



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**LARA ISENSEE SABOYA DE SOUSA**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA MICROBIANA PRODUTORA DE  
ÁCIDO LÁTICO UTILIZANDO ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA METABÓLICA**

**FORTALEZA**

**2022**

LARA ISENSEE SABOYA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA MICROBIANA PRODUTORA DE  
ÁCIDO LÁTICO UTILIZANDO ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA METABÓLICA**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharela em Biotecnologia. Área de concentração: Genética de Microrganismos.

Orientadora Pedagógica: Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo.

Orientador técnico-científico: Dr. Jeferson Gross

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S697d Sousa, Lara Isensee Saboya de.

Desenvolvimento de uma plataforma microbiana produtora de ácido láctico utilizando estratégias de engenharia metabólica / Lara Isensee Saboya de Sousa. – 2022.

121 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Jeferson Gross.

Coorientação: Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Ácido polilático. 3. Resíduos Agroindustriais. 4. PE-2. I. Título.

CDD 661

---

LARA ISENSEE SABOYA DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA MICROBIANA PRODUTORA DE  
ÁCIDO LÁTICO UTILIZANDO ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA METABÓLICA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharela em Biotecnologia. Área de concentração: Genética de Microrganismos.

Aprovada em 13/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo (Orientadora Pedagógica)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram importantes para mim durante essa jornada da graduação, mas primeiramente gostaria de agradecer à minha família: minha mãe Liane Isensee, meu pai Sérgio Saboya, meu irmão Daniel Isensee, meu irmão de coração David Melo e minha cunhada Nicole Young. Obrigada por serem ponto de apoio e consolo nos momentos mais difíceis e serem aqueles que estavam primeiro comemorando comigo minhas vitórias. Obrigada também por apoiarem meus sonhos e sonharem junto comigo. Mãe, obrigada por sempre estar ao meu lado, segurando minha mão. Seu apoio, de perto e de longe, foi essencial para eu conseguir ter paz e conseguir concluir tudo, desde estudar para uma prova complicada até escrever esta monografia.

Também gostaria de agradecer à minha turma, a T8, por simplesmente ser a melhor turma que eu poderia ter. Levo todos com muito carinho no coração. Especialmente, queria agradecer ao meu grupo de amigos, o “Bolabos”: Isabela Costa, Melissa Rios, Liandra Coelho, Nicole Sousa, Lucas Almeida, João Matheus, Daniel Rubens, Pedro Carneiro, Cleber Furtado e Natália Rios. A amizade de vocês foi fundamental para mim durante a graduação e tornou meus dias mais leves, desde os jogos de Uno até os almoços no RU e no Alfa/Omega. Também gostaria de agradecer à minha tutora da graduação, a Luzia Zeferino, que esteve presente desde que eu descobri que tinha passado em Biotecnologia. Obrigada Luzia, eu não sei o que seria de mim sem seus conselhos, orientações, suporte e, principalmente, amizade. Gostaria de agradecer também aos meus pupilos, Nicole Sousa e Guilherme Lobo, por confiarem em mim e pela amizade que desenvolvemos.

Obrigada também ao primeiro laboratório que participei, Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech), por ser um lugar tão acolhedor e querido. Foi nesse laboratório que primeiro me vi como cientista e foi onde tive comprovação que estava no caminho certo. Obrigada Lembiotech por ter sido o laboratório que me permitiu explorar o mundo da microbiologia e formar uma base para a área que eu quero seguir hoje. Gostaria de agradecer especialmente ao time Caatinga: Andreza Freitas, Lara Andrade, Vanessa Ariane e João Victor. Foi muito especial dividir a pesquisa e aprender com vocês. Agradeço também à Professora Vânia Melo e Professora Denise Hissa, por serem inspiração e exemplo como cientistas. Obrigada também Mirella Leite, Maria Luiza Reis, Talita Camila, Andrea

Oliveira, Cristiane Rabelo, Bella Giselly, Gabrielly Silva, Igor Duarte, Jonathan dos Santos, Luzia Zeferino, Liandra Coelho, Melissa Rios e Seu Valdenor, pela ajuda e por terem sido fundamentais para o meu desenvolvimento no laboratório.

Gostaria de agradecer também ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa na Embrapa Agroindústria Tropical, onde realizei minha segunda Iniciação Científica. Jéssica Almeida, Erick Souza, Matheus Oliveira e Adriano Mattos, obrigada por toda a ajuda e companheirismo no tempo que passei no LTB. Principalmente, obrigada Dra. Ana Iraidy pela orientação, inspiração e por acreditar em mim.

Gostaria de agradecer, também, ao grupo do qual eu faço parte atualmente e que tornou possível esta monografia: “o Grupo das Levs”, Yeast Group. Fazer minha terceira Iniciação Científica em Campinas, no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e no Laboratório de Genômica e bioEnergia (LGE) na UNICAMP foi um sonho para mim. Obrigada Gisele Palermo, Ludimila Almeida, Ícaro Fier, Thiago Gaspar, João, Davi de Castro, Natália Coutouné, Paulo Emílio e Beatriz Martins, por todos os aprendizados e auxílio no meu crescimento profissional. Também gostaria de agradecer ao time dos ácidos orgânicos, “DALALU”, composto por Ludi e Davi, pelo trabalho em equipe e companheirismo. Davi, muito obrigada por ser tão prestativo em me ensinar os mais simples protocolos do laboratório e estar do meu lado a cada derrota e vitória que tivemos no desenvolvimento dessas leveduras produtoras de ácidos orgânicos. Sou muito feliz por nossa amizade e parceria no laboratório, obrigada também por ter sido peça fundamental na conquista desse sonho que foi ir pra Campinas - SP. Também gostaria de agradecer à minha família de Campinas, o “quarteto coração”: Natalia, Davi e Paulo. Vocês foram fundamentais para meu crescimento como pessoa e profissional e meu muito obrigada por sempre estarem do meu lado quando eu precisei. Vocês são muito especiais para mim. Natalia, obrigada por todas as conversas (infinitas), “pizzadas” e, acima de tudo, por ser minha irmã de coração e mãe científica. Gostaria também de agradecer ao Dr. Leandro Vieira, pela atenção, por acreditar em mim e por me ensinar a ser sempre uma eterna aprendiz. Também agradeço ao Dr. Jeferson Gross, pela disponibilidade em ser meu Orientador Técnico. Finalmente, gostaria de agradecer à minha família de São Paulo: Tia Nini, Tio Marcio, Bia, Julia, Vovó Rosa, Thor, Dudu e Dani por serem presentes na busca pelo meu sonho e por me apoiarem, me aconselharem e por estarem presentes nos momentos mais difíceis que é sair de casa.

Gostaria de agradecer também ao CNPq, pelo financiamento das três bolsas de Iniciação Científica que eu usufruí, e à UFC, à Embrapa Agroindústria Tropical, ao CNPEM e Unicamp, pela infraestrutura e possibilidade de desenvolvimento da minha pesquisa. Também gostaria de agradecer à coordenação do Bacharelado em Biotecnologia, à secretaria do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) e ao Centro de Ciências da UFC. Por fim, gostaria de agradecer aos meus professores do curso, tão importantes na minha jornada. Principalmente, gostaria de agradecer à Professora Marjory, por ter aceitado ser a Orientadora Pedagógica deste trabalho e ter me ajudado sempre que eu precisei, além de ter ministrado uma das minhas disciplinas favoritas da graduação: Bioprocessos. Gostaria também de agradecer ao Professor Hermógenes pelas disciplinas que ministrou, como Bioquímica 2, Enzimologia e Engenharia Metabólica, as quais também estão entre as minhas favoritas e foram decisivas para a escolha da área em que quero atuar. Além disso, também gostaria de agradecer a Professora Marjory, o Professor Hermógenes e o Professor Danilo pelo aceite na participação da banca da defesa.

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in a laboratory is not only a technician: she is also a child placed before natural phenomena which impress her like a fairy tale. (Marie Curie)



## RESUMO

O ácido láctico (LA) é um ácido orgânico de grande interesse industrial, mas sua produção atual envolve impactos ambientais e gargalos econômicos que afetam suas aplicações, principalmente a produção do ácido polilático (PLA). Isso pode ser superado pela utilização de microrganismos mais robustos e tolerantes a ácidos orgânicos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é a construção de uma linhagem microbiana capaz de converter a glicose (C6) e xilose (C5), açúcares derivados de resíduos agroindustriais, em L-ácido láctico. Inicialmente, realizou-se ensaios de tolerância com cinco cepas de leveduras em meio YPD com concentrações crescentes de LA (20 a 80 g/L) a pH 3 e em hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar solidificado a pH 3 e 5. A seguir, utilizando procedimentos de biologia sintética, foram construídos plasmídeos contendo cassetes de expressão da enzima de produção do LA (L-Lactato desidrogenase, LDH), provenientes de quatro organismos diferentes: *Bos taurus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactocaseibacillus casei*. Além disso, vetores também foram construídos para utilização do sistema CRISPR-Cas9, para a deleção parcial da via de fermentação alcoólica e integração genômica da LDH escolhida. Realizou-se, então, a deleção parcial da via do etanol e testou-se por ensaios fermentativos as diferentes LDHs na linhagem desenvolvida. Quatro cepas de leveduras, a *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* ATCC38555, *Zygosaccharomyces bailii* NCYC 1427 e *Brettanomyces bruxellensis* WLP 4639 foram consideradas altamente tolerantes ao ácido láctico e apenas uma, a *Z. bailii*, demonstrou bom crescimento em hidrolisado lignocelulósico, revelando sua tolerância aos inibidores presentes nesse meio. Como o *chassi* microbiano escolhido neste trabalho é uma cepa fermentadora de xilose derivada da PE-2 (BR-X5), isso a configura como cepa ideal para este estudo. A obtenção da linhagem BR-X5 $\Delta$ pdc1 revelou que a deleção do gene *PDC1*, a principal piruvato descarboxilase expressa em levedura, não foi suficiente para o redirecionamento de carbono dessa via. A expressão dos vetores das *LDHs* nessa linhagem permitiu selecionar a L-LDH de *B. taurus* como a melhor enzima para a produção de LA. Por fim, a montagem dos plasmídeos de integração genômica possibilitam o desenvolvimento de linhagens com diferentes cópias dessa enzima bovina e a deleção de outros genes da via do etanol, como *ADH1*. Foi possível, então, construir uma cepa prova de princípio produtora de 1,7 g/L de ácido láctico, com

rendimento de 1,8% a partir de 90 g/L de açúcar (glicose e xilose) e produtividade de 0,043 g/L.h. A partir dessa cepa, é possível o desenvolvimento de um microrganismo que viabilize a produção eficiente de LA a partir de um recurso renovável e um processo mais sustentável e eficiente.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, Ácido polilático, Resíduos Agroindustriais, PE-2.

## ABSTRACT

Lactic acid (LA) is an organic acid of great industrial interest, but its current production involves environmental impacts and economic bottlenecks that affect its applications, especially the production of polylactic acid (PLA). To overcome this, it is possible to use robust microorganisms tolerant to organic acids, such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this context, this work aims to build a microbial strain capable of converting glucose (C6) and xylose (C5), sugars derived from agro-industrial residues, into L-lactic acid. Initially, tolerance tests were carried out with five yeast strains in a YPD medium with increasing concentrations of LA (20 to 80 g/L) at pH 3 and in lignocellulosic hydrolyzate of sugarcane bagasse solidified at pH 3 and 5. Then, using synthetic biology procedures, plasmids containing LA production enzyme expression cassettes (L-lactate dehydrogenase, LDH) from four different organisms were constructed: *Bos taurus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactocaseibacillus casei*. In addition, vectors were also built to use the CRISPR-Cas9 system for the partial deletion of the alcoholic fermentation pathway and genomic integration of the chosen LDH. Then, the partial deletion of the ethanol pathway was performed and the different LDHs in the developed strain were tested by fermentation assays. Four yeast strains, *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* ATCC38555, *Zygosaccharomyces bailii* NCYC 1427, and *Brettanomyces bruxellensis* WLP 4639 were considered highly tolerant to lactic acid and only one, *Z. bailii*, showed good growth in lignocellulosic hydrolyzate, revealing its tolerance to the inhibitors present in this medium. As the microbial *chassi* chosen in this work is a xylose-fermenting strain derived from PE-2 (BR-X5), this configures it as an ideal strain for this study. Obtaining the BR-X5 $\Delta$ pdc1 strain revealed that the deletion of the PDC1 gene, the main pyruvate decarboxylase expressed in yeast, was not sufficient for the carbon redirection of this pathway. The expression of the LDH vectors in this strain allowed the selection of L-LDH from *B. taurus* as the best enzyme for the production of LA. Finally, the assembly of genomic integration plasmids allows the development of strains with different copies of this bovine enzyme and the deletion of other genes of the ethanol pathway, such as ADH1. It was then possible to build a proof-of-principle strain producing 1.7 g/L of lactic acid, with a yield of 1.8% from 90 g/L of sugar (glucose and xylose) and productivity of 0.043 g/L. L.h. From this strain, it is possible to develop a microorganism that enables

the efficient production of LA from a renewable resource and a more sustainable and efficient process.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Polylactic acid, Agro-industrial Waste, PE-2.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Os 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas na Agenda 2030.....	27
Figura 2	– Organização estrutural e constituição da biomassa lignocelulósica...	28
Figura 3	– Visão geral da produção de bioplásticos a partir da fermentação da biomassa lignocelulósica .....	30
Figura 4	– Fórmulas em perspectiva dos dois isômeros do ácido láctico, o L-ácido láctico e o D-ácido láctico.....	31
Figura 5	– Principais aplicações do biopolímero ácido polilático (PLA).....	32
Figura 6	– Representação ilustrativa da interação Cas9/gRNA e DNA-alvo, complexo formado na técnica de edição genética CRISPR-Cas9 .....	39
Figura 7	– Mecanismo de integração em multicópia do fragmento de DNA de interesse pela técnica de DI-CRISPR, delta-integration (integração em elementos delta) .....	41
Figura 8	– Metabolismo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contendo a via heteróloga de fermentação láctica.....	42
Figura 9	– Desenho esquemático da montagem por recombinação homóloga dos vetores para utilização do sistema CRISPR-Cas9 na deleção dos genes <i>PDC1</i> e <i>ADH1</i> na cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5.....	59
Figura 10	– Esquema experimental para deleção do gene da <i>PDC1</i> utilizando o sistema CRISPR-Cas9 em duas etapas na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5.....	60
Figura 11	– Desenho esquemático da montagem por recombinação homóloga dos vetores contendo o cassete de expressão das enzimas L-LDH de diferentes organismos para expressão na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 $\Delta$ <i>PDC1</i> .....	62
Figura 12	– Desenho esquemático da montagem por recombinação homóloga dos vetores para integração genômica da L-LDH de <i>Bos taurus</i>	64

	utilizando o sistema CRISPR-Cas9 na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5.....	
Figura 13	– Ensaio de tolerância das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC38555, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC3312, <i>Brettanomyces bruxellensis</i> WLP4639 e <i>Zygosaccharomyces bailii</i> NCYC 1427 a estresse ácido em diferentes concentrações de ácido láctico a pH 3 em meio mínimo por <i>Spot Assay</i> .....	66
Figura 14	– Ensaio de tolerância das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC38555, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC3312, <i>Brettanomyces bruxellensis</i> WLP4639 e <i>Zygosaccharomyces bailii</i> NCYC 1427 ao crescimento em hidrolisado lignocelulósico a pH 3 e 5 por <i>Spot Assay</i> .....	67
Figura 15	– Vetores desenhados para a utilização do sistema CRISPR-Cas9 na deleção dos genes <i>PDC1</i> e <i>ADH1</i> na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5: p2gRNAdelPDC1, p2gRNAdelADH1 e pAB_DonPDC1_DonADH1.....	68
Figura 16	– Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA, da montagem do plasmídeo p2gRNAdelPDC1 e da transformação em <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	69
Figura 17	– Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA, da montagem do plasmídeo p2gRNAdelADH1 e da transformação em <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	70
Figura 18	– Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB_DonPDC1_DonADH1 .....	70
Figura 19	– Deleção do gene <i>PDC1</i> e obtenção da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> .....	71
Figura 20	– Resultado da curagem dos plasmídeos pJACas-K e p2gRNAdelPDC1 de duas colônias originadas da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 $\Delta$ <i>PDC1</i> confirmada .....	71

Figura 21 – Cinética fermentativa das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 e BR-X5 $\Delta$ pdc1 em meio YPD <sub>50</sub> e YPX <sub>50</sub> .....	72
Figura 22 – Placas de transformação resultantes da técnica de CRISPR-Cas9, objetivando a deleção no gene <i>ADH1</i> na cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 $\Delta$ pdc1 .....	74
Figura 23 – Géis de eletroforese de confirmação molecular das transformantes obtidas do CRISPR-Cas9 para deleção do gene <i>ADH1</i> na cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 $\Delta$ pdc1.....	74
Figura 24 – Vetor desenhado para a expressão das LDHs heterólogas na cepa de <i>S. cerevisiae</i> desenvolvida: L-LDH de <i>Bos taurus</i> (pAB_THD1_LD1), L-LDH de <i>Latobacillus helveticus</i> (pAB_THD1_LD2), L-LDH de <i>Lactobacillus plantarum</i> (pAB_THD1_LD3) e L-LDH de <i>Lacticaseibacillus casei</i> (pAB_THD1_LD4) .....	75
Figura 25 – Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB_TD1_LD1 (L-LDH de <i>Bos taurus</i> ) .....	76
Figura 26 – Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB_TD1_LD2 (L-LDH de <i>Latobacillus helveticus</i> ) .....	76
Figura 27 – Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB_TD1_LD3 (L-LDH de <i>Lactobacillus plantarum</i> ) .....	77
Figura 28 – Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB_TD1_LD4 (L-LDH de <i>Lacticaseibacillus casei</i> ) .....	77
Figura 29 – Confirmação da montagem dos cassetes de expressão heteróloga das L-LDH de <i>Bos taurus</i> (pAB_THD1_LD1), L-LDH de <i>Latobacillus helveticus</i> (pAB_THD1_LD2), L-LDH de <i>Lactobacillus plantarum</i> (pAB_THD1_LD3) e L-LDH de <i>Lacticaseibacillus casei</i> (pAB_THD1_LD4) em <i>E. coli</i> .....	77

Figura 30 – Esquema representativo das linhagens desenvolvidas para a triagem da melhor enzima de fermentação láctica heteróloga (L-LDH de <i>Bos taurus</i> , <i>Latobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lacticaseibacillus casei</i> ) para expressão na cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> .....	78
Figura 31 – Confirmação molecular linhagens desenvolvidas para a triagem da melhor enzima de fermentação láctica heteróloga (L-LDH de <i>Bos taurus</i> , <i>Latobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lacticaseibacillus casei</i> ) para expressão na cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> .....	79
Figura 32 – Crescimento microbiano (Densidade óptica a 600 nm) das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> e BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPD <sub>X</sub> , com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina (NAT) .....	81
Figura 33 – Consumo de açúcares (glicose e xilose) das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> e BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPD <sub>X</sub> , com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina (NAT) .....	82
Figura 34 – Produção de etanol das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> e BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPD <sub>X</sub> , com 50g /L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina (NAT) .....	83
Figura 35 – Produção de ácido láctico das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> e BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPD <sub>X</sub> , com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina (NAT) .....	83
Figura 36 – Produção de glicerol das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> e BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPD <sub>X</sub> , com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina (NAT).....	87



Figura 37 – Produção de ácido acético das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> e BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina (NAT) .....	88
Figura 38 – Vetores desenhados para a utilização do sistema CRISPR-Cas9 na integração genômica da L-LDH de <i>Bos taurus</i> na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5: p2gRNA_DI-CRISPR, pAB_DonPDC1_LDH1 e pAB_DonADH1_LDH1.....	90
Figura 39 – Placas de montagem dos plasmídeos p2gRNA_DI-CRISPR, pAB_DonPDC1_LDH1 e pAB_DonADH1_LDH1 por recombinação homóloga em levedura .....	90
Figura 40 – Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo p2gRNA_DI-CRISPR .....	91
Figura 41 – Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB_DonPDC1_LDH1 .....	91
Figura 42 – Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB_DonADH1_LDH1 .....	92
Figura 43 – Comparação dos requerimentos ideais de concentração, rendimento e produtividade (TRY) demandados pelas industriais para a produção de ácido láctico e os valores obtidos a partir da cepa prova de princípio BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> pLDH1 (L-LDH de <i>Bos taurus</i> desenvolvida.....	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes da reação de PCR para um volume de 25 µL de acordo com o fabricante .....	55
Tabela 2 – Programação da reação de PCR para as enzimas GoTaq® e Phusion® NEB de acordo com os fabricantes .....	55
Tabela 3 – Programação da reação de PCR para as enzimas Phusion LNBR Q5® de acordo com o fabricante .....	56
Tabela 4 – RNAs-guia desenhados para a deleção dos genes <i>PDC1</i> e <i>ADH1</i> da via do etanol e analisados pelas ferramentas CHOPCHOP e CRISPOR .....	69
Tabela 5 – Velocidade específica máxima de crescimento microbiano das linhagens BR-X5, BR-X5Δ <i>pdc1</i> e BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH1-4 cultivadas em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.....	82
Tabela 6 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.....	84
Tabela 7 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5Δ <i>pdc1</i> cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.....	84
Tabela 8 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH1 (L-LDH de <i>Bos taurus</i> ) cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.....	85

- Tabela 9 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH2 (L-LDH de *Lactobacillus helveticus*) cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h..... 85
- Tabela 10 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH3 (L-LDH de *Lactobacillus plantarum*) cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h..... 86
- Tabela 11 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH4 (L-LDH de *Lactocaseibacillus casei*) cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h..... 87
- Tabela 12 – Potencial hidrogeniônico (pH) do sobrenadante obtido a partir do meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h pelas linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ *pdc1* e BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH1-4..... 88
- Tabela 13 – Concentração, rendimento e produtividade obtidos para a produção de ácido láctico em 34h de fermentação (tempo em que houve máxima concentração de ácido láctico) pelas linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ *pdc1* e BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH1-4 em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina, a 200 rpm e 30°C..... 88
- Tabela 14 – Concentração, rendimento e produtividade obtidos para a produção de etanol em 40h de fermentação (tempo em que houve máxima concentração de etanol) pelas linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ *pdc1* e BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH1-4 em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina, a 200 rpm e 30°C..... 89

Tabela 15 – RNA-guia para a integração em multicópia do cassete de expressão da L-LDH de <i>Bos taurus</i> nos elementos delta do genoma da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BR-X5 (HUANG E GENG, 2020).....	90
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PLA	Polylactic acid (ácido polilático)
LA	Lactic Acid (ácido láctico)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas)
Cas9	CRISPR associated protein 9 (proteína 9 associada ao CRISPR)
LDH	Lactate dehydrogenase (lactato desidrogenase)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COP	Conference of the Parties (Conferência das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas)
ONU	Organização das Nações Unidas
NMP	N-metil-2-pirrolidona
GRAS	Generally Recognized As Safe (geralmente reconhecido como seguro)
BAL	Bactérias ácido-láticas
BG-1	Barra Grande 1
CAT-1	Catanduva 1
PE-2	Pedra 2
SA-1	Santa Adelia 1
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
gRNA	RNA guia
PAM	Protospacer Adjacent Motif
NHEJ	Non-homologous end joining (reparo do DNA por junção de pontas não homólogas)
HR	Homologous recombination (reparo do DNA direcionado por homologia)
PKA	Protein kinase A (proteína cinase A)
NADH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida)

PDC	Pyruvate decarboxylase (piruvato descarboxilase)
ADH	Alcohol dehydrogenase (álcool desidrogenase)
ALD	Aldehyde dehydrogenases (aldeído desidrogenase)
ACS	Acyl coenzyme A (CoA) synthetase (acil-CoA sintetase)
GPD	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (glicerol-3-fosfato desidrogenase)
PDH	Pyruvate dehydrogenase (piruvato desidrogenase)
CoA	Coenzyme A (Coenzima A)
ATP	Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
YNBD <sub>20</sub>	Yeast Nitrogen Base (Base de nitrogênio de levedura) suplementado com aminoácidos e 20g/L de glicose
rpm	Rotação por minuto
PPDP	Planta Piloto para Desenvolvimento de Processos
LNBR	Laboratório Nacional de Biorrenováveis
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
YPD <sub>20</sub>	Yeast extract, peptone and dextrose (extrato de levedura, peptona e glicose) suplementado com 20 g/L de glicose
YP	Yeast extract and peptone (extrato de levedura e peptona)
YPX <sub>20</sub>	Yeast extract, peptone and xylose (extrato de levedura, peptona e xilose) suplementado com 20 g/L de xilose
NAT	Nourseothricin (nourseotricina)
G418	Geneticin (geneticina)
NaCl	Cloreto de sódio
YPD <sub>100</sub>	Yeast extract, peptone and dextrose (extrato de levedura, peptona e glicose) suplementado com 100 g/L de glicose
pb	Pares de base
NaOAc	Acetato de sódio
LiOAc/LiAc	Acetato de lítio
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio

DMSO	Dimethyl sulfoxide (dimetilsulfóxido)
NaOH	Hidróxido de sódio
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate ( <i>desoxirribonucleotídeo trifosfato</i> )
TAE	Tris base, acetic acid and EDTA Buffer (Tampão Tris-Acetato-EDTA)
EtBr	Ethidium bromide (Brometo de Etídio)
UV	Ultravioleta
ssDNA	Salmon sperm DNA (DNA de esperma de salmão)
PEG	Polyethylene glycol (polietilenoglicol)
TE	Tris-EDTA Buffer solution (Tampão Tris -EDTA)
LB	Luria-Bertani medium
YPD <sub>10</sub> X <sub>10</sub>	Yeast extract, peptone, dextrose and xylose (extrato de levedura, peptona, glicose e xilose) suplementado com 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose
OD	Densidade óptica
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica a 600nm
YPD <sub>50</sub> X <sub>40</sub>	Yeast extract, peptone, dextrose and xylose (extrato de levedura, peptona, glicose e xilose) suplementado com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
PDC1	Piruvato descarboxilase 1
ADH1	Álcool desidrogenase 1
ORF	Open Reading Frame (Janela aberta de leitura)
LTR	Long Terminal Repeats (repetição terminal longa)

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\varepsilon$	Épsilon
$\alpha$	Alfa
$\delta$	Delta



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	26
1.1	Biotecnologia, Biorrefinaria e Bioeconomia .....	26
1.2	Ácido láctico: produções e aplicações .....	30
1.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como plataforma microbiana produtora de ácido láctico .....	36
2	OBJETIVOS .....	49
2.1	Objetivo geral.....	49
2.2	Objetivos específicos.....	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1	Microrganismos e reagentes utilizados.....	50
3.2	Tolerância a estresses.....	50
3.2.1	<i>Spot assay em meio mínimo com ácido láctico</i> .....	50
3.2.2	<i>Spot assay em hidrolisado lignocelulósico derivado de resíduo agroindustrial</i> .....	51
3.3	Montagem de vetores plasmidiais e transformação genética de microrganismos .....	52
3.3.1	<i>Linhagens e meios de cultura utilizados</i> .....	52
3.3.2	<i>Desenho de RNAs-guia para o sistema CRISPR-Cas9 e primers para reações de PCR</i> .....	53
3.3.3	<i>Extração de DNA genômico e plasmidial</i> .....	53
3.3.4	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	54
3.3.5	<i>Eletroforese em gel de agarose</i> .....	56
3.3.6	<i>Transformação genética de levedura</i> .....	57
3.3.7	<i>Transformação genética de bactéria</i> .....	58
3.4	Estratégia experimental: deleção parcial da via do etanol .....	58
3.4.1	<i>Montagem de vetores para deleção de genes da via de produção do etanol em <u>S. cerevisiae</u> utilizando o sistema CRISPR-Cas9</i> .....	59
3.4.2	<i>Obtenção de linhagem mutante de <u>S. cerevisiae</u> com a deleção parcial da via do etanol</i> .....	59
3.4.3	<i>Cinética fermentativa de linhagens com a deleção parcial da via do etanol</i> .....	61
3.5	Estratégia experimental: expressão heteróloga da via de interesse.	61

3.5.1	<b>Construção dos plasmídeos de expressão gênica da enzima lactato desidrogenase (LDH) de diferentes organismos .....</b>	61
3.5.2	<b>Cinética fermentativa de linhagens expressando as enzimas LDH testadas.....</b>	62
3.6	<b>Integração genômica da via de interesse .....</b>	64
3.6.1	<b>Montagem de vetores para integração genômica da LDH escolhida utilizando o sistema CRISPR-Cas9 .....</b>	64
3.7	<b>Análises estatísticas .....</b>	65
4	<b>RESULTADOS .....</b>	66
4.1	<b>Tolerância a estresses .....</b>	66
4.1.1	<b>Spot assay em ácido láctico .....</b>	66
4.1.2	<b>Spot assay em hidrolisado lignocelulósico derivado de resíduo agroindustrial .....</b>	67
4.2	<b>Deleção parcial da via do etanol .....</b>	68
4.2.1	<b>Montagem de vetores para deleção de genes da via de produção do etanol em <u>S. cerevisiae</u> utilizando o sistema CRISPR-Cas9 .....</b>	68
4.2.2	<b>Obtenção de linhagem mutante de <u>S. cerevisiae</u> com a deleção do gene PDC1 da via do etanol.....</b>	71
4.2.3	<b>Cinética fermentativa de linhagens com a deleção do gene PDC1 da via do etanol.....</b>	72
4.2.4	<b>Obtenção de linhagem mutante de <u>S. cerevisiae</u> com a deleção do gene PDC1 e ADH1 da via do etanol .....</b>	73
4.3	<b>Expressão heteróloga da via de interesse .....</b>	75
4.3.1	<b>Construção dos plasmídeos de expressão gênica da enzima lactato desidrogenase (LDH) de diferentes organismos .....</b>	75
4.3.2	<b>Obtenção de linhagens mutantes de <u>S. cerevisiae</u> com a deleção do gene PDC1 da via do etanol e expressão da via de interesse.....</b>	78
4.3.3	<b>Cinética fermentativa das linhagens <u>S. cerevisiae</u> prova-de-princípio e avaliação da melhor LDH expressa heterologicamente.....</b>	80
4.4	<b>Integração genômica da via de interesse .....</b>	89
5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	94
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	106
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	107

<b>APÊNDICE A - PLASMÍDEOS UTILIZADOS NAS ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA METABÓLICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA SACCHAROMYCES CERVEVISIAE PRODUTORA DE ÁCIDO LÁTICO .....</b>	<b>117</b>
<b>APÊNDICE B - PRIMERS DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA UTILIZADOS NA MONTAGEM DOS VETORES p2gRNAdelPDC1, p2gRNAdelADH1 e pAB_DonPDC1_DonADH1.....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE C - PRIMERS DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA UTILIZADOS NA MONTAGEM DOS VETORES pAB_TDH1_LDH1, pAB_TDH1_LDH2, pAB_TDH1_LDH3 e pAB_TDH1_LDH4.....</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICE D: PRIMERS DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA UTILIZADOS NA MONTAGEM DOS VETORES p2gRNA_DI-CRISPR, pAB_DonPDC1_LDH1 e pAB_DonADH1_LDH1.....</b>	<b>121</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Biotecnologia, biorrefinaria e bioeconomia

Os recursos fósseis, como petróleo, gás natural e carvão, são as principais fontes de energia e os principais precursores de materiais, compostos químicos e produtos que utilizamos atualmente (KIRCHER, 2021). A utilização desenfreada desses recursos, porém, tem causado uma série de problemas ambientais, como altos níveis de CO<sub>2</sub> na atmosfera, mudanças climáticas e perda de biodiversidade. Diante desse cenário, a reestruturação da matriz energética tornou-se uma necessidade mundial e vêm estimulando a criação de políticas de descarbonização globais e de desenvolvimento sustentável (KIRCHER, 2021; ABAS *et al.*, 2015). A Conferência das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas (COP) é um exemplo de evento que reúne líderes mundiais para discutirem o tema, representando iniciativas globais que visam mitigar essas problemáticas ambientais. A última edição ocorreu em 2021 (COP26), mas foi a COP21 que deu origem ao Acordo de Paris, o qual definiu a meta de limitar o aquecimento global em 2°C em relação a níveis pré-industriais, com o objetivo de redução em 95% das emissões de gases de efeito estufa até 2050 (KIRCHER, 2021). Além disso, a Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) na Agenda 2030, dentre os quais estão metas para assegurar a preservação do planeta e dos recursos naturais, objetivando alcançar a sustentabilidade global, como pode ser observado na Figura 1 (SOLARTE-TORO e ALZATE, 2021).

Dessa forma, a reestruturação da matriz energética está intimamente atrelada ao desenvolvimento de processos mais sustentáveis, que por sua vez podem ser atingidos por meio do desenvolvimento de processos biotecnológicos. A biotecnologia é uma ciência multidisciplinar que visa o desenvolvimento de produtos e processos a partir da utilização de sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados (BRASIL, 2010). Esses processos, portanto, estão envolvidos em uma bioeconomia, ou economia de base biológica, a qual envolve a utilização de recursos renováveis de energia e carbono, como a biomassa vegetal, produzida principalmente pela agricultura e silvicultura (KIRCHER, 2021). O desenvolvimento da bioeconomia se enquadra em cinco dos objetivos da Agenda 2030 da ONU, como a produção de energia limpa e acessível (ODS 7), por meio dos biocombustíveis; o desenvolvimento

da indústria, inovação e infraestrutura (ODS 9), por meio do desenvolvimento de produtos industriais biotecnológicos; o consumo e produção sustentáveis (ODS 12), a ação contra a mudança global climática (ODS 13) e a proteção da vida terrestre (ODS 15), por meio da reestruturação da matriz energética e utilização de fontes renováveis. As matérias-primas derivadas da biomassa vegetal que contém grande quantidade de açúcar e amido disponíveis, como o mosto derivado de milho, beterraba e cana-de-açúcar, são chamadas de primeira geração, enquanto as de segunda geração são aquelas derivadas de resíduos agroindustriais (AYODELE *et al.*, 2020). Além da utilização de recursos renováveis, os produtos derivados dos processos biotecnológicos também são interessantes por serem mais biodegradáveis com menos impactos ambientais e mais sustentáveis em toda a cadeia produtora e de consumo.

Figura 1 - Os 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas na Agenda 2030.



Fonte: Roma *et al.* (2019).

