

THIAGO FERNANDES SOUSA

**ANÁLISE *IN SILICO* E FUNCIONAL DO CLUSTER GÊNICO BIOSINTÉTICO DE
ESCLEROTIORINA E DERIVADOS EM *Penicillium* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Gilvan Ferreira da Silva
Hector Henrique Ferreira Koolen

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S725a
2021
Sousa, Thiago Fernandes, 1996-
Análise *in silico* e funcional do cluster gênico biossintético de esclerotiorina e derivados em *Penicillium* sp. / Thiago Fernandes Sousa. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônico (43 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2021.

Referências bibliográficas: f. 37-43.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.353>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Penicillium* - Genética. 2. Metabólitos. 3. Atividade biológica. 4. Bioquímica genética. I. Queiroz, Marisa Vieira de, 1964-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.5654

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523


THIAGO FERNANDES SOUSA

**ANÁLISE *IN SILICO* E FUNCIONAL DO CLUSTER GÊNICO BIOSINTÉTICO DE
ESCLEROTIORINA E DERIVADOS EM *Penicillium* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

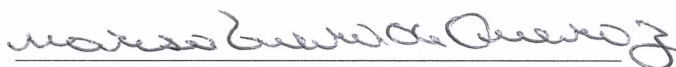
APROVADA: 04 de outubro de 2021.

Assentimento:



Thiago Fernandes Sousa

Autor



Marisa Vieira de Queiroz

Orientadora

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Ribamar dos Santos Sousa e Erlania Oliveira Fernandes, pelo apoio contínuo, conselhos e suporte emocional.

A minha orientadora de mestrado Marisa Vieira de Queiroz, pela paciência, apoio, ensino e formação.

Aos meus coorientadores Gilvan Ferreira da Silva e Hector Henrique Ferreira Koolen pelo ensino, formação e suporte.

A Nayara Cristine Alves da Silva pela ajuda, companheirismo e por ter tornado meus dias mais alegres.

Aos amigos que fiz durante minha passagem em Viçosa: Paloma Cavalcante, Clarice Patrocínio, Bianca Hosken, Mísia Vieira e Thiago Condé por terem tornado tudo mais leve e divertido.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Laboratório de biologia molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo suporte e pela estrutura necessária ao cumprimento dos objetivos desta dissertação.

As pessoas que indiretamente cruzaram a minha jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SOUSA, Thiago Fernandes, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Análise *in silico* e funcional do cluster gênico biossintético de esclerotiorina e derivados em *Penicillium* sp.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Gilvan Ferreira da Silva e Hector Henrique Ferreira Koolen.

Fungos do gênero *Penicillium* sect. *sclerotiora* possuem como principal característica a presença de pigmentação laranja no micélio, que foi associada ao metabólito secundário clorado da classe das azafilonas, denominado de esclerotiorina. Este metabólito possui diversas atividades biológicas, tais como antidiabete, antioxidante, anti-inflamatório, antialzheimer, antiviral e antimicrobiana. Moléculas da classe das azafilonas são produzidas via policetídeos sintases e posteriormente modificadas por enzimas chamadas de “enzimas pós-PKS”, que são codificadas por genes que estão presentes em *clusters* gênicos biossintéticos (BGCs). Com os avanços do sequenciamento de nova geração (NGS), hoje é possível investigar os genes envolvidos na biossíntese de produtos naturais por meio de mineração genômica, análise funcional em conjunto com dados de metabolômica. Contudo, no caso da esclerotiorina, embora sua estrutura tenha sido identificada há mais de 80 anos, até o presente momento a via de biossíntese está sendo descrita pela primeira vez neste trabalho em um isolado do gênero *Penicillium* MMSRG058. A mineração genômica de *Penicillium* sp. MMSRG058 permitiu a identificação do putativo cluster de esclerotiorina contendo duas PKS e 11 genes localizado no *scaffold* 28, para determinar se este BGC é o responsável pela via de síntese de esclerotiorina, foi realizado com sucesso o *knockout* das duas PKSs (genes core) e a análise comparativa do perfil metabolômica de mutantes e selvagem. Essas abordagens permitiram ainda a identificar outros metabólitos que são produzidos por esta mesma via, tais como: Isocromofilonas I e VI, esclerotioramina, ocrefilona A e clorogeumsanol. Os resultados aqui obtidos abrem portas para trabalhos visando à engenharia metabólica para superexpressão ou modificações estruturais para obtenção de novas moléculas.

Palavras-chave: Esclerotiorina. Azafilonas. Deleção de genes.

ABSTRACT

SOUSA, Thiago Fernandes, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **In silico and functional analysis of the biosynthetic gene cluster of sclerotiorin and derivatives in *Penicillium* sp. nov.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisers: Gilvan Ferreira da Silva and Hector Henrique Ferreira Koolen.

Fungi of the genus *Penicillium* section *Sclerotiora* have as main characteristic the presence of orange pigmentation in the mycelium, which was associated with the chlorinated secondary metabolite of the azaphilone class, sclerotiorin. This metabolite has several biological activities, such as anti-diabetes, antioxidant, anti-inflammatory, anti-alzheimer, antiviral and antimicrobial. Molecules of the azaphilone class are produced via polyketide synthases and later modified by enzymes called “post-PKS enzymes”, which are encoded by genes that are present in biosynthetic gene clusters (BGCs). With advances in next generation sequencing (NGS), it is now possible to investigate the genes involved in the biosynthesis of natural products through genomic mining, functional analysis in conjunction with metabolomics data. However, in the case of sclerotiorin, although its structure has been identified more than 80 years ago, until now the biosynthesis pathway is being described for the first time in this work in an isolate of the genus *Penicillium* MMSRG058. The genomic mining of *Penicillium* sp. MMSRG058 allowed the identification of the putative sclerotiorin cluster containing two PKS and 11 genes located in scaffold 28, to determine whether this BGC is responsible for the sclerotiorin biosynthesis pathway, was realized the knockout of the two PKSs (core genes) and comparative analysis of the metabolomic profile of mutants and wild type. These approaches also allowed us to identify other metabolites that are produced by this same pathway, such as: Isochromofilones I and VI, sclerotioramine, ocrefilone A and chlorgeumsanol. the results obtained in this work can serve as a basis for metabolic engineering to obtain bioactive molecules based on the structure of sclerotiorin and new sclerotiorin derivatives.

Keywords: Sclerotiorin. Azaphilones. Gene knock-out.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Reativação do isolado selvagem e condições de cultivo	15
2.2. Mineração genômica e identificação de cluster relacionado a biossíntese de esclerotiorina	15
2.3. Extração de DNA total	16
2.4. Construção dos cassetes para inativação gênica dos genes core PKS <i>sclA</i> e <i>sclI</i>	13
2.5. Obtenção de protoplastos e transformação de <i>Penicillium</i> sp. MMSRG-058	20
2.6. Análise das colônias transformadas para a detecção dos mutantes	21
2.7. Caracterização fenotípica e teste de estabilidade dos mutantes	22
2.8. Perfil químico via HPLC MS/MS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas)	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1. Mineração genômica e caracterização da via para produção de esclerotiorina em <i>Penicillium</i> MMSRG 058	24
3.2. Genômica funcional e metabolômica confirmam a biossíntese de esclerotiorina, esclerotioraminas e isocromofilonas	28
3.3. Biossíntese de esclerotiorina, esclerotioramina e isocromofilonas	33
4. CONCLUSÃO	36
5. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Penicillium* (filo Ascomycota) estão distribuídas mundialmente (Yadav et al. 2018). Em 2011, o gênero passou por uma reestruturação taxonômica baseada na avaliação dos caracteres morfológicos, em comparação com outros gêneros da família Trichocomaceae, e na análise filogenética multilocus, utilizando dados de sequências gênicas parciais: *rpb1* e *rpb2* (subunidades do *core* catalítico da RNA polimerase II), *tsr1* (proteína de biogênese do ribossomo) e *cct8* (componente do complexo chaperonin). O estudo resultou na realocação dos gêneros *Thysanophora*, *Eupenicillium*, *Chromocleista*, *Hemicarpenales* e *Torulomyces* para *Penicillium sensu stricto*, em adição, um novo sistema de classificação foi proposto com base nos 25 clados monofiléticos distintos formados, que são tratados agora como seções, incluindo a seção *sclerotiora* (Houbraken et al 2011; Visagie et al. 2014). Em 2021, segundo o Index fungorum, (<http://www.indexfungorum.org>), 1.342 espécies foram descritas para o gênero. No entanto, esse número diminuiu para 483 quando se trata de espécies válidas nas quais seguem corretamente o código de nomenclatura de plantas, algas e fungos, segundo a revisão realizada por Houbraken et al. (2020).

As principais características morfológicas das espécies que compõem a seção *sclerotiora* que é atualmente composto por 30 taxos, são a produção de pigmentos amarelo, laranja e vermelho e de conidióforos monoverticilados, com exceção das espécies que apresentam conidióforos biverticilados *P. malachiteum*, *P. nodosatum* e *P. herquei* (Houbraken et al 2011; Visagie et al. 2013; Wang et al. 2017; Choi et al. 2020).

Penicillium sclerotiorum apresenta coloração laranja no micélio que foi associada ao metabólito secundário clorado da classe das azafilonas, denominado de esclerotiorina por Curtin et al. (1940). Até o momento, para esta molécula são relatadas atividades antineoplásica (Giridharan et al. 2012; Chen et al. 2021), antidiabete (Chidananda et al. 2006), antioxidante (Dos Santos et al. 2019), anti-inflamatório (Xin, et al. 2019), antialzheimer (Wiglenda et al. 2020), antiviral (Arunpanichlert et al. 2010), antifúngica, frente aos patógenos de importância econômica para a agricultura como *Fusarium* spp. e *Magnaporthe grisea* (Bao et al. 2010) e antibacteriana, frente a *Bacillus* spp., *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Lucas et al. 2010). *Penicillium mallochii*, *P. daejeonium* e *P. hirayamae*, todos da seção *sclerotiora*, também possuem este

metabólito como majoritário e relacionado a pigmentação (Udagawa et al. 1963; Ishiuchi et al. 2019; Dos Santos et al. 2019; Zhang et al. 2019; Bouhri et al. 2020). Estes dados indicam que uma das principais características da seção (pigmentação) está relacionada à síntese dos metabólitos esclerotiorina e análogos.

Desde o isolamento de esclerotiorina, vários análogos dessa molécula vêm sendo relatados (Matzusaki et al, 1995; Lin et al, 2012; Wu et al. 2021). Na linhagem OUCMDZ-3839 de *P. sclerotiorum*, derivada de esponjas marinhas, foram identificados quatro novos derivados e sete análogos conhecidos, sendo a maioria bioativos contra o vírus H1N1. Alguns desses análogos possuem um átomo de nitrogênio incorporado no esqueleto principal da molécula como a sclerotioramina (Jia et al, 2019). Em estudo recente, foi demonstrado que fosfato (PO_4^{3-}) pode servir de catalisador para adição de nitrogênio e de amins primárias no esqueleto de esclerotiorina (Liu et al. 2020)

Estudos de semissíntese resultaram na obtenção de vinte e nove derivados da forma aminada da sclerotioramina que são potentes agentes anti-incrustantes que podem ser usados para prevenir o aparecimento de cracas em embarcações marinhas, revelando a complexa diversidade estrutural e aplicabilidade destes compostos (Wei et al. 2017). Além de todo valor agregado para esclerotiorina e derivados em termos de bioatividade e benefícios a saúde humana, esta molécula também apresenta baixa toxicidade e pode ser utilizada como retardador da deterioração de alimentos, propriedades que lhe conferiu uma patente no Japão (JP2000191527). Devido a sua coloração, a esclerotiorina vem sendo investigada como corante alternativo para alimentos (Gomes et al. 2016; Morales-Oyervides et al. 2020).

Moléculas da classe das azafilonas como a esclerotiorina e análogos são produzidas via policetídeos sintases (PKS). Estas são enzimas multiméricas que podem conter diversos domínios, sendo os domínios cetosintase (KS), aciltransferase (AT) e proteína carregadora de acil (ACP), indispensáveis para uma PKS funcional (Fig. 1A). As PKSs podem conter ainda domínios adicionais, relacionados a reações de redução, a exemplo de cetoreductase (KR), enoilreductase (ER) e dehidrogenase (DH) e para reações de metilação, como os domínios de metiltransferase (MT) (Fig. 1B). As cadeias policetílicas são construídas por malonil-CoA, metilmalonil-CoA ou acetil-CoA (*building blocks*), que funcionam como unidades extensoras. Após formadas, as cadeias policetílicas são liberadas da PKS por meio de hidrólise ou por tioesterificação pelo domínio tioesterase (TE), podendo ainda sofrer uma série de modificações

por meio de enzimas adicionais, também chamadas de “enzimas pós-PKS”, mais conhecidas em inglês pelos termos: "*decoration enzymes*" e "*tailoring enzymes*", cujo os genes estão presentes normalmente no mesmo *cluster* gênico biossintético (BGC) (Simpson & Cox, 2007; Keatinge-clay et al. 2012).

