*no genoma de *S. elongatus* não teve impacto negativo no crescimento das colônias quando
comparado ao grupo controle (cepa selvagem). Não foi observada diferença significativa
(p>0,05) tanto para a densidade celular (células/mL) (Fig. 2a) quanto para OD<sub>750</sub> (Fig. 2b) nas
cepas contendo as construções genéticas psbA1-ZsGreen1 e psbA2-ZsGreen1.



1

Figura 2. Curvas de crescimento de *Synechococcus elongatus* PCC7942. Avaliação do efeito da integração de dois construtos, psbA1-ZsGreen1 (promotor PpsbA1, relacionado à proteína D1:1 do fotossistema II de *S. elongatus*) e psbA2-ZsGreen1 (promotor PpsbA2, relacionado à proteína D1:2 do fotossistema II de *Synechocystis*sp.), na densidade celular (10<sup>4</sup> cels /mL) (A) e no OD<sub>750</sub> nm (B), em relação ao grupo controle, cultura selvagem.
Dados apresentados como média ± desvio padrão da média.

7

# 8 3.3 Intensidades de luz na expressão gênica

9 Três intensidades de luz diferentes foram testadas para avaliar as respostas dos
10 promotores do aparato fotossintético quando induzidos a expressar a proteína verde
11 fluorescente ZsGreen1 (Fig. 3). A indução com luz baixa (50 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) não resultou em

diferença estatisticamente significativa (p>0,05) em comparação com o grupo controle (coleta
 na fase escura) para nenhuma das cepas (Fig. 3a). Era esperado que, nessa intensidade de luz,
 a cepa psbA1-ZsGreen1 com o promotor PpsbA1 gerasse maior transcrição de *zsgreen1*, uma
 vez que o gene psbA1 é mais expresso em condições de luz baixa.

Sob luz média (250 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), a quantidade de transcritos não apresentou diferença
em relação aos tempos de exposição quando comparada ao tempo controle (p>0,05) para a cepa
psbA1-ZsGreen1 (Fig. 3b). Para psbA2-ZsGreen1 com o promotor PpsbA2, o ponto de 6 h
apresentou diferença significativa em relação ao controle (p=0,0019); entretanto, não foi
observada diferença nos outros tempos analisados (p>0,05) (Fig. 3b).

A indução com luz alta (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) resultou no melhor desempenho para a 10 11 produção da proteína fluorescente com a cepa psbA2-ZsGreen1. Para a cepa psbA1-ZsGreen1, 12 não foi observada diferenca estatística nos tempos de exposição em comparação com o tempo 13 controle (p>0,05) (Fig. 3c). No entanto, ao analisar o gráfico de transcrição da cepa psbA2-14 ZsGreen1 nessa intensidade, identificamos o melhor tempo de indução do promotor PpsbA2, 15 com a maior quantidade de transcritos encontrada no ponto de 6 h, estatisticamente diferente 16 em relação ao tempo controle (p=0,0212). Os outros tempos de coleta não apresentaram 17 diferença (p>0.05) (Fig. 3c).



1 Fig. 3. Expressão relativa do gene *zsgreen1* com indução de diferentes intensidades de luz e tempos de exposição,

2 para as cepas transgênicas psbA1-ZsGreen1 e psbA2-ZsGreen1. A: Inducão com luz baixa (50 umol. m<sup>-2</sup>, s<sup>-1</sup>). B:

3 Indução com luz média (250 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). C: Indução com luz alta (500 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). A cepa psbA1-ZsGreen1, 4

possui o promotor PpsbA1, relacionado à proteína D1:1 do fotossistema II de S. elongatus, e a cepa psbA2-

5 ZsGreen1, possui o promotor PpsbA2, relacionado à proteína D1:2 do fotossistema II de Synechocystis sp. 6 Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) nos níveis de expressão gênica nos tempos de coleta em relação

7 ao grupo controle em diferentes intensidades de indução do promotor são indicadas por asteriscos (\* p < 0,05; \*\*

- 8 p<0,01; teste ANOVA unifatorial seguido de Dunnett). Dados apresentados como média ± erro padrão da média.
- 9

#### 3.4 Intensidades de luz nos níveis de fluorescência 10

11 A fluorescência da ZsGreen1 foi avaliada com base no melhor tempo de exposição encontrado na análise de expressão gênica, e assim, após 6 h de exposição a três intensidades 12 de luz diferentes, luz baixa (50 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), luz média (250 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), luz alta (500 13 umol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), a fluorescência foi monitorada por 48 h (Fig. 4). A fluorescência produzida pela 14 15 cepa psbA1-ZsGreen1 não diferiu (p>0,05) do controle nas três intensidades de luz, para ambos 16 os tempos de leitura (Figs. 4a, b, c). Os valores de fluorescência obtidos na cepa psbA2-17 ZsGreen1 foram mais evidentes, como esperado, dada a expressão do gene *zsgreen1* observada. 18 Foi constatado aumento significativo na fluorescência diária para cada intensidade de luz 19 quando comparada diretamente ao controle, tornando-se mais evidente essa diferença no tempo 20 de 48 h de leitura, tendo maior pico de fluorescência produzida com a exposição à luz alta 21 (p<0,05; p<0,0001) (Figs. 4a, b, c).

22

23 Figura 4. Unidades de fluorescência (FU) da proteína verde fluorescente ZsGreen1com indução de diferentes 24 intensidades de luz e tempos de exposição, para as cepas transgênicas psbA1-ZsGreen1 e psbA2-ZsGreen1. A: 25 Indução com luz baixa (50 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). B: Indução com luz média (250 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). c) Indução com luz alta 26 (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). A unidade de fluorescência foi determinada pela leitura no comprimento de onda de excitação 27 de 493 nm e emissão de 505 nm, normalizada pelos valores de densidade ótica OD<sub>750</sub>. Diferenças estatisticamente 28 significativas em relação somente ao grupo controle (tempo 0h) (p<0,05) nos níveis de fluorescência em cada 29 tempo de coleta (h) para cada intensidade de indução, são indicadas por asteriscos (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* 30 p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001; teste ANOVA unifatorial seguido de Dunnett). Dados apresentados como média ± erro 31 padrão da média.

32

#### 33 4. Discussão

1 Como estratégia para otimizar a produção de proteínas recombinantes em S. elongatus 2 PCC 7942 como modelo de biofábrica, foi estudada a eficiência de dois promotores 3 relacionados às isoformas D1:1 e D1:2 dos genes psbA1 e psbA2, respectivamente. Esses 4 promotores foram escolhidos devido à necessidade de utilizar promotores nativos fortes 5 induzidos pela luz, que segundo Li et al. (2018), elimina a necessidade de usar agentes 6 indutores potencialmente tóxicos para a produção de proteínas recombinantes. Assim, foram 7 produzidas duas construções genéticas, psbA1-ZsGreen1 (promotor PpsbA1) e psbA2-8 ZsGreen1 (promotor PpsbA2), ambas conduzindo a expressão do gene repórter zsgreen1, que 9 codifica a proteína verde fluorescente ZsGreen1.