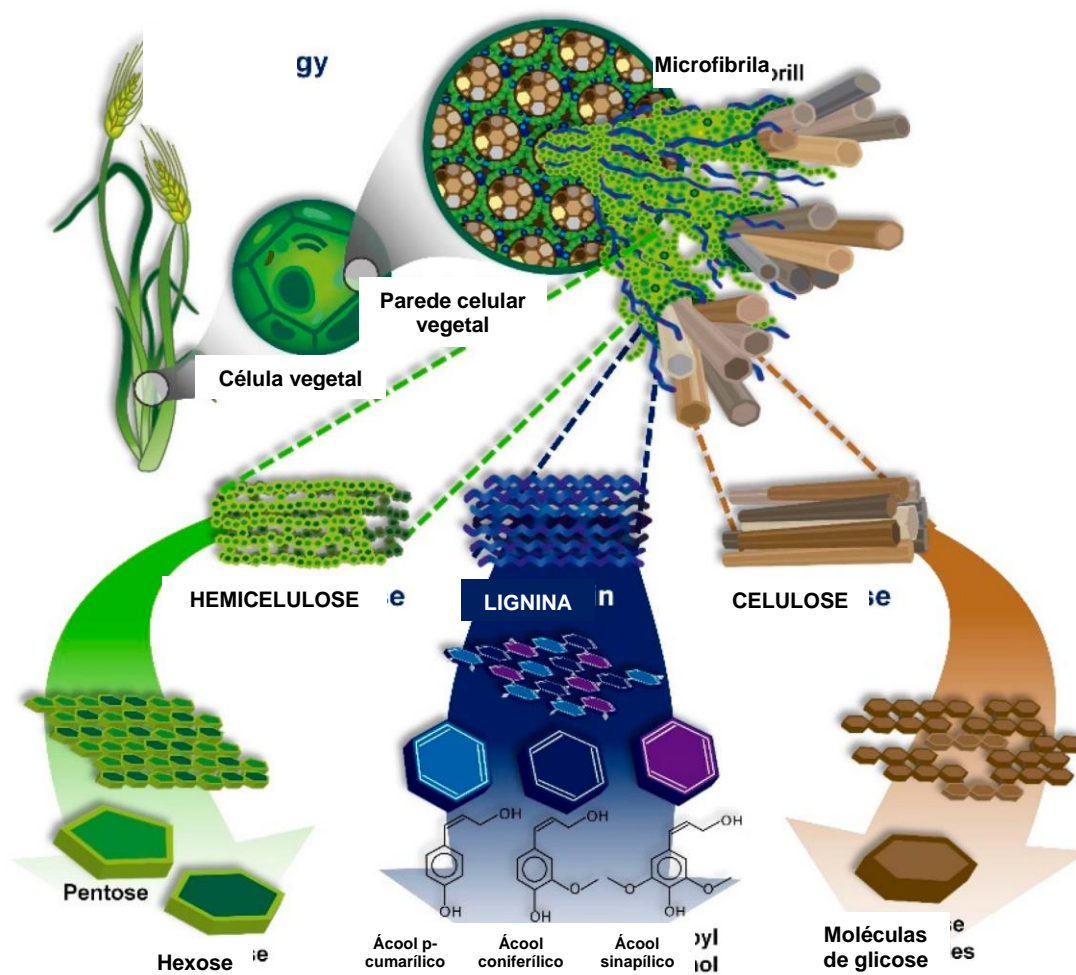
Entretanto, o custo normalmente não competitivo dos produtos biotecnológicos obtidos a partir da biomassa que se destina à produção de alimentos, constitui-se uma das principais barreiras para a implementação da bioeconomia (DUPONT-INGLIS e BORG, 2018; KIRCHER, 2021). Como uma forma de baratear os custos do processo, é possível a utilização da fração lignocelulósica da biomassa vegetal dos resíduos agroindustriais. Essa fração é o tipo de biomassa mais abundante no mundo e grande parte é descartada como resíduo agroindustrial, compreendendo quase 63% da

massa total de todos os resíduos e, assim, apresenta um baixo custo associado (DAHMEN *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2022).

Os resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, são formados por células vegetais com parede secundária com composição lignocelulósica, contendo principalmente os biopolímeros celulose, hemicelulose e lignina, como mostrado na Figura 2. A celulose é o constituinte mais abundante e compreende um homopolímero constituído por monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante e é um heteropolímero formado de hexoses (manose, glicose e galactose), pentoses (xilose e arabinose) e ácidos urônicos, sendo a xilana o principal polissacarídeo presente. A lignina é um heteropolímero formada pela oxidação de álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, formando unidades de guaiacila, siringila e p-hidroxifenila (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019).

Para a utilização dessa fração lignocelulósica, é necessária a realização de um pré-tratamento, para solubilizar a lignina e expor os polímeros de celulose e hemicelulose, seguido de aplicação de um coquetel enzimático para liberação de açúcares fermentescíveis da biomassa (KUMAR *et al.*, 2021). Os principais açúcares liberados são as hexoses, compostos de seis carbonos (C6), como a glicose, e pentoses, composta por cinco carbonos (C5), como a xilose e arabinose (KUMAR *et al.*, 2021). Apesar do pré-tratamento e da sacarificação contribuírem para o aumento dos custos, a potencialidade de resíduos agroindustriais como matéria-prima se acentua com o avanço da tecnologia e das estratégias de aproveitamento dessa biomassa, atrelado à vantagem de diminuição da quantidade de resíduos totais (SINGH *et al.*, 2022). Dessa forma, por suas características de baixo preço, disponibilidade e capacidade de renovação, os resíduos lignocelulósicos são considerados promissores, podendo ser aproveitados como matérias-primas de segunda geração para a fermentação microbiana (DAHMEN *et al.*, 2019; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

Figura 2 - Organização estrutural e constituição da biomassa lignocelulósica.



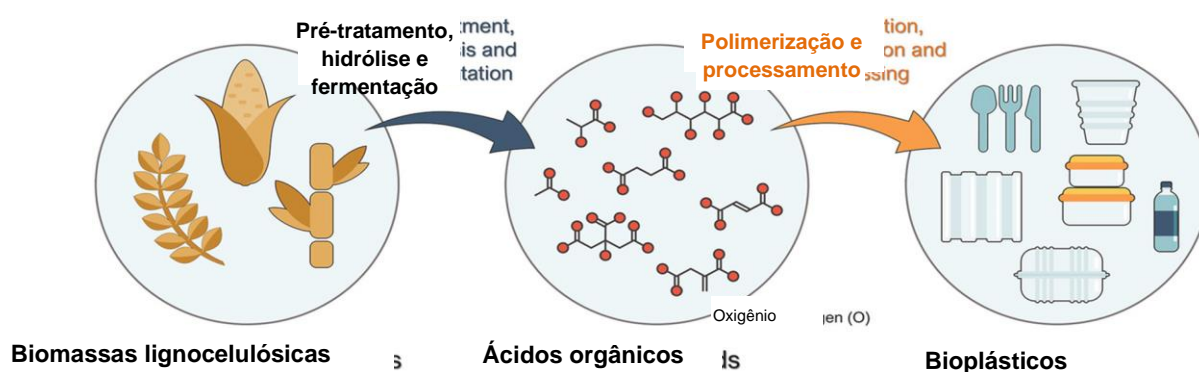
Fonte: DAHMEN *et al.* (2019).

A biotecnologia, portanto, entra como tecnologia que viabiliza a utilização da biomassa e a sua transformação em bioprodutos estimulando a bioeconomia (KIRCHER, 2021). Sob o conceito de biorrefinaria, é possível processar integralmente a biomassa utilizando microrganismos e enzimas para gerar uma diversidade de produtos de elevado valor agregado, como químicos, além de energia (KIRCHER, 2021; SOLARTE-TORO e ALZATE, 2021). A utilização de agentes biológicos de transformação de matérias-primas em produtos é a base dos bioprocessos, os quais são iniciados com a preparação dos meios de cultura. Essa é uma das etapas consideradas “*upstream*”, ou seja, que precedem a fermentação. Além dessa, tem-se a escolha e/ou engenharia do microrganismo, bem como a sua propagação para preparar o inóculo que será utilizado na fermentação. Essa é uma etapa desafiadora, já que o organismo produtor industrial, além de ser eficiente na produção do

bioproduto de interesse, deve ser robusto, tolerando as condições industriais adversas (TRAN e ZHAO, 2021).

Com o avanço da biologia sintética, engenharia metabólica e utilização de técnicas como a de edição genética via CRISPR-Cas9, tem sido possível a construção de microrganismos que possuem as características necessárias para implementação de um processo biotecnológico na indústria. Nesse aspecto, dentre outras aplicações, os microrganismos têm sido modificados geneticamente e utilizados como plataformas microbianas na conversão de açúcares da biomassa vegetal para produção de ácidos orgânicos, reduzindo a dependência de derivados do petróleo para a fabricação de produtos do dia a dia, como os plásticos, segundo a rota de produção mostrada na Figura 3 (GEORGE *et al.*, 2020).

Figura 3 - Visão geral da produção de bioplásticos a partir da fermentação da biomassa lignocelulósica.



Fonte: MAGALHÃES JÚNIOR *et al.* (2021).

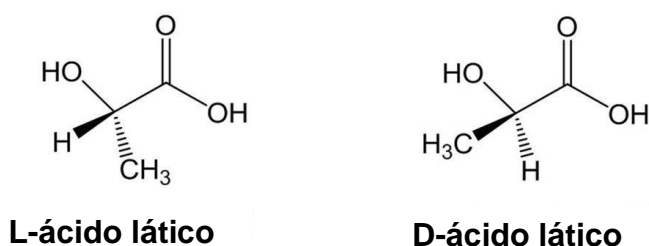
## 1.2 Ácido láctico: produção e aplicações

Dentre as moléculas que podem ser produzidas a partir de rotas microbianas, os ácidos orgânicos são bioprodutos promissores, uma vez que apresentam diversas aplicações e são metabólitos naturais presentes no metabolismo primário e secundário de microrganismos (SUN *et al.*, 2020). O ácido láctico, também chamado de ácido 2-hidroxiopropanóico, é um ácido orgânico de três carbonos amplamente distribuído na natureza. Pela existência de um carbono quiral em sua estrutura, existe em duas formas enantiômeras, porém o L-(+)-ácido láctico (Figura 4) é o produto comercial dominante (MARTINEZ *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2021). Por apresentar inúmeras propriedades com diversas aplicações, o ácido láctico é uma molécula de



grande interesse industrial, apresentando uma crescente demanda no mercado global. Isso pode ser evidenciado pelo fato de que seu mercado em 2017 foi avaliado em 690 milhões de dólares e é estimado atingir 2,09 bilhões em 2023, com potencial para atingir 9,8 bilhões de dólares em 2025 (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022; SINGH *et al.*, 2022). Atualmente, os Estados Unidos e Ásia-Pacífico dominam o mercado de ácido láctico, com diversas empresas produtoras: Nature Works LLC; Corbion Ltd., USA; Chongqing Bofei Biochemical Products, China; Danimer Scientific LLC; Spectrum Chemical Manufacturing Corp.; Hawkins, Inc (SINGH *et al.*, 2022).

Figura 4 – Fórmulas em perspectiva dos dois isômeros do ácido láctico, o L-ácido láctico e o D-ácido láctico.



Fonte: DORDEVIĆ *et al.* (2020).

Além de ser precursor de moléculas e polímeros, o ácido láctico também apresenta aplicações na indústria de cosméticos, alimentícia, química e farmacêutica (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022; MARTINEZ *et al.*, 2013). A indústria química, por exemplo, demanda grandes quantidades de ácido láctico por ser uma plataforma química para a produção de diversos outros compostos, como propilenoglicol, ácido acrílico, ésteres de lactato, óxido de propileno, ácido propanóico-acetaldeído, 2,3-pentanodiona, dilactido, lactato de etila etc. (ABEDI E HASHEMI, 2020; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). O lactato de etila é um dos produtos de destaque porque, além de ser um bom solvente, ainda é seguro ambientalmente, sendo considerado um solvente verde, ao contrário dos solventes derivados do petróleo que são tóxicos, como N-metil-2-pirrolidona (NMP), tolueno, acetona e xileno (LI *et al.*, 2021). O ácido láctico também é usado em agentes desincrustantes, regulador de pH, agentes de limpeza, agentes complexantes de metais, entre outros (ABEDI E HASHEMI, 2020). Além disso, o principal polímero obtido a partir dele, o ácido polilático (PLA), é um bioplástico que pode ser utilizado como uma alternativa renovável aos plásticos petroquímicos (MARTINEZ *et al.*, 2013; UPADHYAYA *et al.*, 2014).

Nesse contexto, os plásticos produzidos a partir do petróleo, por serem extremamente estáveis e recalcitrantes, causam sérios problemas ambientais, como a poluição do solo, acúmulo em cursos d'água e comprometimento da fauna local (RAO *et al.*, 2014; ERNI-CASSOLA *et al.*, 2019; SCHWARZ *et al.*, 2019). Em contrapartida, os biopolímeros, produzidos por rota bioquímica, apresentam características de maior biodegradabilidade, reaproveitamento e biocompatibilidade (SADASIVUNI *et al.*, 2020). Além da sua potencialidade para substituir os polímeros sintéticos, os biopolímeros têm aplicações também em outras áreas, como na geração de dispositivos médicos avançados para *drug delivery*. Entretanto, eles apresentam algumas propriedades de resistência e termoestabilidade consideradas baixas com relação aos plásticos de origem fóssil, o que ainda precisa ser superado (SADASIVUNI *et al.*, 2020).

O PLA é um poliéster alifático biorrenovável derivado de ácido lático e, por ser completamente biodegradável, biocompatível e possuir boa resistência mecânica, termoplasticidade e alta compostabilidade, pode ser utilizado como uma alternativa renovável em relação aos plásticos derivados dos petroquímicos em diversos setores industriais (Figura 5), como têxtil, automotivo, de embalagens, médico e farmacêutico (BALLA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2020; MARTINEZ *et al.*, 2013; UPADHYAYA *et al.*, 2014). O PLA pode ser usado em embalagem de alimentos, como garrafas; utensílios de uso único, como canudos e talheres; na produção de fibras na indústria têxtil, de peças da indústria automotiva, de não tecidos fiados com PLA para cobertura na agricultura, de *scaffolds* para a bioengenharia de tecidos a partir de impressão 3D na área médica, de compósitos para setores de construção civil e de filmes para fabricação de eletrônicos descartáveis (BALLA *et al.*, 2021). Esse biopolímero também apresenta outras características vantajosas para diversas aplicações, como brilho, transparência, resistência a óleo e água, além de ser antibacteriano, retardar chamas e ser facilmente absorvido pelo organismo, podendo ser usado em materiais de embalagem, tecidos não fiados, vestuário, suturas médicas, parafusos ósseos, entre outros (LI *et al.*, 2020).

Figura 5 - Principais aplicações do biopolímero ácido polilático (PLA).



Fonte: Adaptado de Balla *et al.* (2021).

Uma vez que o PLA é considerado um dos materiais poliméricos mais promissores, seu mercado mundial foi avaliado em 525,47 milhões de dólares em 2020 e estima-se que seu crescimento atinja uma taxa de crescimento anual composto (CAGR) de 18,1% até 2028 (BALLA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2020). A crescente demanda desse polímero biodegradável reflete uma grande contribuição no rápido crescimento anual esperado para o ácido lático nos próximos anos (UPADHYAYA *et al.*, 2014). A formação do ácido polilático é feita por síntese química e pode ser realizado por diferentes métodos, como polimerização por condensação direta, condensação por desidratação azeotrópica e polimerização por abertura de anel de lactide (LI *et al.*, 2020). Essa síntese requer a molécula de ácido lático apresentando pureza óptica e química, os quais dependem do processo, sendo biológico ou químico, e do meio de fermentação empregado (UPADHYAYA *et al.*, 2014).

Várias propriedades do PLA são influenciadas pela pureza óptica do ácido lático e a utilização de diferentes aditivos durante a síntese química, a mistura com

outros polímeros ou a formação de copolímeros, permite a variação nas propriedades físicas e reológicas nesse biopolímero, permitindo sua aplicação em outros produtos (LI *et al.*, 2020). Por exemplo, a formação do ácido poliglicólico, um copolímero formado de etileno glicol e ácido lático, melhora as propriedades de hidrofiliabilidade e flexibilidade do biopolímero, permitindo seu uso em suturas cirúrgicas (LI *et al.*, 2020). Além disso, outras moléculas, como a  $\epsilon$ -Caprolactona, podem ser usadas para a formação de outros copolímeros; e outros polímeros de baixo peso molecular, formados por outros ácidos orgânicos, podem ser misturados com o PLA para alterar suas propriedades mecânicas e termodinâmicas (LI *et al.*, 2020). Portanto, o PLA se insere como polímero de alta potencialidade no mercado mundial, tanto por suas características intrínsecas como pela possibilidade de melhoria por meio da utilização de outras moléculas na sua síntese.

Na indústria cosmética, o ácido lático exibe potencial por possuir propriedades para hidratação, umectação, rejuvenescimento e clareamento da pele, mas também é usado como agente antimicrobiano e regulador de pH (ABEDI E HASHEMI, 2020; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022; MARTINEZ *et al.*, 2013). Derivados do ácido lático, os ésteres de lactato também possuem propriedades higroscópicas e emulsificantes interessantes para essa indústria (MARTINEZ *et al.*, 2013). Na indústria farmacêutica, por sua vez, é usado na formulação de produtos, como solução de diálise, preparações minerais, comprimidos, sistema de liberação controlada de drogas, entre outras (ABEDI E HASHEMI, 2020; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). Na indústria alimentícia é normalmente considerado um ingrediente seguro (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) e pode ser aplicado para evitar a proliferação de microrganismos contaminantes, mas também como agente emulsificante em produtos de panificação e como acidulante, intensificador de sabor, viscosificante e crioprotetor na indústria de bebidas (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022; MARTINEZ *et al.*, 2013).

O ácido lático pode ser produzido a partir de síntese química ou a partir da fermentação microbiana (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022; MARTINEZ *et al.*, 2013). As bactérias ácido-láticas (BAL), como as do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus*, são as principais produtoras utilizadas industrialmente, por realizarem naturalmente a fermentação ácido-lática, com o LA como produto final do metabolismo primário (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Apesar da produção biológica de ácido lático já estar bem estabelecida, o custo atrelado a esse produto ainda limita muito a produção

do PLA em larga escala, que requer grandes quantidades do monômero a um custo relativamente baixo, para que o preço desse biopolímero seja competitivo com os plásticos petroquímicos (ZOU *et al.*, 2021). Como as BAL normalmente são fastidiosas nutricionalmente e necessitam de uma suplementação nutricional de alto custo, isso afeta diretamente no preço do produto. De fato, as matérias-primas influenciam em 40 a 70% do custo total do processo e isso, no geral, também impacta nos custos de purificação e na pureza química do ácido láctico, contribuindo para despesas adicionais (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Além disso, apesar da fermentação microbiana apresentar vantagens em relação à síntese petroquímica, por gerar produtos opticamente puros, o que se observa na síntese de ácido láctico por BAL é a variação na pureza óptica desse composto, uma vez que algumas cepas expressam as enzimas de produção dos dois isômeros, como a *Lactobacillus helveticus* (UPADHYAYA *et al.*, 2014; SAITOH *et al.*, 2005). Essas variações na pureza química e óptica do ácido láctico produzido impacta na produção do PLA, porque muitas propriedades do biopolímero são influenciadas por essas características (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de processos a partir de microrganismos capazes de crescer em substratos simples e produzir ácido láctico na sua forma opticamente pura, como já foi observado numa cepa de *Saccharomyces cerevisiae* expressando a L-LDH bovina em Saitoh *et al.* (2005).

Outro fator que influencia enormemente na utilização industrial dessas bactérias é que a maioria delas não consegue sobreviver em pH menor que 4 (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Por causa disso, durante a fermentação, é necessária a adição de agentes neutralizantes, normalmente o óxido de cálcio, e a maioria do ácido láctico presente fica na forma de lactato de cálcio. Para a recuperação do produto, então, é necessária uma acidificação do meio fermentado, usualmente com ácido sulfúrico. Essa acidificação causa, além da recuperação do produto, a formação de grandes quantidades de sulfato de cálcio, também conhecido como gesso (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Mais de uma tonelada de gesso é formada a cada produção de uma tonelada de ácido láctico (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Isso é desvantajoso do ponto de vista industrial, ambiental e econômico, pois a utilização de ácido forte traz problemas de corrosão dos equipamentos e a geração do gesso que, além de encarecer a fase de recuperação do produto final, acarreta um notável impacto ambiental devido ao problema da destinação desse resíduo (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Além disso, por meio de uma análise técnico-econômica considerando uma

biorrefinaria produtora de ácido lático, constatou-se que o custo dos neutralizantes e acidificantes nesse cenário contribuíram para 26% do custo anual de materiais (LI *et al.*, 2021). Isso reforça a necessidade da utilização de microrganismos tolerantes ao baixo pH na produção de ácido lático, já que nesse cenário esses químicos não seriam necessários, contribuindo para melhorar substancialmente a sustentabilidade desse bioprocessos (LI *et al.*, 2021). Assim, o uso de um microrganismo não fastidioso, capaz de consumir os açúcares do hidrolisado lignocelulósico, produzir grandes quantidades de ácido lático e, concomitantemente, tolerar o baixo pH e os inibidores associados do processo, se torna imprescindível para possibilitar a implementação do processo e geração de produtos com custo competitivo (UPADHYAYA *et al.*, 2014)

### **1.3 *Saccharomyces cerevisiae* como plataforma microbiana produtora de ácido lático**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo de grande interesse e aplicabilidade industrial, já sendo tradicionalmente utilizado em vários processos, como na produção de cerveja, vinho e bioetanol (PARAPOULI *et al.*, 2020). Atualmente, essa levedura tem ganhado destaque também na produção de diversos outros produtos, como medicamentos (proteínas recombinantes), aditivos de alimentos (vitaminas e antioxidantes), químicos e biocombustíveis (GAMBACORTA *et al.*, 2020; HONG e NIELSEN, 2012). Dentre os químicos que podem ser produzidos, os *fine chemicals*, como antibióticos e enzimas, são químicos produzidos em baixo volume e vendidos a preços altos, enquanto os *bulk chemicals*, como solventes, aminoácidos e precursores de polímeros, ocorre o contrário (HONG e NIELSEN, 2012). Nessas aplicações, a levedura é usada como *chassi* microbiano, um organismo que incorpora e suporta as modificações genéticas necessárias para sua transformação em uma “fábrica celular” do composto de interesse, ou seja, uma plataforma de produção microbiana (CHI *et al.*, 2019; HONG e NIELSEN, 2012).

Dentre as vantagens de empregar a *S. cerevisiae* em processos industriais, destacam-se o requerimento nutricional simples, o crescimento rápido, a robustez (capacidade de manter a homeostase mesmo em condições adversas) e a compatibilidade com regulações de segurança, por ser reconhecida como organismo GRAS (ABBOTT *et al.*, 2009; GAMBACORTA *et al.*, 2020; NIELSEN e KEASLING, 2016). Além disso, por ser um organismo modelo, existe conhecimento extensivo da

sua genética, fisiologia e metabolismo, o que facilita a modificação genética por ferramentas já desenvolvidas (ABBOTT *et al.*, 2009; PAES e ALMEIDA, 2014). Dessa forma, essa levedura se insere com *chassi* microbiano ideal para uma diversidade de aplicações industriais.

No Brasil, cepas de *S. cerevisiae* foram isoladas de processos de produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar em diversas regiões do país. Essa seleção deu origem a um grupo de leveduras superiores, como as cepas Barra Grande 1 (BG-1), Catanduva 1 (CAT-1), Pedra 2 (PE-2) e Santa Adelia 1 (SA-1), as quais se destacam por apresentar maior robustez, boa sobrevivência em face a estresses do processo e alta produção de etanol (BASSO *et al.*, 2008). Dentre essas leveduras, a PE-2 se destaca tanto na produção de etanol, sendo utilizada em diversas usinas brasileiras, como também como cepa promissora para outras aplicações, devido a suas características de boa tolerância a alta densidade celular, estresse oxidativo, altas temperaturas, estresse osmótico, baixo pH e contaminação bacteriana (BASSO *et al.*, 2008; HONG and NIELSEN, 2012).

No contexto de produção de ácido lático, a levedura *S. cerevisiae* apresenta grande potencial por sua maior capacidade de suportar condições de menor pH do que as bactérias ácido lácticas, por suas membranas apresentarem permeabilidade seletiva aos prótons (ABEDI e HASHEMI, 2020; TRAN e ZHAO, 2021). Em um estudo de tolerância a estresse ácido realizado com 41 cepas de *S. cerevisiae*, sendo elas laboratoriais, industriais e isoladas da natureza, verificou-se que a PE-2 foi a levedura que cresceu melhor em condições de baixo pH como 2,5 (CORADINI *et al.*, 2021). Além disso, algumas linhagens derivadas da PE-2 já foram desenvolvidas para o consumo de outros açúcares do hidrolisado lignocelulósico, como a xilose, a qual não é naturalmente metabolizada pela *S. cerevisiae* (BUENO *et al.*, 2020; DOS SANTOS, *et al.*, 2016; PALERMO *et al.*, 2021). Assim, uma vez que há necessidade de desenvolvimento de processos mais eficientes e com maior viabilidade econômica para a produção de ácido lático, a levedura *S. cerevisiae* PE-2 se insere como *chassi* ideal para o desenvolvimento de linhagens produtoras desse *bulk chemical* a partir de açúcares de segunda geração.

O desenvolvimento dessa plataforma microbiana produtora de ácido lático pode ser atingido pelo uso de técnicas de engenharia metabólica e biologia sintética, para melhorar a produção, sobrevivência do microrganismo e recuperação do produto (UPADHYAYA *et al.*, 2014). A engenharia metabólica é a ciência que compreende o

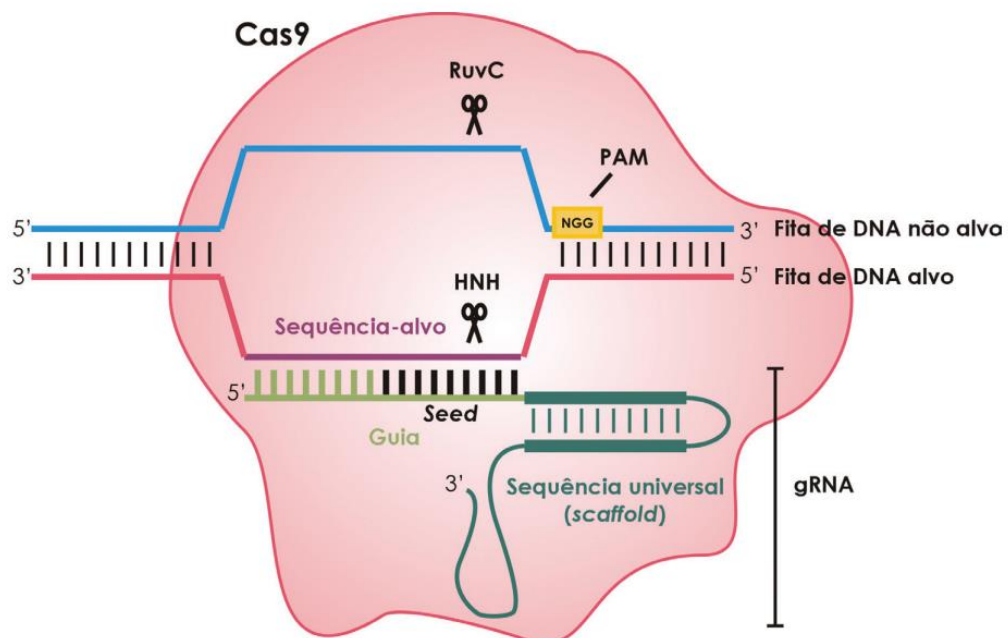
redesenho do metabolismo para tornar a produção do produto de interesse mais eficiente, seja ele um metabólito nativo ou não (NIELSEN e KEASLING, 2016). O ciclo de realização da engenharia metabólica, conhecido como DBTL (*design-build-test-learn*), consiste na implementação de um desenho metabólico por sucessivas modificações genéticas e caracterização fenotípica (NIELSEN e KEASLING, 2016). Dessa forma, a cada ciclo, realiza-se o planejamento da engenharia genética, a construção da cepa, o teste fermentativo e, a partir disso, tira-se conclusões, que serão levadas para os próximos ciclos, objetivando concluir o redesenho do metabolismo desejado (JULLESSON *et al.*, 2015; NIELSEN e KEASLING, 2016). Com a introdução da via biossintética e obtenção da produção do composto de interesse, tem-se o estabelecimento da cepa prova de princípio, a qual ainda será modificada por outras rodadas do ciclo DBTL para a melhoria da produção, com final construção da cepa que será empregada comercialmente. Dessa forma, os requerimentos comerciais de concentração, produtividade e rendimento, também conhecido como T-R-Y (*titer, rate, yield*) podem ser atingidos, para o desenvolvimento de bioprodutos economicamente competitivos (JULLESSON *et al.*, 2015). Entretanto, essa etapa é inerentemente complexa, devido à intrincada regulação do metabolismo dos microrganismos, que deve ser superada para o direcionamento do fluxo de carbono para o composto de interesse, e normalmente envolve inúmeros ciclos DBTL e inclui as mais variadas técnicas de biologia sintética (NIELSEN e KEASLING, 2016).

Como recente técnica molecular de edição gênica, o CRISPR-Cas9 é um sistema de engenharia genética que se destaca para o desenvolvimento de cepas modificadas geneticamente (CHOI *et al.*, 2019). Na engenharia metabólica, muitas vezes é necessário a deleção, inserção, mutação e superexpressão de diversos genes, o que pode ser atingido por esse sistema pela possibilidade de atuar em qualquer sequência desejada (STOVICEK *et al.*, 2015). O CRISPR-Cas9 é uma técnica que promove quebras específicas na dupla fita de DNA pela endonuclease Cas9, direcionada pelo RNA guia, o qual especifica o sítio de clivagem dentro do genoma (PEREIRA *et al.*, 2016). Assim, essa técnica envolve a participação de três moléculas: uma nuclease (a Cas9), um RNA guia (ou gRNA) e o gene-alvo. A Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, a enzima normalmente empregada em modificações genéticas, é uma proteína bacteriana bilobulada, contendo um lóbulo de reconhecimento e um de atividade nucleásica, o qual possui os domínios catalíticos, RuvC e HNH, e o domínio de interação com PAM (Protospacer Adjacent Motif - NGG),



o PI (PEREIRA *et al.*, 2016). O gRNA é composto por uma sequência guia, específica para o alvo genético, e uma sequência universal, também chamada de *scaffold*, formando uma estrutura em grampo, como mostrado na Figura 6. Logo após a região a ser clivada no genoma, é necessário que haja uma sequência PAM, a qual é primordial para formar a associação do complexo Cas9/gRNA com a região alvo do DNA (Figura 6). No mecanismo de ação, o gRNA causa uma alteração na estrutura da Cas9, formando o domínio PI nessa enzima, o qual interage com o motivo PAM presente na fita adjacente de DNA. Isso culmina na estabilização do DNA-alvo, iniciando a interação com o RNA-guia, a partir do *seed*, um domínio da sequência-guia (PEREIRA *et al.*, 2016). Caso haja o pareamento total, ocorre a separação da dupla fita de DNA e a estabilização do complexo inteiro. Em seguida, ocorre a clivagem da fita-alvo (pela HNH) e da outra fita (por RuvC), cerca de 4 pb antes da sequência PAM. Após essa quebra no sítio de clivagem, a célula naturalmente realiza um reparo no DNA, o qual pode ser por junção de pontas não homólogas (NHEJ) ou direcionado por homologia (HR) (PEREIRA *et al.*, 2016). No mecanismo HR, é necessário fornecer à célula uma molécula de DNA linear que contém homologia com ambas as extremidades geradas pela clivagem, conhecido como DNA doador, ou *donor* (CHOI *et al.*, 2019).

Figura 6 - Representação ilustrativa da interação Cas9/gRNA e DNA-alvo, complexo formado na técnica de edição genética CRISPR-Cas9.



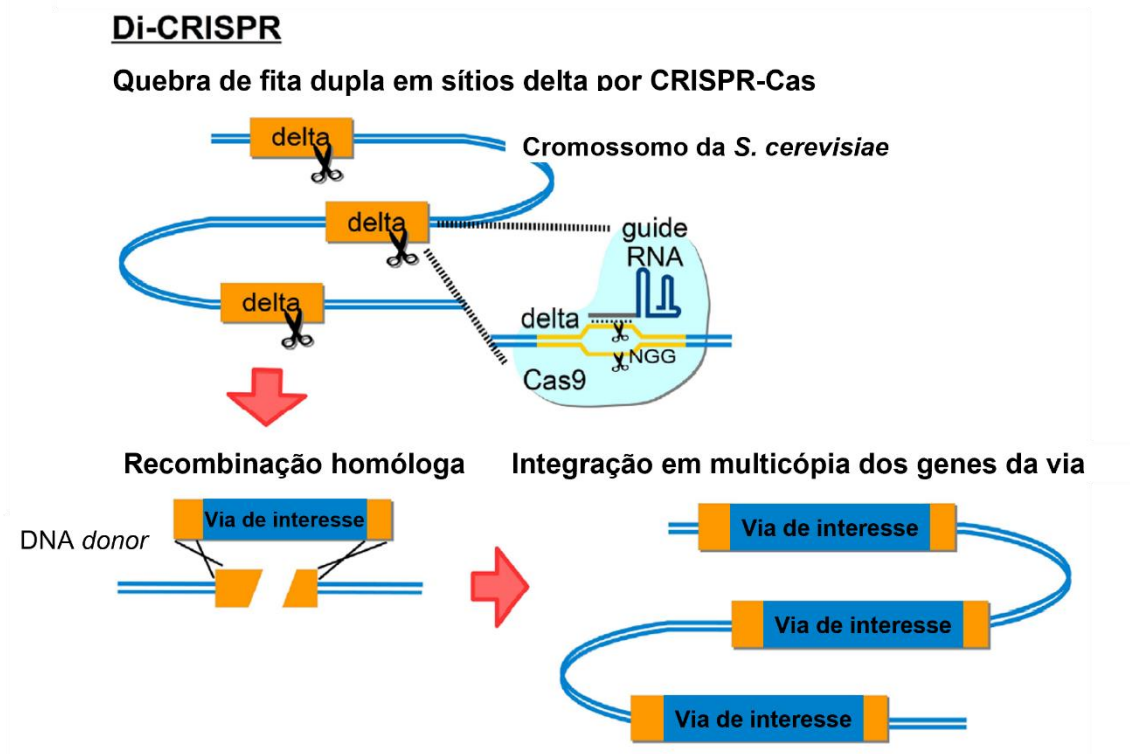
Fonte: PEREIRA *et al.* (2016).