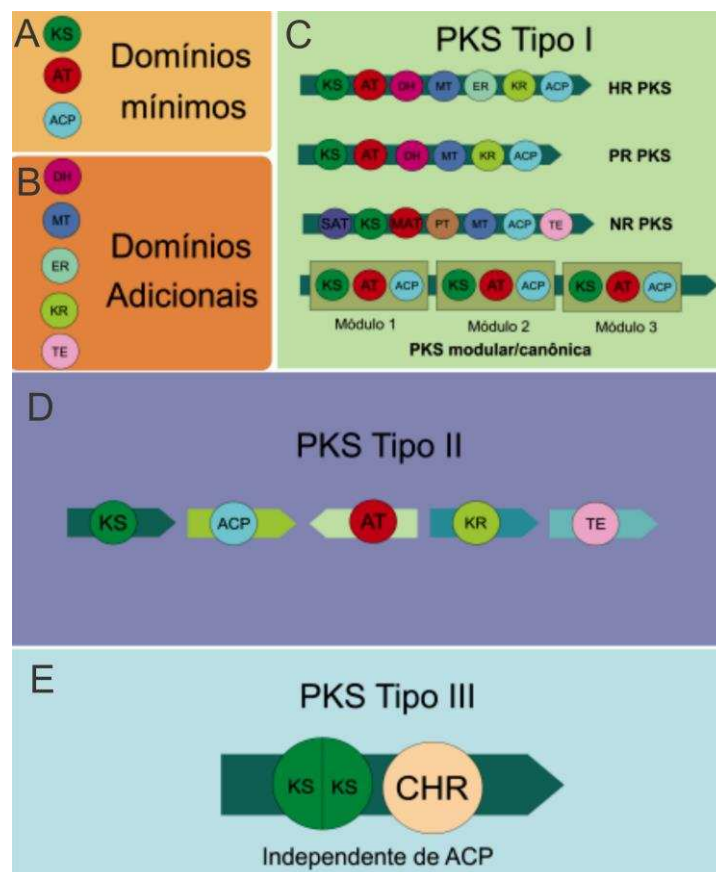
As PKSs são classificadas em três tipos (I, II, III). As PKSs do tipo I contém múltiplos domínios funcionais que são codificadas por um único gene, podem ser iterativas (utilização repetida do mesmo arsenal de domínios durante a biossíntese) monomodular, bimodular, trimodular, híbridos de T1PKS/NRPS (sintase de peptídeos não-ribossomais), ou podem ser multimodulares também conhecidas como canônicas (cada etapa da biossíntese é processada por diferentes módulos, seguindo a regra de colinearidade) o que permite com base nos domínios determinar a molécula a ser produzida (Fig. 1C). As PKSs do tipo II possuem domínios em proteínas dissociadas que interagem para exercer a função (tipicamente encontradas em bactérias) (Fig.1D), enquanto que as PKSs do tipo III, chamadas também de chalconas sintases, são formadas por dímeros do domínio KS e não dependem de ACP (tipicamente encontradas em plantas e fungos) (Fig. E). As PKSs iterativas do tipo I são o tipo mais comum entre os fungos filamentosos (Herbst et al. 2018, Wang et al. 2020).

As PKSs iterativas do tipo I podem ser não redutoras (NR-PKS), parcialmente redutoras (PR-PKS) ou altamente redutoras (HR-PKS). As NR-PKSs não possuem os domínios de redução KR, ER e DH, possuem em sua região N-terminal o domínio transacilase (SAT), que é um iniciador de extensão da cadeia policetídica, que são responsáveis por capturar cetídeos gerados por HR-PKSs, produtos de sintases de ácidos graxos (FAS) ou *building blocks*, um domínio AT específico para malonil-Coa (MAT) que é um domínio para fusão de anéis aromáticos (PT) e um domínio TE na região C-terminal. As PR-PKSs são caracterizadas pela falta de ER, enquanto que as HR-PKSs são caracterizadas pela presença de mais de um domínio de redução (Herbst et al. 2018)

Os domínios básicos de PKSs (KS, AT e ACP) podem ainda ter ação conjunta com os domínios de NRPSs em um mesmo conjunto catalítico (enzimas NRPS-PKSs) formando moléculas híbridas como para produção de fusarina, equisetina, fusaridiona, asperidona, citocalasanos, lovastatina, compactina e monacolina (Fisch 2013; Bayly et al. 2017). Tipos diferentes de PKSs também podem interagir para formar moléculas de maior complexidade como as *dual-PKSs* (NR PKS - HR PKS), a exemplo dos BGCs para produção de

chaetoviridinas, asperfuranonas e trichoderpirona (Chiang et al. 2009; Winter et al. 2012; Chen et al. 2017).

Figura 1. A) Domínios mínimos para uma Policetídeo sintase (PKS) funcional KS (cetosintase), AT (acetiltransferase), ACP (proteína carreadora de acil); B) Domínios adicionais que uma PKS pode conter: DH (desidrogenase), MT (metiltransferase), ER (Enoil redutase), KR (cetoreductase), TE (tioesterase); C) Múltiplos domínios codificados por um único gene característico de PKS's do tipo I, organização de domínios de NR-PKS (PKS não redutora), HR-PKS (PKS altamente redutora), PR-PKS (PKS parcialmente redutoras) e organização de domínios de uma PKS do tipo I multimodular ou canônica; D) Domínios de PKS do tipo II são codificados em genes separados; E) Organização de domínios encontrados em PKS do tipo III contendo homodímeros do domínio KS.



Modificações adicionais nos produtos das PKSs são frequentemente catalisadas por oxidorreduções, halogenases, aciltransferases e aminotransferases, também chamadas de enzimas pós-PKS (Rix et al. 2002). As oxidorreduções são o tipo mais comum encontradas nos BGCs de fungos e compreendem as oxigenases, peroxidases, hidroxilases, redutases e desidrogenases. Essas enzimas introduzem grupos funcionais contendo oxigênio (ex: aldeídos, cetonas e álcoois) ou modificam essas funções orgânicas por remoção ou adição de átomos de hidrogênio. As enzimas pós-PKS do grupo das P450 monooxigenases vêm ganhando destaque pelo seu amplo espectro de funcionalidades, além das reações comuns de hidroxilação e epoxidação, podem atuar na periciclicização, contração do anel e acoplamento aromático estereosseletivo, aumentando assim a diversidade estrutural dos produtos das policetídeo sintases (Zhang et al. 2021).

A incorporação não comum de átomos de halogênio (I, Cl, Br e F) é usada como estratégia por microrganismos para aumentar a bioatividade de metabólitos secundários, sendo realizada por meio de enzimas denominadas halogenases, como observado com frequência em fungos marinhos (Butler et al. 2009; Wang et al. 2021). *Chaetomium chiversii* produz Radicol, uma molécula clorada com potencial anticâncer por inibição da maquinaria da chaperona Hsp90. O *cluster* gênico biossintético para produção de radicol foi elucidado, na qual *dual-PKS* produzem o esqueleto principal e uma triptofano halogenase (radH) adiciona um átomo de cloro no carbono 7 da porção aromática. Para produção de Chaetoviridina em *Chaetomium globosum*, uma triptofano halogenase (CazI) também é responsável pela incorporação de Cl em no C-5 da molécula da porção aromática (Winter et al. 2012). Em adição, foi relatado recentemente uma halogenase em *Aspergillus oryzae* bifuncional, capaz de realizar tanto metilação quanto diclorinação no C-9 (porção não aromática) (Chankhamjon et al. 2016). Halogenação em porções aromáticas é catalisada principalmente por halogenases dependentes de FADH₂ (Van Pée et al. 2006). A diversidade de halogenases com diferentes afinidades por porções de metabólitos secundários é interessante para o engenheiramento de moléculas no sentido do aumento de sua bioatividade.

Antes dos avanços gerados pela tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS), relacionar os metabólitos produzidos por fungos a seus respectivos genes envolvidos era uma tarefa árdua, laboriosa e muitas vezes impossível. Uma das estratégias utilizadas antes do NGS, era a construção de bibliotecas gênicas fúngicas expressas em *E. coli* e um dos primeiros genes

que codificam policetídeos foi identificado por meio desta metodologia. Beck et al. (1990) conseguiram rastrear por meio de expressão em *E. coli* a proteína envolvida na biossíntese do policetídeo ácido 6-metilsalicílico em *Penicillium patulum* e relacionar a seu respectivo gene, possibilitando a busca por outras policetídeo sintases em outros genomas de fungos (Schumann et al. 2006).

Continuamente, o sequenciamento de genomas completos vem sendo democratizado, por meio de custos menores por pares de bases, rapidez e alta resolução. Plataformas como Illumina, Pacbio e Nanopore dispõem desses serviços e atualmente dominam este crescente mercado (Van Dijk et al. 2014; Deamer et al. 2016; Mahmoud et al. 2019). Como resultado, o número de genomas de fungos disponíveis nos bancos de dados biológicos, a exemplo do Genbank, vem aumentando cada vez mais e em 2021 já são 7.957 genomas fúngicos sequenciados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/eukaryotes/fungi>).

Acompanhando o avanço da tecnologia, a caracterização de *clusters* gênicos biossintéticos foi facilitada, principalmente com o avanço da bioinformática, levando a busca por metabólitos secundários de valor a uma nova era (Shen et al. 2015). A criação de bancos de dados acurado como o *Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster* (MiBIG), um atlas que fornece anotações e metadados sobre esses BGCs e seus produtos correspondentes (mibig.secondarymetabolites.org), e de ferramentas para identificação gênica e análise de BGCs de fácil uso como o Antismash que dispõe de versões para plantas, bactérias e fungos (<https://fungismash.secondarymetabolites.org/>), PRISM 4.0 (<http://prism.adapsyn.com/>) e BAGEL (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) são um marco dessa nova era (Kenshole et al. 2021). Estas plataformas de análises de BGCs permitem muitas vezes guiar a descoberta de metabólitos secundários novos e os já conhecidos, além de permitir os primeiros *insights* para a engenharia metabólica (Ziemert et al. 2016).

Duas abordagens são comumente utilizadas para predição de produtos naturais com base em mineração de genomas. A primeira, é chamada de abordagem direta ou *forward*, ou seja, partindo dos genes para os metabólitos, utiliza diretamente o conjunto de genes (BGCs) para identificar os produtos naturais correspondentes. Esta abordagem só é possível quando o mesmo BGC ou parte dele já foi identificado e depositado em bases de dados com MiBIG. A segunda abordagem é conhecida como reversa, neste caso, parte-se dos metabólitos para os *clusters* gênicos. O que pressupõe nesta abordagem que o metaboloma dos organismos e a identificação

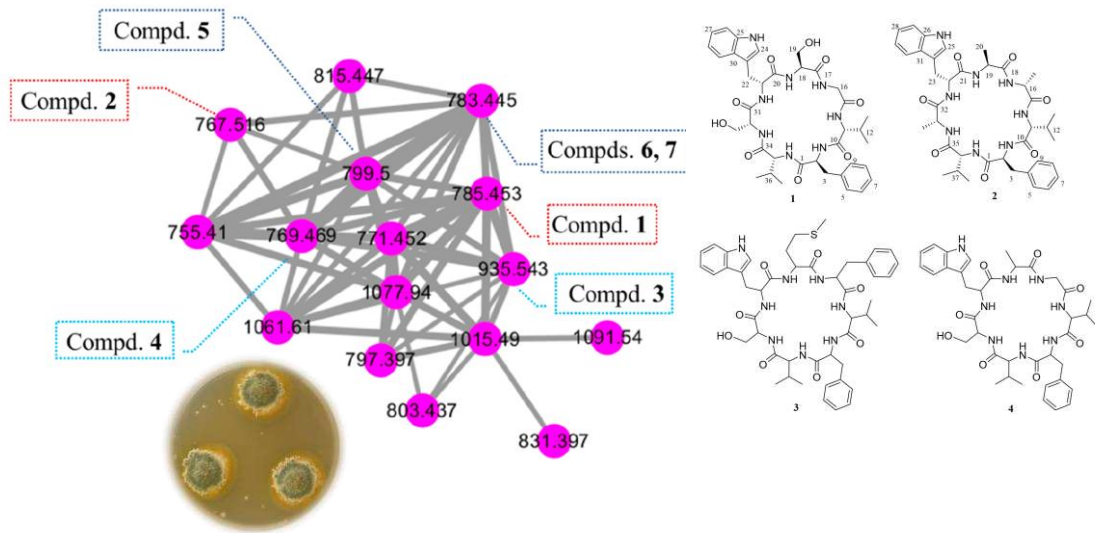
química das moléculas já esteja disponível, assim é possível identificar os *clusters* correspondentes as moléculas baseando-se nas características estruturais da molécula e prováveis proteínas envolvidas na sua biossíntese (Khater et al. 2016).