10 A capacidade de integrar eficientemente genes exógenos em seu genoma tem sido um 11 fator determinante no uso de espécies de cianobactérias em aplicações biotecnológicas. S. 12 elongatus PCC 7942 possui competência natural para a transformação, tornando-se, assim, uma espécie modelo ideal para estudos em biologia sintética (Vioque, 2007). Ao integrar as 13 14 construções produzidas neste trabalho no genoma de S. elongatus PCC 7942, verificou-se que a presença do gene exógeno não trouxe nenhum efeito negativo no crescimento das cepas 15 16 transformadas, confirmando, assim, a capacidade de expressar proteínas recombinantes. 17 Carbonell et al. (2019) relataram que a integração genômica de duas variantes do gene da 18 enzima formadora de etileno (efe) também não trouxe nenhum impacto negativo no 19 crescimento de S. elongatus PCC 7942 quando comparado com a cepa selvagem, reforçando o 20 uso desse modelo para a produção fotoautotrófica de biocompostos recombinantes.

21 O vetor comercial pSyn\_6 (Thermo Fisher Scientific), contendo o promotor 22 constitutivo do gene psbA1 de S. elongatus, foi utilizado neste estudo para gerar a cepa psbA1-ZsGreen1. Mesmo esse promotor sendo ativamente induzido sob luz baixa (125 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-</sup> 23 24 <sup>1</sup>) (Mulo, 2012), não encontramos aumento na transcrição de *zsgreen1* em resposta a intensidades de luz baixa ou média (50 e 250 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). Após 24 h no escuro, de maneira 25 26 geral, a luz baixa parece não ter efeito significativo na quantidade de transcritos (p>0.05), 27 independentemente do tempo de indução e da intensidade de luz. Da mesma forma, Li et al. 28 (2018) também não encontraram resultados significativos no nível transcricional do gene 29 repórter *lacZ*, que codifica uma  $\beta$ -galactosidase, após a indução do promotor Ppsba1 em luz intensa (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) para S. elongatus UTEX 2973. Embora esses autores não tenham 30 31 avaliado a relação entre intensidade de luz e tempo de indução como no presente estudo, 32 podemos verificar que o promotor PpsbA1 não parece responder da mesma forma que o gene

*psbA1* no aparato fotossintético natural de *S. elongatus*, conforme observado na literatura
 (Mulo et al., 2009; Mulo et al., 2012, Muramatsu e Hihara, 2012).

3 Outra hipótese testada neste estudo é que o uso do promotor PpsbA2, relacionado à 4 isoforma D1:2 do complexo do fotossistema II, otimizaria a produção de PR sob intensidades 5 de luz alta. O promotor utilizado na geração da cepa psbA2-zsGreen1 foi isolado de 6 Synechocystis sp., no qual o gene psbA2 é transcrito tanto em intensidades de luz baixa quanto 7 alta (Constant et al., 1997). Em geral, esse promotor pareceu ser mais eficaz na produção de 8 PR nas cianobactérias estudadas aqui, em comparação com o promotor PpsbA1. Avaliar a 9 intensidade de luz em relação ao tempo de exposição foi essencial para definir as melhores 10 condições de indução usando este promotor, uma vez que os resultados indicam que um tempo 11 de inducão mais longo nem sempre resulta em uma maior quantidade de transcritos do gene 12 *zsgreen1*. Sob intensidade de luz média e alta, o tempo de 6 horas mostrou-se mais eficaz para 13 obter o maior nível de expressão. Esse aumento pode estar relacionado à capacidade de 14 crescimento de S. elongatus PCC 7942 nessas faixas de luz mais intensas, conforme 15 demonstrado por Ungerer et al. (2018), ao analisar a tolerância à luz e as taxas máximas de 16 crescimento de duas espécies de cianobactérias, concluindo que S. elongatus PCC 7942 possui crescimento considerável na faixa de densidade de fótons entre 200 e 600 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Outro 17 18 fator importante que pode ter levado à ativação desse promotor está relacionado ao 19 recrutamento do gene psbA2 e, consequentemente, do promotor PsbA2 usado para expressar a 20 ZsGreen1, para uma aclimatação adequada após a mudança de um ambiente restrito à luz para 21 a exposição a uma luz mais intensa (Mulo et al., 2012). De acordo com Constant et al. (1997), 22 essa mudança brusca de exposição para a luz pode gerar um pico na transcrição de *psbA2*, e 23 quando esse estresse luminoso é mantido por um longo período, observa-se a estabilidade do 24 mRNA de *psba2*, reduzindo sua transcrição. Isso explica os valores mais altos de expressão de 25 zsgreen1 no tempo de 6 h, seguido por uma diminuição nos tempos posteriores.

26 Em relação aos resultados de fluorescência encontrados para as duas cepas estudadas, 27 verifica-se uma certa semelhança com os resultados de expressão gênica. Os níveis de 28 fluorescência da cepa com a construção psbA1-ZsGreen1 foram menores durante as 48 h de 29 monitoramento, ao contrário do psbA2-ZsGreen1, que mostrou diferença significativa mais 30 evidente às 48 h para as três intensidades de luz testadas, em comparação com o controle. 31 Segundo Mulo et al. (2012), após tratamentos de condições de estresse responsivas à luz, a 32 tradução da proteína não segue o mesmo comportamento de estabilização observado na 33 transcrição, e isso se torna visível quando observamos o aumento da fluorescência às 48 h na cepa psbA2-ZsGreen, em todas as três intensidades de luz, especialmente com luz intensa. A
 falta de diferença nos resultados com psbA1-ZsGreen1 em relação ao controle corresponde aos
 encontrados na expressão gênica. Li et al. (2018) também não observaram diferenças na
 atividade da β-galactosidase em *S. elongatus* UTEX 2973, usando o promotor PpsbA1, tanto
 em luz baixa (50 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) quanto em luz alta (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>).

6 Neste estudo, demonstramos a importância do momento e da intensidade da luz 7 utilizada para induzir a produção de PRs, utilizando dois promotores relacionados ao 8 fotossistema II, para a cianobactéria S. elongatus PCC 7942. Dados como os apresentados neste 9 estudo são importantes ao trabalhar com promotores de genes que variam sua força sob variadas 10 intensidades de luz, além de auxiliar no desenvolvimento de ferramentas para aprimorar a 11 produção de metabólitos naturais e não naturais nesses microrganismos. Goodchild-Michelman 12 et al. (2023), em sua revisão, discutiram a importância e as ferramentas de biologia sintética 13 usadas para tornar as cianobactérias biofábricas mais eficientes, destacando a necessidade de 14 mais estudos que busquem desbloquear o potencial completo desses microrganismos para sua 15 aplicação na indústria.

16

#### 17 5. Conclusão

No presente estudo, demonstramos as melhores condições para a produção de uma
proteína de interesse usando promotores relacionados ao fotossistema II na ciano*bactéria S. elongatus* PCC 7942. O promotor PpsbA2, quando induzido por 6 h em intensidade de luz mais
alta (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), pode resultar em quantidades maiores da proteína de interesse, quando
comparado com o promotor comercialmente utilizado PpsbA1. Essa combinação pode
melhorar o desempenho da cianobactéria *S. elongatus* PCC 7942 como biofábrica de proteínas
recombinantes.