Apesar da *Saccharomyces cerevisiae* produzir naturalmente apenas baixas concentrações de ácido láctico, essa produção pode ser aumentada por meio da expressão heteróloga da via de fermentação láctica, que consiste em apenas uma enzima, a lactato desidrogenase (LDH), como mostrado na Figura 8 (ABBOTT *et al.*, 2009; TAKAGI e KITAGAKI, 2015). Porém, para que haja produção eficiente de ácido láctico a partir desse *chassi*, é necessário ainda outras modificações genéticas: o redirecionamento de carbono do metabolismo do etanol para a via de interesse, o estabelecimento do equilíbrio de cofatores energéticos, a deleção de vias competidoras e consumidoras do ácido láctico, a modificação genética de transportadores de ácidos orgânicos e, além disso, incorporação de genes relacionados à resistência a estresse ácido e aos inibidores presentes no hidrolisado. Algumas dessas estratégias de engenharia metabólica já foram realizadas em outros trabalhos visando a produção de ácido láctico por *S. cerevisiae* (BAEK *et al.*, 2016; BAEK *et al.*, 2017; COLOMBIÉ E SABLAYROLLES, 2004; ISHIDA *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2006; JANG *et al.*, 2021; KAWAHATA *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2019; LAM *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016; LIAN *et al.*, 2018; MIMITSUKA *et al.*, 2015; MITSUI *et al.*, 2020; NOVY *et al.*, 2017; NOVY *et al.*, 2018; PACHECO *et al.*, 2011; RYU *et al.*, 2018; SAITOH *et al.*, 2005; *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2016; SUGIYAMA *et al.*, 2016; SUZUKI *et al.*, 2013; TOKUHIRO *et al.*, 2009; TURNER *et al.*, 2015; TURNER *et al.*, 2016; TURNER *et al.*, 2017; VAN MARIS *et al.*, 2004; WATCGARAWIPAS *et al.*, 2021; YAMADA *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2019). Porém, a maioria dessas pesquisas foca na utilização de cepas laboratoriais, como SR8, CEN.PK e S288C, as quais são menos robustas que as cepas industriais e, portanto, podem causar desafios na implementação na indústria, já que as condições de fermentação industrial estão longe do ótimo para o crescimento e sobrevivência da levedura (BAEK *et al.*, 2016; BAEK *et al.*, 2017; JANG *et al.*, 2021; KAWAHATA *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2019; LAM *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016; MIMITSUKA *et al.*, 2015; MITSUI *et al.*, 2020; NOVY *et al.*, 2017; NOVY *et al.*, 2018; PACHECO *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2016; SUZUKI *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2015; TURNER *et al.*, 2016 ; TURNER *et al.*, 2017; VAN MARIS *et al.*, 2004; WATCHARAWIPAS *et al.*, 2021; YAMADA *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2019). Além disso, poucas cepas foram desenvolvidas para a produção de ácido láctico a partir de

açúcares de segunda geração (JANG *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2019; LAM *et al.*, 2021; NOVY *et al.*, 2017; NOVY *et al.*, 2018; TURNER *et al.*, 2015; TURNER *et al.*, 2016). Isso evidencia a importância da utilização de cepas industriais, como a PE-2, como *chassi* microbiano para desenvolvimento de leveduras capazes de crescer em hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, em ambiente industrial, para a produção de ácido láctico.

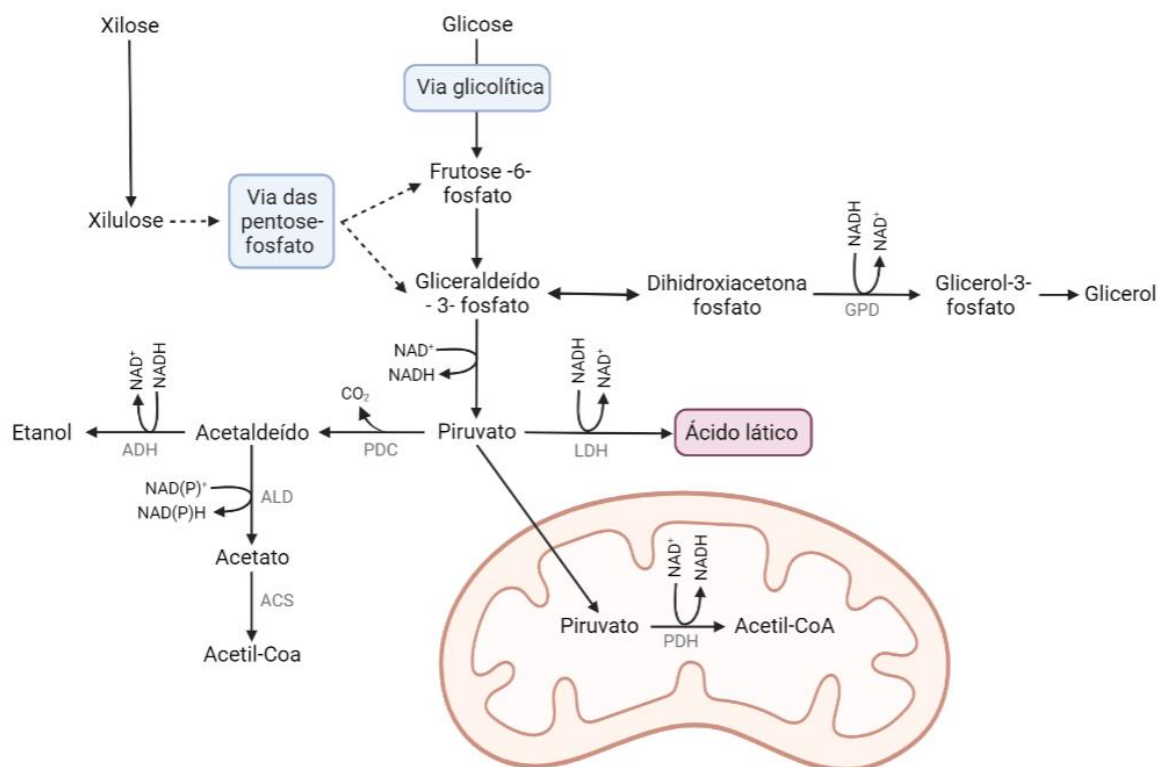
Os primeiros passos do ciclo de engenharia metabólica para o desenvolvimento dessa plataforma microbiana produtora de ácido láctico compreendem tanto a expressão heteróloga da enzima LDH como também o redirecionamento de carbono do metabolismo do etanol para a fermentação láctica (Figura 8). Como a produção de ácido láctico é dependente da cepa escolhida e da origem da enzima, primeiro é importante que haja a prospecção da LDH que é melhor expressa e ativa no *chassi* escolhido (BRANDUARDI *et al.*, 2006). Além disso, também é interessante que, em um processo industrial, a enzima expressa heterologicamente esteja integrada no genoma do organismo, evitando a necessidade de adição de antibiótico ou de utilização de meios quimicamente definidos para a manutenção do plasmídeo (BAI FLAGFELDT *et al.*, 2009). A integração cromossômica também oferece vantagens como o controle do número de cópias e evita a instabilidade segregacional dos plasmídeos (DA SILVA *et al.*, 2012). Dessa forma, diversas estratégias de integração cromossomal tem sido avaliadas para a levedura *S. cerevisiae*. Uma das mais promissoras utilizadas é a integração em elementos  $\delta$  (delta) do genoma, sequências LTR (*Long Terminal Repeats*) dos retrotransposons 1 e 2 de levedura (Ty1 e Ty2) (CURCIO *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2012). A partir disso, objetiva-se a inserção em multicópia do fragmento de interesse no genoma, já que há centenas de elementos delta dispersos nos cromossomos da *S. cerevisiae* (DA SILVA *et al.*, 2012). A partir do desenho de um RNA-guia capaz de conduzir a clivagem do DNA nos elementos delta via CRISPR-Cas9, é possível promover a recombinação homóloga dos genes de interesse em diversas cópias no genoma, como mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Mecanismo de integração em multicópia do fragmento de DNA de interesse pela técnica de DI-CRISPR, delta-integration (integração em elementos delta).



Com relação ao redirecionamento de carbono, a *S. cerevisiae* é uma levedura que apresenta o efeito Crabtree-Warburg, realizando fermentação alcoólica mesmo em condições aeróbicas, quando na presença de elevadas concentrações de glicose (GAMBACORTA *et al.*, 2020). Esse efeito é controlado por inúmeros sistemas de detecção da glicose e regulação do metabolismo, como Rgt1p/Snf3p, Snf1p/Mig1p e cAMP/PKA, os quais primeiramente são responsáveis pelo aumento do metabolismo de glicose, com posterior repressão de enzimas da respiração (GAMBACORTA *et al.*, 2020). Isso demonstra o intrincado metabolismo do etanol nessa levedura, já que possui um papel essencial no balanço redox, relacionado com o balanço dos cofatores NADH/NAD<sup>+</sup>, e outros aspectos da fisiologia e homeostase da célula (GAMBACORTA *et al.*, 2020). Em face da centralidade dessa via e da complexidade da intrincada regulação do metabolismo de glicose e produção de etanol, o redirecionamento do metabolismo do etanol ainda representa um desafio na construção de *S. cerevisiae* como plataforma microbiana produtora de biorrenováveis.

Figura 8 - Metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* contendo a via heteróloga de fermentação láctica



Fonte: Elaborado pela autora. ADH: Álcool desidrogenase, ALD: Aldeído desidrogenase, ACS: Acil-CoA sintetase, LDH: Lactato desidrogenase; GPD: Glicerol-3-fosfato desidrogenase; PDC: Piruvato Descarboxilase; PDH: Piruvato desidrogenase.

A via de produção do etanol compreende 2 reações entre o piruvato e o etanol, catalisadas pelas enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) (Figura 8). No genoma da *S. cerevisiae*, existem 3 genes estruturais que codificam para isoenzimas funcionais da PDC, *PDC1*, *PDC5* e *PDC6*; e 7 genes que codificam para ADH, *ADH1-7* (DE SMIDT *et al.*, 2008; FLIKWEERT *et al.*, 1996). Esforços iniciais objetivaram a deleção dos genes da ADH, porém as células resultantes apresentavam alta produção de glicerol, resultante do desbalanço de cofatores, e baixa sobrevivência, pelo acúmulo de acetaldeído, que é tóxico para a célula (ABBOTT *et al.*, 2009). Então, a deleção das isoenzimas da PDC passou a ser o objetivo dos pesquisadores. Entretanto, essas células também possuem grandes prejuízos fisiológicos, devido tanto ao desbalanço de cofatores, que culmina no acúmulo de glicerol, mas também à hipersensibilidade a altas concentrações de glicose, relacionados com o efeito Crabtree (ABBOTT *et al.*, 2009; GAMBACORTA *et al.*, 2020). De fato, como a via do etanol não está presente para a reoxidação do NADH produzido na glicólise e o efeito Crabtree culmina na superexpressão de genes envolvidos no transporte de glicose, na glicólise e na repressão de genes da

fosforilação oxidativa, há uma ineficiência na regeneração de NAD<sup>+</sup> em condições de alta concentração de glicose, o que faz as células apresentarem um baixo crescimento. Além disso, como o acetaldeído produzido pela PDC é o substrato para a produção citosólica de Acetil-CoA, uma biomolécula essencial para a síntese de lisina e lipídeos no citosol, as células sem as PDCs demonstram uma auxotrofia a C<sub>2</sub>, pois só conseguem apresentar um melhor crescimento quando há suplementação de substratos de 2 carbonos, como acetato e etanol, que permitem a produção de Acetil-CoA citosólico (ABBOTT *et al.*, 2009; GAMBACORTA *et al.*, 2020). Diante disso, inúmeros esforços tem sido realizados para contornar esses prejuízos, como a deleção de genes envolvidos na detecção e importação da glicose, para aliviar a repressão por glicose causada pelo efeito Crabtree, a evolução adaptativa na presença de altas concentrações de glicose, o desenvolvimento de rotas alternativas para a geração de Acetil-CoA citosólico, a incorporação de genes de transporte de Acetil-CoA mitocondrial para o citosol (*Ach1p* - uma CoA transferase), entre outros (GAMBACORTA *et al.*, 2020). Entretanto, essas estratégias não são suficientes para restaurar a taxa de crescimento da *S. cerevisiae* no mesmo nível da levedura com a via do etanol ativa.

Em relação ao desbalanço de cofatores que ocorre em leveduras com a deleção total da via do etanol, o balanço redox pode ser restaurado por meio da incorporação de vias que requerem a mesma quantidade de equivalentes redutores que o etanol (GAMBACORTA *et al.*, 2020). De fato, estequiometricamente, a via de produção de lactato é equivalente a via de produção de etanol e CO<sub>2</sub>, com balanço energético e de cofatores similares, já que nessas fermentações ocorre a reoxidação de duas moléculas de NADH gerado na glicólise (ABBOTT *et al.*, 2009; GAMBACORTA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021). Entretanto, mesmo que o balanço redox NADH/NAD<sup>+</sup> seja teoricamente restaurado, cepas de *S. cerevisiae* apenas com a fermentação láctica demonstraram baixa capacidade de crescimento em condições anaeróbicas, evidenciando que a exportação de ácido láctico é dependente de ATP, ao contrário do etanol, que atravessa a membrana por difusão passiva (ABBOTT *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2021). Portanto, não é possível a substituição total da via do etanol pela via do ácido láctico, devido a desregulação do metabolismo, depleção de ATP intracelular e comprometimento do crescimento microbiano.

Dessa forma, a atenuação da via do etanol tem se mostrado uma estratégia promissora para o redirecionamento de carbono, capaz de aumentar a produção do

composto de interesse ao mesmo tempo que mantém os aspectos fisiológicos da célula. Entretanto, é necessário que se atinja um ponto ótimo, para que, ao mesmo tempo que a atenuação da via do etanol não prejudique a célula, a produção desse composto também não afete os rendimentos do processo. Para isso, os genes codificando as enzimas da via do etanol, PDC e ADH, tem sido alvos de deleção em diferentes combinações (BAEK *et al.*, 2016). Porém, como as isoenzimas PDC1 e PDC5 são as enzimas com maior atividade, juntamente com a ADH1, normalmente elas são os alvos principais para a construção de *S. cerevisiae* produtora de outros bioquímicos (BORODINA e NIELSEN, 2014; TOKUHIRO *et al.*, 2019). Alguns trabalhos realizam apenas a deleção da PDC1 da via do etanol (ISHIDA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2015; MIMITSUKA *et al.*, 2015; MITSUI *et al.*, 2020, RYU *et al.*, 2018, SONG *et al.*, 2016; SUGIYAMA *et al.*, 2016; SUZUKI *et al.*, 2013). Outros, realizam a deleção da PDC1 e da PDC5 (ISHIDA *et al.*, 2006; LAM *et al.*, 2021; NOVY *et al.*, 2017; NOVY *et al.*, 2018; STOVICEK *et al.*, 2015). Porém, muitos trabalhos focam na deleção da PDC1 e da ADH1 ou mais isoenzimas da ADH, objetivando esse equilíbrio entre a via do composto de interesse e a via do etanol (BAEK *et al.*, 2016; BAEK *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2022; LEE e SEO, 2019; TOKUHIRO *et al.*, 2009; WATCGARAWIPAS *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2022; YAMADA *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2019).

Apesar das cepas industriais, como a PE-2, já apresentarem boa tolerância a pH baixo, normalmente esse fenótipo é avaliado frente a ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), situação em que os prótons não conseguem entrar na célula, devido a permeabilidade seletiva da levedura, e afetam principalmente a parede celular (CORADINI *et al.*, 2021; GENG *et al.*, 2017). Para haver a produção eficiente de ácido láctico, entretanto, é necessário que essa tolerância seja ainda mais aprimorada, uma vez que ácidos orgânicos fracos, contendo o próton associado ao grupamento carboxila (forma não dissociada - RCOOH), conseguem atravessar a membrana por difusão passiva quando em altas concentrações, ocorrendo liberação dos prótons no meio intracelular (GENG *et al.*, 2017; TRAN e ZHAO, 2021). Os ácidos orgânicos possuem predominantemente essa forma não dissociada quando o pH do meio está abaixo do seu pKa, que conceitualmente é o pH em que o ácido se encontra 50% dissociado e 50% não dissociado. Portanto, quando mais baixo o pH do meio, maior predominância de ácido na sua forma não dissociada. Uma vez dentro das células, como há o aumento do

pH, ocorre a dissociação do ácido, com acúmulo de prótons e forma aniônica do ácido (no caso do ácido láctico, o lactato) (TRAN e ZHAO, 2021).

Além do acúmulo do próprio lactato ser tóxico, resultando em aumento da pressão de turgor e possivelmente causar outras ações inibitórias, a acidificação intracelular compromete o funcionamento do microrganismo, levando ao aumento da atividade da bomba de prótons e impactando consideravelmente na depleção de ATP, o qual causa inibição de alguns processos metabólicos importantes (ARNEBORG *et al.*, 2000; TRAN e ZHAO, 2021; TAKAGI e KITAGAKI, 2015). Além disso, o ácido láctico também afeta a homeostase de aminoácidos, causa estresse oxidativo e atinge os ácidos graxos da membrana, interferindo na fluidez e estabilidade das proteínas membranares (SUZUKI *et al.*, 2012; TAKAGI e KITAGAKI, 2015). Apesar da forma não dissociada ser a forma mais tóxica a célula, o ideal para um processo de produção de ácido láctico é que ela ocorra em pH igual ou inferior ao pKa do ácido láctico (3,78), pois dessa forma permitiria a recuperação direta do produto (UPADHYAYA *et al.*, 2014). Assim, o microrganismo utilizado como plataforma microbiana produtora de ácido láctico tem que ser capaz de crescer em pH menor que 3,78 e na presença de concentrações altas desse ácido orgânico.

Além da produção de ácido láctico, que causa toxicidade à célula, o hidrolisado lignocelulósico apresenta concentrações significativas de inibidores do crescimento microbiano, derivadas do pré-tratamento da biomassa (ALMEIDA *et al.*, 2007; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). Esses compostos podem causar inibição de genes glicolíticos, aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e comprometimento do citoesqueleto e mitocôndria (MARTÍN e JÖNSSON, 2003; TRAN e ZHAO, 2021). Dentre esses inibidores, como fenólicos e aldeídos furanos, também estão presentes outros ácidos orgânicos, como o ácido acético, levulínico e ácido fórmico (ALMEIDA *et al.*, 2007; PIOTROWSKI *et al.*, 2014; MARTÍN e JÖNSSON, 2003; TRAN e ZHAO, 2021). Esse ambiente de baixo pH, associado com a presença de grandes concentrações de ácido láctico e outros inibidores, tende a causar uma sinergia de estresses e prejudicar a performance da célula (TRAN e ZHAO, 2021). Dessa forma, para o desenvolvimento de linhagens capazes de tolerar essa sinergia de estresses, estratégias como a engenharia genética de fatores de transcrição envolvidos com a resposta a estresses, a evolução adaptativa laboratorial, a engenharia genética por bibliotecas de modulação de genes e o cruzamento com leveduras resistentes, podem ser exploradas (TRAN e ZHAO, 2021). Por isso, a busca



por cepas que já apresentem resistência é primordial para a construção dessa plataforma microbiana, uma vez que a partir delas é possível a prospecção de genes de resistência e de cepas promissoras para cruzamentos com o *chassi* microbiano escolhido.

Leveduras não convencionais, ou seja, leveduras que não são do gênero *Saccharomyces*, formam um grupo diverso de organismos que podem ser explorados biotecnologicamente e, atualmente, elas têm ganhado cada vez mais atenção (GEIJER *et al.*, 2022). Essas leveduras se destacam por possuírem características interessantes industrialmente, como capacidade de utilização de fontes de carbono complexas, inclusive dissacarídeos e polissacarídeos, e alta tolerância a condições estressantes, como baixo pH, altas temperaturas, alta osmolaridade e presença de inibidores do hidrolisado lignocelulósico (GEIJER *et al.*, 2022; YAMAKAWA *et al.*, 2020). Alguns exemplos de leveduras não convencionais que tem se destacado são: *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces stakeyi*, *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Spathaspora passalidarum*, *Rhodotorula toruloides*, *Phaffia rhodozyma* e *Brettanomyces bruxellensis* (GEIJER *et al.*, 2022; WENDLAND, 2019; YAMAKAWA *et al.*, 2020). Essa biodiversidade, então, pode ser explorada por meio do estudo das bases moleculares responsáveis pelos fenótipos relevantes industrialmente para o desenvolvimento de cepas de *S. cerevisiae* mais robustas. Além disso, outras cepas de *S. cerevisiae*, isoladas de ambientes ácidos, por exemplo, também podem ser exploradas nesse sentido.

Assim, esse trabalho objetivou a construção de uma linhagem de *S. cerevisiae* para a produção de ácido lático, utilizando uma cepa derivada da linhagem industrial PE-2 como *chassi* microbiano. Esse *chassi* microbiano já apresenta certas características interessantes para a conversão do hidrolisado lignocelulósico em bioprodutos, como a capacidade metabólica de utilização da xilose como fonte de carbono, além da glicose, e certa tolerância ao ambiente ácido. Dessa forma, este trabalho pretendeu gerar uma cepa inicial “prova de princípio” apresentando a deleção parcial da via da fermentação alcoólica e a expressão heteróloga da via de fermentação láctica, além de apontar cepas potenciais contendo os fenótipos desejados para a plataforma microbiana, a partir da triagem de cepas de *S. cerevisiae* e de leveduras não convencionais. Assim, será possível o desenvolvimento de um microrganismo que viabilize a produção do precursor de PLA a partir de um recurso

renovável e um processo mais sustentável, imprescindível para o desenvolvimento de uma bioeconomia e geração de alternativas para os produtos petroquímicos como o plástico.

As perguntas de partida deste trabalho consistiram em: As leveduras *S. cerevisiae* e leveduras não convencionais presentes no banco de cepas do laboratório exibem potencial para serem exploradas para o desenvolvimento da plataforma microbiana produtora de ácido láctico? A *S. cerevisiae* PE-2, parental da levedura utilizada como *chassi* microbiano neste estudo, já apresenta fenótipos necessários para o desenvolvimento da plataforma microbiana, como resistência ao ácido láctico e aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico? A deleção dos genes *PDC1* e *PDC1/ADH1* da via do etanol prejudicam a performance da cepa no crescimento em xilose ou glicose? A deleção dos genes *PDC1* e *PDC1/ADH1* são suficientes para o redirecionamento de carbono para a via de fermentação láctica? Qual é a enzima LDH mais promissora para produção de ácido láctico e consequente integração no genoma na cepa de levedura escolhida como *chassi* microbiano?

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Construir uma linhagem geneticamente modificada da levedura *S. cerevisiae* derivada da PE-2 para a eficiente conversão de açúcares da biomassa lignocelulósica, como glicose (C6) e xilose (C5), em ácido láctico.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a tolerância de cepas de *S. cerevisiae* e de leveduras não convencionais ao ácido láctico e ao hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, para definir a cepa *background* das modificações genéticas e identificar cepas promissoras para cruzamentos com a plataforma microbiana desenvolvida e para prospecção de genes de resistência;
2. Avaliar o impacto da deleção parcial da via de produção do etanol na performance de crescimento da cepa de *S. cerevisiae* BR-X5, derivada da PE-2;
3. Identificar a melhor enzima lactato desidrogenase (LDH) expressa na *S. cerevisiae* BR-X5 com deleção parcial da via do etanol a partir da triagem de quatro enzimas LDH de diferentes organismos;
4. Avaliar as linhagens de *S. cerevisiae* desenvolvidas, por meio de ensaios fermentativos, quanto a capacidade de produção de ácido láctico e quanto ao redirecionamento do fluxo de carbono pela deleção parcial da via de produção de etanol;
5. Construir plasmídeos para a integração genômica em diversas cópias da LDH escolhida.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Microrganismos e reagentes utilizados

A levedura BR-X5 utilizada para a engenharia metabólica é uma linhagem haplóide derivada da PE-2 e contém a via completa de utilização de xilose, com a superexpressão de *XKS1* e dos quatro componentes da via das pentoses fosfato, *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1*, além de múltiplas cópias do gene que codifica a enzima xilose isomerase, *xyIA*. A linhagem ainda possui mutações pontuais que aumentam a sua capacidade de converter xilose (comunicação pessoal). As demais cepas de leveduras e bactérias utilizadas foram obtidas em diferentes bancos de cepas nacionais e internacionais. Os plasmídeos utilizados para montagem dos outros plasmídeos do estudo (pJASPR\_6A\_nat e pJASPR\_6B), expressão da enzima Cas9 (pJACas-K) e obtenção dos genes das LDHs (pLDH – *Bos taurus*, pLDH – *Lactobacillus heveticus*, pLDH – *Lactobacillus plantarum* e pLDH – *Lacticaseibacillus casei*) foram obtidos a partir de parcerias.

O hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana de açúcar foi produzido pela Planta Piloto para Desenvolvimento de Processos (PPDP) e Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), por tratamento ácido e hidrólise enzimática conduzida com coquetel enzimático desenvolvido no LNBR (FONSECA *et al.*, 2020). O hidrolisado utilizado continha: 47,07 g/L de glicose, 53,89 g/L de xilose, 2,26 g/L de arabinose, 0,34 g/L de ácido fórmico, 9,6 g/L de ácido acético e 0,0775 g/L de ácido levulínico. Além disso, a enzima Polimerase Phusion de alta fidelidade também foi produzida e purificada no LNBR do CNPEM. Os *primers* foram sintetizados pela empresa Exxtend (Paulinia-SP). Os demais reagentes, como extrato de levedura, peptona, ácido láctico, ácido clorídrico, hidróxido de potássio, base de nitrogênio de levedura, aminoácidos, glicose, xilose, nourseotricina, geneticina, ampicilina, zeocina, kanamicina, triptona, ágar, cloreto de sódio, glicerol, acetato de sódio, solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, etanol, acetato de lítio, SDS, cloreto de magnésio, dNTP, polietilenoglicol, entre outros, foram adquiridos comercialmente.

### 3.2 Tolerância a estresses

#### 3.2.1 Spot assay em meio mínimo com ácido láctico

A partir de experimentos anteriores do grupo de pesquisa, em que foi realizado a triagem inicial de 23 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e de 4 leveduras não convencionais por microfermentação em meio mínimo contendo 40g /L de ácido láctico em pH 3 e 5, selecionou-se cinco linhagens tolerantes para ensaios adicionais: *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* ATCC38555 e *S. cerevisiae* NCYC3312, *Brettanomyces bruxellensis* (WLP4639) e *Zygosaccharomyces bailii* (NCYC 1427). O ensaio de *spot assay* foi realizado em placas de meio mínimo YNBD<sub>20</sub> sólido com adição de ácido láctico em diferentes concentrações, 20, 40, 60 e 80 g/L, e padronizado em um pH 3, ajustado com solução de KOH 3 M e HCl 1 M. Além dos meios com ácido láctico, também foi feito um meio YNBD<sub>20</sub> controle a pH 3 e pH 5 (acidificado com HCl 1 M) sem adição de ácido láctico. O meio YNBD<sub>20</sub> foi composto de Yeast Nitrogen Base (base de nitrogênio de levedura) sem aminoácidos (YNB) 6,7 g/L, glicose 20 g/L, ágar 20 g/L (apenas para meio sólido) e *dropout* completo 0,46 g/L, contendo todos os aminoácidos essenciais (AUSUBEL *et al.*, 2003; BUENO *et al.*, 2020). Primeiramente, as leveduras foram cultivadas em meio líquido YNBD<sub>20</sub> por 24h em agitador a 200 rpm e 30°C. Decorrida as 24h, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e as células foram lavadas três vezes com água ultrapura estéril e ressuspensas, com ajuste da densidade óptica para OD<sub>600</sub> = 1,0, medida em Biowave Cell Density Meter CO8000 (Biochrom WPA). A partir disso, foi realizada uma diluição seriada de proporção 1:10 e, com auxílio de uma pipeta automática multicanal, gotejou-se 5 µL das diluições nas placas de Petri contendo os meios YNBD<sub>20</sub> (BUENO *et al.*, 2020). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 horas e, após esse período, o crescimento das leveduras em diferentes diluições foi avaliado. O experimento foi realizado em triplicata.

### **3.2.2 Spot assay em hidrolisado lignocelulósico derivado de resíduo agroindustrial**

O ensaio de crescimento foi realizado em placas de hidrolisado a pH 3 e pH 5 e as cepas utilizadas nesse experimento foram as mesmas utilizadas para o *spot assay* na presença de ácido láctico. Para fazer as placas com o hidrolisado a pH 3 e 5, adicionou-se 2% de ágar para solidificação e, para o meio a pH 3, utilizou-se solução de HCl 1M para ajuste do pH. Primeiramente, as leveduras foram cultivadas em meio YPD<sub>20</sub> (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), *overnight*, a 200

rpm/30°, e depois foram inoculadas nos meios com hidrolisado lignocelulósico solidificado. O mesmo protocolo descrito anteriormente para o *spot assay* foi seguido, porém a incubação ocorreu por 14 dias, com avaliação do crescimento no 7° e 14° dias.

### **3.3 Montagem de vetores plasmidiais e transformação genética de microrganismos**

#### **3.3.1 Linhagens e meios de cultura utilizados**

As linhagens de levedura *S. cerevisiae* utilizadas foram PE-2 e BY4741, ambas cepas comerciais, e BR-X5, desenvolvida no LNBR. Os meios de cultura utilizados foram preparados segundo Ausubel *et al.* (2003), consistindo em meio YP (1% extrato de levedura e 2% peptona) mais uma fonte de carbono, 2% glicose (YPD), 2% xilose (YPX) ou 1% glicose e 1% xilose (YPDX). Quando cultivadas em meio líquido, a incubação com agitação a 200 rpm e temperatura de 30°C. Para o cultivo em meio sólido, 2% de ágar foi utilizado para solidificação e a incubação ocorreu em estufa a 30°C. Quando necessário, os meios foram suplementados com antimicrobianos para seleção de cepas resistentes: nourseotricina (NAT) 100 µg/mL e/ou geneticina (G418) 200 µg/mL.

A linhagem de *Escherichia coli* DH5α foi utilizada para propagação de plasmídeos e seu cultivo foi feito em meio Luria-Bertani (LB), constituído de 0,5% de extrato de levedura, 1% de triptona, 0,5% de NaCl e 2% de ágar (quando meio sólido). O cultivo de *E. coli* foi realizado a 37°C e, quando em meio líquido, foi feito sob agitação a 250 rpm. Para seleção de cepas resistentes, o meio de cultura foi suplementado com os seguintes antibióticos: ampicilina 100 µg/mL, zeocina 100 µg/mL ou kanamicina 40 µg/mL. Os meios de cultura utilizados foram preparados de acordo com AUSUBEL *et al.* (2003).

Para armazenamento dos plasmídeos e linhagens a longo prazo em ultra-freezer, fez-se estoques permanentes de bactérias e leveduras geneticamente modificadas. Para as bactérias, adicionou-se 500 µL de glicerol 80% para 500 µL de cultura crescida overnight. Para as leveduras, foi feito um inóculo em 50 mL de YPD<sub>20</sub> e, após de 7h de crescimento, centrifugou-se a cultura e as células foram ressuspensas em 50 mL de YPD<sub>100</sub> (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 10% de glicose). Depois de 24h de crescimento, as células foram novamente

centrifugadas e, depois, ressuspensas em YP + glicerol (1% extrato de levedura, 2% peptona, 20% glicerol).

### **3.3.2 Desenho de RNAs-guia para o sistema CRISPR-Cas9 e primers para reações de PCR**

Os gRNAs ou RNAs-guia foram desenhados a partir do programa CRISPOR, com análise acerca de off-targets e eficiência (CONCORDET e HAEUSSLER, 2018). A ferramenta online CHOPCHOP também foi usada para auxiliar na seleção desses gRNAs (LABUN *et al.*, 2019; LABUN *et al.*, 2016; MONTAGUE *et al.*, 2014). Os primers foram desenhados com base nas sequências nucleotídicas dos fragmentos a serem amplificados e analisados na ferramenta de análise OligoAnalyzer de acordo com o conteúdo GC, temperatura de *Melting* e formação de dímeros e grampos (OWCZARZY *et al.*, 2008). Para os *primers* em que haveria cauda de homologia, considerou-se uma cauda de aproximadamente 30 pares de base (pb) (VAN LEEUWEN *et al.*, 2015). Os *primers* foram sintetizados pela empresa Exxtend (Paulínia - SP).

### **3.3.3. Extração de DNA genômico e plasmidial**

A extração do DNA de levedura foi realizada pela metodologia de fenol/clorofórmio, descrita por Ausubel *et al.* (2003), e acetato de lítio, descrita por Løoke *et al.* (2011). No primeiro protocolo, a cultura crescida overnight foi centrifugada a 14.000 rpm por 4 min e o sobrenadante foi descartado. As células, então, foram ressuspensas em um tampão de lise de solução detergente, a partir do qual se adicionou “*beads*” de vidro, com o objetivo de liberar o DNA por lise química e mecânica. Em seguida, uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionada e o conteúdo foi agitado em vórtex por 2 minutos e centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. A partir disso, o sobrenadante contendo os ácidos nucleicos extraídos foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 18 µL de uma solução de acetato de sódio (NaOAc) a 3 M e pH 5,3 e 2 volumes de etanol 100% gelado. A solução foi deixada em freezer por no mínimo uma hora e posteriormente centrifugada durante 15 min, a 14000 rpm e 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado, para remover sais e pequenas moléculas orgânicas. Após isso, o precipitado foi seco e

ressuspendido em 40  $\mu$ L de água ultrapura. O protocolo de extração por acetato de lítio consiste em ressuspendar as células centrifugadas em solução de LiOAc 200 mM 1% SDS, incubar as células em 70°C em banho-seco e, em seguida, adicionar primeiro etanol 100% e depois 70%, para a precipitação do material nucleico. Após adição dos álcoois, centrifugação e retirada do sobrenadante, o *pellet* é resuspendido em água ultrapura, centrifugado novamente para retirada de detritos e o sobrenadante é transferido para um novo tubo. A extração de DNA plasmidial bacteriano a partir de uma cultura de *E. coli* crescida *overnight* foi realizada com o kit comercial QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN), o qual utiliza coluna de sílica para adsorção do DNA plasmidial. Após extraídos, a quantificação e avaliação da qualidade dos DNAs extraídos, com as razões de absorbância 260/280 e 260/230, foram feitas por análise em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific).

### **3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

As reações de PCR para amplificação *in vitro* de DNA foram realizadas nos termocicladores Vapo.Protect Mastercycler® Pro (Eppendorf) e Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Para as amplificações, quatro DNA polimerases foram usadas, dependendo do tamanho, conteúdo GC do amplicon e necessidade de repetição da reação: GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) ou Polimerase Phusion de alta fidelidade produzida *in house* (LNBR- CNPEM). O volume de reação utilizado foi de 25  $\mu$ L e, para os reagentes e a programação da reação, seguiu-se a recomendação do fabricante (Tabela 1, 2 e 3). A temperatura de anelamento foi calculada a partir do site NEB Tm Calculator (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) e o tempo de extensão foi estabelecido considerando o tamanho do amplicon, considerando em torno de 1kb/min. Quando as amplificações foram feitas a partir de DNA genômico, utilizou-se 3 minutos para a desnaturação inicial. Além disso, em algumas reações se utilizou aditivos, como incrementos de 0,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2% de DMSO e Q5® High GC Enhancer (New England Biolabs).

Ademais, duas variações de PCR foram usadas: PCR *touch-down* e PCR de colônia. A PCR *touch-down* foi realizada com a enzima polimerase de alta fidelidade produzida *in house* (Phusion LNBR), com adição de 0,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM) e 1  $\mu$ L



de DMSO para cada 50  $\mu\text{L}$  de reação. A programação do termociclador utilizada foi: desnaturação inicial 98°C por 3 min; 12 ciclos de 98°C por 10 s, 67°C por 30 s (-1°C por ciclo) e 72°C por 1 min 30 s; 30 ciclos de 98°C por 10 s, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min 30 s; e extensão final 72°C por 10 min. A reação de PCR de colônia aconteceu nas mesmas condições da PCR usual, mas com diferença no *template* de DNA. Nessa metodologia para levedura, uma biomassa da colônia foi adicionada em 20  $\mu\text{L}$  de NaOH 20 mM e, em seguida, incubada em banho seco em Eppendorf ThermoMixer® por 10 minutos a 99°C. Após a incubação, fez-se a centrifugação a 14000 rpm durante 1 minuto e, para a PCR, foi utilizado 2  $\mu\text{L}$  da solução. Para PCR de colônia de bactéria, uma colônia foi transferida com auxílio de um palito para 20  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril. Em seguida, usou-se o mesmo palito para inocular um meio de cultura líquido. O DNA foi desnaturado em banho seco em 95°C por 5 minutos e, em seguida, realizou-se uma centrifugação por 3 min em 12000 rpm e 2  $\mu\text{L}$  foram retirados da superfície do líquido para ser utilizado em reação de PCR.