Desde a disponibilização da web-plataforma Antismash por Medema et al. (2011) inúmeros BGCs e seus produtos vêm sendo relatados em fungos. No gênero *Penicillium*, uma análise global de *clusters* gênicos biossintéticos em 24 genomas resultou em 1317 BGCs, onde 61% (798) correspondiam a PKS, NRPS ou híbridos de PKS-NRPS e somente 16% (127) desses puderam ser conectados a vias biossintéticas previamente caracterizadas, demonstrando o enorme potencial do gênero para produção de novos compostos e de vias a serem exploradas. Neste mesmo estudo, foi possível investigar a evolução da policetídeo sintase que produz o ácido 6-metilsalicílico (um dos primeiros policetídeos a ser conectado ao gene por abordagem alternativa antes da revolução do NGS). Análise de sintenia com *clusters* caracterizados presentes no MIBIG revelou que esta policetídeo sintase estava presente em *clusters* para produção de patulina e yanuthone D. O estudo evidenciou ainda incorporação e perda de genes adicionais que codificam *tailoring enzymes* nesses *clusters* mantendo o gene core, como no distinto genoma de *Penicillium antarticum*. Isto evidencia o mecanismo pelo qual *Penicillium* diversifica as estruturas dos seus metabólitos secundários a partir de um esqueleto em comum (Nielsen et al. 2017). Estes dados confirmam o avanço na nova era da descoberta de novos produtos naturais guiados por genoma.

Durante uma prospecção de fungos biologicamente ativos, uma espécie do gênero *Penicillium* isolado da planta amazônica *Duguetia Stelechantha* foi selecionada devido a habilidade em produzir compostos com propriedades antifúngicas e antibacterianas. Análises com o extrato total via cromatografia de alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS, do inglês *high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), bem como análises de *networking* molecular revelaram que este fungo é um hábil produtor de moléculas da classe das azafilonas, nas quais três foram caracterizadas via RMN (Ressonância magnética nuclear): esclerotioramina (composto majoritário no extrato), esclerotiorina e isocromofilona VI. Análises de *molecular networking* tem se mostrado promissora para descoberta de novos produtos naturais a exemplo da descoberta de quatro novos cicloheptapeptídeos com propriedades antituberculose em *Aspergillus versicolor* (Chao et al. 2020) (Fig.2).

Apesar de vários estudos terem como foco a obtenção de novos análogos e relatarem o seu excelente potencial para vários ramos da indústria, até o presente momento não há qualquer via de biossíntese para produção de esclerotiorina e seus derivados descrita. Depois de 80 anos desde a sua elucidação, o presente trabalho descreve pela primeira vez a via biossintética pela qual esclerotiorina é produzida utilizando as abordagens de mineração de genoma, genômica funcional e metabolômica.

Figura 2. Análise de *molecular networking* evidenciando a descoberta de quatro novos cicloheptapeptídeos em *Aspergillus versicolor*. A análise permite relacionar compostos com perfil de fragmentação próximos facilitando a busca por análogos.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reativação do isolado selvagem e condições de cultivo

Plugs de micélio da linhagem de *Penicillium* sp. MMSRG-058 que se encontravam preservados em BD + glicerol (1:1) a -80°C e foram colocados em meio BDA (Batata 20 g/L; dextrose 20 g/L; Agar 15 g/L) a uma temperatura de 25°C até a observação do crescimento micelial no meio de cultura. Conídios foram inoculados sucessivamente para um novo meio de cultura (BDA) para seleção de colônias estáveis. Conídios de colônias estáveis (sem a presença de setores) foram inoculados em meio líquido BD (Batata 20 g/L; Dextrose 20 g/L) estático e foi realizado o cultivo por oito dias a 25°C, afim de verificar a presença de pigmentação laranja-avermelhada que está relacionada a produção de esclerotiorina e derivados. Uma colônia positiva para a produção do pigmento foi utilizada nos experimentos posteriores.

2.2. Mineração genômica e identificação de cluster relacionado a biossíntese de esclerotiorina

O genoma completo do isolado MMSRG-058 (37.899.924 pb) foi sequenciado utilizando a plataforma illumina paired-end de 150 pb. A cobertura obtida foi de 294X e a montagem apresentou 907 *scaffolds* com N50 de 113935. O maior *scaffold* apresentou um tamanho de 3,47 Mpb. A mineração para a identificação do *cluster* relacionado a esclerotiorina foi realizado por meio de anotação gênica utilizando a plataforma Augustus (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) e predição de *clusters* gênicos biossintéticos por meio da plataforma FungiSmash (<https://fungismash.secondarymetabolites.org/>). Análises de domínios foram realizadas utilizando a plataforma Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Além da predição de função dadas por essas ferramentas, também foi realizada uma busca baseada na similaridade das proteínas preditas no *cluster* em comparação com outros agrupamento de genes similares já elucidados com o auxílio da plataforma MIBIG (<https://mibig.secondarymetabolites.org/>). As bordas do *cluster* foram definidas por genes relacionados ao metabolismo primário e/ou que não estão relacionados a biossíntese. Análises filogenéticas foram conduzidas utilizando um *dataset* de 138 sequências do domínio KS extraídas de PKS caracterizadas no MIBIG utilizando o método de Neighbor Joining com 1000 replicatas no programa MEGA7 (Kumar et al. 2016).

2.3. Extração de DNA total

Penicillium sp. MMSRG-058 foi inoculado em meio BD e incubado durante 3 dias a 25°C. O micélio foi filtrado e macerado utilizando nitrogênio líquido e a extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de extração por detergente catiônico CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1991). A concentração do DNA foi mensurada por espectrometria (NanoDrop1000) e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,8%). O DNA concentrado foi ajustado para a concentração de 50 ng/μL para realização das PCRs.

2.4. Construção dos cassetes para inativação gênica dos genes core PKS *sclA* e *sclI*

Os cassetes de deleção para os genes core PKS da via (*sclA* e *sclI*) foram construídos utilizando a técnica *Split-Marker* de acordo com o protocolo de Catlett et al. (2003). Para isso, uma primeira rodada de PCR foi realizada para a amplificação de quatro fragmentos por meio da combinação dos primers FP1 e RP1 (fragmento I - ~1000pb; região de homologia – HR 5’); FP2 e RP2 (fragmento II - ~1000 pb; região de homologia - HR 3’); M13R e NLC37 (fragmento III – 2100 pb; promotor *gpdA* + sequência parcial do gene *hph* que confere resistência a higromicina); NLC38 e M13F (fragmento IV – 3100 pb; sequência parcial do gene *hph* + terminador do gene *trpC*). Logo após, uma segunda rodada de PCR foi realizada para fundir os fragmentos I-III e os fragmentos II-IV por meio da combinação de primers FP1 e NLC37, NLC38 e RP2 para obtenção dos fragmentos V e VI, respectivamente (Tabela 1; Fig. 3). O cassete contendo o gene marcador *hph* inteiro foi obtido por meio da recombinação *in vivo* (Tabela 1) (Fig.3). Para a amplificação das sequências parciais do gene *hph*, o plasmídeo pAN7.1 (Punt et al. 1987) foi usado como molde (Fig. 4).

As condições de PCR para a primeira rodada de amplificação foram realizadas em um volume de reação de 50 μL que continha 100 ng de DNA genômico, 1 pmol de cada iniciador e 50 uL de PCR master mix (2X). As reações se deram em uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e alongamento a 72 °C por 3 minutos. O alongamento final foi realizado a 72 °C por 10 min. A segunda rodada foi realizada utilizando como molde os fragmentos I e III (ou II e IV), 1 pmol de cada iniciador e 50 μL de PCR master mix (2X). As condições de PCR foram

as mesmas para a rodada 1 com o aumento do tempo de alongamento para 4:15 minutos. Para confirmar se as sequências alvo foram amplificadas, os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1,5% (Sigma) corados com brometo de etídio e depois fotografados sob luz UV em um sistema de imagem molecular (Loccus Biotecnologic L-Pix. Chemi), por fim comparado com o marcador 1 kb (Invitrogen).

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados para realização da técnica de Split-Marker e detecção de mutantes para os genes *sclA* e *sclI*.

Iniciador	Sequência
FP1 - <i>sclA</i>	5'- AGATGTAGCTCCAGGGCTG -3'
RP1- <i>sclA</i>	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTGTCCTCATCGCGCATAATGC
FP2- <i>sclA</i>	5'- GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTCACTGTTCTGAACCGCGTT - 3'
RP2- <i>sclA</i>	5'- AGCTGGAAGATCGTAACCTTTCA - 3'
FP1 - <i>sclI</i>	5'- GTCCAGATCCGCGATATGCA - 3'
RP1- <i>sclI</i>	5' - CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCGATTGTGTGAGCTGGCAAC - 3'
FP2- <i>sclI</i>	5'- GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGGCAGGGTCATCTAAGAGTGGC - 3'
RP2- <i>sclI</i>	5'- AGTTATGTAGAGTTGCAAGGTTGT - 3'
M13R	5'- AGCGGATAACAATTTACACAGGA - 3'
NCL37	5'- GGATGCCTCCGCTCGAAGTA - 3'
M13F	5'- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC - 3'
NLC38	5'- CGTTGCAAGACCTGCCTGAA - 3'
<i>ΔsclA</i> detec F	5'- GAAGGACCAAGCTGAAGTCG - 3'
<i>ΔsclA</i> detec R	5'- ATCTCCTTGACAGGGCCTCC - 3'
<i>ΔsclI</i> detec F	5'- CACCAAGACACCGAACACAC - 3'
<i>ΔsclI</i> detec R	5'- CAGTCCCACGAATAGCGAAA - 3'

Figura 3: Estratégia *Split-Marker* para inativação gênica. Na primeira rodada de PCR (quatro amplificações): Iniciadores FP1 e RP1 amplificaram o fragmento I (Região de homologia - HR 5'); Iniciadores FP2 e RP2 amplificaram o fragmento II (RegiHR 3'); iniciadores M13R e NLC37 amplificaram o fragmento III (sequência parcial 5' do gene *hph*); iniciadores NLC38 e M13F amplificaram o fragmento IV (sequência parcial 3' do gene *hph*). Na segunda rodada de PCR (duas amplificações): os fragmentos I e III foram usados como molde e fusionados via combinação dos iniciadores FP1 e NL37 gerando o fragmento V; os fragmentos IV e II foram usados como molde e fusionados via combinação dos iniciadores NLC38 e RP2 gerando o fragmento VI. A união dos fragmentos V e VI foi realizada por meio de recombinação *in vivo*, ocorrendo a integração homóloga.