25

#### 26 6. Referências

Banerjee, A., Ward, V. (2022) Production of recombinant and therapeutic proteins in
microalgae. Curr Opin Biotechnol 78:102784. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102784

29 Battistuzzi, M., Cocola, L., Claudi, R., Pozzer, A.C., Segalla, A., Simionato, D., Morosinotto,

30 T., Poletto, L. La Rocca, N. (2023) Oxygenic photosynthetic responses of cyanobacteria

- 1 exposed under an M-dwarf starlight simulator: Implications for exoplanet's habitability. Front.
- 2 Plant Sci. 14:1070359. https://10.3389/fpls.2023.1070359
- 3 Carbonell, V., Vuorio, E., Aro, E.M., et al. (2019) Enhanced stable production of ethylene in
- 4 photosynthetic cyanobacterium Synechococcus elongatus PCC 7942. World J Microbiol
- 5 Biotechnol 35:77. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2652-7
- 6 Castro, V., Oliveira, R., Dias, A.C.P. (2023) Microalgae and cyanobacteria as sources of
- 7 bioactive compounds for cosmetic applications: A systematic review. Algal Research
- 8 76:103287. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103287
- 9 Constant, S., Perewoska, I., Alfonso, M., et al. (1997) Expression of the psbA gene during
- 10 photoinhibition and recovery in Synechocystis PCC 6714: inhibition and damage of
- 11 transcriptional and translational machinery prevent the restoration of photosystem II activity.
- 12 Plant Mol Biol 34:1-13. https://doi.org/10.1023/A:1005754823218
- 13 Cui, J., Sun, H., Chen, R., Sun, J., Mo, G., Luan, G., Lu, X. (2023) Multiple routes toward
- engineering efficient cyanobacterial photosynthetic biomanufacturing technologies. Green
  Carbon 1(2):210-226. https://doi.org/10.1016/j.greenca.2023.11.004
- 16 Goodchild-Michelman, I.M., Church, G.M., Schubert, M.G., Tang, T. (2023) Light and carbon:
- Synthetic biology toward new cyanobacteria-based living biomaterials. Materials Today Bio
  19:100583. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100583
- 19 Grahl, S., Strack, M., Mensching, A., Morlein, D. (2020) Alternative protein sources in
- 20 Western diets: Food product development and consumer acceptance of spirulina-filled pasta.
- Food Quality and Preference 84:103933. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103933
- 22 Heinz. S., Liauw, P., Nickelsen, J., Nowaczyk, M. (2016) Analysis of photosystem II
- biogenesis in cyanobacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1857
  (3):274-287. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.11.007
- Li, S., Li, X., Ho, S. (2022) Microalgae as a solution of third world energy crisis for biofuels
- production from wastewater toward carbon neutrality: An updated review. Chemosphere
  27 291:132863. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132863
- 28 Li, S., Sun, T., Xu, C., Chen, L., Zhang, W. (2018) Development and optimization of genetic
- 29 toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. Metabolic
- 30 Engineering 48:163-174. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.06.00

- 1 Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time
- 2 quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. Methods 25:402-8.
- 3 https://doi:10.1006/meth.2001.1262
- Marangon, B.B., Magalhães, I.B., Pereira, A.S.A.P., et al. (2023) Emerging microalgae-based
  biofuels: Technology, life-cycle and scale-up. Chemosphere 326:138447.
  https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138447
- Mulo, P., Sakurai, I., Aro, E. (2012) Strategies for psbA gene expression in cyanobacteria,
  green algae and higher plants: From transcription to PSII repair. Biochimica et Biophysica Acta
  (BBA) Bioenergetics 1817:247-257. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.04.011
- Sicora, C., Aro, E.M. (2009) Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic
  photosynthesis. Cell Mol Life Sci. 66(23):3697-710. doi: https://10.1007/s00018-009-0103-6
- Muramatsu, M., Hihara, Y. (2012) Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from
  gene expression to physiological responses. J Plant Res 125:11-39.
  https://doi.org/10.1007/s10265-011-0454-6
- 15 Oviedo-Olvera, M.V., Feregrino-Pérez, A.A., Nieto-Ramírez, M.I., Tovar-Ramírez, M.M.,
- 16 Aguirre-Becerra, H., Garcia-Trejo J.F (2023) Prebiotic emergent sources for aquaculture:
- 17 Microalgae and insects. Aquaculture and Fisheries, 2468-550X.
  18 https://doi.org/10.1016/j.aaf.2023.06.007
- 19 Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J., Long, B.M. (2008) Advances in understanding the
- 20 cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters,
- 21 diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. Journal of Experimental
- 22 Botany 59 (7):1441-1461. https://doi.org/10.1093/jxb/erm112
- 23 Rehman, M., Kesharvani, S., Dwivedi, G., Suneja K.G. (2022) Impact of cultivation conditions
- on microalgae biomass productivity and lipid content. Materials Today: Proceedings, 56:282-
- 25 290. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.152
- 26 Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979) Generic
- 27 assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology
- 28 111:1-61. https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1
- 29 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd
- 30 ed. Cold Spring Harb Lab Press, New York.

- 1 Sengupta, S., Jaiswal, D., Sengupta, A., et al. (2020) Metabolic engineering of a fast-growing
- 2 cyanobacterium Synechococcus elongatus PCC 11801 for photoautotrophic production of
- 3 succinic acid. Biotechnology for Biofuels 13:89. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01727-7
- 4 Sproles, A.E., Fields, F.J., Smalley, T.N., Le, C.H., Badary, A., Mayfield, S.P. (2021) Recent
- 5 advancements in the genetic engineering of microalgae. Algal Research 53:102158. https://doi-
- 6 org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.algal.2020.102158
- 7 Tham, P.E., Lim, H.R., Chew, K.W., et al. (2023) Insights of microalgae-based aquaculture
  8 feed: A review on circular bioeconomy and perspectives. Algal Research 74:103186.
  9 https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103186
- 10 Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik.
- Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte. Limnologie
  9:1-38.
- 13 Ungerer, J., Lin, P., Chen, H., Pakrasi., H.B. (2018) Adjustments to Photosystem Stoichiometry
- and Electron Transfer Proteins Are Key to the Remarkably Fast Growth of the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. ASM Journals mBio 9(1).
  https://doi.org/10.1128/mbio.02327-17
- 17 Vioque, A. (2007) Transformation of Cyanobacteria. In: León, R., Galván, A., Fernández, E.
- 18 (eds) Transgenic Microalgae as Green Cell Factories. Advances in Experimental Medicine and
- 19 Biology, vol 616. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8\_2
- Winayu, B.N.R., Lin, Y., Hsueh, H., Chu, H. (2024) Importance of lighting color and period
  for CO2 fixation and C-phycocyanin production during *Thermosynechococcus* sp. CL-1
- 22 growth. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 55:103003.
- 23 https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.103003
- 24

# **6. CAPÍTULO 3**

2	
3	Utilização de campos magnéticos no inremento da produção de proteína recombinante
4	em Synechococcus elongatus PCC 7942
5	
6	
7	Artigo submetido para publicação na revista
8	<b>Bioprocess and Biosystems Engineering</b>
9	