Tabela 1- Componentes da reação de PCR para um volume de 25  $\mu\text{L}$  de acordo com o fabricante.

Reagentes (para 25 $\mu\text{L}$ )	GoTaq®	Phusion® NEB	Phusion LNBR	Q5®
Água ultrapura	10,7 $\mu\text{L}$	11,75 $\mu\text{L}$	12,7 $\mu\text{L}$	9,75 $\mu\text{L}$
Tampão	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu\text{L}$	-	-	-
Primer F (5 $\mu\text{M}$ )	3 $\mu\text{L}$	2,5 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2,5 $\mu\text{L}$
Primer R (5 $\mu\text{M}$ )	3 $\mu\text{L}$	2,5 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2,5 $\mu\text{L}$
dNTP (2,5 mM)	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Enzima	0,3 $\mu\text{L}$	0,25 $\mu\text{L}$	0,3 $\mu\text{L}$	0,25 $\mu\text{L}$
DNA	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Programação da reação de PCR para as enzimas GoTaq® e Phusion® NEB de acordo com os fabricantes.

Fases do ciclo e repetições		GoTaq®		Phusion® NEB	
		Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação inicial	(x1)	94	04:00	98	00:30
Desnaturação	(x35)	94	00:20	98	00:10
Anelamento	(x35)	x	00:20	x	00:30
Extensão	(x35)	72	x	72	x
Extensão final	(x1)	72	04:00	72	10:00
Final	(x1)	4	N/A	4	N/A

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 - Programação da reação de PCR para as enzimas Phusion LNBR e Q5® de acordo com os fabricantes.

Fases do ciclo e repetições		Phusion LNBR		Q5®	
		Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação inicial	(x1)	98	01:30	98	00:30
Desnaturação	(x35)	98	00:15	98	00:10
Anelamento	(x35)	x	00:20	x	00:30
Extensão	(x35)	72	x	72	x
Extensão final	(x1)	72	04:00	72	04:00
Final	(x1)	4	N/A	4	N/A

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.3.5 Eletroforese em gel de agarose

As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% ou 2%, dependendo do tamanho do amplicon, utilizando cubas de eletroforese Bio-Rad contendo tampão TAE 1x, com coloração por Brometo de Etídio (EtBr) ou GelRed Nucleic Acid Gel Stain. Para a utilização do EtBr, 4 µL desse reagente foram adicionados a cada 60mL de TAE 1X fundido com agarose, na hora de fazê-lo. No caso do GelRed, este é adicionado junto da amostra, em uma proporção de 3 µL do produto de PCR para 1 µL de tampão (5X Green GoTaq® Reaction Buffer) e 0,5 µL de GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Biotium) diluído 500x em água ultrapura. Entretanto, para os amplicons maiores que 2000pb, foi aplicado 3 µL de amostra mais 1 µL de tampão no gel de agarose e, após a corrida eletroforética, foi feito um banho de GelRed® (0,03% v/v de GelRed 10.000X) por 30 minutos. Para comparação do

tamanho das bandas de DNA, utilizou-se o marcador de peso molecular Thermo Scientific™ O´GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder. As eletroforeses foram feitas com voltagem de 60 – 120 V e corrente de 400 mA, durante 60 a 80 minutos, dependendo da necessidade do experimento e tamanho da cuba. Os resultados foram visualizados sob exposição de luz UV e fotografados em fotodocumentador Gel Logic 212 PRO Imaging System, com auxílio do programa Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc.).

### **3.3.6 Transformação genética de levedura**

Para montagem dos plasmídeos, utilizou-se a metodologia de recombinação homóloga em levedura. Para isso, uma transformação das partes do plasmídeo contendo caudas de homologia é realizada em levedura, seguindo uma adaptação do protocolo de transformação descrito por VAN LEEUWEN *et al.* (2015). Nessa metodologia, a levedura BY4741 é previamente preparada e armazenada no ultrafreezer em seu estado competente, a partir da lavagem das células crescidas em meio líquido rico e ressuspensão em solução de acetato de lítio (LiAc) 0,1 M suplementado com 10% glicerol. Para a transformação, os DNAs foram concentrados em Concentrador plus (*Eppendorf*) em 45°C até atingir um volume de 20 µL e o espermatozóide de salmão (ssDNA) foi desnaturado por choque térmico, com exposição a 99°C por 10 min seguido de incubação em gelo. O DNA foi adicionado de 2 µL de ssDNA e 12 µL de células de levedura competentes. Em seguida, 100 µL do tampão de transformação foi adicionado, que constitui de uma solução de 800 µL PEG 50%, 100 µL 1 M LiAc, 100 µL 10x TE e 50 µL de DMSO. Após isso, essa mistura foi incubada por 30 min em temperatura ambiente, seguido de incubação por 15 minutos em banho seco em *Eppendorf ThermoMixer®* a 42°C e 5 minutos em gelo. Após as incubações, realizou-se uma centrifugação a 3000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de YPD, as quais foram incubadas por 2 h ou *overnight* a 30°C. Após a incubação, as células foram plaqueadas em meio YPD na presença antibiótico específico, para seleção das transformantes.

Outro protocolo de transformação de levedura usado foi o método de acetato de lítio descrito em GIETZ & SCHIESTL (2007). Nessa metodologia, a levedura foi inoculada em 6mL de meio líquido e crescida *overnight* em 250 rpm a 30°C. No dia

seguinte, a cultura foi inoculada em mais 44 mL de meio e crescida por mais 4h nas mesmas condições. Decorrido esse tempo, após  $\pm 2$  duplicações, as células foram lavadas três vezes por ressuspensão em água destilada estéril seguida de centrifugação por 3 min a 2500 rpm. Por fim, as células foram ressuspendidas em solução 1x TE/LiOAc e incubadas a 30°C por 45 minutos. Após esse tempo, em um tubo foi adicionado 12,5  $\mu$ L ou 25  $\mu$ L do DNA, 10  $\mu$ L ou 20  $\mu$ L de espermatozoides de salmão e 100  $\mu$ L ou 200  $\mu$ L de células competentes, caso o DNA a ser inserido seja plasmidial ou cassete, respectivamente. Além disso, adiciona-se também 600  $\mu$ L de uma solução de 40% PEG/1x LiOAc (520  $\mu$ L 50% PEG, 65  $\mu$ L 10x LiAc e 65  $\mu$ L TE). Em seguida, as células foram incubadas a 30°C por 45 minutos em 200 rpm e, após isso, 70  $\mu$ L de DMSO foi adicionado. Posteriormente, as células passaram por um choque térmico, consistindo em incubação em banho seco a 42°C por 40 min seguida de incubação em gelo por 2 minutos. Após isso, as células foram centrifugadas por 1 min a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e fez-se uma recuperação em meio líquido *overnight*. No dia seguinte, as células foram lavadas e plaqueadas em meio contendo antibiótico específico para seleção dos transformantes.

### **3.3.7 Transformação genética de bactéria**

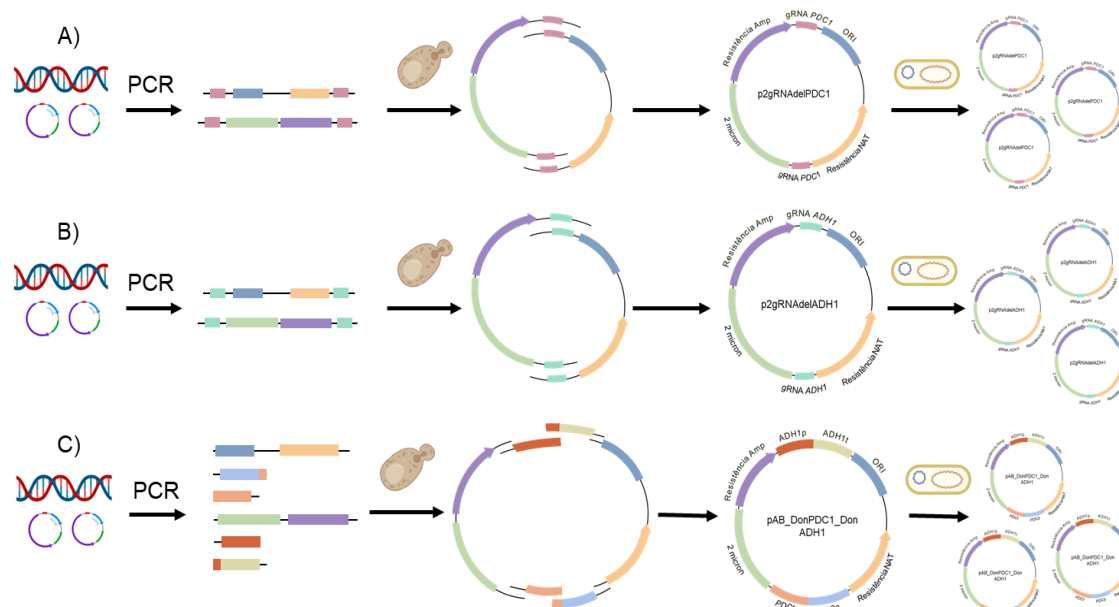
A transformação bacteriana foi feita com a técnica de eletroporação, na bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$ , de acordo com AUSUBEL *et al.* (2003). Primeiramente, o DNA a ser eletroporado foi dialisado em uma membrana Millipore 0,25  $\mu$ M e, após isso, 5  $\mu$ L do DNA dialisado foi adicionado em um tubo contendo 0,6 mL de *E. coli* competente. Essa célula competente foi previamente preparada, a partir do crescimento em LB até uma OD<sub>600</sub> de 0,4, lavagem das células com água e ressuspensão em glicerol 8,7% estéril (UNTERGASSER, 2008). Em seguida, transferiu-se o conteúdo para uma cubeta de eletroporação e, em um Sistema de Eletroporação Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad), foi realizado um pulso de 25  $\mu$ F, 2,5 kV e 2000 Ohm. Por fim, adicionou-se 1 mL de meio LB e incubou-o a 37°C e 250 rpm por 1 hora. Decorrido esse tempo, as células foram plaqueadas em meio LB contendo antibiótico específico para seleção dos transformantes.

### **3.4 Estratégia experimental: deleção parcial da via do etanol**

### 3.4.1 Montagem de vetores para deleção de genes da via de produção do etanol em *S. cerevisiae* utilizando o sistema CRISPR-Cas9

Para a utilização do sistema CRISPR-Cas9 e deleção de genes-alvo, *PDC1* e *ADH1*, três vetores foram desenhados: p2gRNAdelPDC1, p2gRNAdelADH1 e pAB\_DonPDC1\_DonADH1 (Apêndice A). A construção desses plasmídeos foi realizada a partir da amplificação dos fragmentos de DNA contendo caudas de homologia, seguido de montagem por recombinação homóloga pela transformação na levedura *S. cerevisiae* e seguinte eletroporação em bactéria (DH5 $\alpha$ ), de acordo com os protocolos descritos anteriormente (Figura 9). Para amplificação das partes constituintes dos vetores montados, foi utilizado o DNA genômico da *S. cerevisiae* PE-2 e de 2 plasmídeos modificados a partir de GENEROSO *et al.* (2016) (comunicação pessoal) (Apêndice A).

Figura 9 - Desenho esquemático da montagem por recombinação homóloga dos vetores para utilização do sistema CRISPR-Cas9 na deleção dos genes *PDC1* e *ADH1* na cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5.

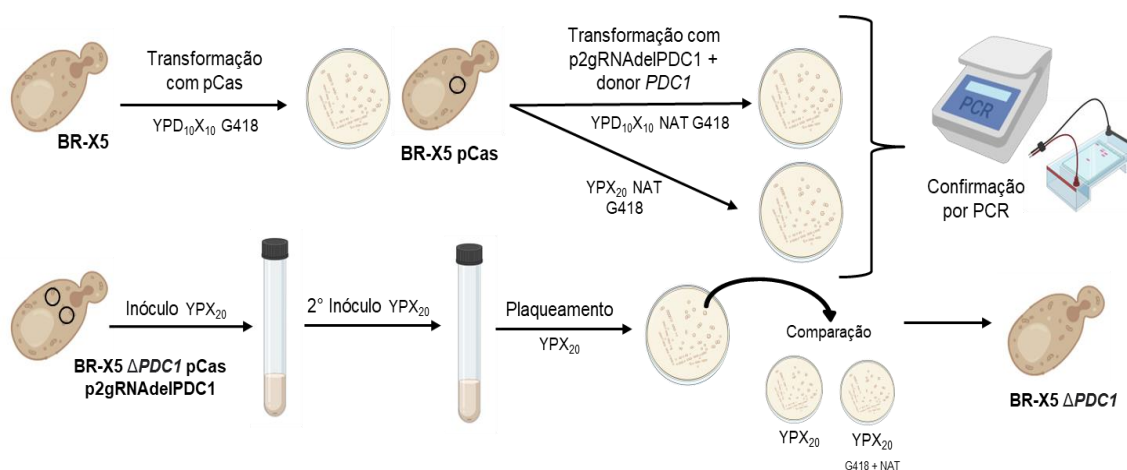


Fonte: Elaborado pela autora. A) Montagem do plasmídeo p2gRNAdelPDC1, contendo dois gRNAs diferentes para a deleção da *PDC1* B) p2gRNAdelADH1, contendo dois gRNAs diferentes para deleção do *ADH1*; e C) pAB\_DonPDC1\_DonADH1, contendo os *donors* para a deleção dos genes *PDC1* e *ADH1*, consistindo no promotor e terminador de cada gene.

### 3.4.2. Obtenção de linhagem mutante de *S. cerevisiae* com a deleção parcial da via do etanol

Para a obtenção das linhagens mutantes, utilizou-se um sistema de duas etapas, na qual consiste em primeiro transformar a cepa com o plasmídeo contendo a Cas9 (pJACas-K) e, depois, realizar a transformação com o gRNA e *donor*, para deleção do gene escolhido (Figura 10). O pJACas-K é um plasmídeo derivado do plasmídeo pDURRCC-K de GENEROSO *et al.* (2016) (comunicação pessoal). A linhagem BR-X5 foi a cepa escolhida para ser engenheirada com o objetivo de construir uma plataforma microbiana produtora de ácido láctico. Para sua transformação, primeiro foi usado o meio YPD<sub>10</sub>X<sub>10</sub> na inserção do pJACas-K com a geneticina como antibiótico de seleção e, depois, a segunda etapa de transformação foi realizada em dois meios de cultura, YPD<sub>10</sub>X<sub>10</sub> e YPX<sub>20</sub>, com a geneticina e nourseotricina como antibióticos de seleção. O DNA a ser inserido consistiu no plasmídeo contendo o gRNA do gene a ser deletado, em uma quantidade de 1500 ng, e 5 reações de PCR do *donor* linear amplificado. Depois da confirmação da deleção, para retirada dos plasmídeos da linhagem com a mutação, foram realizados dois inóculos seguidos em meio de cultura líquido sem antibiótico e, por fim, plaqueamento em meio sólido sem antibiótico. Com as colônias crescidas, fez-se o teste em meio com antibiótico, para verificação da perda de resistência (Figura 10). Inicialmente realizou-se a deleção do gene da *PDC1* na cepa BR-X5 e, com a obtenção da linhagem BR-X5  $\Delta pdc1$ , foi utilizado o sistema CRISPR-Cas9 para deleção do gene da *ADH1* na cepa BR-X5  $\Delta pdc1$ .

Figura 10 - Esquema experimental para deleção do gene da *PDC1* utilizando o sistema CRISPR-Cas9 em duas etapas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5.



Fonte: Elaborado pela autora. BR-X5: levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como *chassi* microbiano neste estudo; pCas: plasmídeo de expressão da enzima Cas9; YPD<sub>10</sub>X<sub>10</sub> G418: meio YPD<sub>X</sub> contendo 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose suplementado com 200µg/mL de geneticina; BR-X5 pCas: levedura BR-X5 contendo o plasmídeo pCas. p2gRNAdelPDC1: plasmídeo contendo os

gRNAs para deleção do gene da PDC1; donor PDC1: DNA linear constituído de promotor e terminador do gene PDC1; YPD10X10 NAT G418: meio YPDX contendo 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose suplementado com 100µg/mL de nourseotricina (NAT) e 200µg/mL de geneticina (G418); YPX20 NAT G418: meio YPX contendo 20 g/L de xilose suplementado com 100µg/mL de nourseotricina (NAT) e 200µg/mL de geneticina (G418); PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase); BR-X5  $\Delta pdc1$  pCas p2gRNA $\Delta$ delPDC1: levedura BR-X5 com a deleção do gene *PDC1* e contendo os plasmídeos pCas e p2gRNA $\Delta$ delPDC1; YPX20: meio YPX contendo 20 g/L de xilose; BR-X5  $\Delta pdc1$ : levedura BR-X5 com a deleção do gene *PDC1*.

### **3.4.3 Cinética fermentativa de linhagens com a deleção parcial da via do etanol**

Realizou-se a fermentação utilizando a linhagem mutante e parental em 80 mL de meio YPD<sub>50</sub> e YPX<sub>50</sub> em 30°C a 200 rpm durante 12 h e 28 h, respectivamente. Primeiramente, 50 mL de meio YPD<sub>20</sub> foi utilizado para realização do inóculo da fermentação, o qual foi crescido em Erlenmeyer a 200 rpm, 30°C, *overnight*. No dia seguinte, a OD das culturas a 600 nm foi medido e o volume inicial para a OD desejada na fermentação para o volume final a ser utilizado foi calculado. As células, então, foram lavadas três vezes com água ultrapura estéril e resuspendidas em 5 mL de meio da fermentação. A seguir, foi adicionado o volume de meio correspondente para completar o volume final, a partir do qual checkou-se a OD inicial. A fermentação foi realizada em garrafas seladas de 100 mL e iniciou com a cultura de células com densidade óptica de aproximadamente 1,0. No meio com glicose, amostras de 1 mL foram coletados a cada 2 h e, no meio de xilose, a cada 4 h. O sobrenadante foi analisado quanto a medição da OD<sub>600</sub> em espectrofotômetro e as concentrações de glicose e xilose (g/L) foram analisadas em equipamento YSI – 2900 (Tecnal).

## **3.5 Estratégia experimental: expressão heteróloga da via de interesse**

### **3.5.1 Construção dos plasmídeos de expressão gênica da enzima lactato desidrogenase (LDH) de diferentes organismos**

Para a inserção heteróloga do gene da LDH de quatro organismos diferentes e avaliação da melhor enzima para construção da plataforma microbiana produtora de ácido láctico, 4 vetores foram desenhados: pAB\_TDH1\_LDH1, pAB\_TDH1\_LDH2, pAB\_TDH1\_LDH3 e pAB\_TDH1\_LDH4 (Apêndice A). A construção desses plasmídeos foi realizada da mesma forma que descrito anteriormente, com amplificação dos fragmentos de DNA contendo cauda de homologia e recombinação homóloga em levedura (Figura 11). Os genes escolhidos foram: L- lactato desidrogenase A de *Bos taurus* (chamada de LDH1, GenBank: BC146210.1), L-lactato

desidrogenase de *Lactobacillus helveticus* (LDH2, UniProtKB/Swiss-Prot: O32765.1), L-lactato desidrogenase de *Lactobacillus plantarum* (LDH3, WCFS1 - P56512.2) e L-lactato desidrogenase de *Lactocaseibacillus casei* (LDH4, UniProtKB P00343.3) por serem os mais relatados na literatura. Para amplificação das partes constituintes dos vetores montados, foi utilizado o DNA genômico da *S. cerevisiae* PE-2 e de 2 plasmídeos modificados a partir de GENEROSO *et al.* (2016) (comunicação pessoal) (Apêndice A).

Figura 11 - Desenho esquemático da montagem por recombinação homóloga dos vetores contendo o cassete de expressão das enzimas L-LDH de diferentes organismos para expressão na levedura *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 $\Delta$ PDC1



Fonte: Elaborado pela autora..

### 3.5.2 Cinética fermentativa de linhagens expressando as enzimas LDH testadas

Os plasmídeos construídos p2gRNAdelPDC1, pAB\_TDH1\_LDH1, pAB\_TDH1\_LDH2, pAB\_TDH1\_LDH3 e pAB\_TDH1\_LDH4 (Apêndice A) foram transformados na linhagem BR-X5 $\Delta$ pd $c$ 1, de acordo com protocolos descritos anteriormente. Além disso, o plasmídeo p2gRNAdelPDC1 também foi transformado na linhagem BR-X5 parental, para permitir que todas as linhagens estivessem na mesma condição de crescimento, ou seja, contendo um plasmídeo de alta cópia e com resistência a nourseotricina. Realizou-se, portanto, a fermentação utilizando seis linhagens em 140 mL de meio YPD<sub>50</sub>X<sub>40</sub> (50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, mimetizando as concentrações de açúcares normalmente encontradas em hidrolisado lignocelulósico) adicionado de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina (NAT) em 30°C a 200 rpm durante 70 h. O preparo do inóculo foi realizado como descrito anteriormente. A fermentação foi realizada em Erlenmeyer de 250 mL, em triplicata, e foi iniciada com a cultura de células com densidade óptica (OD) de aproximadamente 0,5. Ao final da fermentação, o pH do sobrenadante foi medido em pHmetro. Inicialmente, alíquotas de 1 mL foram coletadas em intervalos de 4 h e, após 16 h de fermentação, com 6 h de intervalo. Ao todo, coletou-se 14 amostras da fermentação, a partir das quais mediu-se a OD<sub>600</sub> em equipamento Biowave Cell Density Meter CO8000 (Biochrom



WPA) e o sobrenadante foi separado por centrifugação para análises posteriores. A partir da construção de um gráfico  $\ln X/X_0$  em função do tempo para o crescimento das leveduras avaliadas, obteve-se o valor da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), correspondente ao coeficiente angular da reta obtida da fase exponencial do crescimento, conforme a equação 1.

$$\mu = \frac{\ln(OD_{final}/OD_{inicial})}{tempo_{final}-tempo_{inicial}} \quad (1)$$

O sobrenadante, então, foi analisado quanto aos conteúdos de glicose, xilose, etanol, ácido láctico, ácido acético e glicerol, para todos os pontos coletados, em colaboração com o grupo de química analítica do LNBR, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O cromatógrafo Alliance HT (Waters) com detector de índice de refração (Waters 2414) foi utilizado para as quantificações, utilizando a coluna de exclusão iônica HPX-87H (300mm x 7,8mm, BioRad®), aquecida em forno a 35 °C, com fase móvel de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mM (pH 2,3) a uma vazão de 0,6 mL/min. A determinação da concentração foi realizada com uma curva padrão de concentrações conhecidas dos compostos de interesse, a partir da qual faz-se comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos. A partir da quantificação, calculou-se as velocidades instantâneas de consumo de glicose e xilose e de produção de etanol e ácido láctico, além dos fatores de conversão de substrato em produto. As velocidades instantâneas foram obtidas a partir da obtenção da equação da linha de tendência ajustada aos dados obtidos, derivação e cálculo a partir de cada tempo, conforme a equação das velocidades instantâneas (2 e 3). O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi calculado a partir das velocidades instantâneas, segundo a equação 4. Além disso, também se realizou o cálculo da produtividade e rendimento da produção de ácido láctico etanol (no tempo de maior concentração desses produtos), a partir das equações (5) e (6). O rendimento foi calculado considerando as duas fontes de carbono utilizadas.

$$rS = \frac{dS(Glicose, Xilose)}{dt(tempo)} \quad (2)$$

$$rP = \frac{dP(Etanol, ácido láctico)}{dt(tempo)} \quad (3)$$

$$Y_{p/s} = \frac{rP(Etanol\ ou\ ácido\ láctico)}{rS\ Glicose + rS\ Xilose} \quad (4)$$

$$Produtividade = \frac{[Produto\ final]-[Produto\ inicial]}{tempo} \quad (5)$$

$$Rendimento = \frac{[Produto\ final]-[Produto\ inicial]}{[Substrato\ inicial]-[Substrato\ final]} \quad (6)$$

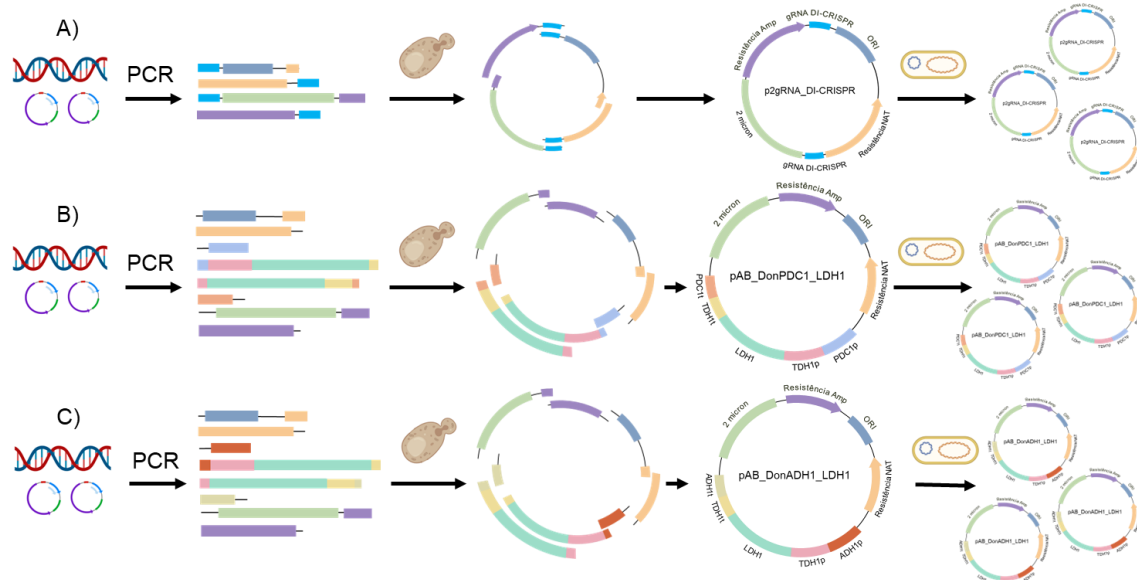
### 3.6 Integração genômica da via de interesse

#### 3.6.1 Montagem de vetores para integração genômica da LDH escolhida

##### **utilizando o sistema CRISPR-Cas9**

Para a utilização do sistema CRISPR-Cas9 e integração da enzima L-LDH escolhida no *locus* dos genes-alvo, *PDC1* e *ADH1*, dois vetores foram desenhados: pAB\_DonPDC1\_LDH1 e pAB\_DonADH1\_LDH1 (Apêndice A). Além disso, mais um vetor foi desenhado, p2gRNA\_DI-CRISPR, para uma estratégia de integração em várias cópias da L-LDH escolhida no genoma. A construção desses plasmídeos foi realizada pelos mesmos protocolos citados anteriormente, por meio de recombinação homóloga em levedura (Figura 12). Para amplificação das partes constituintes dos vetores montados, foi utilizado o DNA genômico da *S. cerevisiae* PE-2 e de 2 plasmídeos modificados a partir de GENEROSO *et al.* (2016) (comunicação pessoal) (Apêndice A).

Figura 12 - Desenho esquemático da montagem por recombinação homóloga dos vetores para integração genômica da L-LDH de *Bos taurus* utilizando o sistema CRISPR-Cas9 na levedura *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5.



Fonte: Elaborado pela autora. A) Montagem do plasmídeo p2gRNA\_DI-CRISPR, contendo um gRNA duplicado para integração nos elementos delta do genoma; B) pAB\_DonPDC1\_LDHI, contendo o *donor* para integração do cassete de LDHI no locus do gene da PDC 1; e C) pAB\_DonADH1\_LDHI, contendo o *donor* para integração do cassete de LDHI no locus do gene da ADH1.

### 3.7 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Rstudio versão 2020.02.0+443 (RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>). Os dados passaram pelo teste de Shapiro-Wilk para determinar a normalidade dos resultados coletados. Caso os dados seguissem uma distribuição normal, realizou-se os testes de ANOVA seguido do teste Tuckey, considerando  $p \leq 0,05$ , ou seja, com intervalo de confiança de 95%. Caso contrário, o teste de Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn, com correção de valor de p pelo Bonferroni, foi utilizado. Em alguns casos, também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Wilcoxon ou Mann Whitney. Os gráficos foram construídos com auxílio do programa Microsoft Excel.

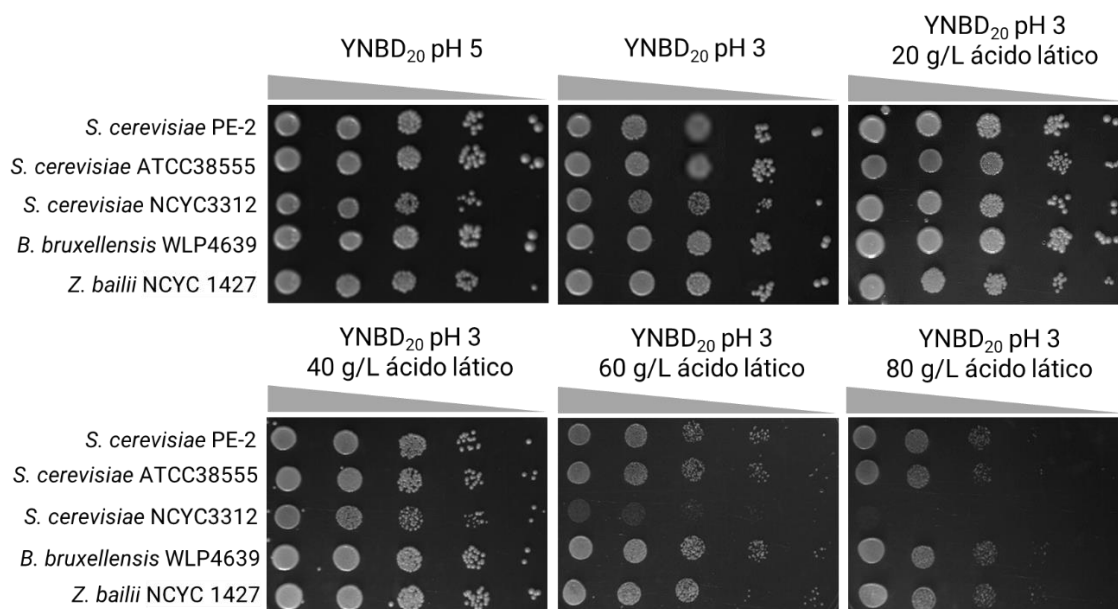
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Tolerância a estresses

#### 4.1.1 *Spot assay em ácido lático*

O resultado do ensaio de tolerância das leveduras realizado na presença de diferentes concentrações de ácido lático a pH 3 está mostrado na Figura 13. As diferentes concentrações de ácido lático foram avaliadas apenas a um pH 3, pois essa é a condição esperada para uma fermentação sem adição de neutralizantes, além de ser um pH em que a maioria das moléculas desse ácido orgânico se apresenta na forma mais tóxica ( $\text{pH} < \text{pKa}$ ,  $\text{pKa}$  ácido lático = 3,85), capaz de entrar na célula (KUANY SHEV *et al.*, 2020). A partir dos controles, pode-se observar que não houve diferença significativa no crescimento das leveduras entre os meios a pH 5 e pH 3, demonstrando que o baixo pH do meio ocasionado pela adição do ácido inorgânico não afetou o crescimento microbiano. Além disso, a presença de ácido lático nas concentrações de 20 g/L e 40 g/L em um meio a pH 3 também não interferiu no crescimento das cepas. Porém, quando o ácido lático está presente em uma concentração de 60 g/L a pH 3, foi observada uma diminuição significativa no crescimento, principalmente da cepa de *S. cerevisiae* NCYC3312, sendo mais evidente na presença de uma concentração de 80 g/L de ácido lático. As outras cepas, contudo, foram capazes de crescer em 60 e 80 g/L de ácido lático, demonstrando que as *S. cerevisiae* PE-2, ATCC38555 e as leveduras não-convencionais apresentaram boa resistência ao ácido lático em concentrações altas e em baixo pH.

Figura 13 - Ensaio de tolerância das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC38555, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC3312, *Brettanomyces bruxellensis* WLP4639 e *Zygosaccharomyces bailii* NCYC 1427 a estresse ácido em diferentes concentrações de ácido lático a pH 3 em meio mínimo por *Spot Assay*.

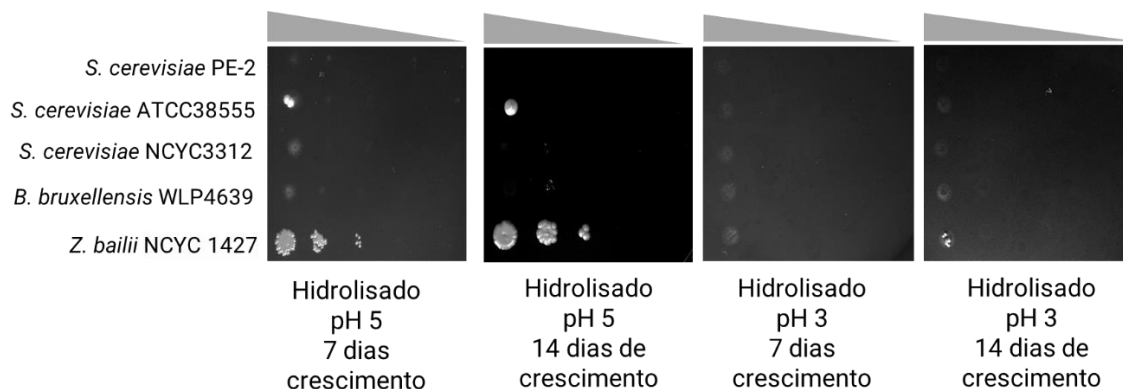


Fonte: Elaborado pela autora. As colunas representam as diluições, sendo a primeira a  $OD_{600} = 1,0$  e as demais de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.1.2 Spot assay em hidrolisado lignocelulósico derivado de resíduo agroindustrial

O resultado do ensaio de tolerância de leveduras realizado na presença de hidrolisado lignocelulósico em pH 3 e pH 5 está representado na Figura 14. Um forte comprometimento no crescimento das cepas testadas foi observado, principalmente a pH 3, onde apenas a cepa *Z. bailii* foi capaz de crescer. Nas placas de hidrolisado a pH 5, a *Z. bailii* foi a única que demonstrou crescimento em 3 colunas ( $OD_{600}$  de 1,0 e diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ). A *S. cerevisiae* ATCC38555, cresceu apenas na coluna correspondente a  $OD$  de 1,0. Esses resultados demonstram como o hidrolisado lignocelulósico é um meio de difícil crescimento, sobretudo em pH 3, e apontam para a *Z. bailii* como cepa promissora para estudo mais aprofundado de resistência aos inibidores presentes nesse meio.

Figura 14 - Ensaio de tolerância das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC38555, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC3312, *Brettanomyces bruxellensis* WLP4639 e *Zygosaccharomyces bailii* NCYC 1427 ao crescimento em hidrolisado lignocelulósico a pH 3 e 5 por Spot Assay.