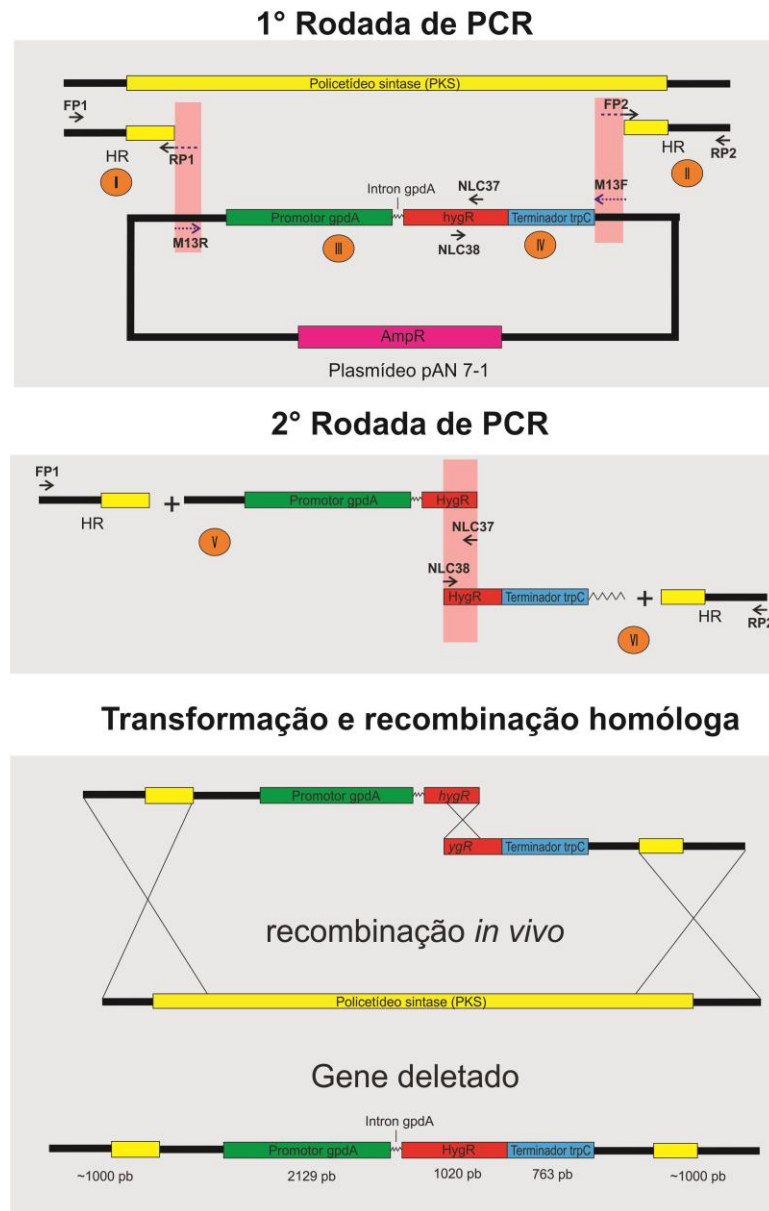
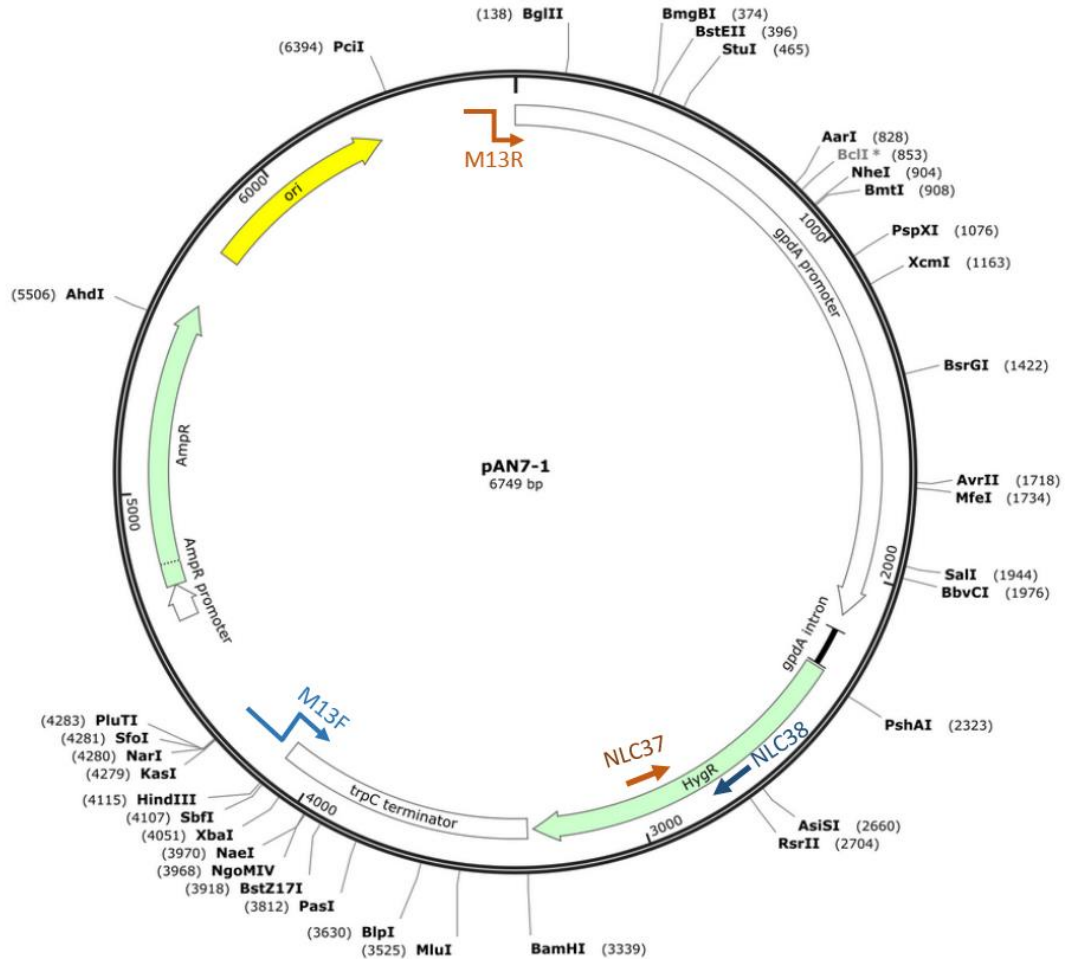


Figura 4: Mapa do plasmídeo pAN 7.1 (Punt et al. 1987) construído para transformação em espécies de *Aspergillus*. O plasmídeo contém o promotor do gene *gpdA* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), o gene de resistência a higromicina *hph* de *Escherichia coli* e um terminador do gene *trpC* (triptofano sintase) de *Aspergillus nidulans* utilizados como molde para construção dos cassetes de deleção dos genes *sclA* e *sclI*. As setas em tom avermelhado representam os primers utilizados para amplificação do fragmento III e as setas em tom azulado representam os primers utilizados para amplificação do fragmento IV. (Adaptado =

https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pAN7-1)



2.5. Obtenção de protoplastos e transformação de *Penicillium sp.* MMSRG-058

A linhagem selvagem foi colocada para crescer em meio BDA até a produção massiva de conídios. Uma solução de conídios foi preparada em uma concentração de 10^8 conídios/mL e filtrada em seringa com gaze. Alíquotas de 1 mL dessa solução foram inoculados em meio BD e incubadas em shaker a 25°C por 12 horas a 150 rpm de agitação. Os tubos germinativos foram coletados (800 mg) e transferidos para erlenmeyer de 25 mL com 5 mL de KCl (1M) em tampão fosfato 10 mM contendo 30 mg/mL de Lysing Enzyme (SIGMA- ALDRICH) e 50 mg/mL de Driselase (SIGMA- ALDRICH). A mistura foi incubada a 30°C a 100 rpm por três horas para obtenção dos protoplastos. Os protoplastos foram filtrados e centrifugados a 5000

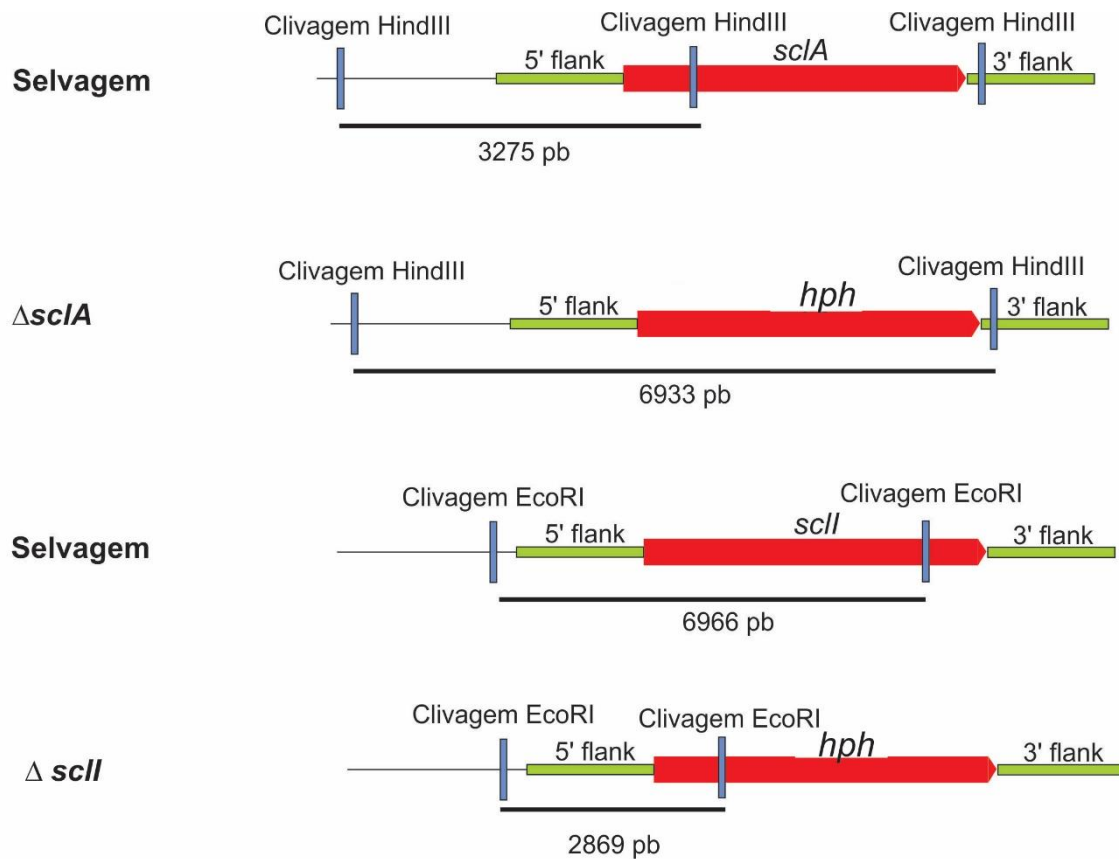
rpm por 15 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em ST (Sorbitol 1M; Tris-HCl 10mM pH 7,5) e novamente centrifugado como descrito acima. O *pellet* contendo os protoplastos foram ressuscitados em STC (Sorbitol 1M; Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 7,5) e os protoplastos foram for fim contados em câmara de Neubauer e diluídos para uma concentração final de 10⁸ protoplastos/ 0,1 mL de solução.

Para a transformação foram adicionados 5 µg do cassete de inativação gênica a um tubo contendo 200 µL da suspensão de protoplastos e 50 µL de Polietilenoglicol 6000 60% (SIGMA-ALDRICH), CaCl₂ 50 mM e homogeneizados gentilmente com micropipeta. A mistura foi incubada por 20 minutos em gelo, depois foram acrescentados 500 µL de Polietilenoglicol 6000 60% (SIGMA-ALDRICH), CaCl₂ 50 mM e foi realizada uma incubação de 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o volume foi completado para 1,5 mL com STC. Os protoplastos foram recuperados por centrifugação (11750 rpm por 5 minutos), ressuscitados em 0,5 mL de STC, plaqueados pelo método pour-plate em meio BDA com estabilizador osmótico (sacarose-0,56 M) e higromicina (100 µg/mL) e incubados por cerca de 5 dias a 28°C ou até o surgimento das colônias.

2.6. Análise das colônias transformadas para a detecção dos mutantes

Os transformantes foram isolados em meio BDA e foi realizada a purificação monospórica. Após a purificação foi realizada a extração do DNA como descrito no item 2.3. O DNA dos transformantes e do isolado selvagem foram utilizados para a amplificação por PCR utilizando iniciadores que anelam em regiões centrais dos genes *sclA* e *sclI* (Tabela 1). Os amplicons dos isolados selvagem e dos possíveis mutantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose e a confirmação se deu por ausência de amplificação da região interna de cada gene no mutante e amplificação no DNA do selvagem. Em adição, para confirmação da deleção gênica no local correto e verificação do número de integrações foi realizado o *Southern Blot* utilizando como sonda o fragmento I, as enzimas *EcoRI* (*sclI*) e *HindIII* (*sclA*), que foram usadas para digestão do DNA e foram utilizados os kits *PCR DIG Probe Synthesis kit* (Roche Applied Science) e *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit* (Roche Applied Science) (Fig 5), de acordo com as especificações do fabricante.