1	
2	Utilização de campos magnéticos no incremento da produção de proteína recombinante
3	em Synechococcus elongatus PCC 7942
4	
5	Arthur C. S. Cardoso <sup>1</sup> , Raíza S. Azevedo <sup>1</sup> , Lucielen O. Santos <sup>2</sup> , Luis F. Marins <sup>1,*</sup>
6	
7	<sup>1</sup> LEGENE - Grupo de Pesquisa em Engenharia Genética e Biotecnologia, Laboratório de
8	Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande
9	(FURG), Rio Grande, RS, Brasil
10	
11	<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio
12	Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil
13	
14	*Autor correspondente: Luis Fernando Marins, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto
15	de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália Km 8, CEP 96203-
16	900, Rio Grande, RS, Brazil.
17	E-mail: luf@furg.br
18	

#### 1 Resumo

2 O presente estudo aborda a utilização de campos magnéticos (CMs) para a maximização da 3 produção de proteínas recombinantes (PRs) na cianobactéria Synechococcus elongatus PCC 4 7942. Para tanto, uma cepa de S. elongatus geneticamente modificada foi utilizada como 5 modelo experimental. Tal cepa foi transformada com uma construção genética constituída pelo 6 promotor PpsbA2 (associado à proteína D1:2 do fotossistema II) direcionando a expressão do gene que codifica a proteína verde fluorescente ZsGreen1. Culturas da cianobactéria 7 8 transformada foram submetidas a um CM de 30 (mT) e avaliadas quanto aos níveis de transcrição do gene zsgreenl e, também, quanto aos níveis de fluorescência da proteína 9 10 recombinante. Na comparação com as cianobactérias cultivadas na ausência do CM, observou-11 se aumento significativo nos níveis de transcrição em 45% e da fluorescência em até 28%, 12 indicando um efeito importante na capacidade da biofábrica produzir PR. A utilização de 13 cianobactérias associadas à aplicação de CM como uma abordagem não tóxica, econômica e 14 ambientalmente sustentável pode representar um avanço significativo na produção de PRs, cuja fonte principal de carbono é o CO<sub>2</sub> atmosférico. 15

16

17 Palavras-chave: campos magnéticos, promotor livre de indutor químico, manipulação
18 genética, aplicações biotecnológicas.

#### 1 1. Introdução

2 A introdução de microrganismos fotoautotróficos em aplicações industriais é uma 3 realidade em um momento em que as indústrias buscam cada vez mais tornar esses processos 4 mais sustentáveis ambientalmente (Brasil et al., 2017; Torres-Tiji et al., 2020). As 5 cianobactérias são atualmente a matéria-prima em muitos processos biotecnológicos visando a 6 produção de biomoléculas e compostos de interesse comercial, contribuindo de maneira 7 sustentável também para o consumo de CO<sub>2</sub> quanto para o aumento da biomassa (Li et al., 8 2022, Nascimento et al., 2023). A produção fotoautotrófica de proteínas recombinantes (PRs) 9 tem mostrado excelentes resultados (Azevedo et al., 2019; Dehghani et al., 2020; Barolo et al., 10 2020). No entanto, o aumento no rendimento de produção é um desejo na indústria como um 11 todo, visto que é essencial para que essas biofábricas celulares alcancem bons rendimentos em 12 menos tempo (Dabros et al., 2010).

13 Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias e metodologias 14 que busquem a otimização desses processos biotecnológicos, como as ferramentas 15 desenvolvidas pela engenharia genética e biologia sintética (Brasil et al., 2017; Sproles et al., 16 2021). Banerjee e Ward (2022) relataram que atualmente muitas dessas estratégias estão 17 focadas em abordagens genéticas, como o uso de vetores de expressão robustos e integração 18 no genoma da biofábrica, mas é necessário explorar novas condições de cultivo que contribuam 19 ainda mais para essas estratégias de engenharia genética. A aplicação de campos magnéticos 20 (CMs) se apresenta como uma ferramenta emergente com o potencial de influenciar 21 positivamente diversos processos biológicos (Sincak et al., 2023). Além de influenciar 22 organismos vivos, os CMs também podem ter algum efeito nas características físico-químicas 23 da água e do meio de cultura. Sua aplicação contribui para a manutenção homeostática em 24 sistemas de cultivo, ou no tratamento de águas residuais, reduzindo a turbidez e eliminando 25 impurezas (Wang et al., 2018; Poshtarenko, 2021).

Apesar dos mecanismos de ação dos CM sobre os microrganismos não serem bem compreendidos, essa ferramenta oferece várias vantagens, como a ausência de toxicidade, baixo custo de implementação e a não formação de poluentes secundários (Zhang et al., 2017). A literatura relata os efeitos positivos do uso de CM nos níveis transcricionais e, consequentemente, o desencadeamento de diferentes respostas metabólicas, aumentando a produção de compostos de interesse, como carboidratos, lipídios, proteínas, pigmentos etc., em diferentes espécies de microrganismos (Santos et al., 2022). Portanto, o objetivo deste trabalho é incrementar a produção de PRs na cianobactéria *Synechococcus elongatus* PCC 7942, com a
 aplicação de campos magnéticos.

3

# 4 2. Material e Métodos

5

# 6 2.1 Cepas e condições de cultivo

7 Durante o processo de manipulação genética, foram utilizadas células de Escherichia 8 coli One Shot TOP10 Electrocomp (Invitrogen) em meio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 9 1989) à 37 °C, com agitação de 220 rpm; e Synechococcus elongatus PCC 7942 (Thermo Fisher Scientific) em Meio BG-11 (Rippka et al., 1979) à 34 °C, sob luz fluorescente branca fria a 50 10 µmol m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. As culturas transgênicas de *E. coli* e *S. elongatus* PCC 7942 foram suplementadas 11 com 100 e 10 µg mL<sup>-1</sup> de espectinomicina, respectivamente. O crescimento das cianobactérias 12 13 foi monitorado pela medida de absorbância (750 nm) em espectrofotômetro (BioMate 3, 14 Thermo Fisher Scientific).

15

# 16 2.2 Vetores e transformação de *S. elongatus* PCC 7942

O vetor pSyn\_1 (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para montar a construção
genética psbA2-ZsGreen1. Neste vetor, um novo promotor, PpsbA2, foi inserido, isolado da
proteína D1:2 do fotossistema II da cianobactéria *Synechocystis* sp., juntamente com o
fragmento gênico que codifica a proteína verde fluorescente do coral *Zoanthus* sp. (ZsGreen1
ou zoanGFP), utilizando as enzimas de restrição *Eco*RI e *Kpn*I (Biolabs).

A construção psbA2-ZsGreen1 foi transformada em um inóculo selvagem de *S. elongatus* PCC 7942 seguindo o protocolo do Gene Art *Synechococcus* Engineering kit
 (Thermo Fisher Scientific) e plaqueado em ágar BG-11 a 1,5%, suplementado com 10 µg. mL<sup>-1</sup>
 <sup>1</sup> de espectinomicina.

26

### 27 2.3 Configuração experimental

Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, sobre indução com diferentes
 intensidades de luz para o promotor PpsbA2 demonstrou que, sob luz intensa (500 µmol m<sup>-2</sup>.

s<sup>-1</sup>), há aumento na produção da PR ZsGreen1 (dados não publicados). Como forma de induzir
 ainda mais a produção dessa PR com esse promotor, culturas da cepa psbA2-ZsGreen1 foram
 expostas a campos magnéticos de 30 mT (CM30) sob intensidade de luz intensa (500 μmol m<sup>-</sup>
 s<sup>-1</sup>), e a expressão do gene *zsgreen1* e os níveis de fluorescência dessa proteína foram
 analisados.