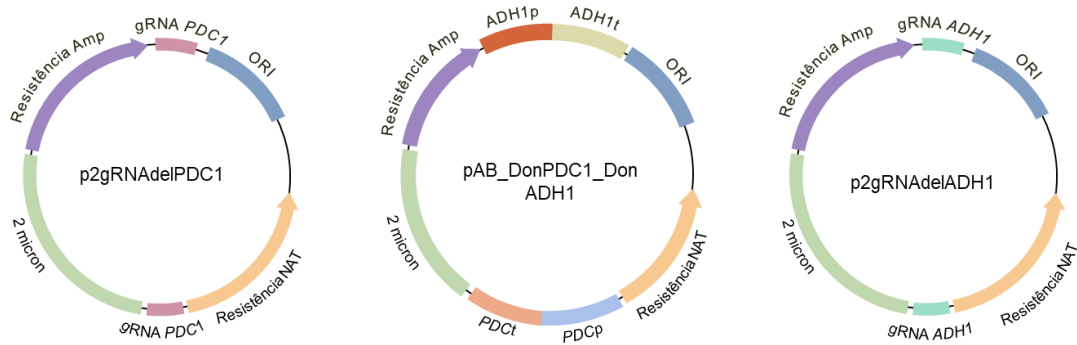
Fonte: Elaborado pela autora. As colunas representam as diluições, sendo a primeira a  $OD_{600} = 1,0$  e as demais de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata e as placas foram fotografadas com 7 e 14 dias de crescimento.

## 4.2 Deleção parcial da via do etanol

### 4.2.1 Montagem de vetores para deleção de genes da via de produção do etanol em *S. cerevisiae* utilizando o sistema CRISPR-Cas9

Os 3 vetores desenhados, p2gRNAdelPDC1, p2gRNAdelADH1 e pAB\_TDH1\_LDH1, estão esquematizados na Figura 15 e resumidos no Apêndice A. Os dois primeiros contêm os gRNAs necessários para o reconhecimento das sequências a serem deletadas e o terceiro contém os *donors*, que são sequências para o sistema de reparo da célula realizar recombinação homóloga após o corte na dupla fita do DNA pela enzima Cas9. Os gRNAs desenhados estão apresentados na Tabela 4, exibindo boa eficiência e nenhum alvo inespecífico, importante para o direcionamento em apenas um ponto de clivagem no genoma. Os *donors* constituem a sequência do promotor e terminador de cada gene sem a ORF (*Open Reading Frame*). Os *primers* desenhados para amplificação dos fragmentos de DNA usados na montagem dos vetores estão apresentados no Apêndice B. As figuras 16, 17 e 18 trazem os géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA contendo caudas de homologia, das montagens dos plasmídeos em levedura e transformação em *E. coli* para clonagem do vetor.

Figura 15 - Vetores desenhados para a utilização do sistema CRISPR-Cas9 na deleção dos genes *PDC1* e *ADH1* na levedura *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5: p2gRNAdelPDC1, p2gRNAdelADH1 e pAB\_DonPDC1\_DonADH1.



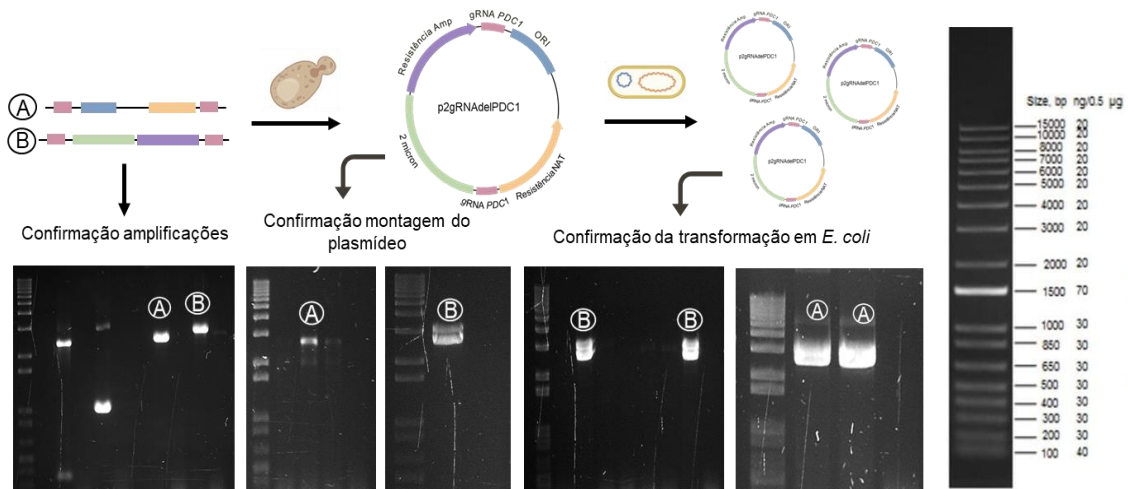
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 - RNAs-guia desenhados para a deleção dos genes *PDC1* e *ADH1* da via do etanol e analisados pelas ferramentas CHOPCHOP e CRISPOR.

Nome	RNA-guia + sequência PAM	Eficiência	Alvos não específicos
gRNA1_ <i>PDC1</i>	TCTGTCAATTTTCAGCTGGGG CGG	64,77%	0
gRNA2_ <i>PDC1</i>	TTGGTTGATACCGAAAGCGG AGG	64,06%	0
gRNA1_ <i>ADH1</i>	CAAGTCAGTGTGACAGACAC CGG	64,20%	0
gRNA2_ <i>ADH1</i>	GAATTATTCAGATCCATCGG TGG	71,33%	0

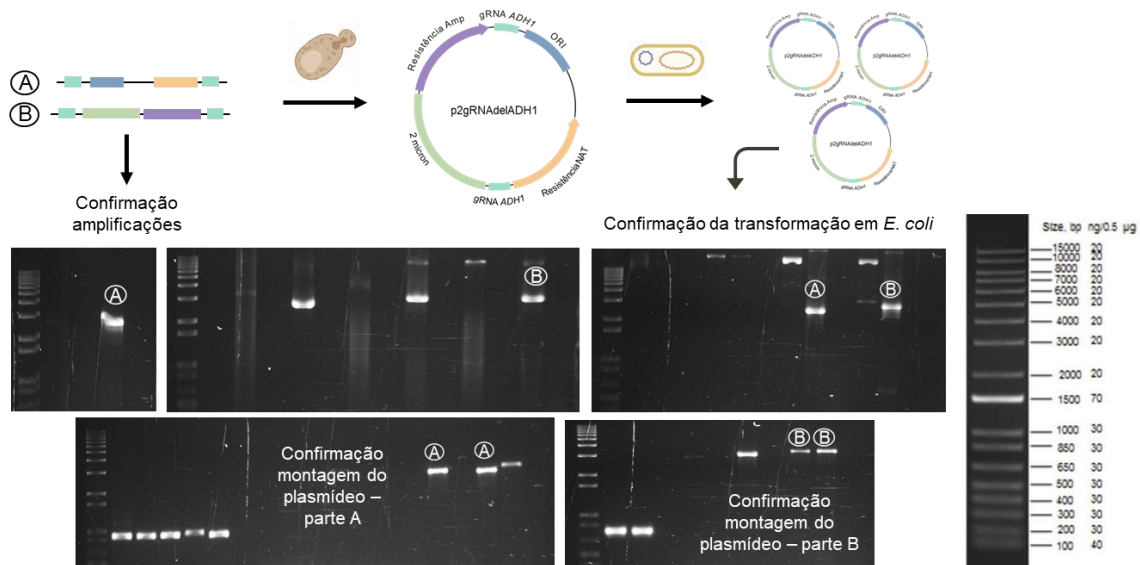
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 16 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA, da montagem do plasmídeo p2gRNAdelPDC1 e da transformação em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .



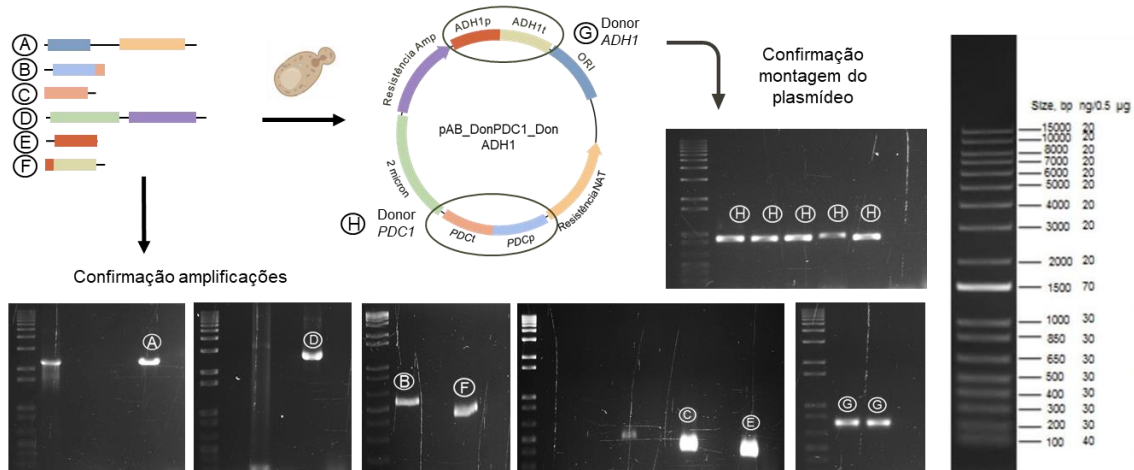
Fonte: Elaborado pela autora. As bandas "A" correspondem à amplificação de um fragmento de 2666pb, pelos primers Aa\_pdc1a F e Ab\_pdc1b R, e as bandas "B" correspondem a um amplicon de 3046pb, amplificado pelos primers Ba\_pdc1b F e Bb\_pdc1a R. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 17 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA, da montagem do plasmídeo p2gRNAdelADH1 e da transformação em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .



Fonte: Elaborado pela autora. As bandas "A" correspondem à amplificação de um fragmento de 2666pb, pelos primers Aa\_adh1a F e Ab\_adh1b R, e as bandas "B" correspondem a um amplicon de 3046pb, amplificado pelos primers Ba\_adh1b F e Bb\_adh1a R. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 18 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB\_DonPDC1\_DonADH1.



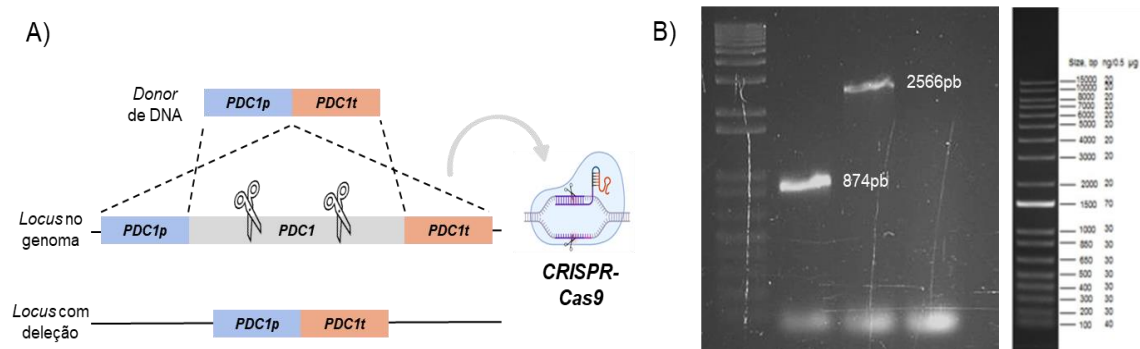
Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: "A" corresponde à amplificação de um fragmento de 2305pb, pelos primers Vector A\_F e VectorA\_R rc; o "B" 555pb por PDC1p\_vectorA e PDC1p joint t\_rc R (promotor da *PDC1*); o "C" 434pb por PDC1t\_F e PDC1t\_vectorB\_R rc (terminador da *PDC1*); o "D" 2715pb por Vector B\_F e VectorB\_R rc; o "E" 426pb por ADH1p\_vectorB\_F e ADH1p\_R rc (promotor da *ADH1*); o "F" 464pb por ADH1t joint p\_F e ADH1t\_vector A\_R rc (terminador da *ADH1*). Na confirmação, o G corresponde à confirmação do *donor* do *ADH1*, 756pb, ADH1p\_F e ADH1t\_R, e o H corresponde ao *donor* da *PDC1*, 874pb, PDC1p\_F e PDC1t\_R rc. O plasmídeo foi mantido em levedura, pois não foi possível confirmar a presença dos plasmídeos nas bactérias eletroporadas. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).



#### 4.2.2 Obtenção de linhagem mutante de *S. cerevisiae* com a deleção do gene *PDC1* da via do etanol

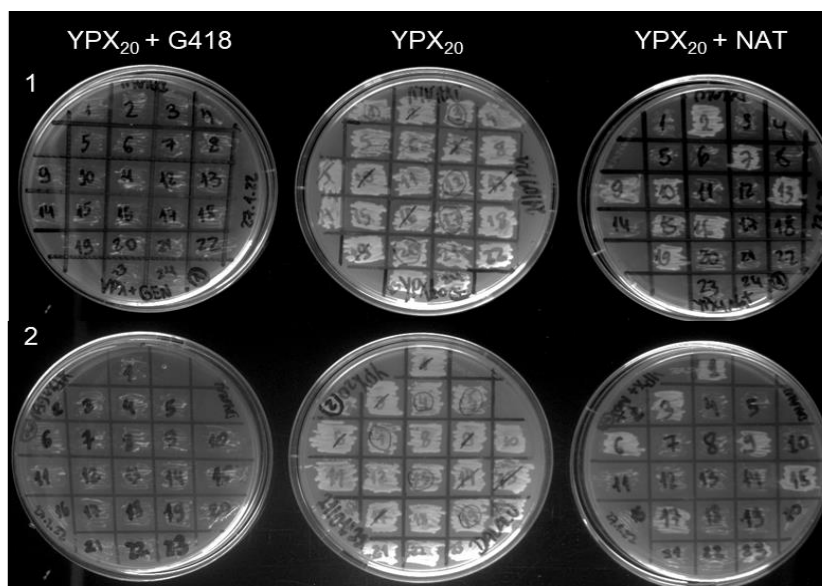
A utilização do sistema CRISPR-Cas9 consistiu em duas transformações sucessivas, com a primeira para inserção do plasmídeo da Cas9 na cepa BR-X5 e, a segunda, para inserção do plasmídeo p2gRNAdelPDC1 e o *donor PDC1p-PDC1t* linear. A confirmação da transformação do pJACas-K foi feita pela seleção por antibiótico e verificação do fenótipo da colônia, que se apresenta de maneira rugosa quando esse plasmídeo é incorporado. A partir da segunda transformação e seleção por antibiótico, algumas colônias foram selecionadas para serem testadas molecularmente quanto à deleção do gene da *PDC1*. Uma das colônias, que teve origem na transformação em meio YPX<sub>20</sub>, foi confirmada, apresentando a amplificação de um fragmento de DNA de apenas 874 pb, correspondente ao *donor PDC1p-PDC1t* linear (Figura 19). A retirada dos plasmídeos, após subcultivos em meio sem antibiótico, foi evidenciada pela perda de resistência aos antibióticos usados para a seleção, geneticina e nourseotricina (Figura 20).

Figura 19 - Deleção do gene *PDC1* e obtenção da cepa *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 $\Delta$ *pdc1*.



Fonte: Elaborado pela autora. A) Desenho esquemático do sistema de reparo dirigido por homologia (HDR) na deleção do gene *PDC1* pelo Sistema CRISPR-Cas9. PDC1p: promotor PDC1; PDC1t: terminador PDC1; PDC1: ORF do gene B) Confirmação por PCR da deleção do gene *PDC1* revelado em eletroforese em gel de agarose. O DNA de uma transformante (BR-X5 $\Delta$ *PDC1*) e da cepa original (BR-X5) foram amplificados com os mesmos primers, PDC1p\_F e PDC1t\_R, resultado em um fragmento apenas com o tamanho do promotor e terminador (*donor*) (primeiro poço – 874pb) e outro com o gene parental completo (segundo poço – 2566pb), respectivamente. O terceiro poço corresponde ao branco da reação. O marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 20 - Resultado da curagem dos plasmídeos pJACas-K e p2gRNAdelPDC1 de duas colônias originadas da cepa *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 $\Delta$ *PDC1* confirmada.

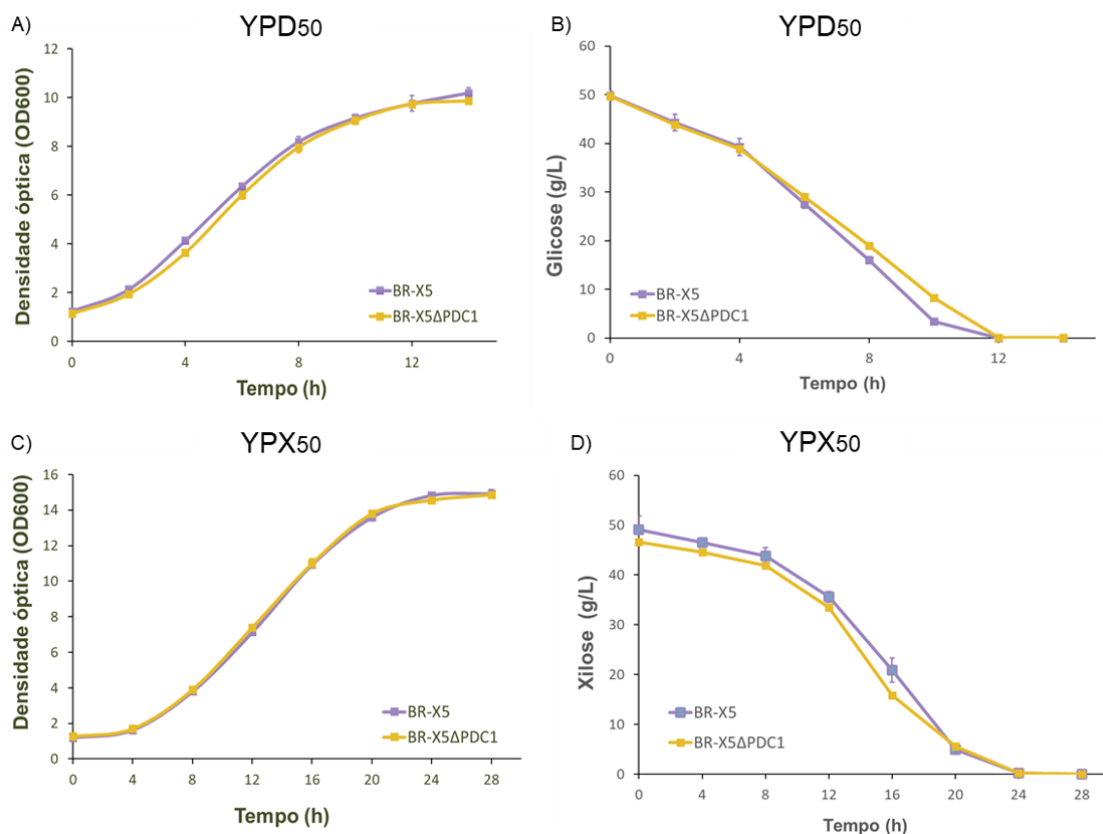


Fonte: Elaborado pela autora. YPX<sub>20</sub>: meio YPX contendo 20 g/L de xilose; YPX<sub>20</sub> + NAT: meio YPX<sub>20</sub> suplementado com 100µg/mL de nourseotricina; YPX<sub>20</sub> + G418: meio YPX<sub>20</sub> suplementado com 200µg/mL de geneticina (G418).

#### 4.2.3 Cinética fermentativa de linhagens com a deleção do gene *PDC1* da via do etanol

O crescimento da BR-X5 $\Delta$ *pdc1* se mostrou similar ao da BR-X5 e indicou que a deleção desse gene, essencial na via de produção do etanol, não afetou a taxa de crescimento da cepa em meios contendo xilose ou glicose a 50 g/L, nem de consumo de açúcares (Figura 21). De fato, os testes estatísticos revelaram que não há diferença significativa entre as curvas de crescimento microbiano e de consumo de açúcares ( $p > 0,05$ ) para as cepas BR-X5 $\Delta$ *pdc1* e BR-X5. Comparando-se o crescimento das leveduras nas duas fontes de carbono, enquanto uma OD final de 14,93 (BR-X5) e 14,86 (BR-X5 $\Delta$ *pdc1*) foi atingida em meio com xilose, as ODs de 10,2 (BR-X5) e 9,86 (BR-X5 $\Delta$ *pdc1*) foram observadas para a fermentação em glicose. Apesar disso, 50 g/L de glicose foram consumidos mais rapidamente do que os 50 g/L de xilose, o qual levou o dobro do tempo para ser consumido.

Figura 21 – Cinética fermentativa das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 e BR-X5 $\Delta$ *pdc1* em meio YPD<sub>50</sub> e YPX<sub>50</sub>.



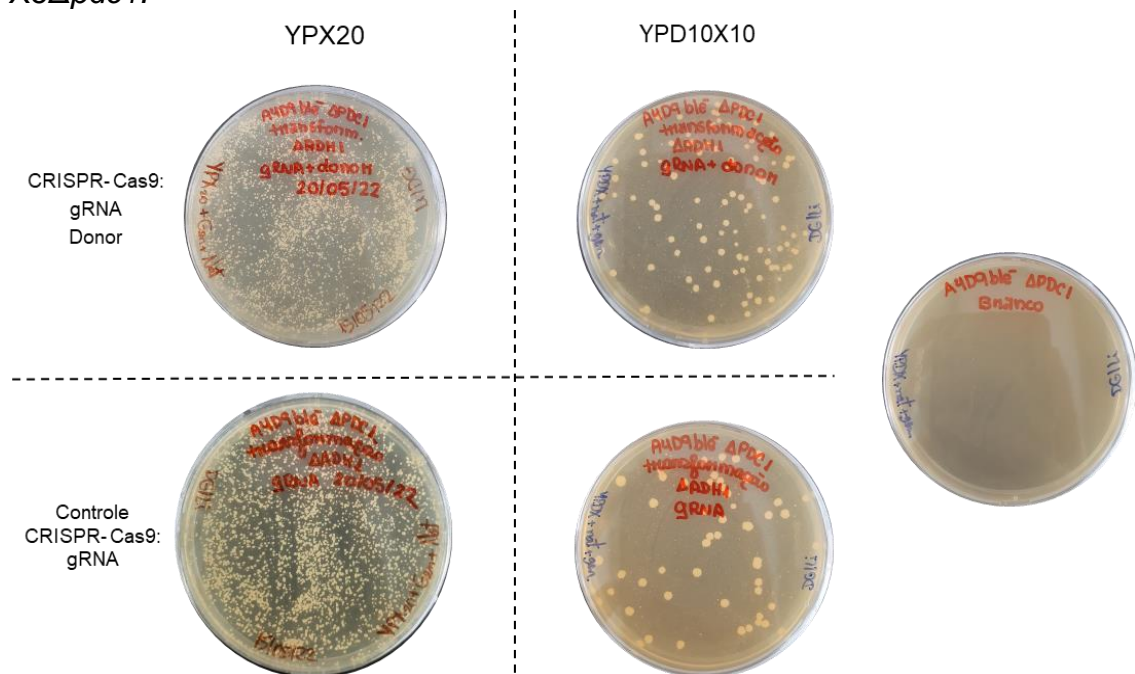
Fonte: Elaborado pela autora. YPD<sub>50</sub>: YPD contendo 50 g/L de glicose; YPX<sub>50</sub>: YPX contendo 50 g/L de xilose. (A) Crescimento microbiano (OD 600 nm) em YPD<sub>50</sub>; (B) Consumo de glicose (g/L) em YPD<sub>50</sub>; (C) Crescimento microbiano (OD 600 nm) em YPX<sub>50</sub>; (D) Consumo de xilose (g/L) em YPX<sub>50</sub>. O experimento foi realizado em triplicata e os desvios padrão são representados na imagem. Tanto para o crescimento microbiano quanto para o consumo de açúcares, o teste de Kruskal-Wallis revelou não haver diferença significativa entre as curvas das linhagens ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.4 Obtenção de linhagem mutante de *S. cerevisiae* com a deleção do gene *PDC1* e *ADH1* da via do etanol

Da mesma forma que a deleção anterior, o CRISPR-Cas9 também foi realizado em duas etapas de transformação. Primeiramente, o plasmídeo pJACas-K foi transformado na cepa BR-X5Δ*pdc1* e, após confirmação por seleção em antibiótico e observação do fenótipo das colônias, a segunda transformação foi feita para inserir o plasmídeo p2gRNAdelADH1 e o *donor* linear *ADH1p-ADH1t*. As placas resultantes da transformação estão mostradas na Figura 22. Apesar do controle do CRISPR-Cas9, em que foi adicionado apenas o plasmídeo p2gRNAdelADH1, ter muitas colônias e representar uma grande quantidade de falsos-positivos, as placas do CRISPR-Cas9 em si apresentaram mais colônias, um bom indicativo de colônias positivas. Então, algumas colônias foram selecionadas para serem testadas molecularmente quanto à deleção do gene da *ADH1*. Entretanto, ao todo, 39 colônias passaram por testes moleculares, objetivando a amplificação do locus do gene da *ADH1*, e não se obteve

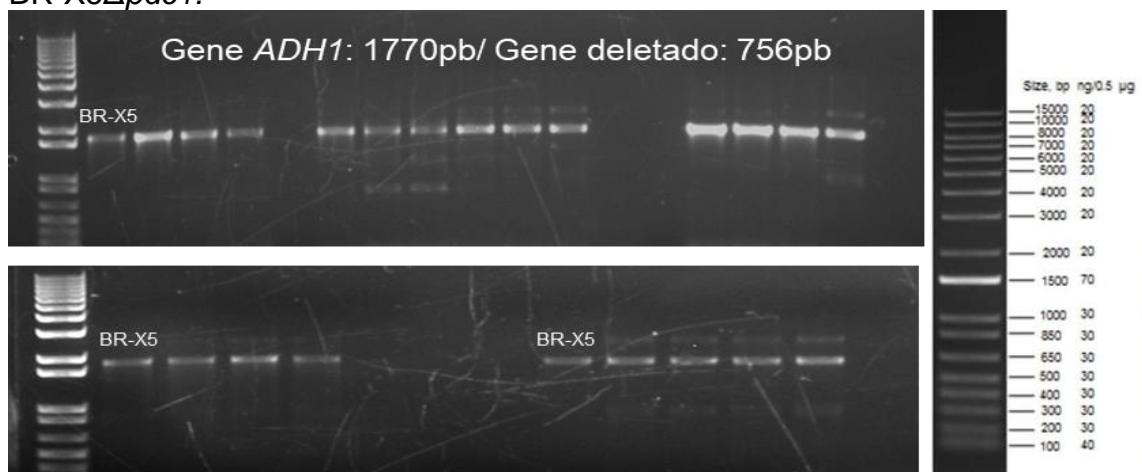
nenhuma positiva. Então, apesar das cepas apresentarem o fenótipo de resistência a genética e nourseotricina, elas se mostraram ser falso-positivas, contendo o gene íntegro da ADH1, e não foi possível obter uma colônia BR-X5 $\Delta$ *pdc1* $\Delta$ *adh1* (Figura 23).

Figura 22 - Placas de transformação resultantes da técnica de CRISPR-Cas9, objetivando a deleção no gene *ADH1* na cepa *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 $\Delta$ *pdc1*.



Fonte: Elaborado pela autora. A primeira coluna é referente à transformação realizada na presença de 20g/L de xilose e a segunda em 10g/L de xilose e 10g/L de glicose. A primeira linha é o resultado da transformação do CRISPR-Cas9, em que foi transferido para a célula o plasmídeo contendo o gRNA e o *donor* linear. A segunda linha é referente à transformação apenas com o gRNA, resultando no background da transformação, em que ou não houve a clivagem do DNA ou a célula realizou um outro tipo de reparo. À direita, tem-se a placa do branco, em que na transformação das células só foi adicionado DNA de esperma de salmão.

Figura 23 - Géis de eletroforese de confirmação molecular das transformantes obtidas do CRISPR-Cas9 para deleção do gene *ADH1* na cepa *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 $\Delta$ *pdc1*.



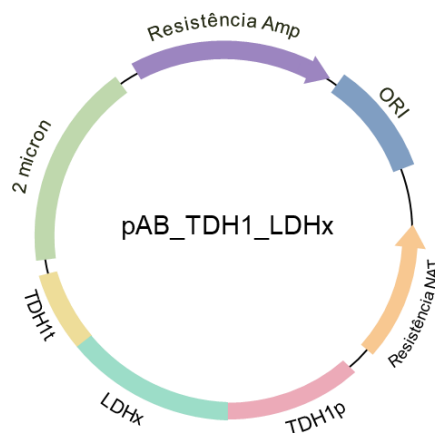
Fonte: Elaborado pela autora. Cada banda corresponde a uma colônia testada, exceto as bandas definidas com “BR-X5”, que representam o controle da reação para o gene íntegro. As colônias passaram por inoculação em meio YPD20 e extração de DNA pelo método de acetato de lítio. A PCR foi realizada com os primers ADH1p\_F e ADH1t\_R rc (resultado de cima) e checkdel\_ADH1\_F e checkdel\_ADH1\_R rc (resultado de baixo). Os tamanhos das bandas correspondem ao gene íntegro, com 1770pb, mostrando que não houve deleção do gene. Algumas amplificações inespecíficas também estão presentes. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

### 4.3 Expressão heteróloga da via de interesse

#### 4.3.1 Construção dos plasmídeos de expressão gênica da enzima lactato desidrogenase (LDH) de diferentes organismos

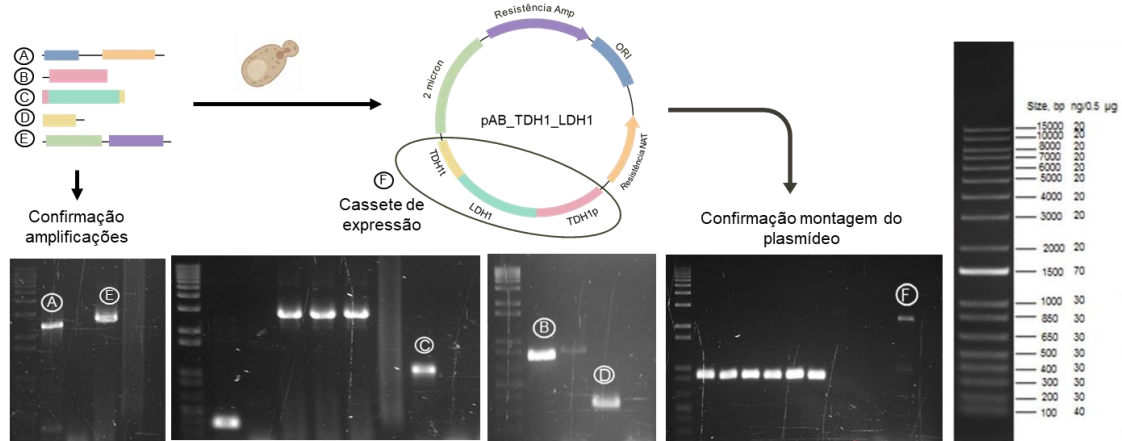
O vetor desenhado para a expressão heteróloga da L-lactato desidrogenase (L-LDH) sob influência de um promotor constitutivo e forte (TDH1) na levedura BR-X5 $\Delta$ PDC1, *pAB\_TDH1\_LDHx*, está esquematizado no Apêndice A e Figura 24. Para cada uma das L-LDHs de diferentes organismos provenientes, construiu-se um plasmídeo diferente: *pAB\_TDH1\_LDH1* (LDH de *Bos taurus*), *pAB\_TDH1\_LDH2* (LDH de *Lactobacillus helveticus*), *pAB\_TDH1\_LDH3* (LDH de *Lactobacillus plantarum*) e *pAB\_TDH1\_LDH4* (LDH de *Lactocaseibacillus casei*). Os primers desenhados para amplificação dos fragmentos de DNA usados na montagem dos vetores estão apresentados no Apêndice C. As figuras 25, 26, 27, 28 e 29 trazem os géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA contendo caudas de homologia, das montagens dos plasmídeos em levedura e transformação em *E. coli* para clonagem do vetor

Figura 24 – Vetor desenhado para a expressão das LDHs heterólogas na cepa de *S. cerevisiae* desenvolvida: L-LDH de *Bos taurus* (*pAB\_THD1\_LDH1*), L-LDH de *Latobacillus helveticus* (*pAB\_THD1\_LDH2*), L-LDH de *Lactobacillus plantarum* (*pAB\_THD1\_LDH3*) e L-LDH de *Lactocaseibacillus casei* (*pAB\_THD1\_LDH4*).



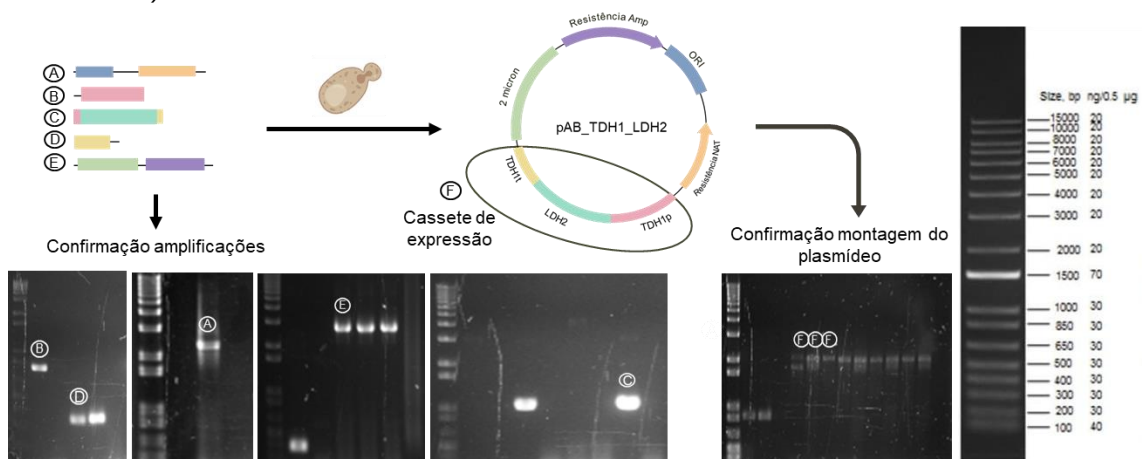
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB\_TDH1\_LDH1 (L-LDH de *Bos taurus*).