Figura 5. Regiões genômicas de *Penicillium* sp. MMSRG-058, onde estão localizados os genes *sclA* e *sclI*. A digestão com a enzima *HindIII* do DNA total da linhagem selvagem e do mutante $\Delta sclA$ produzirá fragmentos de 3275 pb e de 6933 pb, respectivamente. A digestão com a enzima *EcoRI* do DNA total da linhagem selvagem e do mutante $\Delta sclI$ produzirá fragmentos de 6966 pb e de 2869 pb, respectivamente. A sequência flanqueadora 5' de cada gene foi usada como sonda na hibridização.



2.7. Caracterização fenotípica e teste de estabilidade dos mutantes

Os mutantes foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA sem higromicina por sete dias a 28 °C. Depois desse período, foram transferidos para outra placa contendo BDA e este procedimento foi repetido cinco vezes. Após as transferências seriadas foi verificado a capacidade de crescimento dos mutantes em BDA contendo 100 μ g de higromicina/mL. A

presença ou a ausência de pigmentos intra e extracelulares, bem como as estruturas reprodutivas assexuais foram também analisadas.

2.8. Perfil químico via HPLC MS/MS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas)

As fermentações da linhagem selvagem e dos mutantes obtidos foram realizadas em microescala em frascos de Erlenmeyer (capacidade de 250 mL) com 100 mL de meio de caldo BD estático a 25 ° C por 21 dias. Logo após, a massa micelial foi separada do caldo fermentado, em seguida, o caldo fermentado foi extraído com acetato de etila (1: 1 v / v) e o solvente evaporado sob pressão reduzida para proporcionar o extrato bruto para cada linhagem. As análises de HPLC-MS / MS foram realizadas com um espectrômetro de massas modelo micrOTOF II (Bruker) acoplado a um sistema de cromatografia Shimadzu modelo Nexera X2.

As ionizações das moléculas foram realizadas com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operando nos modos negativo e positivo de polaridade. As separações foram realizadas em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 de 2,7 µm, 4,6 mm i.d., 50 mm (Agilent Technologies) com uma fase móvel binária. Água (A) e metanol (B) foram utilizados como solventes. A eluição do gradiente a 35 ° C foi a seguinte: 0–17 min, 15-100% B; 17–20 min, 100% (v / v) B a uma taxa de fluxo de 0,35 mL / min. A temperatura do amostrador automático foi mantida à 20 °C e o volume de injeção foi de 15 µL. Os espectros de íons dos produtos resultantes da análise HPLC-MS / MS das linhagens foram analisados e organizados em perfis químicos através de interpretação manual com espectros processados no software data analysis v.4.2 (Bruker). Os dados obtidos foram observados na plataforma GPNS (<https://gnps.ucsd.edu>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Mineração genômica e caracterização da via para produção de esclerotiorina em *Penicillium* sp. MMSRG 058

A predição de *clusters* gênicos (BGCs) via Fungismash 5.1.0 (Blin et al. 2019) identificou 53 *clusters* gênicos biossintéticos putativos, sendo 14 *clusters* preditos para biossíntese de T1 PKS; 1 para T3 PKS; 6 para NRPS; 4 para terpenos; 3 para híbridas NRPS-Like – T1PKS; 13 para NRPS-Like; 2 para alcalóides; 2 para ácidos graxos e 9 para sacarídeos. Dos 14 clusters preditos para T1PKS, 3 continham dualPKS, sendo uma NR-PKS e a outra HR-PKS (Fig. 6).

Figura 6. Predição de *clusters* gênicos biossintéticos no genoma de *Penicillium* sp. MMSRG058 usando a plataforma Fungismash v. 5. As cores indicam a classe dos compostos preditos com base em genoma; os números indicam o *scaffold* onde o cluster foi localizado.

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity	Compact view
Region 1.1	indole	626,835	647,878			<input type="checkbox"/>
Region 1.2	T3PKS	2,452,297	2,493,550			<input type="checkbox"/>
Region 1.3	NRPS-like	2,693,550	2,736,505			<input type="checkbox"/>
Region 2.1	T1PKS	31,000	73,528			<input type="checkbox"/>
Region 2.2	NRPS	196,397	246,572			<input type="checkbox"/>
Region 2.3	NRPS-like, T1PKS	1,085,592	1,136,216			<input type="checkbox"/>
Region 2.4	terpene	1,234,403	1,256,776	clavarinic acid	100%	<input type="checkbox"/>
Region 2.5	T1PKS	1,411,087	1,458,320	naphthopyrone	100%	<input type="checkbox"/>
Region 2.6	NRPS	2,203,913	2,250,210			<input type="checkbox"/>
Region 3.1	NRPS-like	1,125,006	1,169,664			<input type="checkbox"/>
Region 5.1	T1PKS	672,890	731,970			<input type="checkbox"/>
Region 5.2	NRPS-like	1,000,629	1,046,201			<input type="checkbox"/>
Region 6.1	T1PKS	15,625	62,751	landrastin A	30%	<input type="checkbox"/>
Region 6.2	terpene	157,979	179,599	squalestatin S1	40%	<input type="checkbox"/>
Region 6.3	saccharide	361,264	394,534			<input type="checkbox"/>
Region 6.4	NRPS-like	495,001	538,837			<input type="checkbox"/>
Region 6.5	indole	1,561,816	1,582,544			<input type="checkbox"/>
Region 7.1	T1PKS	201,660	240,162			<input type="checkbox"/>
Region 7.2	NRPS	860,760	894,448			<input type="checkbox"/>
Region 7.3	T1PKS	921,379	966,419	burnettramic acid A	44%	<input type="checkbox"/>
Region 7.4	NRPS, T1PKS	1,387,591	1,439,900			<input type="checkbox"/>
		455,739	514,299	nidulanin A	75%	<input type="checkbox"/>

Aqui, as características estruturais de esclerotioramina e esclerotiorina, como seu núcleo bicíclico de piraquinona e o seu átomo incomum de cloro, foram utilizadas como guia para a

mineração. Em *Chaetomium globosum*, o BGC *caz* produz chaetoviridina, uma azafilona clorada, sendo *CazI* (CHGG_07641) uma halogenase dependente de FADH₂, responsável pela incorporação de cloro no carbono 5 de chaetoviridina (Winter et al. 2012). Esta halogenase foi utilizada para a busca, utilizando a ferramenta BLAST no genoma de *Penicillium* sp. MMSRG058, resultando em um único *stronger hit* localizado no *scaffold* 28. Predição com FungiSmash resultou em 1 BGC no *scaffold* 28, no qual continha 13 *Open Reading Frames* (ORFs), onde o gene que codifica a halogenase foi localizado entre duas PKS (dualPKS) (Fig. 7) (Tabela 2).

Figura 7. *Cluster* gênico biossintético *scl* para produção de esclerotiorina e derivados



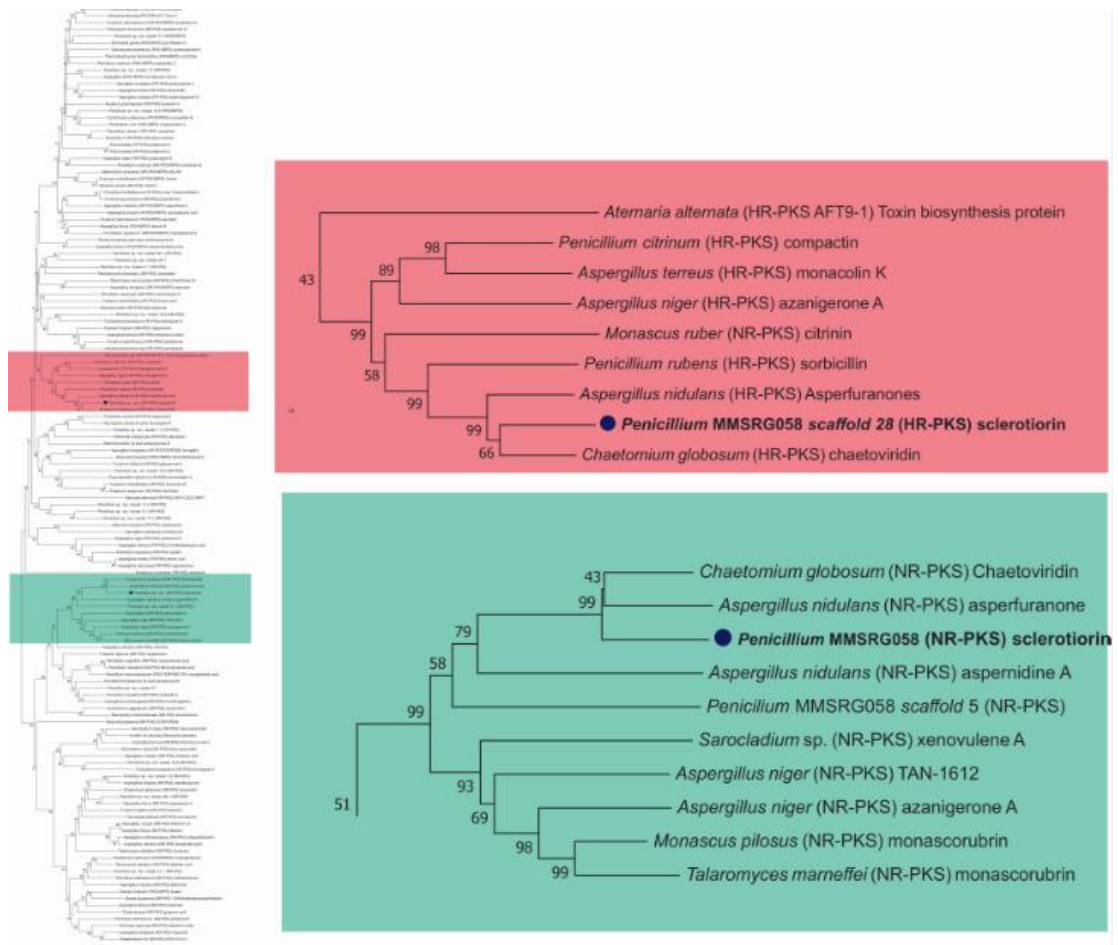
Tabela 2 – Genes da via para produção de esclerotiorina *scl* localizadas no *scaffold* 28 de *Penicillium* sp. MMSRG058.

Gene	Função proposta	Identidade %	Número de acesso
<i>sclA</i>	HR-PKS	66	XP_026602986
<i>sclB</i>	Função desconhecida	57	OOO10561
<i>sclC</i>	Flavina halogenase	63	TVY85213
<i>sclD</i>	FAD-dependente monooxigenase	59	XP_026602994
<i>sclE</i>	Zn(II)2Cys6 Fator de transcrição	47	XP_026602990
<i>sclF</i>	Enoil redutase like	58	CRL23359

<i>sclG</i>	Transportador MFS	61	KAF3765281
<i>sclH</i>	3-O- acetiltransferase	47	KAF3054734
<i>sclI</i>	NR-PKS	67	A0A0K0MCJ4
<i>sclJ</i>	FAD- oxidoreductase	49	XP_026602988
<i>sclL</i>	Proteína de membrana	60	RMJ26603.1
<i>sclM</i>	Proteína hipotética	32	KZN85707
<i>sclN</i>	Enoil reductase like	58	PMD29059

Análise filogenética do domínio KS (cetosintase) da NR-PKS e HR-PKS do *cluster* localizado no *scaffold* 28 quando comparadas com PKS de BGCs depositados no MIBIG indicou a relação das PKSs do cluster 28 com a biossíntese de azafilonas ou azafilona-*like* produzidas pelos *clusters* caz (Winter et al. 2012) e asperfuranonas produzidas pelo cluster afo (Chiang et al. 2009).

Figura 8. Análise filogenética do domínio cetosintase (KS) presentes na policetídeo sintase não redutora (NR-PKS) e policetídeo sintase altamente redutora (HR-PKS) do cluster 28 de *Penicillium* sp MMSRG 058 comparadas com 138 sequências de PKS oriundas de BGCs cujos produtos naturais já foram caracterizados e depositados no MIBIG.