6 O experimento teve início quando as culturas atingiram densidade de OD<sub>750</sub> médio de 0,512 (±0,005) passando por uma fase preliminar de restrição de luz de 24 h para estabilização 7 8 do gene promotor pertencente à família psbA (Mulo et al. 2012). Após esta fase, o promotor foi induzido intensidade de luz intensa de 500 µmol m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> por 6 h, em dois tratamentos em 9 triplicata, com e sem exposição a CM30. Esta exposição foi realizada com o uso de ímãs de 10 11 ferrite com intensidade de 30 mT ( $150 \times 50 \times 10$  mm) na base dos reatores, uma vez que os 12 efeitos positivos dessa intensidade no fotossistema II já foram comprovados (Deamici et al. 13 2019). A intensidade de CM30 foi medida com medidor de CM (Global Mag, TLMP-HALL 14 05 K), e para o tratamento sem CM30, apenas o CM terrestre (0,005 mT) foi considerado.

15

#### 16 2.4 Expressão gênica e níveis de fluorescência

17 Amostras de 30 mL de cada réplica foram coletadas para análise da expressão gênica 18 após o período de indução de 6 h. O RNA total foi extraído seguindo o protocolo Trizol 19 (Invitrogen), tratado com DNase I (Invitrogen) e 1 µg foi utilizado para a síntese de cDNA 20 usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A expressão 21 foi medida por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o kit PowerUP SYBR 22 Green Master Mix (Applied Biosystems). A normalização da análise foi realizada com dois 23 genes endógenos: rpod, que codifica a subunidade Delta da RNA polimerase e rnpb, que codifica a subunidade R da ribonuclease P. Os dados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ 24 25 (Livak e Schmittgen, 2001) e os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. Para avaliar os 26 níveis de fluorescência, o monitoramento foi realizado antes da inducão (tempo 0h) e após a 27 indução em 24 e 48h, o tempo estimado para a maturação da proteína fluorescente. Placas 28 pretas foram utilizadas para as leituras, empregando um leitor de microplacas híbrido (Biotek 29 Synergy® H1) com comprimento de onda de excitação de 493 nm e emissão de 505 nm. Os 30 dados obtidos foram normalizados para os valores de densidade de OD<sub>750</sub> nm de cada réplica. 31 Os resultados de ambas as análises foram testados usando o teste t de Student não pareado, com

- 1 um valor de significância considerado em p<0,05 utilizando o software GraphPad Prism 9.0
- 2 (GraphPad Software).

Primers	Sequência (5'–3')	PCR amplicon (pb)
PNI - For	ctcggtctgatvttagcggggga	
RRNB - Rev	gcgctacggcgtttcacttctga	1215
s7942 - For	tgctgcgtaacatcgttggct	1400
s7942 - Rev	atgtgatcggaaccctgaccgt	
ZsGreen1 - For	gaccaaggagatgaccatgaagta	69
ZsGreen1 - Rev	ccggtgatcacgaacttgtg	
RPOD - For	gagcaagcaagtcagcgatttg	272
RPOD - Rev	tgagcccgcaaccacgatc	
RNPB - For	gtgaggagagtgccacagaa	
RNPB - Rev	taagccgggttctgttctct	224

**3 Tabela 1.** Iniciadores utilizados nas reações de PCR, qPCR e identificação de integração genômica.

4

# 5

# 6 3. Resultados e Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que o CM30 foi eficaz na otimização da
produção da proteína ZsGreen1 usando o promotor PpsbA2. Houve aumento significativo de
45% (p=0.0013) na quantidade de transcritos após 6 h de indução em comparação com o grupo
sem CM30 (Figura 1a). Esse aumento também é observado nos dados de fluorescência, a
exposição ao CM30 resultou em aumento significativo de 25% em 24 h (p=0.0250) e 28% em
48 h (p=0.0176) (Figura 1b).



Figura. 1 A: Expressão do gene *zsgreen1* na cepa psbA2-ZsGreen1 após 6 horas de indução com intensidade de
luz de 500 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>, normalizada pelos genes endógenos *rpod* e *rnpb*, que codificam a subunidade Delta da
RNA polimerase e a subunidade R da ribonuclease P, respectivamente; B: Cinética de maturação ao longo de 48
horas após indução com intensidade de luz de 500 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> da proteína verde fluorescente ZsGreen1. Foram
utilizadas duas condições de exposição em ambas as análises: Sem campo magnético e com campo magnético de
30 mT. O grupo psbA2-ZsGreen1 possui o promotor PpsbA2, relacionado à proteína D1:2 do fotossistema II de

Synechocystis sp. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por asteriscos e os resultados são
 apresentados como média ±erro padrão (p<0,05\*; p<0,01\*\*; teste t de Student).</li>

3

4 Nascimento et al. (2023) avaliaram o efeito do CM de 30 mT aplicado 24 h por dia, no 5 metabolismo de S. elongatus PCC 7942, e encontraram resultados satisfatórios em relação aos 6 níveis de proteína total e dos pigmentos C-ficocianina e aloficocianina, demonstrando que os 7 CMs podem ter efeitos positivos nessa cepa. No entanto, de maneira geral, a aplicação de CM 8 para otimizar processos biotecnológicos ainda é recente, e seu uso na produção de PRs em microalgas e cianobactérias é algo novo. Os mecanismos que buscam compreender os efeitos 9 10 do CM em microrganismos estão relacionados às propriedades magnéticas de átomos e 11 moléculas presentes nos sistemas biológicos, no entanto, são necessários mais estudos para 12 entender melhor como esses mecanismos funcionam (Font et al., 2023), especialmente quando 13 se trata de alterações no nível molecular.

14 Goodman e Shirley-Henderson (1991) afirmaram que qualquer mudança metabólica 15 e/ou genética observada em células expostas a um CM reflete-se em padrões de transcrição, e 16 essas mudanças podem ser melhor compreendidas com modelos experimentais que abordam o 17 uso de agentes indutores em genes afetados pela presenca de um CM. Deamici et al. (2019) 18 mostraram em seu estudo que a aplicação de um CM de 30 mT influencia positivamente as proteínas que fazem parte dos centros de reação do fotossistema II em cianobactérias. Nosso 19 20 estudo alcançou resultados satisfatórios na quantidade de transcritos e nos níveis de 21 fluorescência da proteína ZsGreen1 ao utilizar o promotor do gene psbA2 pertencente ao 22 complexo do fotossistema II. Esses resultados destacam os efeitos positivos do CM no aparato 23 fotossintético de cianobactérias, mostrando que, por meio do uso de promotores de genes desse 24 complexo, é possível aumentar a transcrição e tradução de genes recombinantes de interesse.

25 Outra hipótese para tentar explicar o efeito positivo do CM na expressão gênica pode 26 estar relacionada aos metais envolvidos nos processos celulares. A aplicação do CM influencia 27 o conteúdo mineral de cianobactérias, como observado por Li et al. (2007), ao relatar aumento 28 significativo nos elementos traço níquel (Ni), estrôncio (Sr), cobre (Cu), magnésio (Mg), ferro 29 (Fe), manganês (Mn), cálcio (Ca), cobalto (Co) e vanádio (V) em Spirulina platensis exposta a campo eletromagnético de 550 mT. Muitos desses elementos estão envolvidos em vários 30 31 processos celulares, como na atividade de enzimas associadas à expressão gênica. É possível que o aumento na disponibilidade desses elementos dentro das células, como os níveis de ferro 32 33 e cobre, possa influenciar os processos de transcrição e tradução de proteínas, pois eles atuam 34 como cofatores nesses processos (Blanchard e Cousins, 1997).