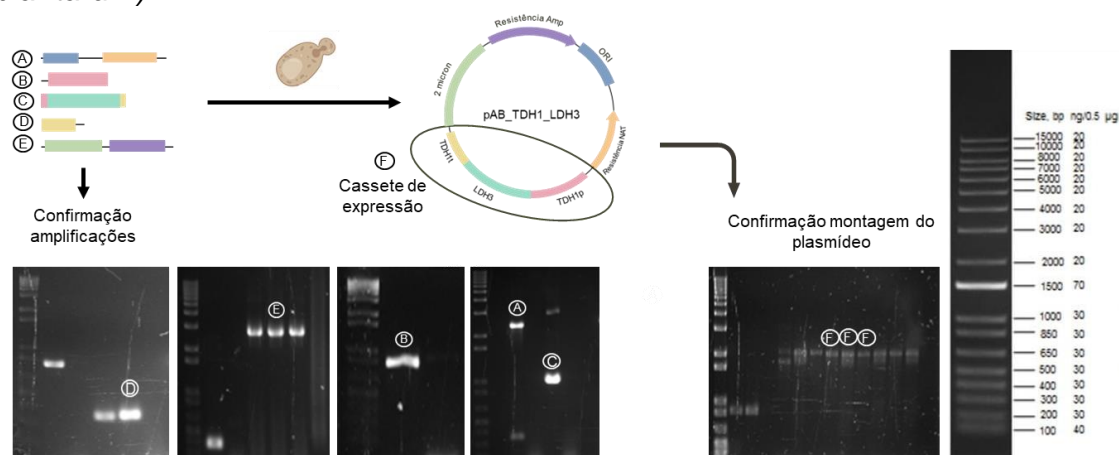
Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: "A" corresponde à amplificação de um fragmento de 2373pb, pelos primers Vector A to B\_F e VectorA\_R rc; o "B" 778pb por TDH1p\_vectorA\_F e Vector A\_R rc (promotor da *TDH1*); o "C" 1063pb por THD1p\_LDH1\_F e LDH1\_TDH1t\_R rc (ORF LDH1); "D" 343pb por TDH1t\_F e TDH1t\_vector B\_rc R (terminador da *TDH1*); o "E" 2751pb por Vector B\_F e VectorB to A\_R rc. Na confirmação, o F corresponde à confirmação do cassete de expressão, 2156pb, com os *primers* TDH1p\_vectorA\_F e TDH1t\_vector B\_rc R. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 26 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB\_TDH1\_LDH2 (L-LDH de *Latobacillus helveticus*).



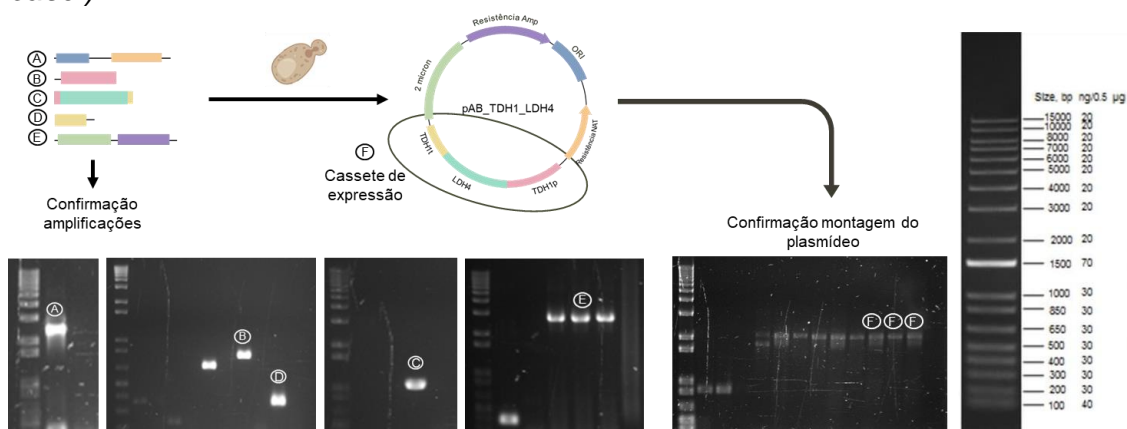
Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: A" corresponde à amplificação de um fragmento de 2373pb, pelos primers Vector A to B\_F e VectorA\_R rc; o "B" 778pb por TDH1p\_vectorA\_F e Vector A\_R rc (promotor da *TDH1*); o "C" 1035pb por THD1p\_LDH2\_F e LDH2\_TDH1t\_R rc (ORF LDH2); "D" 343pb por TDH1t\_F e TDH1t\_vector B\_rc R (terminador da *TDH1*); o "E" 2751pb por Vector B\_F e VectorB to A\_R rc. Na confirmação, o F corresponde à confirmação do cassete de expressão, 2156pb, com os *primers* TDH1p\_vectorA\_F e TDH1t\_vector B\_rc R. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 27 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB\_TDH1\_LDH3 (L-LDH de *Lactobacillus plantarum*).



Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: : A" corresponde à amplificação de um fragmento de 2373pb, pelos primers Vector A to B\_F e VectorA\_R rc; o "B" 778pb por TDH1p\_vectorA\_F e Vector A\_R rc (promotor da *TDH1*); o "C" 1026pb por THD1p\_LDH3\_F e LDH3\_TDH1t\_R rc (ORF LDH2); "D" 343pb por TDH1t\_F e TDH1t\_vector B\_rc R (terminador da *TDH1*); o "E" 2751pb por Vector B\_F e VectorB to A\_R rc. . Na confirmação, o F corresponde à confirmação do cassete de expressão, 21144pb, com os *primers* TDH1p\_vectorA\_F e TDH1t\_vector B\_rc R. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

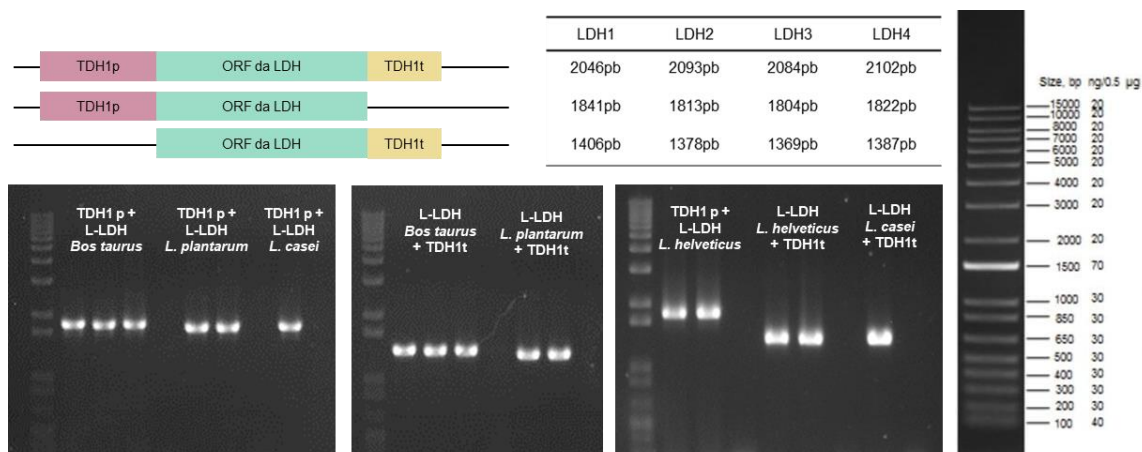
Figura 28 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB\_TDH1\_LDH4 (L-LDH de *Lactocaseibacillus casei*).



Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: A" corresponde à amplificação de um fragmento de 2373pb, pelos primers Vector A to B\_F e VectorA\_R rc; o "B" 778pb por TDH1p\_vectorA\_F e Vector A\_R rc (promotor da *TDH1*); o "C" 1044pb por THD1p\_LDH4\_F e LDH4\_TDH1t\_R rc (ORF LDH2); "D" 343pb por TDH1t\_F e TDH1t\_vector B\_rc R (terminador da *TDH1*); o "E" 2751pb por Vector B\_F e VectorB to A\_R rc. . Na confirmação, o F corresponde à confirmação do cassete de expressão, 2165pb, com os *primers* TDH1p\_vectorA\_F e TDH1t\_vector B\_rc R. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 29 - Confirmação da montagem dos cassetes de expressão heteróloga das L-LDH de *Bos taurus* (pAB\_THD1\_LDH1), L-LDH de *Latobacillus helveticus*

(pAB\_THD1\_LD2), L-LDH de *Lactobacillus plantarum* (pAB\_THD1\_LD3) e L-LDH de *Lactobacillus casei* (pAB\_THD1\_LD4) em *E. coli*.



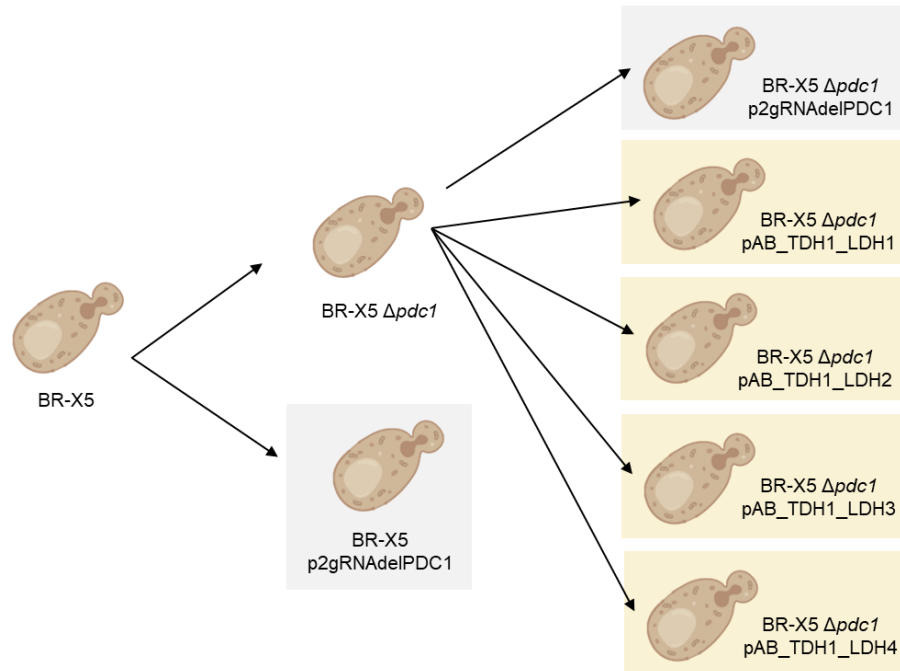
Fonte: Elaborado pela autora. A confirmação foi feita com amplificação de partes cassete de expressão, um contendo o promotor TDH1 e a ORF e outro contendo a ORF e o terminador TDH1, como indicado nos géis eletroforese 1% de agarose. As amplificações foram feitas a partir dos primers TDH1p\_vectorA\_F e LDHx\_TDH1t\_R rc, para o amplicon contendo promotor e ORF, e LDHx\_TDH1p\_F e TDH1t\_vectorB\_R rc, para o amplicon contendo ORF e terminador. Os tamanhos de cada cassete e partes do cassete de expressão estão resumidas na tabela da imagem. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

#### 4.3.2 Obtenção de linhagens mutantes de *S. cerevisiae* com a deleção do gene *PDC1* da via do etanol e expressão da via de interesse

Para a seleção da melhor L-LDH heteróloga para expressão no *chassi* escolhido, desenvolveu-se 4 linhagens, cada uma contendo uma L-LDH de um organismo diferente, e duas linhagens controles (Figura 30). A confirmação da obtenção das leveduras BR-X5 $\Delta$ pdc1 contendo os plasmídeos com os cassetes de expressão das L-LDHs foi realizada por crescimento em marca de seleção e teste molecular, mostrado na Figura 31. Para isso, além do gene *PDC1* deletado, também foi confirmado a presença do cassete de expressão da LDH no DNA extraído (Figura 31). Para verificação molecular da obtenção das leveduras BR-X5 e BR-X5 $\Delta$ pdc1 contendo a resistência a nourseotricina, além da amplificação do locus do *PDC1*, também foi feita a amplificação da parte do plasmídeo p2gRNAdeIPDC1 que contém o gene de resistência ao antibiótico (Figura 31).

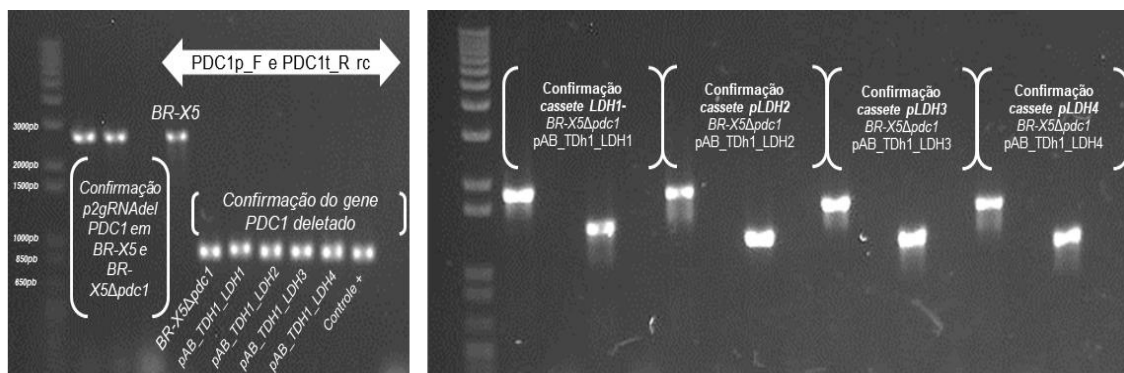
Figura 30 - Esquema representativo das linhagens desenvolvidas para a triagem da melhor enzima de fermentação láctica heteróloga (L-LDH de *Bos taurus*, *Latobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*) para expressão na cepa *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 $\Delta$ pdc1





Fonte: Elaborado pela autora. Em cinza estão as linhagens controle e, em amarelo, as linhagens a serem testadas para a produção de ácido láctico. O plasmídeo p2gRNAdeIPDC1 nesse caso foi usado para padronizar todas as leveduras, para que a BR-X5 e BR-X5Δpdc1 também exibissem resistência a nourseotricina e a presença de um plasmídeo de alta cópia, características do plasmídeo pAB\_TDH1\_LDHx.

Figura 31 - Confirmação molecular linhagens desenvolvidas para a triagem da melhor enzima de fermentação láctica heteróloga (L-LDH de *Bos taurus*, *Latobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lacticaseibacillus casei*) para expressão na cepa *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5Δpdc1.



Fonte: Elaborado pela autora. Para confirmação da presença do plasmídeo p2gRNAdeIPDC1 nas cepas BR-X5 e BR-X5 Δpdc1, foi realizada uma PCR com os primers Aa\_pdc1a\_F e Ab\_pdc1b\_R rc, resultando em um amplicon de 2666pb. Para confirmação das linhagens com o PDC1 deletado, realizou-se uma PCR com os primers PDC1p\_F e PDC1t\_R rc para todas as linhagens do teste mais um controle positivo (PDC1 deletado – 874pb, PDC1 íntegro – 2566pb). Para confirmação da presença dos plasmídeos com os cassetes de expressão, as amplificações foram feitas a partir dos primers TDH1p\_vectorA\_F e LDHx\_TDH1t\_R rc, para o amplicon contendo promotor e ORF (~1800pb), e LDHx\_TDH1p\_F e TDH1t\_vectorB\_R rc, para o amplicon contendo ORF e terminador (~1400pb). Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

### **4.3.3 Cinética fermentativa das linhagens *S. cerevisiae* prova-de-princípio e avaliação da melhor LDH expressa heterologicamente**

As linhagens desenvolvidas foram cultivadas em meio simulando a concentração de açúcares de um hidrolisado lignocelulósico e, a partir da curva de crescimento (Figura 32), foi possível observar que as leveduras BR-X5  $\Delta$ pdc1 com o plasmídeo da LDH1 (pAB\_TDH1\_LDH1) e da LDH4 (pAB\_TDH1\_LDH4) apresentaram taxa de crescimento menor que as outras na fase log. Entretanto, pelos testes estatísticos, essa diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ), o que também é observado nos dados de velocidade específica máxima de crescimento microbiano (Tabela 5). Porém, o mesmo padrão de separação aconteceu para o consumo de açúcares, glicose e xilose (Figura 33), produção de etanol (Figura 34) e de glicerol (Figura 36), apesar de não ser significativo em nenhum desses casos.

No consumo do substrato, é possível verificar a repressão catabólica promovida pela presença de glicose no meio (Figura 33), em que a xilose só começa a ser consumida depois de um tempo, o que também é corroborado pelas velocidades instantâneas de consumo dos substratos nas Tabelas 6 a 11. Também pode-se observar, pelas tabelas 6 a 11, que as leveduras contendo BR-X5  $\Delta$ pdc1 com o plasmídeo da LDH1 e da LDH4 apresentaram um consumo mais lento de xilose com relação às outras.

Para a produção de etanol, foi observado que todas as cepas alcançaram valores próximos ao máximo teórico, em torno de 40 g/L, que, para 90 g/L de açúcar, é de 45,9g/L de etanol (JACKMAN *et al.*, 1991). Como não há diferença significativa entre a produção de etanol pelas linhagens (Figura 34), conclui-se que a deleção do gene PDC1 não afetou a via de fermentação alcoólica da cepa utilizada. Isso também é verificado a partir dos fatores de conversão dos substratos em etanol, que seguem uma mesma tendência (Tabela 6 a 11), e a partir da concentração máxima obtida, em 40 h de fermentação, bem como os rendimentos e produtividades nesse tempo, os quais também não apresentam diferença significativa (Tabela 14).

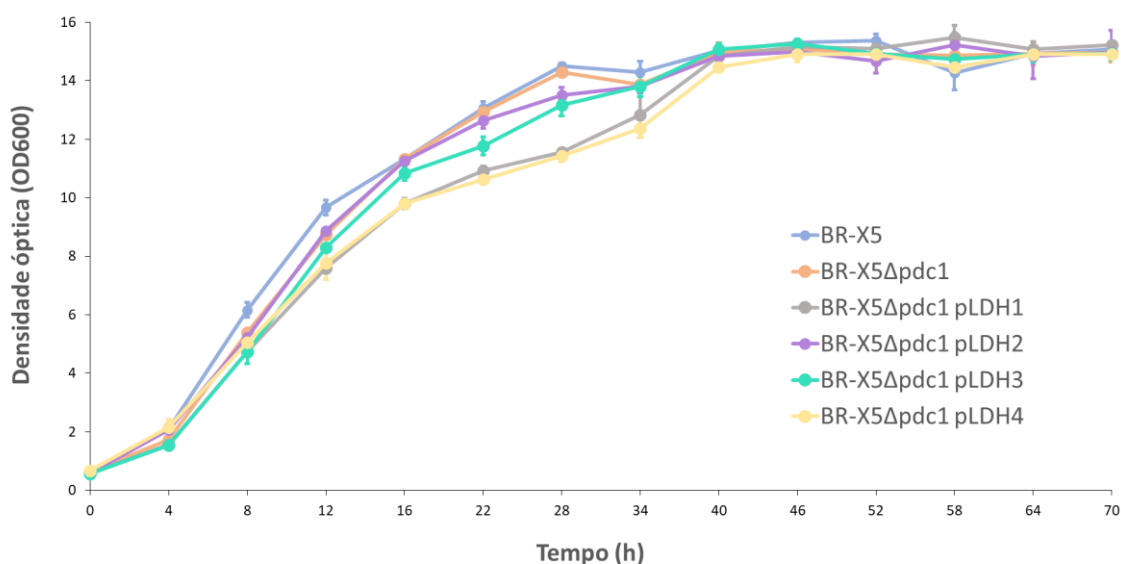
A produção de ácido láctico pelas linhagens com o plasmídeo da LDH2 e LDH3 se assemelhou estatisticamente às linhagens BR-X5 e BR-X5  $\Delta$ pdc1, a partir dos resultados apresentados na Figura 35. Entretanto, nas análises das velocidades instantâneas de produção de ácido láctico e fatores de conversão, é possível observar taxas de produção desse composto nas leveduras com LDH2 e LDH3, apesar de muito

baixas, sobretudo para a levedura com o plasmídeo LDH3 (Tabela 9 e 10). De fato, de acordo com os resultados de rendimento e produtividade de ácido láctico (Tabela 13), verifica-se que apenas as cepas BR-X5  $\Delta pdc1$  pLDH1, BR-X5  $\Delta pdc1$  pLDH2 e BR-X5  $\Delta pdc1$  pLDH4 produziram ácido láctico. Isso demonstra que houve baixa expressão e/ou atividade da enzima L-LDH de *Lactobacillus helveticus* e, provavelmente, nenhuma expressão/atividade para a enzima de *Lactobacillus plantarum*. Observa-se, também, que as linhagens com o plasmídeo da LDH1 e da LDH4 apresentaram diferenças significativas na produção de ácido láctico com relação às linhagens parentais (Figura 35). Isso pode estar associado com a tendência de separação dessas duas linhagens em comparação com as outras em outros parâmetros avaliados.

A partir desses resultados, foi possível observar que a linhagem BR-X5  $\Delta pdc1$ , expressando a L-LDH *Bos taurus* (LDH1), foi a levedura que resultou em maior produção de ácido láctico (1,7 g/L), em 34 horas de fermentação, além de maior rendimento (1,847%) e produtividade (0,0436 g/L.h) do produto de interesse. Portanto, essa enzima é apontada como a enzima escolhida para a integração genômica, uma vez que ela apresentou melhor atividade e/ou expressão no *chassi* microbiano utilizado. Em comparação com a BR-X5 (0,2 g/L), a produção de ácido láctico nessa linhagem foi de 8,5 vezes maior. A fermentação resultou em um pH final acima do pKa do ácido láctico para todas as linhagens e replicatas (Tabela 12).

Com relação à produção de glicerol, apesar do teste de Kruskal-Wallis apontar diferença nas distribuições dos dados, o teste post-hoc de Dunn não foi capaz de apontar em quais linhagens havia essa diferença. Realizando um teste de Mann-Whitney ou Wilcoxon, houve uma diferenciação principalmente da linhagem BR-X5  $\Delta pdc1$  pLDH1 com relação às demais, exceto a BR-X5  $\Delta pdc1$  pLDH4. Enquanto isso, a produção de ácido acético não foi diferente significativamente entre as linhagens ( $p > 0,05$ ) (Figura 37).

Figura 32 - Crescimento microbiano (Densidade óptica a 600 nm) das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta pdc1$  e BR-X5 $\Delta pdc1$  LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPD<sub>X</sub>, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina (NAT).



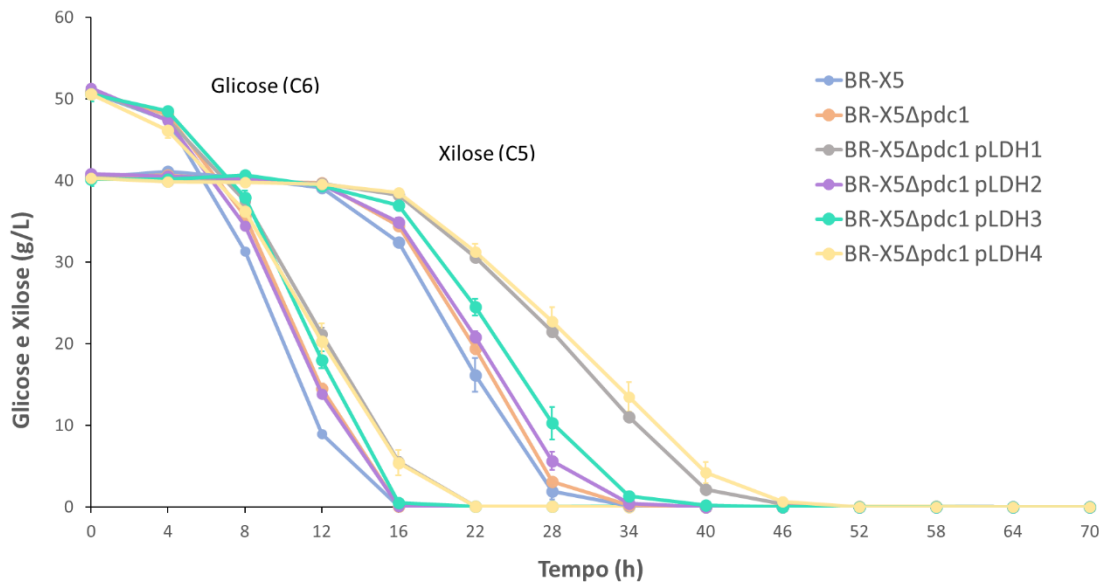
Fonte: Elaborado pela autora. As curvas não são estatisticamente diferentes, a partir dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn ( $p > 0,05$ ). Os dados são resultados da média de uma triplicata e o desvio padrão está representado pelas barras de erro.

Tabela 5 – Velocidade específica máxima de crescimento microbiano das linhagens BR-X5, BR-X5Δpdc1 e BR-X5Δpdc1 LDH1-4 cultivadas em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 μg/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.

Linhagem de fermentação	$\mu$ máx
BR-X5	0,285 ± 0,016 <sup>ns</sup>
BR-X5Δpdc1	0,268 ± 0,011 <sup>ns</sup>
BR-X5Δpdc1 LDH1	0,258 ± 0,001 <sup>ns</sup>
BR-X5Δpdc1 LDH2	0,271 ± 0,003 <sup>ns</sup>
BR-X5Δpdc1 LDH3	0,265 ± 0,012 <sup>ns</sup>
BR-X5Δpdc1 LDH4	0,255 ± 0,024 <sup>ns</sup>

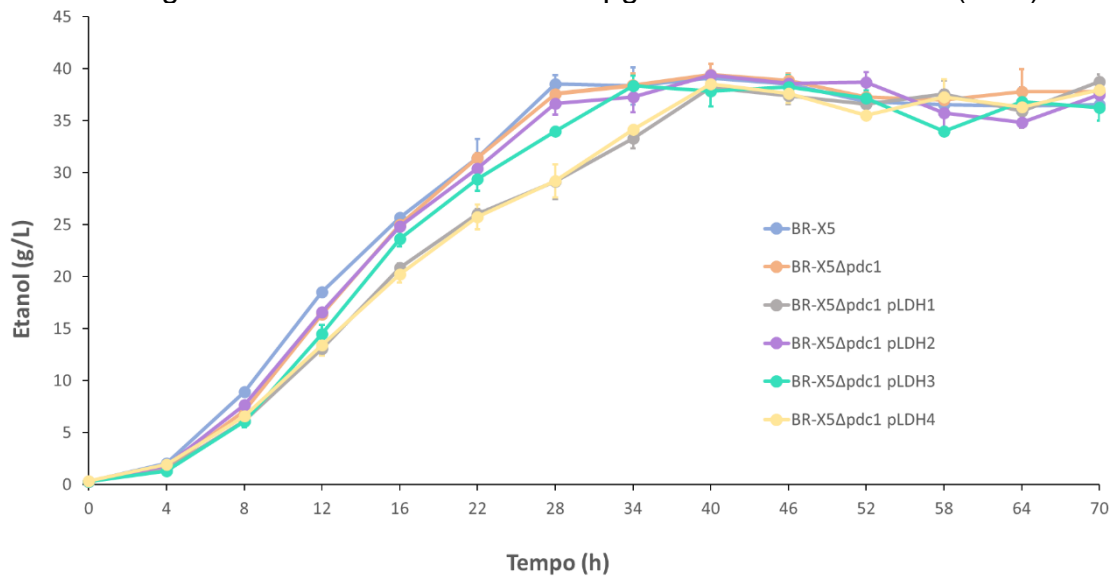
Fonte: Elaborado pela autora. Médias representadas por “ns” não se diferiram significativamente pelo teste de ANOVA ( $p > 0,05$ ).

Figura 33 - Consumo de açúcares (glicose e xilose) das linhagens BR-X5, BR-X5Δpdc1 e BR-X5Δpdc1 LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 μg/mL de nourseotricina (NAT).



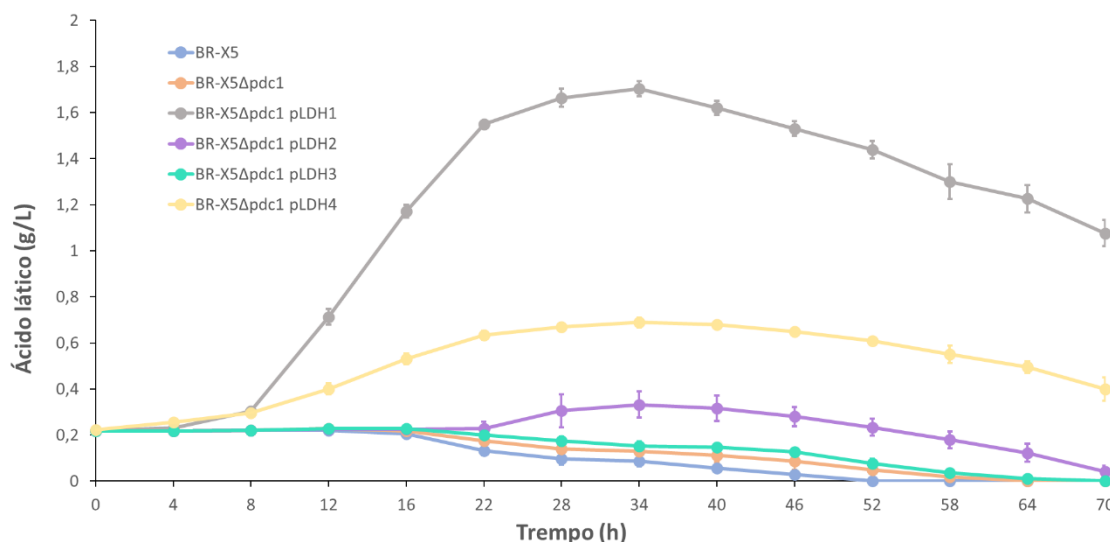
Fonte: Elaborado pela autora. As curvas não são estatisticamente diferentes, a partir dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn ( $p > 0,05$ ). Os dados são resultados da média de uma triplicata e o desvio padrão está representado pelas barras de erro.

Figura 34 - Produção de etanol das linhagens BR-X5, BR-X5Δpdc1 e BR-X5Δpdc1 LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPDX, com 50g /L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 μg/mL de nourseotricina (NAT).



Fonte: Elaborado pela autora. As curvas não são estatisticamente diferentes, a partir dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn ( $p > 0,05$ ). Os dados são resultados da média de uma triplicata e o desvio padrão está representado pelas barras de erro.

Figura 35 - Produção de ácido láctico das linhagens BR-X5, BR-X5Δpdc1 e BR-X5Δpdc1 LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100 μg/mL de nourseotricina (NAT).



Fonte: Elaborado pela autora. As curvas de BR-X5, BR-X5 $\Delta$ pdc1, BR-X5 $\Delta$ pdc1 pLDH2 e BR-X5 $\Delta$ pdc1 pLDH3 não são significativamente diferentes, com valor de  $p > 0,05$  a partir dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn. As curvas BR-X5 $\Delta$ pdc1 pLDH1 e BR-X5 $\Delta$ pdc1 pLDH4 não são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), mas são em relação as demais. Os dados são resultados da média de uma triplicata e o desvio padrão está representado pelas barras de erro.

Tabela 6 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.

BR-X5						
Tempo (h)	rS Glicose (g/Lh)	rS Xilose (g/Lh)	rP Etanol (g/Lh)	rP Ácido láctico (g/Lh)	Y (P Etanol/S)	Y (P ácido láctico/S)
0	0	0	2,459	-0,0004	0	0
4	3,0958	0	2,1158	-0,0019	0,683442	-0,00062
8	5,3438	0,67396	1,8014	-0,00322	0,299347	-0,00053
12	4,3278	1,41764	1,5158	-0,00434	0,263827	-0,00075
16	0,0478	1,92708	1,259	-0,00526	0,637507	-0,00267
22	0	2,15124	0,9278	-0,0063	0,431286	-0,00293
28	0	1,58916	0,6614	-0,0069	0,416195	-0,00434
34	0	0,08532	0,4598	-0,00706	5,389123	-0,08279
40	0	0	0,323	-0,0068	0	0
46	0	0	0,251	-0,0061	0	0
52	0	0	0,2438	-0,00498	0	0
58	0	0	0,3014	-0,00342	0	0
64	0	0	0,4238	-0,00142	0	0
70	0	0	0,611	0,001	0	0

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 7 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 $\Delta$ pdc1 cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.

BR-X5 $\Delta$ pdc1						
Tempo (h)	rS Glicose (g/Lh)	rS Xilose (g/Lh)	rP Etanol (g/Lh)	rP Ácido láctico (g/Lh)	Y (P Etanol/S)	Y (P ácido láctico/S)
0	0	0	2,3753	0,0013	0	0
4	2,375	0	2,0569	-0,00025	0,866063	-0,00011
8	4,5254	0,42144	1,7577	-0,00171	0,355318	-0,00035
12	4,631	1,12816	1,4777	-0,00307	0,256583	-0,00053
16	2,6918	1,77152	1,2169	-0,00433	0,272645	-0,00097
22	0	2,38256	0,8617	-0,00605	0,36167	-0,00254
28	0	2,24624	0,5497	-0,00755	0,24472	-0,00336
34	0	0,99968	0,2809	-0,00883	0,28099	-0,00883
40	0	0	0,0553	-0,0099	0	0
46	0	0	-0,1271	-0,01075	0	0
52	0	0	-0,2663	-0,01139	0	0
58	0	0	-0,3623	-0,01181	0	0
64	0	0	-0,4151	-0,01201	0	0
70	0	0	-0,4247	-0,012	0	0

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 8 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 $\Delta$ pdc1 LDH1 (L-LDH de *Bos taurus*) cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.

BR-X5 $\Delta$ pdc1 LDH1						
Tempo (h)	rS Glicose (g/Lh)	rS Xilose (g/Lh)	rP Etanol (g/Lh)	rP Ácido láctico (g/Lh)	Y (P Etanol/S)	Y (P ácido láctico/S)
0	0	0	1,7144	0	0	0
4	1,9792	0	1,54384	0,030241	0,780032	0,015279
8	3,7248	0,15364	1,38096	0,070017	0,356061	0,018053
12	4,0496	0,49796	1,22576	0,080737	0,269542	0,017754
16	2,9536	0,85572	1,07824	0,070081	0,283053	0,018397
22	0	1,35036	0,87136	0,027793	0,64528	0,020582
28	0	1,70244	0,68176	-0,03178	0,400461	-0,01866
34	0	1,80828	0,50944	-0,09826	0,281726	-0,05434
40	0	1,5642	0,3544	-0,1675	0,226569	-0,10708
46	0	0,86652	0,21664	-0,24158	0,250012	-0,2788
52	0	0	0,09616	-0,3288	0	0
58	0	0	-0,00704	-0,44366	0	0
64	0	0	-0,09296	-0,60691	0	0
70	0	0	-0,1616	-0,8455	0	0

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 9 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 $\Delta$ pdc1 LDH2 (L-LDH de

*Lactobacillus helveticus*) cultivada em meio YPDx, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.

BR-X5Δpdc1 LDH2						
Tempo (h)	rS Glicose (g/Lh)	rS Xilose (g/Lh)	rP Etanol (g/Lh)	rP Ácido láctico (g/Lh)	Y (P Etanol/S)	Y (P ácido láctico/S)
0	0	0	2,2974	-0,0076	0	0
4	2,5564	0	1,9974	-0,00293	0,781333	-0,00115
8	4,5084	0,34956	1,7166	-3,5E-05	0,353358	-7,2E-06
12	4,4924	0,97884	1,455	0,001251	0,265936	0,000229
16	2,5084	1,59468	1,2126	0,001078	0,295534	0,000263
22	0	2,22444	0,885	-0,00158	0,397853	-0,00071
28	0	2,13276	0,6006	-0,00666	0,281607	-0,00312
34	0	0,90492	0,3594	-0,01364	0,397162	-0,01507
40	0	0	0,1614	-0,022	0	0
46	0	0	0,0066	-0,03123	0	0
52	0	0	-0,105	-0,0408	0	0
58	0	0	-0,1734	-0,0502	0	0
64	0	0	-0,1986	-0,0589	0	0
70	0	0	-0,1806	-0,0664	0	0

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 10 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5Δpdc1 LDH3 (L-LDH de *Lactobacillus plantarum*) cultivada em meio YPDx, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 µg/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.