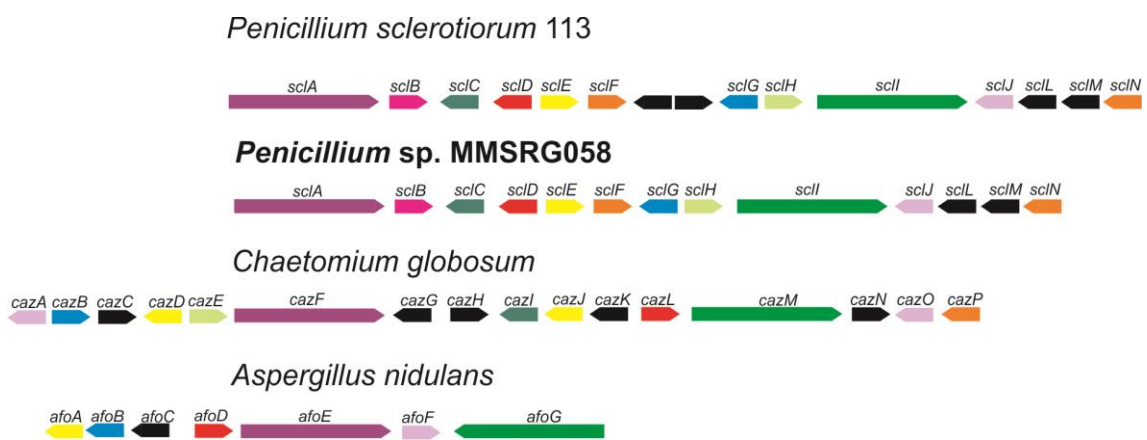


Em adição, análise de sintenia do cluster 28 de *Penicillium* sp. MMSRG 058 revelou uma arquitetura de genes semelhantes, contendo 7 genes com a mesma função tanto no BGC de caz quanto no de afo (HR-PKS, NR-PKS, FAD-dependente monooxigenase, transportador MFS, FAD-oxidoreductase, enoil reductase e fator de transcrição Zn(II)2Cys6, Fig. 9). Os genes que codificam halogenase e acetiltransferase foram estão presentes apenas BGC caz, onde a acetiltransferase tem função chave na transferência de tricetídeo produzido pela HR-PK à uma moléculas previamente formado pela interação (HR-PKS/NR-PKS/monooxigenase e halogenase) chamada de cazichromeno para formar chaetoviridinas e chaetomugilinas (Winter et al. 2012).

O cluster 28 mostrou ainda homologia com todos os genes presentes no cluster 5.3 do genoma de *Penicillium sclerotiorum* que é primeira espécie de fungo de onde foi isolada a esclerotiorina (fig. 9). As análises *in silico* fornecem uma hipótese robusta de que o cluster localizado no *scaffold 28* de *Penicillium* sp MMSRG 058 é o responsável pela biossíntese de

esclerotiorina. A confirmação esta hipótese foi realizada por meio de análise funcional dos genes que codificam HR-PKS e NR-PKS e metabolômica das linhagens mutantes.

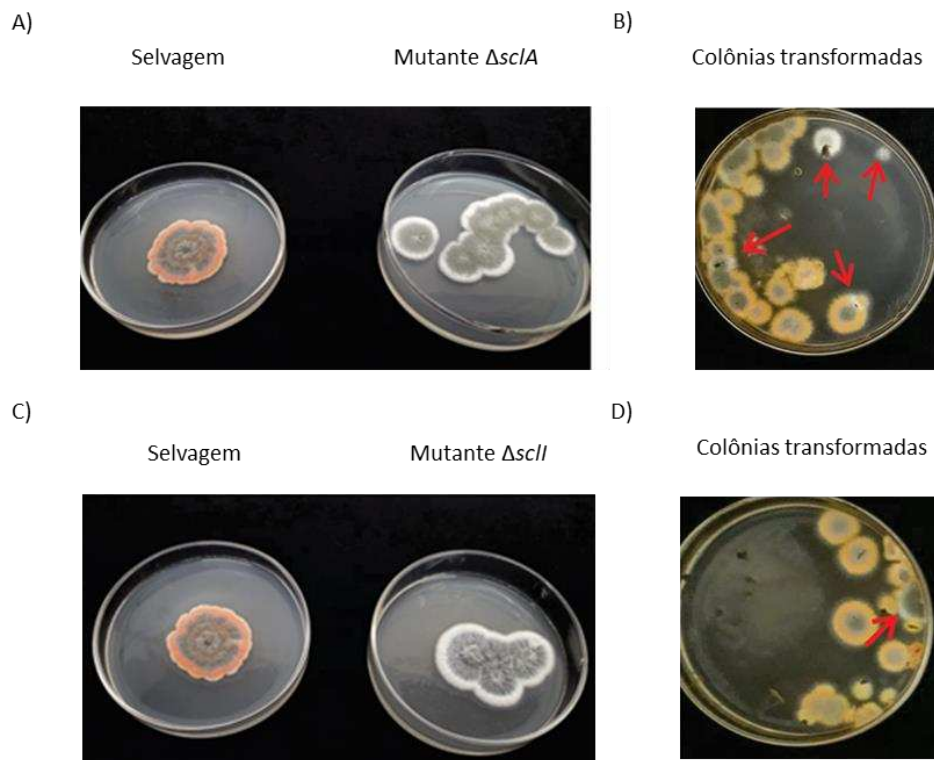
Figura 9. Análise da sintenia dos genes conservados da via para produção de esclerotiorina (*scl*), esclerotioramina e isocromofilonas em diferentes espécies de fungos filamentosos. São marcados com cor preta os genes hipotéticos que não codificam enzimas que participam da biossíntese da molécula produzida pelo BGC.



3.2. Genômica funcional e metabolômica confirmam a biossíntese de esclerotiorina, esclerotioraminas e isocromofilonas

A confirmação do *cluster* presente no *scaffold* 28 e sua relação com a biossíntese de esclerotiorina e análogos, foi realizada com base no isolamento de mutantes com deleção para os genes HR-PKS aqui denominado de *sclA* ou do gene NR-PKS *sclI* (Tabela 2). A transformação genética de *Penicillium* sp. MMSRG058 utilizando o cassete para recombinação e deleção do gene *sclA* produziu 18 transformantes. Desses, 4 (22,2%) apresentaram micélio não pigmentado. Os resultados obtidos por PCR (Fig. 11) e *Southern blot* (Fig. 12) confirmaram a deleção do gene *sclA*. Já para o gene *sclI* foram obtidos 14 transformantes. Desses, 3 (21,4%) apresentaram micélio não pigmentados e foram confirmados como linhagens *knockout*, apresentando deleção do gene *sclI* (Figura 10)

Figura 10. Isolamento e fenótipo das linhagens mutantes; A) Fenótipo dos mutantes com o gene *sclA* deletado; B) Colônias transformadas obtidas do tratamento com cassete de deleção para o gene *sclA*; C) Fenótipo dos mutantes com o gene *sclI* deletado; D) Colônias transformadas obtidas do tratamento com o cassete de deleção para o gene *sclI*. Setas vermelhas indicam colônias com perda da pigmentação.



Os resultados de *Southern blot* para o transformante 1, linhagem *knockout* do gene *sclA* ($\Delta sclA$ MUT1) mostram que a hibridização da sonda ocorre em um fragmento acima de 10000 pb, sendo esperado a hibridização em um fragmento de ~ 7000 pb, como ocorreu nos mutantes 3 e 4 para este gene, este resultado indica possíveis rearranjos do cassete de recombinação no momento da integração. Estes resultados confirmam a ocorrência de integração em um único sítio no *locus* específico e corroboram com análise de detecção do gene *sclA* realizada por PCR.

Curiosamente, todos os mutantes para o gene *sclI* não apresentam o fragmento esperado correspondente ~ 2800 pb. A sonda hibridizou em dois fragmentos de tamanho 1200 e 800 pb. Este resultado indica a ocorrência de um sítio de restrição na sequência do gene *hph* que

hibridiza com a sonda, já a linhagem selvagem apresenta um fragmento de 7000 pb como esperado. Apesar desses resultados não esperados, o padrão de bandas dos mutantes indica integração no locus específico, caso contrário seria obtido o mesmo perfil do selvagem, com hibridização em um fragmento de 7000 pb. A ausência de amplificação por PCR do gene *sclI* nos transformantes aqui denominados de $\Delta sclI$ MUT reforçam a hipótese de integração sítio dirigida e deleção do gene (Fig. 11).

Figura 8. Perfis dos amplicons após eletroforese em gel de agarose (1,5%). Confirmação da qualidade do DNA extraído por meio da amplificação do gene *CaM* (calmodulina) pela linhagem selvagem e mutantes $\Delta sclA$ e $\Delta sclI$. Confirmação da deleção gênica por meio da amplificação dos genes *sclA* e *sclI* pela linhagem selvagem e não amplificação nas linhagens mutantes

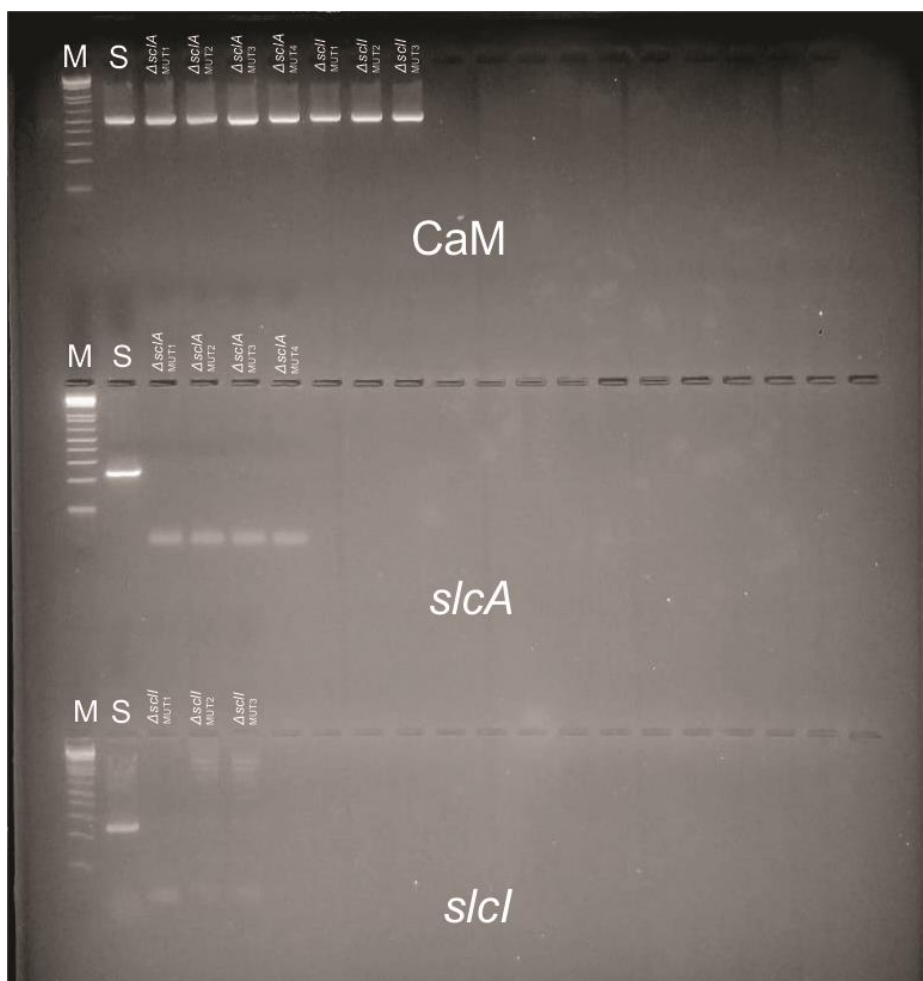
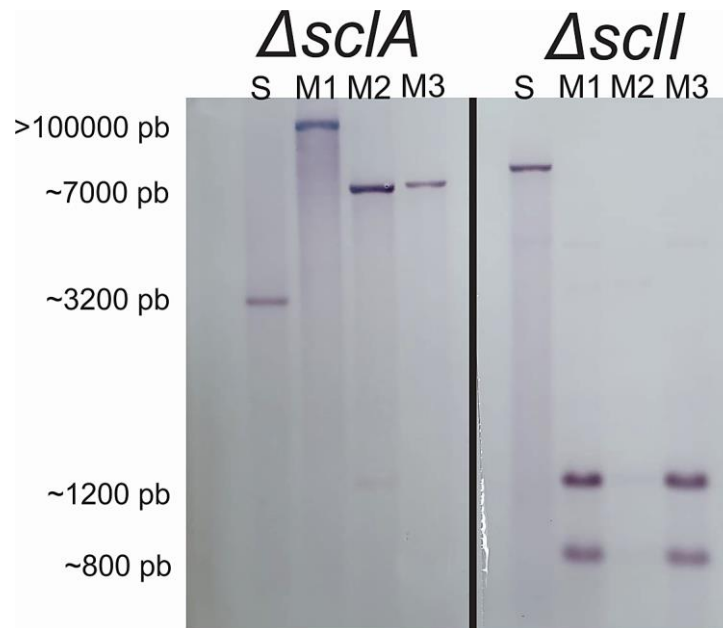


Figura 11. Perfis de hibridização da linhagem selvagem de *Penicillium* MMSRG058 e de mutantes para os genes *sclA* e *sclI* que abrigam o cassete de deleção contendo o gene *hph*. O DNA genômico dos mutantes *sclA* foram digeridos com *HindIII* e mutantes para o gene *sclI* com *EcoRI*. A região flanqueadora 5' dos genes *sclA* e *sclI* mais parte do gene *hph* foram usadas como sonda.