1

#### 2 4. Conclusão

Este estudo contribui para a pesquisa em busca de ferramentas que possam otimizar o
uso de cianobactérias em processos biotecnológicos. A utilização de um campo magnético de
30 mT (CM30) foi demonstrada como uma ferramenta de incremento na PRs em *S. elongatus*PCC 7942 é eficiente com o uso do promotor PpsbA2.

7

#### 8 5. Referências

9 Adessi, A., De Philippis, R. (2014) Photosynthesis and hydrogen production in purple non10 sulphur bacteria: fundamental and applied aspects. Adv Photosynth Respir 38:269–290.
11 https://doi.org/10.1007/978-94-017-8554-9

Azevedo, R., Lopes, J.L., Souza, M.M., Quirino, B.F., Cançado, L.J., Marins, L.F. (2019) *Synechococcus elongatus* as a model of photosynthetic bioreactor for expression of
recombinant β-glicosidases. Biotechnol Biofuels 12:174. https://doi.org/10.1186/s13068-0191505-9

Banerjee, A., Ward, V. (2022) Production of recombinant and therapeutic proteins in
microalgae. Curr Opin Biotechnol 78:102784. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102784

18 Barolo, L., Abbriano, R.M., Commault, A.S., George, J., Kahlke, T., Fabris, M., Padula, M.P.,

19 Lopez, A., Ralph, P.J., Pernice, M. (2020) Perspectives for Glyco-Engineering of Recombinant

20 Biopharmaceuticals from Microalgae. Cells 9:633. https://doi.org/10.3390/cells9030633

21 Blanchard, R.K., Cousings, R.J. (1997) In: Carlson-Newberry, S.J., Costello, R.B. (ed)

22 Emerging Technologies for Nutrition Research: Potential for Assessing Military Performance

23 Capability, 16. Washington (DC)

Brasil, B., Dos, S.A.F., De Siqueira, F.G., Salum, T.F.C., Zanette, C.M., Spier, M.R. (2017)
Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. Algal Res 25:76-89.
https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.035

27 Dabros, M., Schuler, M.M., Marison, I.W. (2010) Simple control of specific growth rate in

28 biotechnological fed-batch processes based on enhanced online measurements of biomass.

29 Bioprocess Biosyst Eng 33:1109-1118. https://doi.org/10.1007/s00449-010-0438-2

Deamici, K.M., Cuellar-Bermudez, S.P., Muylaert, K. et al. (2019) Quantum yield alterations
 due to the static magnetic fields action on *Arthrospira platensis* SAG 21.99: evaluation of
 photosystem activity. Bioresour Technol 292:121945. https://doi org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.biortech.2019a.121945

5 Dehghani, J., Adibkia, K., Movafeghi, A., Maleki-Kakelar, H., Saeedi, N., Omidi, Y. (2020)
6 Towards a new avenue for producing therapeutic proteins: Microalgae as a tempting green
7 biofactory. Biotechnology Advances 40:107499.

8 https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107499

9 Font, Y.S., Díaz, Y.O., Cuypers, A., et al. (2023) The effect of magnetic field treatment on the

10 cultivation of microalgae: An overview of involved mechanisms. J Appl Phycol 35:1525-1536.

11 https://doi-org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10811-023-02994-1

12 Goodman, R., Shirley-Henderson, A. (1991) Transcription and translation in cells exposed to

13 extremely low frequency electromagnetic fields. Journal of Electroanalytical Chemistry and

14 Interfacial Electrochemistry 320:335-355. https://doi.org/10.1016/0022-0728(91)85651-5

Li, S., Li, X., Ho, S. (2022) Microalgae as a solution of third world energy crisis for biofuels
production from wastewater toward carbon neutrality: An updated review. Chemosphere
291:132863. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132863

18 Li, Z., Guo, S., Li, L., Cai, M. (2007) Effects of electromagnetic field on the batch cultivation

and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. Bioresource
Technology 98:700-705. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.024

21 Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time 22 quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. Methods 25:402-8. 23 https://doi:10.1006/meth.2001.1262.

24 Mulo, P., Sakurai, I., Aro, E. (2012) Strategies for psbA gene expression in cyanobacteria,

25 green algae and higher plants: From transcription to PSII repair. Biochimica et Biophysica Acta

26 (BBA) - Bioenergetics 1817:247-257. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.04.011

Nascimento, R.R.C., Moreno, M.R., Azevedo, R.S., Costa, J.A.V., Marins, L.F., Santos, L.O.
(2023) Magnetic Fields as Inducers of Phycobiliprotein Production by *Synechococcus*

- *elongatus* PCC 7942. Current Microbiology 80:242. https://doi org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00284-023-03348-3
- 3 Panchal, T.M., Patel, A., Chauhan, D., Thomas, M., Patel, J.V. (2017) A methodological
- 4 review on bio-lubricants from vegetable oil based resources. Renew Sustain Energy Ver 70:65-
- 5 70. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.105
- Poshtarenko, A. (2021) Application of alternating magnetic field in wastewater treatment at
  yeast enterprises. Ukr J Ecol 11:156–160. https://doi:10.15421/2021\_23
- 8 Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979) Generic
  9 assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology
- 10 111:1-61. https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd
  ed. Cold Spring Harb Lab Press, New York.
- Santos, L.O., Silva, P.G.P., Machado, B.R., et al. (2022) Update on the application of magnetic
  fields to microalgal cultures. World J Microbiol Biotechnol 38:211. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11274-022-03398-y
- Sincak, M., Luptakova, A., Matusikova, I., Jandacka, P., Sedlakova-Kadukova, J. (2023)
  Application of a Magnetic Field to Enhance the Environmental Sustainability and Efficiency
  of Microbial and Plant Biotechnological Processes. Sustainability 15:14459.
  https://doi.org/10.3390/su151914459
- Singh, S., Rajam, M.V. (2009) Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future
  directions. Physiol Mol Biol Plants 15:3-22. https://doi.org/10.1007/s12298-009-0001-2
- 22 Sproles, A.E., Fields, F.J., Smalley, T.N., Le, C.H., Badary, A., Mayfield, S.P. (2021) Recent
- advancements in the genetic engineering of microalgae. Algal Research 53:102158. https://doi-
- 24 org.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.algal.2020.102158
- Torres-Tiji, Y., Fields, F.J., Mayfield, S.P. (2020) Microalgae as a future food source.
  Biotechnology Advances 41:107536. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536
- 27 Wang, Y., Wei, H., Li, Z. (2018) Effect of magnetic field on the physical properties of water.
- 28 Results Phys 8:262-267. https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.12.022

Zhang, X., Yarema, K., Xu, A. (2017) Biological effects of static magnetic fields. Springer,
 Singapore

3

# 4 7. DISCUSSÃO GERAL

5 Por muitos anos, os processos biotecnológicos que utilizam microrganismos vivos se 6 basearam principalmente em espécies de bactérias como E. coli, e de leveduras como S. 7 cerevisiae, e assim as pesquisas também. No entanto, nos últimos anos, bastante atenção tem 8 sido voltada aos microrganismos fotossintéticos, que através dos avanços de pesquisas 9 genéticas, mostraram as vantagens e o potencial de implementação desses microrganismos 10 como plataformas de biotecnologia industrial (Al-Haj et al., 2016). Estudos nas áreas da 11 engenharia genética e biologia sintética, possibilitaram o conhecimento de genomas completos 12 de microalgas e cianobactérias, identificando espécies, por exemplo, naturalmente competentes 13 para integrar e expressar de forma eficiente genes externos para a produção de biomoléculas 14 que poderiam vir a ter interesse no mercado global de proteínas (Sun et al., 2018, Mordor 15 Inteligência, 2021).