BR-X5Δpdc1 LDH3						
Tempo (h)	rS Glicose (g/Lh)	rS Xilose (g/Lh)	rP Etanol (g/Lh)	rP Ácido láctico (g/Lh)	Y (P Etanol/S)	Y (P ácido láctico/S)
0	0	0	2,1637	0,0019	0	0
4	1,9284	0	1,8981	0,001138	0,984287	0,00059
8	4,0492	0,35124	1,6517	0,000454	0,375349	0,000103
12	4,8068	0,93396	1,4245	-0,00015	0,248138	-2,7E-05
16	4,2012	1,37652	1,2165	-0,00069	0,2181	-0,00012
22	0,7368	1,71036	0,9405	-0,00134	0,384323	-0,00055
28	0	1,55604	0,7077	-0,00182	0,454808	-0,00117
34	0	0,80988	0,5181	-0,00213	0,639724	-0,00262
40	0	0	0,3717	-0,00226	0	0
46	0	0	0,2685	-0,00222	0	0
52	0	0	0,2085	-0,00201	0	0
58	0	0	0,1917	-0,00163	0	0
64	0	0	0,2181	-0,00107	0	0
70	0	0	0,2877	-0,00034	0	0

Fonte: Elaborado pela autora

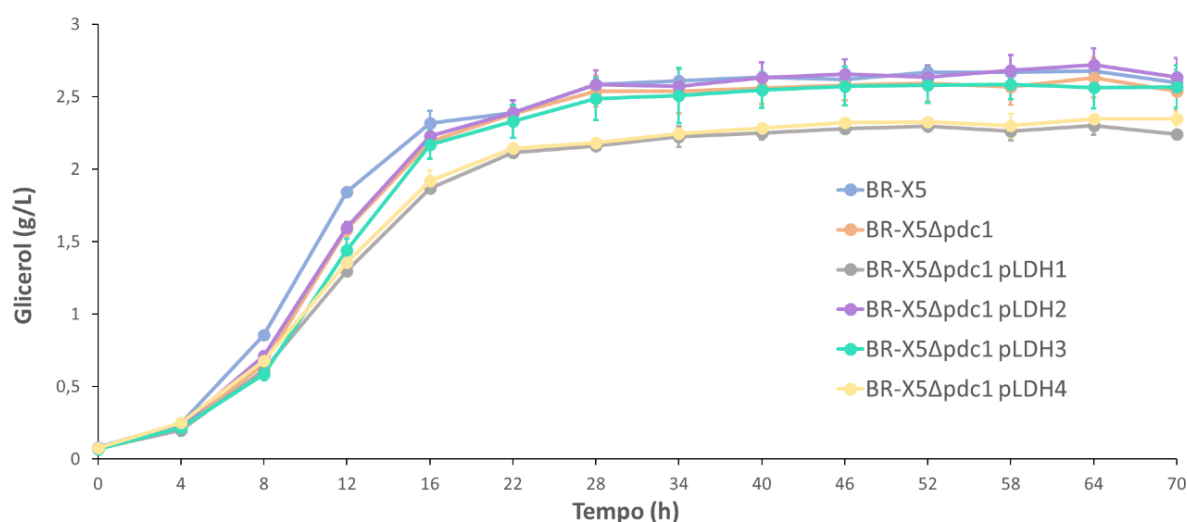


Tabela 11 – Velocidades instâneas de consumo e produção de metabólitos e fator de conversão de substrato em produto da linhagem BR-X5 $\Delta$ pdc1 LDH4 (L-LDH de *Lactocaseibacillus casei*) cultivada em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h.

BR-X5 $\Delta$ pdc1 LDH4						
Tempo (h)	rS Glicose (g/Lh)	rS Xilose (g/Lh)	rP Etanol (g/Lh)	rP Ácido láctico (g/Lh)	Y (P Etanol/S)	Y (P ácido láctico/S)
0	0	0	1,6924	0,016	0	0
4	2,0746	0	1,52776	0,018266	0,736412	0,008804
8	3,6362	0,13134	1,36984	0,018765	0,36359	0,004981
12	3,8826	0,44606	1,21864	0,017651	0,281528	0,004078
16	2,8138	0,80302	1,07416	0,015078	0,29699	0,004169
22	0	1,35046	0,87004	0,008819	0,644255	0,006531
28	0	1,82014	0,68104	0,000141	0,374169	7,74E-05
34	0	2,10838	0,50716	-0,01044	0,240545	-0,00495
40	0	2,1115	0,3484	-0,0224	0,165001	-0,01061
46	0	1,72582	0,20476	-0,03523	0,118645	-0,02041
52	0	0,84766	0,07624	-0,0484	0,089942	-0,05709
58	0	0	-0,03716	-0,0614	0	0
64	0	0	-0,13544	-0,0737	0	0
70	0	0	-0,2186	-0,0848	0	0

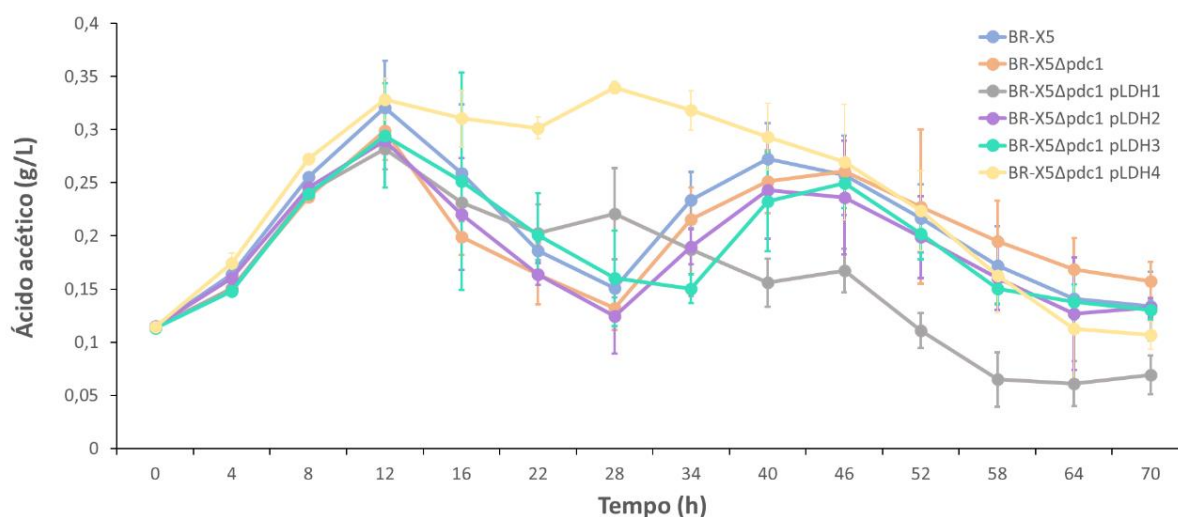
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 36 - Produção de glicerol das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ pdc1 e BR-X5 $\Delta$ pdc1 LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina (NAT).



Fonte: Elaborado pela autora. As curvas das linhagens apresentam diferenças estatísticas entre si, principalmente a da cepa BR-X5 $\Delta$ pdc1 pLDH1 com relação as demais, exceto a da BR-X5 $\Delta$ pdc1 pLDH4, a qual não há diferença significativa, considerando um intervalo de confiança de 95% a partir dos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Wilcoxon. Os dados são resultados da média de uma triplicata e o desvio padrão está representado pelas barras de erro.

Figura 37 - Produção de ácido acético das linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ *pdc1* e BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH1-4 em 70 h de fermentação, a 200 rpm e 30°C, em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina (NAT).



Fonte: Elaborado pela autora. As curvas não são significativamente diferentes, com um  $p > 0,05$  a partir do teste anova. Os dados são resultados da média de uma triplicata e o desvio padrão está representado pelas barras de erro.

Tabela 12 - Potencial hidrogeniônico (pH) do sobrenadante obtido a partir do meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina fermentado a 200 rpm, 30°C e 70 h pelas linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ *pdc1* e BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH1-4.

Linhagem de fermentação	pH
BR-X5	5,416 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>
BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i>	5,35 $\pm$ 0,03464 <sup>ab</sup>
BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH1	4,583 $\pm$ 0,023 <sup>b</sup>
BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH2	5,293 $\pm$ 0,023 <sup>ab</sup>
BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH3	5,34 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>
BR-X5 $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH4	4,99 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>

Fonte: Elaborado pela autora. Médias representadas pela mesma letra não se diferiram significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ( $p < 0,05$ ).

Tabela 13 - Concentração, rendimento e produtividade obtidos para a produção de ácido láctico em 34h de fermentação (tempo em que houve máxima concentração de ácido láctico) pelas linhagens BR-X5, BR-X5 $\Delta$ *pdc1* e BR-X5 $\Delta$ *pdc1* LDH1-4 em meio YPDX, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de nourseotricina, a 200 rpm e 30°C.

Linagem	Concentração máxima (g/L)	Rendimento (g produto/g substrato)	Produtividade (g/L.h)
BR-X5	0,087 ± 0,023 <sup>a</sup>	< 0 <sup>a</sup>	< 0 <sup>a</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i>	0,13 ± 0,023 <sup>ab</sup>	< 0 <sup>ab</sup>	< 0 <sup>ab</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH1	1,704 ± 0,033 <sup>b</sup>	0,01847 ± 0,0004 <sup>b</sup>	0,0436 ± 0,0009 <sup>b</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH2	0,33 ± 0,056 <sup>ab</sup>	0,00126 ± 0,0006 <sup>ab</sup>	0,0034 ± 0,00167 <sup>ab</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH3	0,152 ± 0,02 <sup>ab</sup>	< 0 <sup>ab</sup>	< 0 <sup>ab</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH4	0,69 ± 0,0215 <sup>ab</sup>	0,00602 ± 0,0001 <sup>ab</sup>	0,01371 ± 0,0006 <sup>ab</sup>

Fonte: Elaborado pela autora. Médias representadas pela mesma letra não se diferiram significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ( $p < 0,05$ ).

Tabela 14 - Concentração, rendimento e produtividade obtidos para a produção de etanol em 40h de fermentação (tempo em que houve máxima concentração de etanol) pelas linhagens BR-X5, BR-X5Δ*pdc1* e BR-X5Δ*pdc1* LDH1-4 em meio YPD<sub>X</sub>, com 50 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, acrescido de 100 μg/mL de nourseotricina, a 200 rpm e 30°C.

Linagem	Concentração máxima (g/L)	Rendimento (g produto/g substrato)	Produtividade (g/L.h)
BR-X5	39,102 ± 0,55 <sup>ns</sup>	0,425 ± 0,00468 <sup>ns</sup>	0,970 ± 0,013 <sup>ns</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i>	39,44 ± 1,04 <sup>ns</sup>	0,429 ± 0,012 <sup>ns</sup>	0,979 ± 0,026 <sup>ns</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH1	38,18 ± 0,45 <sup>ns</sup>	0,424 ± 0,003 <sup>ns</sup>	0,948 ± 0,011 <sup>ns</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH2	39,35 ± 0,40 <sup>ns</sup>	0,424 ± 0,004 <sup>ns</sup>	0,976 ± 0,009 <sup>ns</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH3	37,82 ± 1,47 <sup>ns</sup>	0,415 ± 0,022 <sup>ns</sup>	0,939 ± 0,036 <sup>ns</sup>
BR-X5Δ <i>pdc1</i> LDH4	38,54 ± 0,53 <sup>ns</sup>	0,441 ± 0,0009 <sup>ns</sup>	0,955 ± 0,013 <sup>ns</sup>

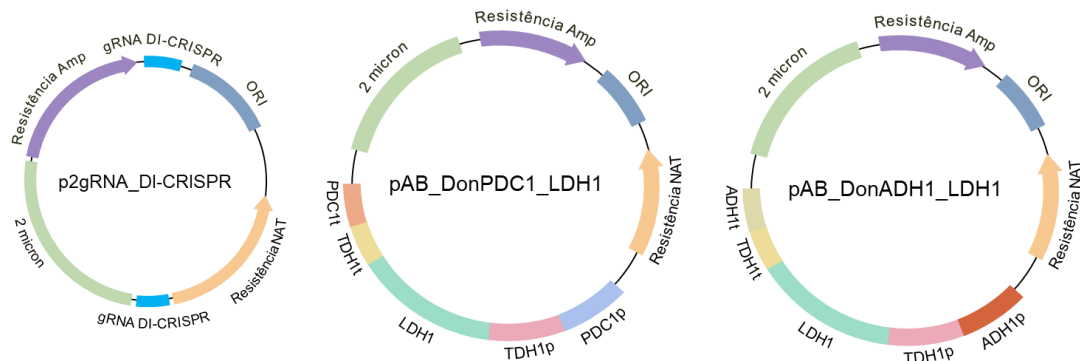
Fonte: Elaborado pela autora. Médias representadas por “ns” não se diferiram significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4 Integração genômica da via de interesse

Para a integração genômica em diferentes cópias da enzima LDH1 (*Bos taurus*), três plasmídeos foram desenhados: p2gRNA\_DI-CRISPR, pAB\_DonPDC1\_LDH1 e pAB\_DonADH1\_LDH1 (Apêndice A, Figura 38). Os primers utilizados foram listados no Apêndice D e o gRNA desenhado na Tabela 15. O plasmídeo p2gRNA\_DI-CRISPR contém o gRNA para clivagem em elementos δ (delta) do genoma, o qual já foi utilizado com sucesso na construção de uma cepa produtora de 2,3-butanol, resultando na integração de 25 cópias do fragmento de interesse (HUANG e GENG, 2020). Os plasmídeos pAB\_DonPDC1\_LDH1 e pAB\_DonADH1\_LDH1 contém os *donors* que serão utilizados no CRISPR-Cas9 com os plasmídeos já mencionados que contém os gRNAs para deleção do *PDC1* e *ADH1*.

Com esses plasmídeos, se objetiva o desenvolvimento de leveduras com integração em uma cópia, no locus *PDC1*, como duas cópias, no locus da *PDC1* e *ADH1*. Até então, os plasmídeos foram montados em levedura por recombinação homóloga (Figura 39) e confirmados por PCR (Figura 40, 41 e 42).

Figura 38 - Vetores desenhados para a utilização do sistema CRISPR-Cas9 na integração genômica da L-LDH de *Bos taurus* na levedura *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5: p2gRNA\_DI-CRISPR, pAB\_DonPDC1\_LDH1 e pAB\_DonADH1\_LDH1.



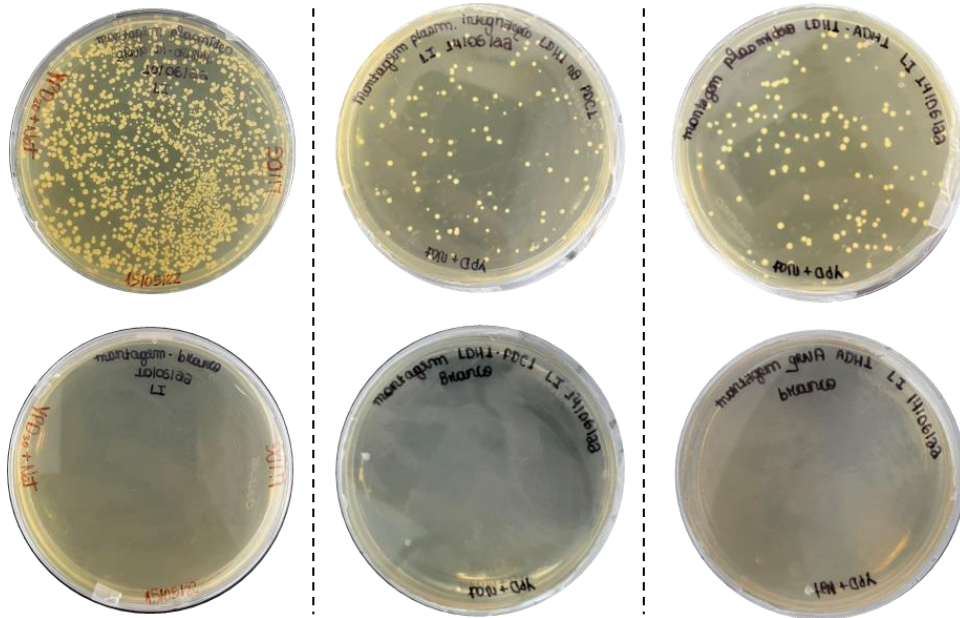
Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 15 - RNA-guia para a integração em multicópia do cassete de expressão da L-LDH de *Bos taurus* nos elementos delta do genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* BR-X5 (HUANG E GENG, 2020).

Nome	RNA-guia + sequência PAM	Eficiência	Alvos não específicos
gRNA	TGAGGATTCCTATATCCTCG AGG	66,74%	194

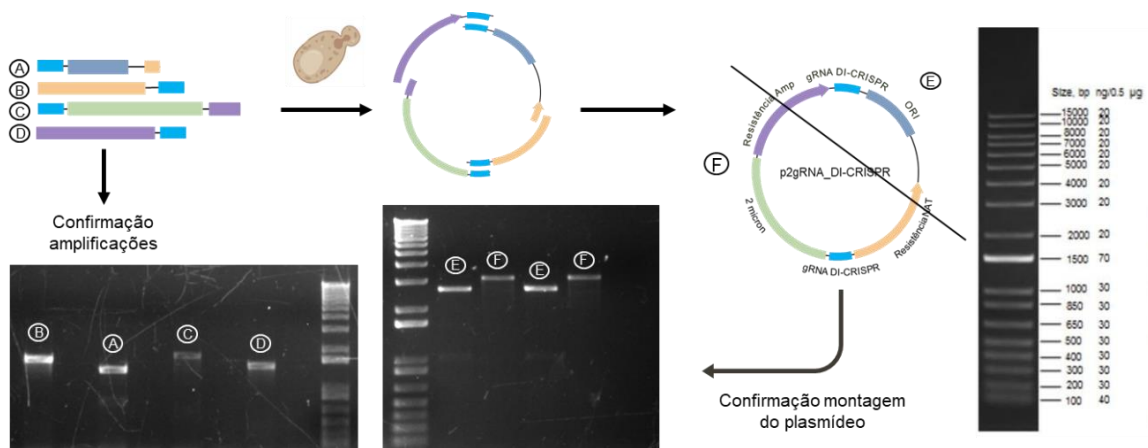
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 39 - Placas de montagem dos plasmídeos p2gRNA\_DI-CRISPR, pAB\_DonPDC1\_LDH1 e pAB\_DonADH1\_LDH1 por recombinação homóloga em levedura.



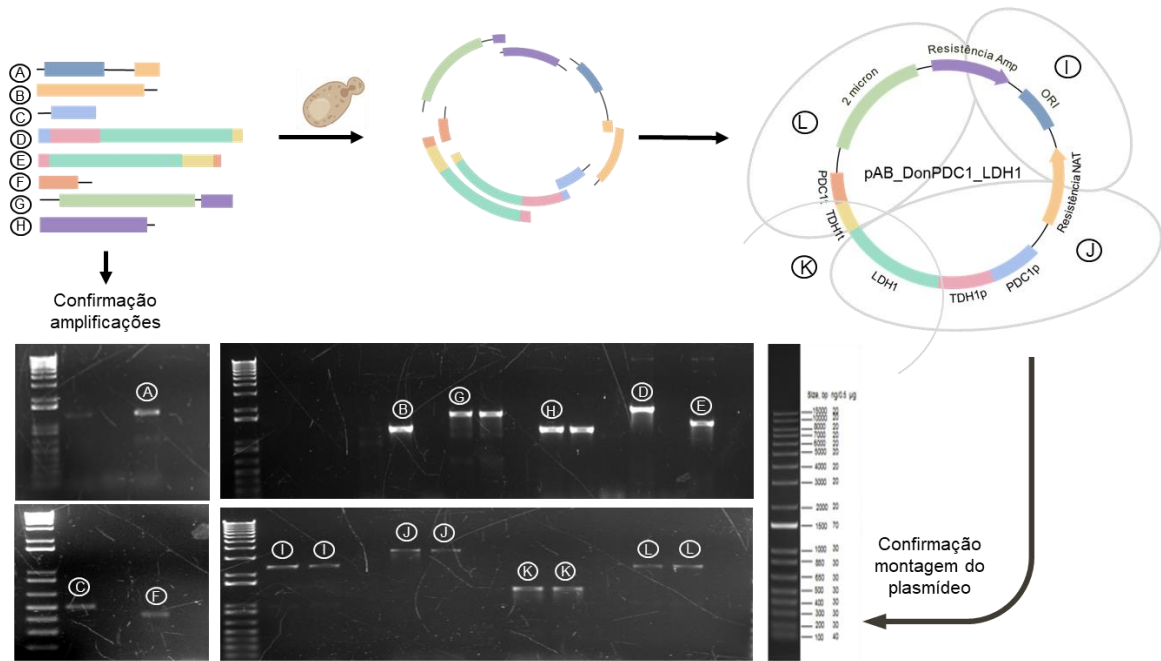
Fonte: Elaborado pela autora. A levedura BY4741 foi transformada com os fragmentos de DNA contendo as caudas de homologia e plaqueadas em meio contendo marca de seleção. Em cima, tem-se as placas resultantes dessa transformação e, em baixo, o branco da transformação, em que não foi adicionado DNA. As colônias, então, passaram por confirmação molecular.

Figura 40 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo p2gRNA\_DI-CRISPR.



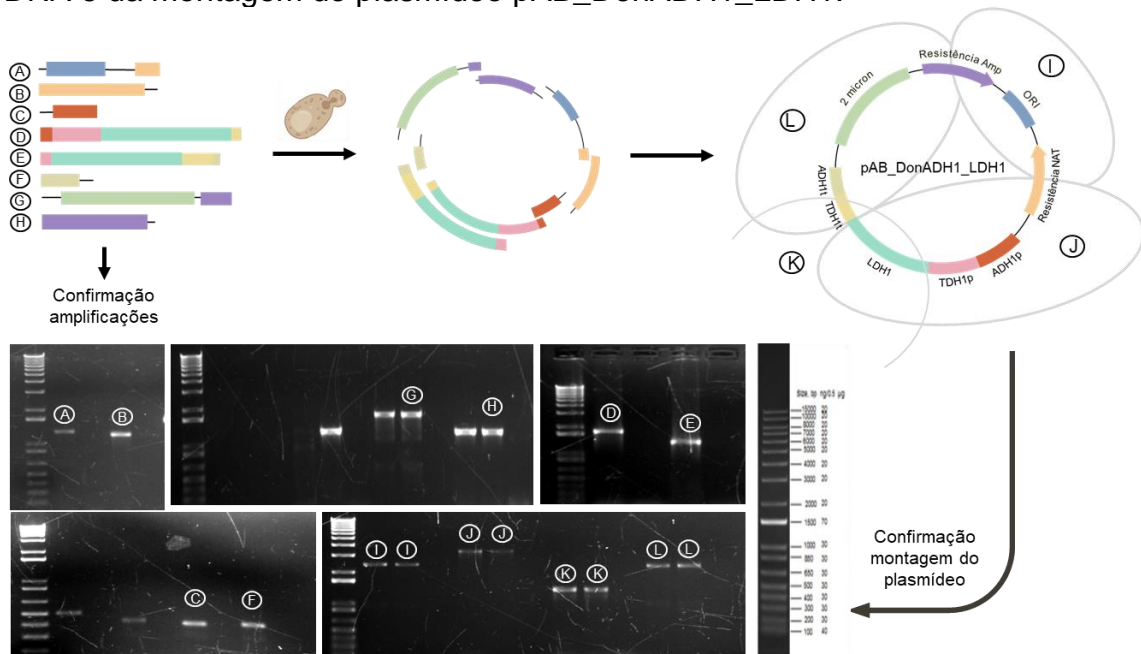
Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: “A” corresponde à amplificação de um fragmento de 1277pb, pelos primers Vector Aa\_Ba\_gRNA  $\delta$ 1e $\delta$ 2\_F e Mxtermf2 ; o “B” 1463 pb por Mxterm5R e Ab\_Bb\_gRNA  $\delta$ 1e $\delta$ 2\_R rc ; o “C” 1650pb por Aa\_Ba\_gRNA  $\delta$ 1e $\delta$ 2\_F e AmpPro; “D” 1405pb por VR e Ab\_Bb\_gRNA  $\delta$ 1e $\delta$ 2\_R rc. A confirmação foi feita em duas partes, com o “E” correspondendo a 2702pb, amplificado pelos primers VR e Mxtermf2; o “E” 3134pb por Mxterm5R e AmpPro. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 41 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB\_DonPDC1\_LDH1.



Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: “A” corresponde à amplificação de um fragmento de 1277pb, pelos primers Vector A to B\_F e Mxtermf2 ; o “B” 1194pb por Mxterm5R e Vector A\_R rc ; o “C” 516pb por PDC1\_Vector A\_F e PDC1p\_R rc ; “D” 1805pb por TDH1p\_PDC1p\_F e LDH1\_TDH1t\_R rc ; o “E” 1372pb por LDH1\_TDH1p\_F e TDH1t\_PDC1t\_R rc ; o “F” 434pb por PDC1t\_F e PDC1t\_vectorB\_R rc ; o “G” 1650pb por Vector B\_F e AmpPro ; o “H” 1136pb VR e Vector B to A\_R rc. A confirmação foi feita em quatro partes, com o “I” correspondendo a 2413pb, amplificado pelos primers VR e Mxtermf2 ; o “J” 3442pb por Mxterm5R e LDH1\_TDH1t\_R rc ; o “K” 1372pb por LDH1\_TDH1p\_F e TDH1t\_PDC1t\_R rc ; o “L” 2350pb por TDH1t\_F e AmpPro. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

Figura 42 - Géis de eletroforese de confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA e da montagem do plasmídeo pAB\_DonADH1\_LDHI.



Fonte: Elaborado pela autora. Na parte de amplificação dos fragmentos de DNA para montagem: "A" corresponde à amplificação de um fragmento de 1277pb, pelos primers Vector A to B\_F e Mxtermf2 ; o "B" 1194pb por Mxterm5R e Vector A\_R rc ; o "C" 409pb por ADH1p\_Vector A\_F e ADH1p\_R rc; "D" 1800pb por TDH1p\_ADH1p\_F e LDH1\_TDH1t\_R rc; o "E" 1371pb por LDH1\_TDH1p\_F e TDH1t\_ADH1t\_R rc; o "F" 423pb por ADH1t\_F e ADH1t\_vectorB\_R rc; o "G" 1650pb por Vector B\_F e AmpPro; o "H" 1136pb VR e Vector B to A\_R rc. A confirmação foi feita em quatro partes, com o "I" correspondendo a 2413pb, amplificado pelos primers VR e Mxtermf2; o "J" 3335pb por Mxterm5R e LDH1\_TDH1t\_R rc; o "K" 1339pb por LDH1\_TDH1p\_F e TDH1t\_ADH1t\_R rc; o "L" 2339pb por TDH1t\_F e AmpPro. Um controle de reação foi feito para todas as reações de PCR e o marcador 1KB plus Thermo Scientific foi utilizado para verificar o tamanho dos amplicons (tamanhos do marcador representados à direita).

## 5 DISCUSSÃO

A partir do contexto de reestruturação da matriz energética atual, o desenvolvimento de processos mais sustentáveis, baseados em recursos renováveis e com menor impacto ambiental, detém grande importância para atingir a sustentabilidade global. A atual produção do ácido láctico, uma molécula que apresenta grande interesse industrial e inúmeras aplicações, envolve impactos ambientais e gargalos econômicos que podem ser superados pela utilização de plataformas microbianas mais robustas e substratos com menor valor agregado. O desenvolvimento de um bioprocessamento mais eficiente, com o emprego de uma levedura produtora de ácido láctico a partir de resíduos agroindustriais e tolerante aos estresses do processo, é imprescindível para viabilizar essas inúmeras aplicações e, principalmente, tornar a comercialização em larga escala do biopolímero PLA economicamente viável.

A plataforma microbiana ideal, produtora de ácido láctico a partir de hidrolisado lignocelulósico, deve apresentar boa tolerância a condições de baixo pH, altas concentrações de ácidos orgânicos e inibidores do hidrolisado lignocelulósico (TRAN e ZHAO, 2021). Esses fenótipos microbianos são imprescindíveis para viabilizar a implementação desse processo industrial e, até o presente momento, apenas uma levedura *S. cerevisiae* com essas características foi relatada para a produção de LA a partir de açúcares de segunda geração (JANG *et al.*, 2021). Apesar disso, nesse estudo, a produção de ácido láctico, feita a partir de hidrolisado de casca de trigo sarraceno, ainda foi considerada baixa, havendo necessidade de melhorias na performance da cepa, incluindo a resistência aos estresses do processo (JANG *et al.*, 2021). Isso demonstra a importância da utilização de estratégias para melhorar esses fenótipos de resistência e, nesse sentido, a triagem e identificação de cepas que demonstrem mecanismos superiores de tolerância é um método muito promissor. A partir delas, é possível o uso de abordagens sistêmicas para explorar a base do seu comportamento fisiológico, na busca de padrões genéticos e evolutivos para a subsequente modificação genética racional ou realização de retrocruzamentos, para melhoria da performance de leveduras na produção de ácidos orgânicos (TRAN e ZHAO, 2021; MARULLO *et al.*, 2009).

Entretanto, na literatura, a triagem de linhagens de *S. cerevisiae* resistentes a altas concentrações de ácido láctico a um pH baixo ainda se restringe a mutantes



gerados a partir de modificações genéticas e evoluções adaptativas. Em um experimento recente, por exemplo, MITSUI *et al.* (2020) reportou uma avaliação do crescimento de mutantes de *S. cerevisiae* em diferentes concentrações de ácido láctico por *spot assay*. Esses mutantes foram desenvolvidos a partir de uma metodologia de evolução do genoma mediado por CRISPR-Cas9, em que uma célula expressando a Cas9 e um RNA-guia para múltiplas clivagens do genoma, passou por uma evolução adaptativa em meio contendo 80g/L de ácido láctico a pH baixo, objetivando a seleção de mutações que contribuam para o fenótipo de resistência (MITSUI *et al.*, 2019; MITSUI *et al.*, 2020). Apesar da utilização da estratégia de evolução, a cepa gerada não foi capaz de crescer em meio YPD sólido suplementado com 80 g/L de LA, nem na coluna correspondente à OD<sub>600</sub> de 1. Enquanto isso, no presente estudo, foi possível identificar cepas de leveduras selvagens e industrial que foram capazes de crescer em 80 g/L a pH 3. Entretanto, MITSUI *et al.* (2020) não fornece informações sobre o pH do meio testado, o qual provavelmente não foi ajustado e deveria estar abaixo de 3, o que deve ter contribuído para a não sobrevivência da levedura. Mesmo assim, isso demonstra o potencial que cepas de *S. cerevisiae* selvagens e industriais possuem para a prospecção de mecanismos de resistência.

Outros estudos também trazem a avaliação da resistência de cepas de levedura por *spot assay* após estratégias de engenharia metabólica. BAEK *et al.* (2017) gerou uma levedura por evolução adaptativa em concentrações crescentes de ácido láctico (10 até 40 g/L) capaz de crescer em meio sólido contendo 10g/L desse ácido orgânico. Enquanto isso, pela deleção de quatro genes ( $\Delta dse2$ ,  $\Delta scw11$ ,  $\Delta eaf3$  e  $\Delta sed1$ ), SUZUKI *et al.* (2013) gerou uma levedura mutante que cresceu em meio sólido com 70g/L de ácido láctico (pH 2,5). Por fim, uma *S. cerevisiae* contendo a superexpressão do gene *ESBP6* foi capaz de crescer em meio contendo 62 g/L de ácido láctico (pH 2,6) (SUGIYAMA *et al.*, 2016).

Portanto, enquanto foi necessário modificações e evoluções adaptativas para o aumento da resistência de cepas de *S. cerevisiae* nos estudos relatados, as cepas testadas neste estudo revelaram uma boa resistência natural devido a mecanismos adaptativos intrínsecos, provavelmente relacionados com o ambiente do qual eles foram isolados. Não há exatamente um consenso acerca da concentração inibitória de ácido láctico para *S. cerevisiae*, uma vez que a cepa, a composição e estado do meio de cultura e o pH do meio podem afetar na resistência da célula (MITSUI *et al.*, 2020; SUZUKI *et al.*, 2013). Entretanto, estudos apontam que a concentração de 50

g/L-60 g/L em um meio a um pH baixo é a concentração em que ocorre efeitos tóxicos para a célula (KUANYSHEV *et al.*, 2020; SUZUKI *et al.*, 2013). De fato, isso foi observado neste trabalho, em que, a partir de 60g/L, foi observado inibição do crescimento da cepa NCY3312 e diminuição do crescimento das demais.

A capacidade de crescimento em 80 g/L de LA a pH 3 da cepa de *S. cerevisiae* PE-2 revela que a utilização da levedura BR-X5, utilizada como *chassi* microbiano para o desenvolvimento da plataforma microbiana deste trabalho, derivada da PE-2, demonstra um potencial para a tolerância ao ácido láctico. A PE-2 (Pedra-2) é uma cepa de *S. cerevisiae* isolada da indústria de bioetanol brasileiro, em que se usa a operação Melle-Boinot, em que as leveduras são recicladas a cada batelada por meio de centrifugação e tratamento ácido (CORADINI *et al.*, 2021). Dessa forma, as células são expostas ao ácido sulfúrico por duas horas antes de serem introduzidas em uma nova fermentação, para redução de bactérias contaminantes (CORADINI *et al.*, 2021). Como microrganismo isolado dessa operação, a PE-2 exhibe naturalmente alta resistência ao ambiente ácido (CORADINI *et al.*, 2021). Apesar de haver diferenças em como os ácidos inorgânicos e orgânicos atingem as células, alguns mecanismos de resistência, como mudanças na estrutura e conteúdo da parede celular, são comuns na resposta aos ácidos e podem explicar por que a PE-2 demonstrou boa resistência a altas concentrações de ácido láctico em um pH baixo (CORADINI *et al.*, 2021; KAWAHATA *et al.*, 2006). Além da evidência deste estudo da resistência aos ácidos orgânicos fracos pela PE-2, o trabalho de Della-bianca e Gombert (2013) demonstraram que essa cepa também é capaz de crescer em concentrações de até 3 g/L de ácido acético em *spot assay*.

As leveduras, como algumas cepas de *S. cerevisiae* e *Z. bailii*, estão entre os principais microrganismos encontrados em bebidas e comidas deterioradas (TAKAGI e KITAGAKI, 2015). Uma vez que normalmente nesses produtos é empregado o uso de ácidos orgânicos fracos como conservantes, essas cepas isoladas exibem respostas adaptativas para o crescimento nessas condições (TAKAGI e KITAGAKI, 2015). De fato, a *S. cerevisiae* ATCC 38555, apontada como altamente resistente ao ácido láctico em baixo pH, é uma levedura originalmente isolada de molho de maçã pasteurizado enlatado na Bélgica. A *Z. bailii* NCYC 1427, apesar de não ter sua origem descrita na literatura, também foi potencialmente isolada de bebidas ou alimentos estragados, uma vez que é muito recorrente encontrar essa espécie nessas condições (KUANYSHEV *et al.*, 2017).