Análises químicas por meio da técnica de HPLC MS/MS com os extratos brutos dos mutantes e do fungo selvagem, revelam que os picos correspondentes às azafilonas esclerotiorina, isocromofilonas I e VI, clorogeumsanol e ocreofilona A estão presentes na linhagem selvagem e ausentes nos mutantes (Fig. 12 e Fig. 13). Estes resultados confirmam o papel do *cluster 28* na biossíntese de esclerotiorina e derivados.

A identificação desses compostos foi realizada com base nas bibliotecas GNPS, bem como em buscas na literatura que continham os dados de massa/carga e perfis de fragmentação. A partir da aplicação da análise de *molecular networking* foi possível desvendar ainda mais os metabólitos secundários dependente da via de produção da esclerotiorina que são produzidas em quantidades traços, mostrando o potencial da análise para prospecção de moléculas (Fig.12). O primeiro trabalho que utilizou análises de *molecular networking* para identificar intermediários de uma via biossintética para produção de metabólitos secundários foi publicado

em 2020, onde guiou a descoberta de novos intermediários e análogos de epicospirina (Zhu et al. 2020).

A produção do meroterpenóide atlantiona A foi detectada tanto nos mutantes quanto no selvagem (Fig.12 e Fig. 13). Essa molécula tem sido relatada no fungo psicrotolerante *Penicillium ribeum* e fungos associados a queijos como *P. solitum*, *P. discolor*, *P. commune*, *P. caseifulvum*, *P. palitans*, *P. novae-zeelandiae* e *P. monticola* (Dalsgaard et al. 2012).

Figura 12. Perfil químico e redes moleculares dos extratos dos mutantes $\Delta sclA$ e $\Delta sclII$ de *Penicillium* sp. MMSRG058 e da linhagem selvagem evidenciando a produção de esclerotiorina (1), isocromofilona I (2), clorogeumsanol (3), isocromofilona VI (5), composto 38 (6) e ocrefilona A (7) apenas pela linhagem selvagem. O pico sobreposto mostra a produção de Atlantionona A pela linhagem selvagem e linhagens mutantes. Redes moleculares mostram a produção de outros análogos em quantidade traço nos extratos.

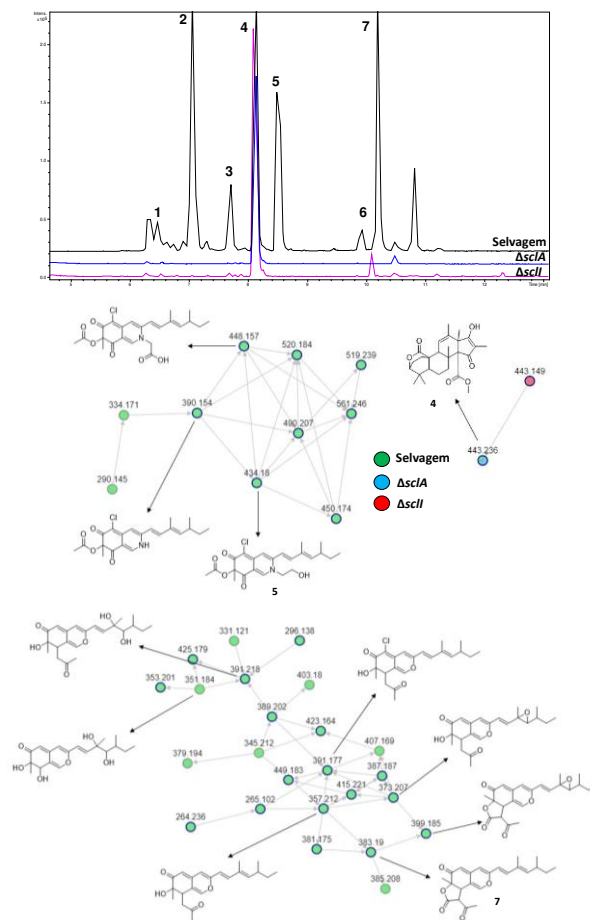
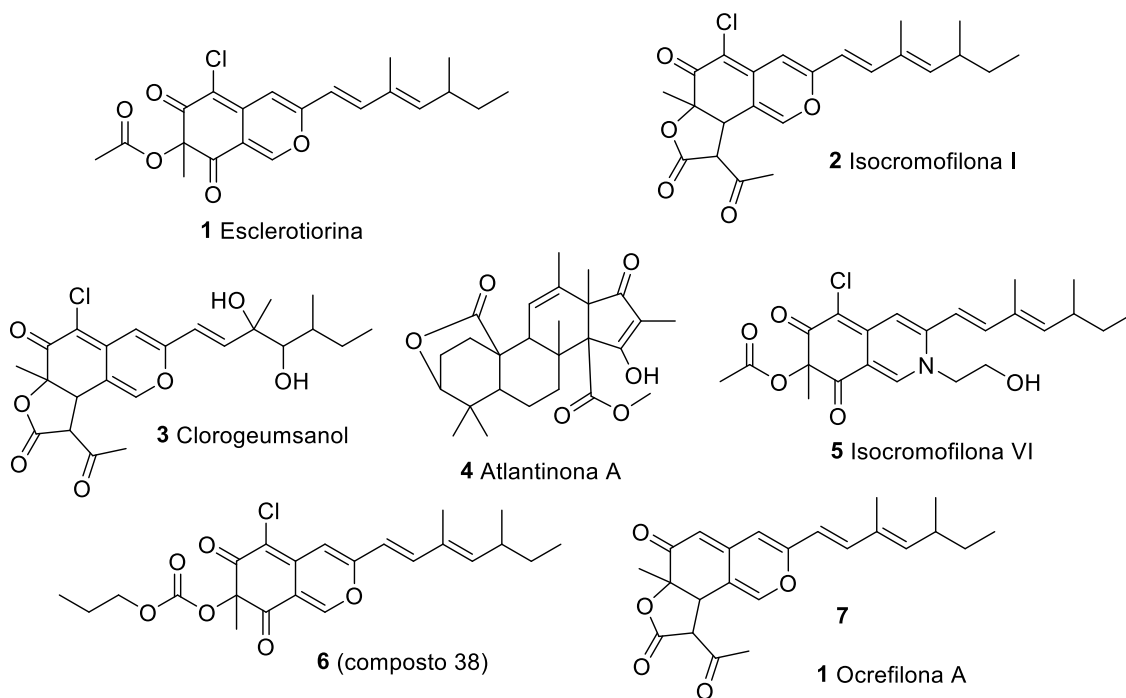


Figura 13. Características estruturais dos compostos detectados por cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC/MSMS)



3.3. Proposta de biossíntese de esclerotiorina, esclerotioramina e isocromofilonas

Com base resultados obtidos por análise funcional, metabolômica, análise de identidade e sintenia foi possível propor uma via de biossíntese para esclerotiorina e derivados (Figura 14). Para a formação do esqueleto principal de esclerotiorina, uma molécula de acetil-CoA é conjugada com uma molécula de malonil-CoA por meio do domínio KS de SclA (HR-PKS) formando um dicetídeo não modificado, logo após os domínios KR, DH e ER (codificada em trans pelo gene *sclF*) modificam o dicetídeo por meio de etapas de redução ocorrendo a perda do grupamento carbonila, nesta mesma etapa de iteração uma C-metilação é adicionada por meio do domínio MT (metiltransferase). Esse dicetídeo modificado é novamente estendido com malonil-CoA, novamente reduzido pelos domínios KR e DH sem a participação de SclF e metilado por MT para formação de um tricetídeo. Na última etapa de extensão ocorre a incorporação de uma molécula de malonil-CoA e mais uma etapa de redução por KR e DH formando um tetracetídeo.

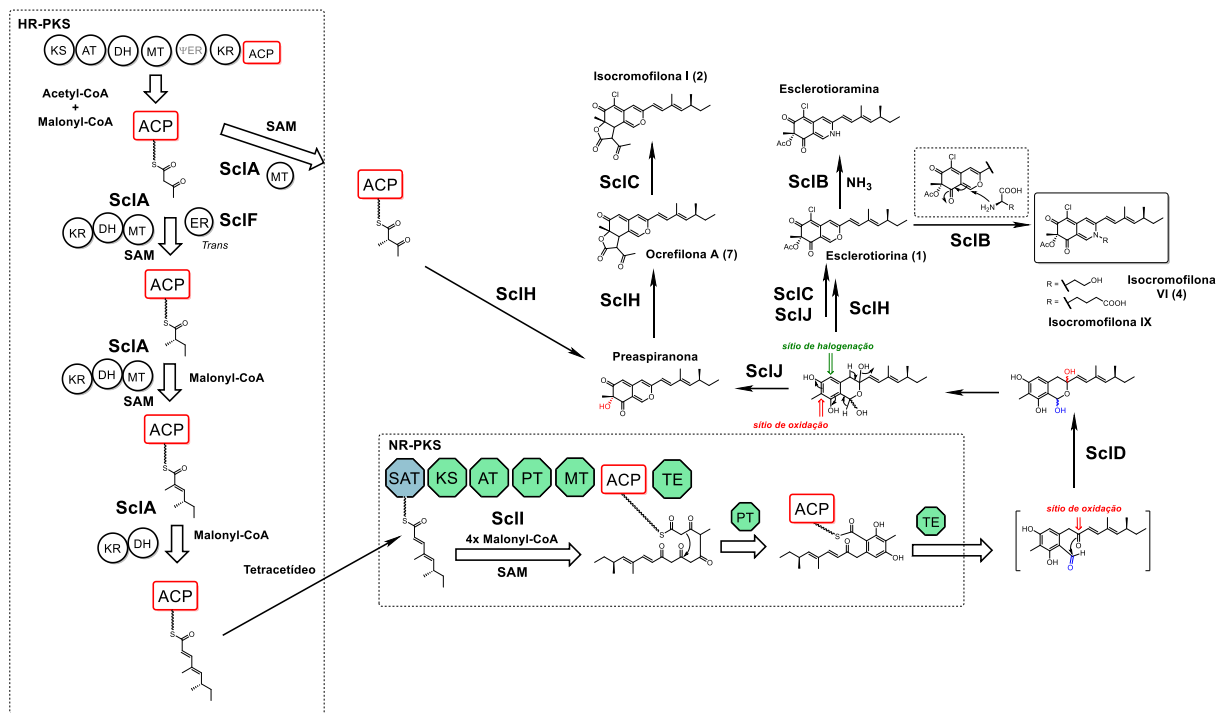
O tetracetídeo formado é capturado pelo domínio SAT da NR-PKS SclI, que por sua vez estende o tetracetídeo no domínio KS com 4x com malonil-Coa, durante a terceira etapa de extensão também ocorre a adição de uma s-adenosil-metionina (SAM), logo após, o domínio PT realiza a aromatização da molécula e por fim libera a molécula por meio de tioesterificação usando o domínio TE. Os passos subsequentes da via são realizadas por meio das *tailoring enzymes* (etapas pós-PKS).

A primeira modificação pós-PKS ocorre pela monooxigenase SclD que é responsável pela ciclização, o produto gerado é uma molécula instável detectada em níveis traço por HPLC/MSMS, essa molécula sofre a ação da oxidoreductase SclJ que elimina as hidroxilas para formação de um anel heterocíclico de cinco átomos de carbono e um átomo de oxigênio e contendo duas ligações duplas gerando o intermediário preaspiranona. A acetiltransferase SclH adiciona um grupo acetil e a halogenase SclC é responsável por adicionar um átomo de cloro na molécula de preaspiranona, formando finalmente esclerotiorina (1). Em adição reações não espontâneas com aminas primárias e aminoácidos podem ocorrer formando sclerotioramina (reação com NH₃), isocromofilona VI (4) (reação com serina) e isocromofilona IX (reação com o ácido glutâmico). A enzima SclB possui um domínio (DUF4246) de função não descrita até o momento, mas análise de sintenia mostram que em outros fungos como *Aspergillus* os genes que flanqueiam *sclB* codificam transferases de aminoácidos, nos levando a hipotetizar que SclB pode servir catalisador para formação de isocromofilonas. Em adição, a acetiltransferase sclH pode ainda capturar o dicetídeo não modificado produzido na primeira rodada de iteração da SclA e incorporar ao intermediário preaspiranona para a formação de Ocrofilona A (7) e isocromofilona I (2) sofra halogenação por SclC.