16 Esses estudos auxiliam no conhecimento da biologia de espécies modelos e não-17 modelos para aplicação biotecnológica mais eficiente (Mukherjee et al., 2020). Porém, em um 18 panorama geral, o uso de cianobactérias como biofábricas fotossintéticas ainda enfrenta alguns 19 desafios para atingir escala comercial, assim como os demais microrganismos já presentes em 20 processos industriais (Cui et al., 2023). Neste trabalho buscamos contribuir com informações 21 sobre diferentes ferramentas da engenharia genética e biotecnológica que podem ser 22 empregadas para ampliar a eficiência e o rendimento de produção de PRs na espécie S. 23 elongatus PCC 7942. Essa espécie tem sido considerada como um dos modelos 24 cianobacterianos mais promissores para a biofabricação fotossintética.

25 O primeiro trabalho desta tese (capítulo 1) é baseado na engenharia de promotores para 26 expressão de PRs em S. elongatus, sem a utilização de agentes indutores com potencial tóxicos 27 às células. Nesse capítulo, o objetivo foi comparar dois promotores, um induzido por indutor 28 químico (PnrsB) e outro livre de indutor (PpsbA2), e, saber como esses promotores 29 responderiam à aplicação do campo magnético de 30 mT como ferramenta de otimização na 30 expressão do gene repórter zsgreen1. Assim, foi mostrado que a utilização do promotor PpsbA2 31 pode ser mais eficiente quando comparado a um promotor induzível, PnrsB, em condições 32 normais de cultivo e que essa expressão pode ser otimizada na presença do CM30.

1 Os resultados do primeiro capítulo sugerem, então, que promotores livres de indutores 2 são potencialmente mais efetivos e, consequentemente, mais fáceis de trabalhar uma vez que 3 não exigem um agente indutor e custos adicionais para a sua ativação. Para Khani e Bagheri 4 (2020), para o desenvolvimento de biofábricas para a produção de PR em escala industrial é 5 necessário estudar opções de promotores alternativos, livres de indutores, ou substâncias 6 indutoras que não sejam potencialmente tóxicos. Dois pontos importantes são levantados nessa 7 questão: a toxicidade por aumento na escala de produção e o custo-benefício. Um dos químicos 8 mais utilizados na produção de PRs com promotores induzíveis é o isopropil-β-D-1-9 tiogalactopiranosídeo (IPTG), porém já foi relatada a toxicidade do seu uso causando estresse 10 fisiológico às células e consequentemente danos aos hospedeiros. Além disso, o seu uso 11 também se mostra inviável financeiramente para ser aplicado em maior escala de produção 12 (Dvorak et al., 2015).

Promotores nativos e livres de indutores se mostram como importantes ferramentas nesse sentido, uma vez que não oferecem riscos aos sistemas de produção e possuem potencial de aumento na escala industrial (Ramarajan et al., 2019). Segundo Berla et al. (2013), um dos principais objetivos dos estudos genéticos com cianobactérias é aproveitar a capacidade dessas bactérias de realizar fotossíntese, para gerar produtos de valor. Partindo desse princípio, a utilização de promotores de genes que fazem parte dos complexos fotossintéticos se torna uma opção interessante a ser explorada para a expressão heteróloga de PRs.

20 Como alternativa, demonstramos que o promotor PpsbA2, relacionado ao fotossistema 21 II de Synechocystis sp. PCC 6803, foi efetivo na produção da proteína fluorescente ZsGreen1. 22 Esse promotor faz parte de uma família de genes que respondem de diferentes formas variando 23 a intensidade de luz do sistema. Dessa forma, o segundo trabalho da tese (capítulo 2), buscou estabelecer as melhores condições de indução de expressão da produção da ZsGreen1, 24 25 avaliando a performance de dois promotores do fotossistema II de cianobactérias, PpsbA1 e 26 PpsbA2. O promotores são responsáveis por modular a transcrição gênica, respondendo a 27 estímulos internos ou externos (Wichmann et al., 2023) e, para utilizar promotores do 28 fotossistema na biofabricação fotoautotrófica de PRs, se torna essencial conhecer como as 29 diferentes intensidades de luz e o tempo de inducão podem influenciar nesse processo.

30 De acordo com os resultados do capítulo 2, mostrou-se que para *S. elongatus* há maior
 31 produção de transcritos do gene de interesse com o promotor PpsbA2 em 6 h de indução sob
 32 intensidade luminosa de 500 μmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Li et al. (2018) encorajaram a utilização de

promotores relacionados a proteínas do aparato fotossintético, ao obter resultados promissores
 na produção de β-galactosidase recombinante em *S. elongatus* PCC 2973, avaliando a força de
 diferentes promotores que controlam genes envolvidos com o fotossistema. Assim como nesta
 tese, estes autores destacam que esses promotores precisam ser mais explorados, destacando a
 eficiência desses promotores sobre aqueles que necessitam de algum agente químico.

6 Um dos objetivos da tese, também, foi avaliar a capacidade da aplicação de campos 7 magnéticos como ferramenta para aumentar a produção de PRs, o que foi verificado nos 8 capítulos 1 e 3. Enquanto no primeiro capítulo foi testado se a aplicação de um campo 9 magnético teria influência positiva sobre o promotor PpsbA2, no terceiro capítulo a aplicação 10 de campo magnético foi usada na otimização da produtividade da ZsGreen1, após definidas as 11 melhores condições de indução do promotor PpsbA2 (capítulo 2), foi utilizada novamente a 12 aplicação do CM30. Com isso foi possível observar que com os devidos ajustes nas condições 13 de indução, essa ferramenta contribuiu para o aumento da produção da ZsGreen1. Segundo 14 Velizarov (1999), para a inclusão do uso de campos magnéticos em processos de grande escala, 15 é necessário ter conhecimento sobre as demandas de projeto do sistema, a fim de evitar fatores 16 limitantes como razões econômicas e fatores externos. Os resultados encontrados nesta tese 17 podem contribuir na expansão da produção fotossintética utilizando CMs, uma vez que ficou 18 evidente que não é necessário um longo período para obter o maior rendimento da PR de 19 interesse. A figura 1 mostra a evolução no aumento da expressão gênica do gene *zsgreen1*, 20 após as diferentes etapas de otimização.