Na biossíntese de chaetoviridina a CazM (HR-PKS) produz um tricetídeo que é capturado pelo domínio SAT da CazF (NR-PKS), estendido por 4x com malonil-COA (KS) formando um heptacetídeo, metilado no C11 (MT) e ciclizado no C2-C5 (PT). A inserção do átomo de cloro no anel aromático e posterior anulação catalisada por hidroxilação no C7 se dá pela ação das enzimas halogenase (CazI) e monooxigenase (CazL) respectivamente para formar cazizochromeno (Winter et al. 2012). As características estruturais de cazizochromeno são muito semelhantes à esclerotiorina e nós propomos aqui, que o mecanismo para formação de esclerotiorina são muito próximos, e que essas diferenças estruturais entre esses dois compostos se devem devido a mais uma rodada de incorporação de malonil-COA por SclA (HR-PKS)

produzindo um tetracetídeo ao invés de um tricetídeo. As PKSs presentes no *cluster scl* assim como no BGC *caz* são iterativas, pois quando deletado o gene *sclA* ou *sclI* a síntese de esclerotiorina e derivados foram completamente abolidas.

Figura 14. Via de biossíntese proposta para formação de esclerotiorina e derivados aminados. A formação do esqueleto principal (preaspiranona) é dada por iteração dos domínios de HR-PKS para formação de tetracetídeo que é capturado pelo domínio SAT da NR-PKS. Modificações no esqueleto principal é realizado pelas *tailoring enzymes* *sclB* (putativa aminotransferase DUF4246), *sclC* (halogenase), *sclD* (monooxigenase), *sclH* (acetiltransferase) e *sclJ* (oxireductase) para formação de esclerotiorina e isocromofilonas.



4. CONCLUSÃO

No presente trabalho confirmou-se pela primeira vez por meio de genômica funcional e metabolômica a via biossintética de esclerotiorina, esclerotioramina e isocromofilonas, bem como a relação desses compostos com a pigmentação micelial, caráter macromorfológico principal para taxonomia de espécies de *Penicillium* da seção sclerotiora. As moléculas produzidas pelo cluster gênico biossintético aqui descrito apresentam uma variedade de propriedades biológicas e muitas delas com aplicação biotecnológica e o conhecimento dessa via nos permite montar estratégias para a engenharia metabólica visando a diversificação com base nessas estruturas bioativas.

5. REFERÊNCIAS

ARUNPANICHLERT, Jiraporn et al. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1033-1036, 2010.

BAO, Li et al. (-)-Sclerotiorin from an Unidentified Marine Fungus as an Anti-meiotic and Antifungal Agent. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 11, p. 1934578X1000501119, 2010.

BAYLY, Carmen L.; YADAV, Vikramaditya G. Towards precision engineering of canonical polyketide synthase domains: recent advances and future prospects. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 235, 2017.

BECK, Joachim et al. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*: its gene structure relative to that of other polyketide synthases. **European Journal of Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 487-498, 1990.

BLIN, Kai et al. Recent development of antiSMASH and other computational approaches to mine secondary metabolite biosynthetic gene clusters. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1103-1113, 2019.

BOUHRI, Youcef et al. The orange-red pigment from *Penicillium mallochii*: Pigment production, optimization, and pigment efficacy against Glioblastoma cell lines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101451, 2020.

BUTLER, Alison; SANDY, Moriah. Mechanistic considerations of halogenating enzymes. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 848-854, 2009.

CATLETT, Natalie L. et al. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. **Fungal Genetics Reports**, v. 50, n. 1, p. 9-11, 2003.

CHANKHAMJON, Pranatchareeya et al. Regioselective Dichlorination of a Non-Activated Aliphatic Carbon Atom and Phenolic Bismethylation by a Multifunctional Fungal

Flavoenzyme. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 39, p. 11955-11959, 2016.

CHAO, Rong et al. Targeted Isolation of Asperheptatides from a Coral-Derived Fungus Using LC-MS/MS-Based Molecular Networking and Antitubercular Activities of Modified Cinnamate Derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 1, p. 11-19, 2020.

CHEN, Lin et al. Trichoderpyrone, a unique polyketide hybrid with a cyclopentenone-pyrone skeleton from the plant endophytic fungus *Trichoderma gamsii*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1944-1947, 2017.

CHEN, Tao et al. Preparation, COX-2 Inhibition and Anticancer Activity of Sclerotiorin Derivatives. **Marine Drugs**, v. 19, n. 1, p. 12, 2021.

CHIANG, Yi-Ming et al. A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 8, p. 2965-2970, 2009.

CHIDANANDA, C.; RAO, L. Jagan Mohan; SATTUR, A. P. Sclerotiorin, from *Penicillium frequentans*, a potent inhibitor of aldose reductase. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 20, p. 1633-1636, 2006.

CHOI, Doo-Ho et al. *Penicillium ulleungdoense* sp. nov. from Ulleung Island in Korea. **Mycobiology**, p. 1-9, 2020.

CURTIN T. P. and Reilly J. (1940), Sclerotiorin, C₂₀H₂₀O₅Cl, a chlorine-containing metabolic product of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. **Biochemistry**. J. 34, 1419-1421.

DALSGAARD, Petur W. et al. Atlantinone A, a meroterpenoid produced by *Penicillium ribeum* and several cheese associated *Penicillium* species. **Metabolites**, v. 2, n. 1, p. 214-220, 2012.

DEAMER, David; AKESON, Mark; BRANTON, Daniel. Three decades of nanopore sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 518-524, 2016.

DOS SANTOS, Patricia O. et al. Antioxidant and antibacterial activities of the chlorine pigment sclerotiorin from *Penicillium mallochii* and its chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 86, p. 103915, 2019.

DOYLE, Jeffrey. DNA protocols for plants. In: **Molecular techniques in taxonomy**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. p. 283-293.

GILCHRIST, Cameron Laurence Mathison; CHOOI, Yit-Heng Heng. clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. **bioRxiv**, 2020.

GIRIDHARAN, Periyasamy et al. Anticancer activity of sclerotiorin, isolated from an endophytic fungus *Cephalotheca faveolata* Yaguchi, Nishim. & Udagawa. 2012.

GOMES, Dhionne Corrêia; TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida. Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. **Food Chemistry**, v. 210, p. 355-361, 2016.

HERBST, Dominik A.; TOWNSEND, Craig A.; MAIER, Timm. The architectures of iterative type I PKS and FAS. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 10, p. 1046-1069, 2018.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1-51, 2011.

HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in mycology**, v. 95, p. 5-169, 2020.

ISHIUCHI, Kan'ichiro et al. isochromophilol a, a new azaphilone isolated from *Penicillium* sp. RO369, a leaf litter inhabiting fungus from *tsuga diversifolia*. **Heterocycles: an international journal for reviews and communications in heterocyclic chemistry**, v. 98, n. 11, p. 1574-1579, 2019.

JIA, Qian et al. Azaphilones from the marine sponge-derived fungus *Penicillium sclerotiorum* OUCMDZ-3839. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 260, 2019.

KEATINGE-CLAY, Adrian T. The structures of type I polyketide synthases. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 10, p. 1050-1073, 2012.

KENSHOLE, Emma et al. Natural product discovery through microbial genome mining. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 60, p. 47-54, 2021.

KHATER, Shradha; ANAND, Swadha; MOHANTY, Debasisa. In silico methods for linking genes and secondary metabolites: the way forward. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 80-88, 2016.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEE, Namil et al. Mini review: genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in Streptomyces. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2020.

LIN, Long et al. Synthesis and antifungal activity of novel sclerotiorin analogues. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4480-4491, 2012.

LIU, Lu et al. Metabolites from marine invertebrates and their symbiotic microorganisms: Molecular diversity discovery, mining, and application. **Marine Life Science & Technology**, v. 1, n. 1, p. 60-94, 2019.

LIU, Lujie et al. Interfacing a phosphate catalytic reaction with a microbial metabolism for the production of azaphilone alkaloids. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 11, p. 2048-2052, 2020.

LUCAS, E. et al. Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, 2010.

MAHMOUD, Medhat et al. Efficiency of PacBio long read correction by 2nd generation Illumina sequencing. **Genomics**, v. 111, n. 1, p. 43-49, 2019.

MATSUZAKI, KEIICHI; TANAKA, HARUO; OMURA, SATOSHI. Isochromophilones I and II, Novel Inhibitors against gp120-CD4 Binding Produced by *Penicillium multicolor* FO-2338 II. Structure Elucidation. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 7, p. 708-713, 1995.

MEDEMA, Marnix H. et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_2, p. W339-W346, 2011.

MORALES-OYERVIDES, Lourdes et al. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by Talaromyces/Penicillium: A review. **Biotechnology Advances**, p. 107601, 2020.

NEGISHI, K., Matsuo, N., Miyadera, K., & Yajima, M. (2000). Japanese patent JP2000191527. Japan

NIELSEN, Jens Christian et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in Penicillium species. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 1-9, 2017.

PUNT, P.J., OLIVER, R.P., DINGEMANSE, M.A., POUWELS, P.H. AND VAN DEN HONDAL, C.A. (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 59, 117–124.

RIX, Uwe et al. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 5, p. 542-580, 2002.

SCHÜMANN, Julia; HERTWECK, Christian. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 4, p. 690-703, 2006.

SHEN, Ben. A new golden age of natural products drug discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.

SIMPSON, Thomas J. Fungal polyketide biosynthesis—a personal perspective. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 10, p. 1247-1252, 2014.

UDAGAWA, Shunichi. (-)-Sclerotiorin, A Major Metabolite of *Penicillium hirayamae*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, n. 3, p. 366-367, 1963.

VAN DIJK, Erwin L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 418-426, 2014.

VAN PÉE, Karl-Heinz; PATALLO, Eugenio P. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 631-641, 2006.

VISAGIE, C. M. et al. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 31, p. 42, 2013.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014

WANG, Cong et al. A Review: Halogenated Compounds from Marine Fungi. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 458, 2021.

WANG, Xin-Cun et al. Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* (Fungi) lead to the discovery of five new species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

WEI, Mei-Yan et al. Preparation, structure, and potent antifouling activity of sclerotioramine derivatives. **Marine Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 372-378, 2017.

WIGLENDTA, Thomas et al. Sclerotiorin stabilizes the assembly of nonfibrillar A β 42 oligomers with low toxicity, seeding activity, and beta-sheet content. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 7, p. 2080-2098, 2020.

WINTER, Jaclyn M. et al. Identification and characterization of the chaetoviridin and chaetomugilin gene cluster in *Chaetomium globosum* reveal dual functions of an iterative highly-reducing polyketide synthase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 43, p. 17900-17903, 2012.

WU, Shu et al. Submerged culture of *Penicillium sclerotiorum* for production of rotiorin alkaloids by using biosynthetic and chemical catalytic cascade reactions. **Process Biochemistry**, 2021.

XIN, Qiao et al. Submerged culture of marine-derived *Penicillium sclerotiorum* FS50 to produce sclerotiorin. **Process Biochemistry**, v. 79, p. 28-31, 2019.

XIN, Qiao et al. Submerged culture of marine-derived *Penicillium sclerotiorum* FS50 to produce sclerotiorin. **Process Biochemistry**, v. 79, p. 28-31, 2019.

YADAV, Ajar N. et al. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2018. p. 3-18.

ZHANG, Shuxiang et al. Antimicrobial metabolites produced by *Penicillium mallochii* CCH01 isolated from the gut of *Ectropis oblique*, cultivated in the presence of a histone deacetylase inhibitor. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2186, 2019.

ZHANG, Xingwang et al. Cytochrome P450 enzymes in fungal natural product biosynthesis. **Natural Product Reports**, 2021.

ZHU, Guoliang et al. Molecular networking assisted discovery and biosynthesis elucidation of the antimicrobial spiroketals epicospirocins. **Chemical Communications**, v. 56, n. 70, p. 10171-10174, 2020.

ZIEMERT, Nadine; ALANJARY, Mohammad; WEBER, Tilmann. The evolution of genome mining in microbes—a review. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 8, p. 988-1005, 2016.