Figura 1. Aumento da transcrição e tradução da proteína recombinante ZsGreen1 com o promotor PpsbA2 ao
 longo dos três capítulos, aplicando indutores alternativos. Capítulo 1: PpsbA2 + campo magnético (30 mT);
 capítulo 2: PpsbA2 + indução com luz alta (500 μmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>); capítulo 3: PpsbA2 + campo magnético (30 mT)
 + indução com luz alta (500 μmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>).

5 O uso de CM ainda é recente como ferramenta nos processos biotecnológicos, porém, 6 tem se destacado à medida que apresenta bons resultados e vantagens do seu uso (Hunt et al., 2009; Santos et al., 2022; Font et al., 2023). Aqui propomos sua utilização como metodologia 7 8 alternativa, principalmente, por ser uma ferramenta de baixo custo e sem riscos aos sistemas 9 de cultivo de microrganismos procariontes e eucariontes (Sincak et al., 2023). Atualmente, 10 ainda são poucos os estudos com uso dessa ferramenta na produção de PRs, principalmente 11 avaliando o efeito sobre os processos de transcrição e tradução. Como já relatado aqui, muitas 12 metodologias são direcionadas principalmente às bactérias e leveduras. Até o momento ainda 13 não foram encontrados trabalhos utilizando essa ferramenta com o objetivo de aumentar o 14 rendimento de PRs em microalgas e cianobactérias, podendo esta tese representar os primeiros 15 relatos.

# 1 8. CONCLUSÕES GERAIS

- O promotor nativo PpsbA2 relacionado à proteína D1:2 do fotossistema II de
   *Synechocystis* sp. demonstrou bom desempenho sob condições naturais de cultivo, para
   a produção de proteínas recombinantes (PRs) em *S. elongatus* PCC 7942.
- A eficiência na produção de uma PR de interesse, usando promotores relacionados ao fotossistema II nas cianobactérias, depende das intensidades de luz e tempo de indução.
   Quando estimulado por um período de 6 horas sob uma intensidade de luz mais elevada (500 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>), o promotor PpsbA2 demonstra a capacidade de gerar quantidades superiores da proteína de interesse em comparação com o promotor comercialmente utilizado PpsbA1.
- O uso de campo magnético de 30 mT pode ser usado como ferramenta para otimizar o
   funcionamento do promotor PpsbA2 para a produção de PRs, em *S. elongatus* PCC
   7942.

## **1 9. ESTUDOS FUTUROS**

Os resultados desta tese contribuem para o avanço do conhecimento sobre ferramentas
e metodologias que podem ser usadas para otimizar a produção de proteínas recombinantes
(PRs) em microrganismos fotoautotróficos. Dessa forma, propõem-se como continuação deste
estudo:

- implementar as condições de indução do promotor PpsbA2 estabelecidas neste estudo,
  para a produção de outras PRs de interesse comercial e de interesse na aquicultura;
- explorar intensidades de luz mais intensas do que 500 μmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>, no intuito de obter
   maiores rendimentos na produção de PR com o promotor PpsbA2, e elucidar o limite
   de produção e fotoinibição das células;
- explorar outras opções de promotores de genes relacionados ao aparato fotossintético
   de microalgas e cianobactérias para a produção de PRs, e testar sua eficiência em
   relação ao campo magnético;
- testar mais intensidades de campo magnético para a produção de PR com o promotor
   PpsbA2.

## 1 10. REFERÊNCIAS GERAIS

- Al-Haj, L., Lui., Y.T., Abed, R.M.M., Gomaa, M.A., Purton, S. 2016. Cyanobacteria as Chassis
  for Industrial Biotechnology: Progress and Prospects. Life, 6:4, 42.
  https://doi.org/10.3390/life6040042
- 5 Berla, B.M., Saha, R., Immethun, C.M., Maranas, C.D., Moon, T.S., Pakrasi H.B. 2013.

6 Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. Front. Microbiol.

- 7 4:246. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00246
- 8 Cui, J., Sun, H., Chen, R., Sun, J., Mo, G., Luan, G., Lu, X. 2023. Multiple routes toward
- 9 engineering efficient cyanobacterial photosynthetic biomanufacturing technologies. Green
- 10 Carbon, 1 (2), 210-226. https://doi.org/10.1016/j.greenca.2023.11.004
- 11 Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P.I. et al. 2015. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in

12 Escherichia coli BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. Microb. Cell. Fact. 14,

- 13 201. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3
- 14 Font, Y.S., Diaz, Y.O., Cuypers, A., Alemán, E.I., Vandamme, D. 2023. The efect of magnetic
- 15 feld treatment on the cultivation of microalgae: An overview of involved mechanisms. Journal
- 16 of Applied Phycology, 35, 1525-1536. https://doi.org/10.1007/s10811-023-02994-1
- 17 Hunt, R.W., Zavalin, A., Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Das, K.C. 2009. Electromagnetic
- 18 Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology. Biofuel and Bioenergy Applications. Int.
- 19 J. Mol. Sci., 10, 4515-4558. https://doi.org/10.3390/ijms10104515
- Khani, M., Bagheri, M. 2020. Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of
  recombinant protein expression. Protein Expression and Purification, 170, 105593.
  https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.10559
- Li, S., Sun, T., Xu, C., Chen, L., Zhang, W. 2018. Development and optimization of genetic
  toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. Metabolic
- 25 Engineering, 48, 163-174. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.06.00
- 26 Mordor Intelligence. 2021. Recombinant Protein Market Industry Share, Size, Growth.
- 27 https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/recombinant-protein-market. Acessado
- 28 em 03 de Junho de 2023

- 1 Mukherjee, B., Madhu, S., Wangikar, P.P. 2020. The role of systems biology in developing
- 2 non-model cyanobacteria as hosts for chemical production. Curr. Opin. Biotechnol., 64, 62-69.
- 3 https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.10.003
- 4 Rashidieh, B., Ansari, A.M., Behdani, M., Darvishi, B., Habibi-Anbouhi. 2022. Extremely low
- 5 frequency magnetic field enhances expression of a specific recombinant protein in bacterial
- 6 host. Analytical Biochemistry, 652, 114745. https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114745
- Santos, L.O., Silva, P.G.P., Machado, B.R., et al. 2022. Update on the application of magnetic
  fields to microalgal cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 38, 211. https://doiorg.ez40.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11274-022-03398-y
- Sincak, M., Luptakova, A., Matusikova, I., et al. 2023. Application of a Magnetic Field to
  Enhance the Environmental Sustainability and Efficiency of Microbial and Plant
  Biotechnological Processes. Sustainability, 15 (19), 14459.
  https://doi.org/10.3390/su151914459
- Sun, T., Li, S., Song, X., Diao, J., Chen, L., Zhang, W. 2018. Toolboxes for cyanobacteria:
  recent advances and future direction. Biotechnol. Adv., 36, 1293-1307.
  https://10.1016/j.biotechadv.2018.04.007
- Velizarov, S. 1999. Electric and magnetic fields in microbial biotechnology: possibilities,
  limitations, and perspectives. Eletro and magnetobiology, 18 (2), 185-212.
  https://doi.org/10.3109/15368379909012912
- Wichmann, J., Behrendt, G., Boecker, S., and Klamt, S. 2023. Characterizing and utilizing
  oxygen-dependent promoters for efficient dynamic metabolic. engineering. Metab. Eng. 77,
  199-207. https://10.1016/j.ymben.2023.04.006