HAITANI *et al.* (2012) realizaram um estudo comparativo de cepas de *S. cerevisiae* e apontaram a cepa ATCC 38555 como uma levedura de elevada resistência a ácido acético. Isso sugere que esses mecanismos também estão envolvidos com a resistência ao ácido láctico e explicam por que essa cepa conseguiu crescer tanto em altas concentrações de LA quanto em hidrolisado a pH 5. Apesar da resposta adaptativa ao ácido láctico ainda não ter sido totalmente elucidada, assim como para outros ácidos orgânicos fracos, como o ácido acético, há alguns mecanismos comuns, como a resposta ao baixo pH intracelular, que resulta no bombeamento de prótons para fora da célula por meio de H<sup>+</sup>-ATPases e para dentro do vacúolo, por V-ATPase (SUGIYAMA *et al.*, 2016; TAKAGI e KITAGAKI, 2015). Além disso, o fator de transcrição Haa1 foi descrito como o principal determinante para a resistência ao ácido láctico, provavelmente envolvido com a diminuição das concentrações de lactato nas células e da reentrada do ácido não dissociado (SUGIYAMA *et al.*, 2016; TAKAGI e KITAGAKI, 2015). De fato, sabe-se que a resposta ao estresse pelo ácido acético também envolve o fator de transcrição Haa1 e os genes induzidos se mostraram ocorrer nas duas condições (INABA *et al.*, 2013; TAKAGI e KITAGAKI, 2015). Outros fatores de transcrição, provavelmente também presentes na resposta ao ácido acético, como Hog1 e Slt2-MAPK, e Nat3, que estão envolvidos na modificação das proteínas da membrana, integridade celular e reparo de DNA, também foram descritos na resposta ao ácido láctico (TAKAGI e KITAGAKI, 2015).

A *Zygosaccharomyces bailii* é uma levedura não-convencional normalmente encontrada em comidas e bebidas estragadas e exibe grande interesse biotecnológico por sua conhecida tolerância a ácidos orgânicos em condições de baixo pH (KUANY SHEV *et al.*, 2017). Kuanyshev *et al.* (2020) relatou a triagem de 7 cepas de *Z. bailii* crescidas em *spot assay* na presença de ácido láctico e ácido acético, entre as quais três cepas revelaram boa resistência a níveis tóxicos desses ácidos a pH 3, sendo 5 g/L de ácido acético e 60 g/L de ácido láctico (KUANY SHEV *et al.*, 2020). O crescimento da *Z. bailii* NCYC 1427 em ácido láctico acima do nível relatado no estudo reforça o potencial dessa cepa para estudos mais aprofundados. Além disso, o hidrolisado utilizado neste trabalho continha 9,5 g/L de ácido acético, além de outros inibidores, o que revela que a *Z. bailii* NCYC 1427 potencialmente possui alta resistência a uma sinergia de inibidores presentes no hidrolisado. Porém, isso foi observado a um pH 5 e, como o pKa do ácido acético é 4,75, a forma predominante neste pH é a menos tóxica. Considerando a existência de outros ácidos com

predominância na sua forma não dissociada em pH 3, como o ácido fórmico (pKa 3,77) e levulínico (pKa 4,59), e a presença de outros inibidores do metabolismo microbiano, sua capacidade de crescimento a pH 3, mesmo sendo mínima, revela mecanismos adaptativos para esse meio adverso, os quais podem ser explorados para a construção de novas plataformas microbianas (KAWAHATA *et al.*, 2006).

A *Brettanomyces bruxellensis* é uma levedura não-convencional que normalmente causa deterioração em alimentos e bebidas, como vinho, cidra e produtos lácteos, alterando seus sabores, além de ser um contaminante encontrado na produção de bioetanol (BLOMQVIST e PASSOTH, 2015; CRAUWELS *et al.*, 2015). Entretanto, essa levedura pode ser usada para adicionar sabores desejáveis a bebidas fermentadas, como as cervejas belgas Lambic e Gueuze (CRAUWELS *et al.*, 2015). De fato, a cepa utilizada neste estudo, a *B. bruxellensis* WLP 4639, é uma levedura isolada em uma cervejaria dos Estados Unidos que produz cervejas belgas. No processo de produção dessas cervejas, a fermentação acontece pela *B. bruxellensis*, mas também por outros microrganismos, como bactérias ácido lácticas, bactérias ácido acéticas e *S. cerevisiae* (CRAUWELS *et al.*, 2015). Apesar de não haver muito conhecimento sobre o metabolismo e resistência dessa espécie, a tolerância ao ácido láctico pela cepa deste estudo pode estar relacionada com esse crescimento na presença de outros organismos, já que há produção de ácidos orgânicos fracos durante o processo e a característica dessa cerveja é o teor ácido. Há evidências também que leveduras dessa espécie produzam altas concentrações de ácido acético, contribuindo para esse ambiente ácido e resistência ao baixo pH decorrente de ácidos orgânicos fracos (BLOMQVIST e PASSOTH, 2015).

Além do estudo dos mecanismos de adaptação de outras cepas de levedura, a modificação genética a partir de dados presentes da literatura também representa uma estratégia promissora para melhorar a capacidade de resistência da cepa desenvolvida. Por exemplo, no trabalho de Sugiyama *et al.* (2016), a superexpressão do gene *ESBP6* se mostrou importante para a manutenção do pH intracelular na presença de ácido. Além disso, Suzuki *et al.* (2013) apontou que a deleção dos genes *DSE1*, *SCW11*, *EAF3* e *SED1*, levou a uma maior resistência a ácido láctico.

Entretanto, antes de se chegar nessa etapa de melhoria da tolerância da plataforma microbiana ao substrato, ao produto e às condições do meio de crescimento, primeiro é necessário passar por etapas iniciais (ABBOTT *et al.*, 2009). O primeiro deles é permitir o acúmulo de piruvato, o substrato da enzima lactato

desidrogenase (LDH), por meio do redirecionamento e diminuição do fluxo de carbono da via de fermentação alcoólica (ABBOTT *et al.*, 2009). O segundo é a expressão heteróloga da enzima (LDH) da via de produção do ácido lático para conversão eficiente no produto de interesse, com outras modificações genéticas visando diminuição do desbalanço redox (ABBOTT *et al.*, 2009).

Dada a importância fundamental da via do etanol no metabolismo da *S. cerevisiae*, alguns desafios são enfrentados na tentativa de redirecionar os fluxos de carbono para outros produtos de interesse. De fato, a deleção completa da fermentação alcoólica já se mostrou uma estratégia desfavorável, com diversas cepas de *S. cerevisiae* sendo estudadas há mais de 25 anos e nenhuma tentativa bem-sucedida em restaurar o crescimento microbiano a níveis convencionais (DAI *et al.*, 2018). Dessa forma, a estratégia utilizada neste estudo foi a deleção parcial da via, especificamente dos genes mais responsáveis pela conversão dos metabólitos a etanol e CO<sub>2</sub>. Essa abordagem já foi realizada com sucesso por outros pesquisadores para a produção de diversos biocompostos, como 2,3-butanediol, ácido málico e o próprio ácido lático (BAEK *et al.*, 2016; ISHIDA *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2016; TOKUHIRO *et al.*, 2009). Entretanto, a deleção parcial da via do etanol na cepa de *S. cerevisiae* BR-X5 se mostrou mais dificultosa do que os estudos relatados na literatura.

A manutenção da homeostase da célula é decorrente de interações do metabolismo fortemente reguladas, as quais também devem ser flexíveis para tornar o organismo capaz de se adaptar a condições ambientais e nutricionais adversas (YU *et al.*, 2019). Em microrganismos como a levedura *S. cerevisiae* PE-2, que é um organismo industrial de robustez elevada, provavelmente há mecanismos regulatórios evolutivos mais fortemente interligados, principalmente envolvendo a produção de etanol. Isso, apesar de ser bom do ponto de vista industrial e fermentativo, por fornecer capacidade da célula sobreviver mesmo em face de estresses industriais, pode impor dificuldades no redesenho do metabolismo pela engenharia metabólica.

Em cepas de *S. cerevisiae*, a *PDC1* é a principal isoenzima, sendo a mais expressa na maioria das condições (ROMAGNOLI *et al.*, 2012). A *PDC5*, por sua vez, apenas é expressa em condições específicas, como em limitação de nitrogênio ou de tiamina e na ausência do gene *PDC1* funcional, uma situação de autorregulação (ROMAGNOLI *et al.*, 2012). Além disso, essas duas isoenzimas são reguladas pelo fator de transcrição Pdc2 e são induzidas na presença de glicose (EBERHARDT *et*

*al.*, 1999; MOJZITA e HOHMANN, 2006). Portanto, quando se realiza a deleção da *PDC1*, há uma autorregulação compensatória que promove o aumento da expressão de *PDC5*. Entretanto, na literatura, como mostrou o estudo de Zhang *et al.*, (2022), normalmente é relatado que, na deleção da *PDC1*, mesmo na presença da *PDC5*, a cepa apresenta um crescimento microbiano menor, além de menor produção de etanol e maior produção de glicerol, resultante do menor fluxo na via do etanol e menor reoxidação dos cofatores por essa via (EBERHARDT *et al.*, 1999). Uma vez que as isoenzimas *PDC1* e *PDC5* não são completamente idênticas, essa compensação apenas parcial provavelmente está ligado com a estrutura e atividade das enzimas, uma vez que já foi relatado um maior  $K_m$  para a *PDC5* em relação a *PDC1*, o que contribui para manter 50-80% da atividade da piruvato descarboxilase em relação a cepa parental (ROMAGNOLI *et al.*, 2012).

Contrariamente a isso, o resultado deste estudo demonstrou que a performance da cepa BR-X5 $\Delta pdc1$  não foi alterada, um fenótipo que talvez tenha ligação com o fato de ser uma cepa industrial. De fato, a maioria das leveduras utilizadas nos trabalhos, onde foi realizado a deleção parcial da via do etanol, são cepas laboratoriais ou isoladas do meio ambiente, sendo menos robustas que as cepas industriais. É possível que, pela robustez inerente de uma levedura derivada da *S. cerevisiae* industrial PE-2, haja mecanismos regulatórios adicionais que façam as outras isoenzimas compensarem totalmente o gene funcional *PDC1*, resultando no fenótipo observado neste trabalho. Outra hipótese é de que a *PDC5* da BR-X5 apresente mutações que a façam mais eficiente e comparável a atividade da *PDC1* ou que a *PDC6* esteja sendo também expressa por regulações compensatórias. Sabe-se que a *PDC6* é normalmente expressa em culturas com limitação de enxofre, por uma regulação transcricional (ROMAGNOLI *et al.*, 2012). Porém, em algumas cepas, a deleção tanto da *PDC1* quanto da *PDC5* não demonstra total depleção da atividade piruvato descarboxilásica, o que indica que talvez a *PDC6* também exiba essa atividade compensatória (ISHIDA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2022). Portanto, outras estratégias se fazem necessárias para a deleção parcial da via do etanol, como a deleção da *PDC5* e a regulação dinâmica da expressão da *PDC5* e *PDC6*, por exemplo por meio da utilização do sistema CRISPR-dCas9 associado com um efector de transcrição (BOWMAN *et al.*, 2020).

A partir de relatos na literatura de que a deleção apenas da *ADH1* resulta no crescimento muito reduzido da cepa mutante, pelo grande acúmulo de acetaldeído

tóxico, a deleção desse gene foi testada na cepa BR-X5 $\Delta$ *pdc1* (TOKUHIRO *et al.*, 2009). Entretanto, como nessa linhagem não houve modificação na conversão metabólica de piruvato em acetaldeído, isso pode ter influenciado a sobrevivência de células BR-X5 $\Delta$ *pdc1* $\Delta$ *adh1*, as quais não conseguiram crescer na mesma taxa que células BR-X5 $\Delta$ *pdc1* durante a recuperação e plaqueamento da transformação. Realmente, obteve-se muitas colônias falso positivas, confirmado pelas transformações controle, que mostra que muito provavelmente elas dominaram o meio de cultura e competiram com as células positivas de menor crescimento. Além disso, levanta-se outras duas hipóteses sobre a deleção não bem-sucedida dessa enzima: a Cas9 pode não ter sido capaz de clivar o gene ADH1 com os gRNAs desenhados; ou o desbalanço redox resultante da deleção da ADH1 propiciou a sobrevivência apenas de cepas falso-positivas. Para testar essas hipóteses, pode-se realizar uma nova tentativa de deleção após o ajuste dos níveis de atividade da piruvato descarboxilase; testagem de novos gRNAs; ou então realizar uma nova tentativa de deleção a partir de cepas mutadas contendo a integração da LDH, para diminuição do desbalanço redox.

A deleção da PDC1 e ADH1 é uma estratégia comum no desenvolvimento de cepas de *S. cerevisiae* produtoras de ácido láctico. Tokuhiro *et al.* (2009), por exemplo, investigaram a deleção apenas da *PDC1* e *ADH1* e das duas em conjunto em uma cepa de *S. cerevisiae* produtora de LA, contendo o gene L-LDH bovino. Enquanto a mutação apenas na *ADH1* inviabilizou o crescimento do microrganismo, a mutação dupla resultou em um aumento no rendimento de lactato produzido, comparado com a cepa apenas com a *PDC1* deletada, embora a taxa de crescimento tenha sido diminuída pela metade pelo aumento de sensibilidade à glicose. Dessa forma, normalmente a deleção do PDC1 resulta em diminuição da atividade de piruvato descarboxilase das cepas, contribuindo para uma redução da produção de etanol e aumento da produção de lactato (BAEK *et al.*, 2017; ISHIDA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2015; MITSUI *et al.*, 2020; NOVY *et al.*, 2017; SUGIYAMA *et al.*, 2016; SUZUKI *et al.*, 2013; TOKUHIRO *et al.*, 2009; WATCHARAWIPAS *et al.*, 2021; ZHONG *et al.*, 2019). Apesar de normalmente isso ocorrer em cepas laboratoriais e selvagens, isso também foi verificado em cepas de produção de vinho, que talvez também possuam maior robustez (ISHIDA *et al.*, 2005). Ishida *et al.* (2005), por exemplo, reportou que a deleção de PDC1 resultou na diminuição de 1/3 da atividade piruvato descarboxilásica em relação a cepa parental, culminando na diminuição de 40,5 g/L para 33,1 g/L de

etanol e resultando na produção de 16,1 g/L de ácido láctico, em crescimento em YPD com 10% de glicose sem adição de neutralizantes. Esses resultados, apesar de não corroborarem com os obtidos neste estudo, demonstram como o redirecionamento da via do etanol é importante no aumento da produção de ácido láctico.

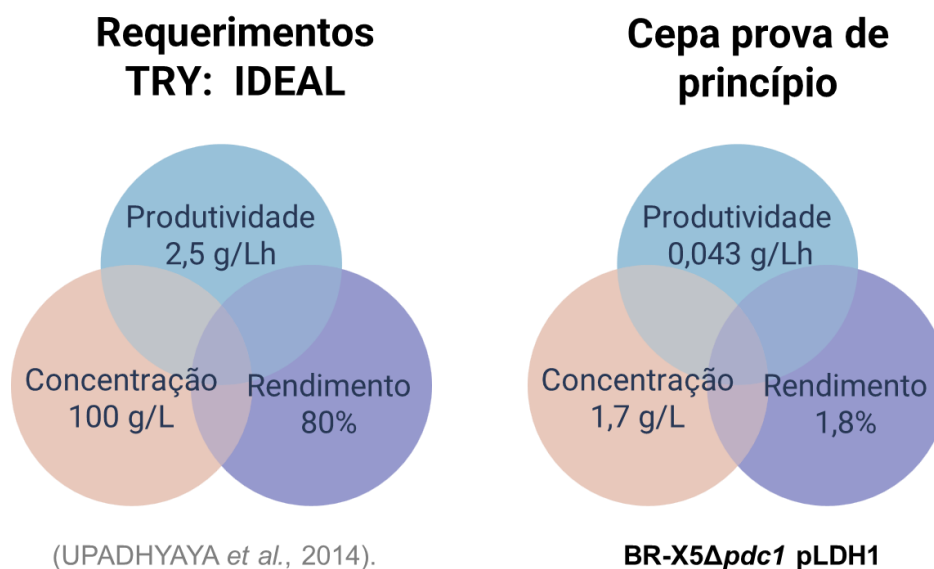
Com relação a escolha da enzima LDH heteróloga expressa para a produção de ácido láctico, é importante que haja o estudo da melhor LDH empregada no *chassi* escolhido, uma vez que a produção de ácido láctico se mostra dependente da cepa de *S. cerevisiae* utilizada e da origem da enzima expressa (BRANDUARDI *et al.*, 2006). De fato, estudos de Branduardi *et al.* (2006) mostraram que a mesma enzima expressa de forma integrativa e sob influência de um promotor constitutivo e forte (TPI) tem diferentes atividades e resulta em diferentes concentrações de ácido láctico dependendo da cepa de *S. cerevisiae* usada. Nesse estudo, a expressão da L-LDH A de *Bos taurus* resultou em concentrações de LA que variaram de 20 mg/L até 801 mg/L em diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Além disso, esse mesmo estudo mostrou que a expressão de diferentes LDHs, incluindo a LDH A de *Bos taurus* e as L-LDHs de *L. plantarum* e *L. casei*, na mesma cepa, resultou em diferentes concentrações de ácido láctico produzido, como também foi observado nos resultados deste estudo. Branduardi *et al.* (2006) apontou a LDH de *L. plantarum* como a melhor enzima, que resultou em 6,15 g/L de ácido láctico em meio YNB 2% de glicose. Em contrapartida, a LDH de *L. plantarum* expressa em BR-X5 não resultou em produção significativa de ácido láctico, corroborando com o fato de que a expressão também é dependente da cepa escolhida. Maiores estudos sobre os níveis de expressão das LDHs, suas atividades enzimáticas e afinidade com o substrato podem ser feitas para investigar a influência das diferentes enzimas na BR-X5, como foi feito em Branduardi *et al.* (2006) e Ishida *et al.* (2005).

Apesar da linhagem contendo a LDH de *Bos taurus* ter apresentado a maior concentração de ácido láctico deste estudo e configurar como uma cepa prova de princípio, com relação a literatura, essa produção ainda é muito pequena. Leveduras produtoras de vinho expressando a LDH de *Bos taurus* já foram relatadas produzindo 50,2 g/L, 55,6 g/L, 64,1 g/L e 122 g/L de ácido láctico (ISHIDA *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2006; TOKUHIRO *et al.*, 2009; SAITOH *et al.*, 2005). Entretanto, essas leveduras foram desenvolvidas com redução parcial da via do etanol e múltiplo número de cópias da enzima, o que contribui para o aumento das concentrações obtidas. Sem a modificação genética de outras vias, a levedura desenvolvida por Turner *et al.* (2015)



atingiu 49,1 g/L de produção de LA em xilose e 9,9 g/L em glicose, o que ainda são concentrações muito maiores do que as obtidas neste estudo. Apesar disso, a obtenção de uma cepa prova de princípio, a qual é capaz de produzir o composto desejado, mesmo em pequenas concentrações, é o primeiro passo para se obter uma cepa produtora industrial (HONG e NIELSEN, 2012). Após isso, se objetiva o desenvolvimento de linhagens para atingir os requerimentos industriais, que para o ácido láctico consiste em um rendimento de 80%, produtividade de 2,5 g/Lh e concentração de 100 g/L, como pode ser visto na Figura 43 (UPADHYAYA *et al.*, 2014).

Figura 43 – Comparação dos requerimentos ideais de concentração, rendimento e produtividade (TRY) demandados pelas industriais para a produção de ácido láctico e os valores obtidos a partir da cepa prova de princípio BR-X5  $\Delta pdc1$  pLDH1 (L-LDH de *Bos taurus*) desenvolvida.



Fonte: Elaborado pela autora

A pequena produção de ácido láctico resultante das cepas desenvolvidas neste estudo, além de ter relação com a drenagem de carbono pela via do etanol, também possui contribuição pela produção de ácido láctico ter sido avaliada a partir de LDHs expressas em plasmídeo de alta cópia. A multiplicação desse plasmídeo dentro da célula utiliza energia que poderia estar sendo direcionada para a produção do produto de interesse. Ishida *et al.* (2005) verificou que a integração genômica de 2 cópias da enzima LDH bovina resultou na produção de 50,6 g/L de ácido láctico, enquanto a

produção em plasmídeo de alta cópia apenas tinha resultado na produção de 16,1 g/L. Além disso, para as linhagens desse estudo, a sobrevivência em antibiótico implica na expressão do gene de resistência, o que também consome metabólitos, ATP e monômeros da célula. Dessa forma, apesar da concentração máxima obtida neste estudo ter sido de 1,7 g/L, é esperado que a real concentração seja verificada quando a enzima for integrada. Isso é relevante também do ponto de vista industrial, uma vez que a utilização de grandes quantidades de antibióticos para manter o plasmídeo na célula é uma técnica dispendiosa.

A utilização de açúcares pelas linhagens desse trabalho demonstra que houve uma repressão catabólica pela glicose. Entretanto, na cepa BR-X5 $\Delta$ *pdc1* cultivada apenas em xilose, pode-se verificar também que há uma captação mais demorada dessa fonte de carbono. Então, em meio contendo essas duas fontes de carbono, mesmo depois do consumo da glicose, a xilose é consumida mais lentamente, sobretudo para as leveduras que apresentaram produção significativa de ácido láctico. Isso pode estar associado com o pico de produção de ácido láctico, que, para a BR-X5 $\Delta$ *pdc1* pLDH1, ocorreu quando a xilose estava sendo consumida, uma vez que já foi relatado maior produção de ácido láctico em xilose como única fonte de carbono (TURNER *et al.*, 2015). Os pesquisadores hipotetizaram que isso ocorreu pelo menor acúmulo de piruvato em meio com xilose, decorrente dessa captação mais lenta dessa fonte de carbono, o que pode favorecer a enzima LDH, por causa da baixa afinidade que a PDC exibe com o substrato. Além disso, também foi discutido que a ausência da sinalização da glicose pode levar a menores fluxos para a produção de etanol, que pode acabar direcionando o piruvato para outras vias, como a do láctico (TURNER *et al.*, 2015). Entretanto, como a produção do ácido láctico pela BR-X5 $\Delta$ *pdc1* pLDH1 começa em torno de 8h de fermentação, quando a glicose ainda está sendo consumida, essa influência da xilose pode ter contribuído apenas parcialmente para atingir o pico de produção.

Ainda em relação aos metabólitos produzidos, a menor produção de glicerol pela cepa BR-X5 $\Delta$ *pdc1* pLDH1 pode estar relacionada com a sua maior produção de ácido láctico. Tradicionalmente, o glicerol é produzido como um mecanismo compensatório para manter o balanço redox das células, regenerando NAD<sup>+</sup> que foram reduzidos na glicólise. Isso é evidenciado, por exemplo, na deleção do ADH1, em que as cepas, além de produzir menos etanol, também possuem uma maior produção de glicerol (BAEK *et al.*, 2016). A via do ácido láctico, entretanto, também

realiza essa reoxidação do NADH, o que pode ter contribuído com a menor necessidade da célula de redirecionar o fluxo metabólico para essa via. Interessantemente, muitos trabalhos que visam o aumento da produção de ácido láctico também fazem a deleção das enzimas da via do glicerol, para impulsionar a redução desses cofatores atrelados à produção de ácido láctico (BAEK *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2015; RYU *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2016).

Dessa forma, a cepa prova de princípio gerada neste trabalho ainda precisa passar por outros ciclos de engenharia metabólica para haver uma produção eficiente de ácido láctico. Branduardi *et al.* (2006) mostrou que um enorme contribuinte para a maior produção de ácido láctico é a superexpressão do gene por aumento do número de cópias. Isso pode ser atingido pela transformação da BR-X5 com os plasmídeos para integração genômica da LDH de *Bos taurus* em diferentes cópias desenvolvidos neste trabalho. Porém, além da integração genômica, outras modificações genéticas também ainda precisam ser feitas, como o ajuste da atividade da piruvato descarboxilase e deleção da ADH1, para redirecionamento do carbono para a via de interesse. Além disso, a deleção dos genes GPD1 e/ou GPD2 podem ser realizados, como foi feito em Baek *et al.* (2016), Lee *et al.* (2016), Ryu *et al.* (2018), Song *et al.* (2016), para aumento da produção de ácido láctico. Outra estratégia bem comum também tem sido a deleção da via de consumo de ácido láctico (Cyb2), como em Ryu *et al.* (2018), Song *et al.* (2016) e Zhong *et al.* (2019). Isso é imprescindível para eliminar a competição pelo uso de ácido láctico como substrato e é ainda mais relevante neste estudo, em que foi observado consumo do ácido láctico pela cepa BR-X5 $\Delta$ *pdc1* pLDH1 mesmo antes da depleção de toda xilose. Ademais, como a melhoria da produção de ácido láctico também tem relação com a resistência da cepa a esse ácido orgânico, outras estratégias podem ser utilizadas para a melhoria desse microrganismo, como evolução adaptativa em meio ácido, cruzamento com as cepas identificadas como mais resistentes neste trabalho, como a *S. cerevisiae* ATCC 38555, exploração de seus mecanismos intrínsecos e a modificação genética de genes relacionados com a resistência ao ácido láctico, como superexpressão do *Haa1* e *ESBP6* (SUGIYAMA *et al.*, 2016).

## 6 CONCLUSÕES

A partir deste estudo, identificou-se as cepas *S. cerevisiae* PE-2, ATCC38555, *Z. bailii* NCYC 1427 e *B. bruxellensis* WLP 4639, como altamente resistentes ao ácido láctico, e a *Z. bailii* NCYC 1427, como resistente aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Portanto, essas quatro cepas exibem potencial para serem exploradas no desenvolvimento da plataforma microbiana produtora de ácido láctico a partir de hidrolisado lignocelulósico. Além disso, a alta tolerância ao ácido láctico da cepa de *S. cerevisiae* PE-2 indica que a levedura BR-X5, utilizada como *chassi* microbiano neste trabalho, potencialmente também apresenta esse fenótipo, que é favorável para o desenvolvimento de um microrganismo produtor desse ácido.

A deleção do gene *PDC1* não acarretou prejuízos na performance da cepa desenvolvida, mas também não resultou em diminuição da produção de etanol, o que revela que novas tentativas de diminuição do fluxo de carbono para a via de fermentação alcoólica devam ser realizadas, abrindo possibilidades para traçar novas estratégias, completando um ciclo DBTL dessa ciência do redesenho do metabolismo. O estudo das LDHs foi imprescindível para identificar a melhor enzima expressa na cepa escolhida, com a L-LDH A de *Bos taurus* sendo apontada como a mais promissora. Com a expressão dessa enzima em plasmídeo de alta cópia e sob influência de um promotor constitutivo e forte, foi possível o desenvolvimento de uma cepa de *S. cerevisiae* prova de princípio para a produção de ácido láctico, com concentração máxima de 1,7 g/L, rendimento de 1,8% e produtividade de 0,043 g/L.h. Apesar da obtenção bem-sucedida dessa cepa prova de princípio, para atingir os requerimentos industriais, ainda é necessário que a linhagem passe por mais ciclos de engenharia metabólica.

Por fim, o desenvolvimento dos plasmídeos de integração genômica permite a exploração de novos ciclos DBTL para a construção da plataforma microbiana produtora de ácido láctico, com o estudo da influência de diferentes números de cópias integradas no genoma. Além disso, a integração também favorece a realização de novas estratégias para redirecionamento do carbono da via do etanol para a via de fermentação láctica, como a deleção do gene *ADH1*, que não foi possível de ser realizado neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAS N.; KALAIR A.; KHAN N. Review of fossil fuels and future energy technologies. **Futures**, v. 69, p. 31-49, 2015.

ABEDI, E.; HASHEMI, S. M. B. Lactic acid production—producing microorganisms and substrates sources-state of art. **Heliyon**, v. 6, n. 10, e04974, 2020.

ABBOTT, D. A. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 8, p. 1123-1136, 2009.

ALMEIDA, R. M.; MODIG, T.; PETERSSO, A. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v 82, p 340-349, 2007.

ARNEBORG, N.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. **Archives of microbiology**, v. 174, n. 1, p. 125-128, 2000.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 2003.

AYODELE, B. V. *et al.* An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first-and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, v. 245, p. 118857, 2020.

BAEK, S.-H. *et al.* Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2737-2748, 2016.

BAEK, S.-H. *et al.* Improvement of d-lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* under acidic conditions by evolutionary and rational metabolic engineering. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 10, p. 1700015, 2017

BAI FLAGFELDT, D. *et al.* Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, n. 10, p. 545-551, 2009.

BALLA, E. *et al.* Poly (lactic Acid): A Versatile Biobased Polymer for the Future with Multifunctional Properties—From Monomer Synthesis, Polymerization Techniques and Molecular Weight Increase to PLA Applications. **Polymers**, v. 13, n. 11, p. 1822, 2021.

BASSO, L. C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008

BLOMQUIST, J.; PASSOTH, V. Dekkera bruxellensis—spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 4, p. fov021, 2015.

BORODINA, I.; NIELSEN, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. **Biotechnology journal**, v. 9, n. 5, p. 609-620, 2014.

BOWMAN, E. K. *et al.* Bidirectional titration of yeast gene expression using a pooled CRISPR guide RNA approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 31, p. 18424-18430, 2020.

BRANDUARDI, P. *et al.* Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 134p. Disponível em: Biodiversidade - V.16, N1, 2017 - pág. 152. Acesso em: 08 junho 2022.

BUENO, J. G. R.; BORELLI, G.; CORRÊA, T. L. R.; FIAMENGHI, M. B.; JOSÉ, J.; CARVALHO, M.; OLIVEIRA, L. C.; PEREIRA, G. A. G.; SANTOS, L. V.. Novel xylose transporter Cs4130 expands the sugar uptake repertoire in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains at high xylose concentrations. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2020.

CHI, Haotian *et al.* Engineering and modification of microbial chassis for systems and synthetic biology. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25-33, 2019.

CHOI, Kyeong Rok *et al.* Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 817-837, 2019.

COLOMBIÉ, S.; SABLAYROLLES, J. Nicotinic acid controls lactate production by K1-LDH: a *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a bacterial LDH gene. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 209-215, 2004.

CONCORDET, J.-P.; HAEUSSLER, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W242-W245, 2018.

CORADINI, A. L. V. *et al.* QTL mapping of a Brazilian bioethanol strain links the cell wall protein-encoding gene GAS1 to low pH tolerance in *S. cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2021.

CRAUWELS, S. *et al.* *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. **BrewingScience**, v. 68, n. 9, p. 110-121, 2015

CURCIO, M. J.; LUTZ, S.; LESAGE, P. The Ty1 LTR-retrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 2, p. 3.2. 19, 2015.

DAHMEN, N.; LEWANDOWSKI, I.; ZIBEK, S.; WEIDTMANN, A. Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. **GCB Bioenergy**, v. 11, p. 107-117, 2019.

DAI, Z. *et al.* Global rewiring of cellular metabolism renders *Saccharomyces cerevisiae* Crabtree negative. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2018.

DE SMIDT, O.; DU PREEZ, J. C.; ALBERTYN, J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 967-978, 2008.

DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 6, p. 1083-1095, 2013.

DORDEVIĆ, D. *et al.* Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes. **Journal of Advanced Research**, 2020.

DOS SANTOS, L. V. *et al.* Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

DUPONT-INGLIS, J.; BORG, A. Destination bioeconomy—The path towards a smarter, more sustainable future. **New biotechnology**, v. 40, p. 140-143, 2018.

EBERHARDT, I. *et al.* Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity. **European journal of biochemistry**, v. 262, n. 1, p. 191-201, 1999.

ERNI-CASSOLA, G. *et al.* Distribution of plastic polymer types in the marine environment: A meta-analysis. **Journal of hazardous materials**, v. 369, p. 691-698, 2019.

ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, D. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. S.; LÓPEZ-PACHECO, I. Y.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Resource recovery of lignocellulosic biomass waste into lactic acid-Trends to sustain cleaner production. **Journal of Environmental Management**, v. 301, 113925, 2022.

FLIKWEERT, M. T. *et al.* Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. **Yeast**, v. 12, n. 3, p. 247-257, 1996.

FONSECA, L. M.; PARREIRAS, L. S.; MURAKAMI, M. T. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, p. 1-15, 2020.

GAMBACORTA, Francesca V. *et al.* Rewiring yeast metabolism to synthesize products beyond ethanol. **Current opinion in chemical biology**, v. 59, p. 182-192, 2020

GEIJER, C.; LEDESMA-AMARO, R.; TOMÁS-PEJÓ, E. Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. foab071, 2022.

GENEROSO, W. C. *et al.* Simplified CRISPR-Cas genome editing for *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of microbiological methods**, v. 127, p. 203-205, 2016.

GENG, P.; ZHANG, L.; SHI, Gui Y. Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 1-8, 2017.

GEORGE, A. *et al.* A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 329-338, 2020.

GIETZ, D. R.; SCHIESTL, R. H. **Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method**. *Nature Protocols*, Vol. 2 – No.1, 2007.

HAITANI, Y. *et al.* Identification of an acetate-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization by gene expression analysis. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 648-651, 2012.

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U. *et al.* Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: current state, challenges, and opportunities. **Applied sciences**, v. 9, n. 18, p. 3721, 2019.

HONG, K.-K.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 16, p. 2671-2690, 2012.

HUANG, S.; GENG, A. High-copy genome integration of 2, 3-butanediol biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* via in vivo DNA assembly and replicative CRISPR-Cas9 mediated delta integration. **Journal of biotechnology**, v. 310, p. 13-20, 2020.

INABA, T. *et al.* An organic acid-tolerant HAA1-overexpression mutant of an industrial bioethanol strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its application to the production of bioethanol from sugarcane molasses. **AMB express**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2013.



ISHIDA, N. *et al.* Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1964-1970, 2005.

ISHIDA, N. *et al.* The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 5, p. 1148-1153, 2006.

JANG, B.-K. *et al.* L-Lactic Acid Production Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae* with Improved Organic Acid Tolerance. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 928, 2021.

JULLESSON, D. *et al.* Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1395-1402, 2015.

KANG, N. K, *et al.* L-malic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, p. 2000431, 2021.

KAWAHATA, M. *et al.* Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 6, p. 924-936, 2006.

KIM, J.-W. *et al.* Lactic acid production from a whole slurry of acid-pretreated spent coffee grounds by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 189, n. 1, p. 206-216, 2019.

KIRCHER, M. Bioeconomy—present status and future needs of industrial value chains. **New Biotechnology**, v. 60, p. 96-104, 2021.

KUANYSHEV, N. *et al.* Domesticating a food spoilage yeast into an organic acid-tolerant metabolic engineering host: Lactic acid production by engineered *Zygosaccharomyces bailii*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 118, n. 1, p. 372-382, 2021.

KUMAR, A. *et al.* Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 564-582, 2021

LAM, F. H. *et al.* Engineered yeast tolerance enables efficient production from toxified lignocellulosic feedstocks. **Science Advances**, v. 7, n. 26, p. eabf7613, 2021.

LABUN, K. *et al.* CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W171-W174, 2019.

LABUN, K. *et al.* CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W272-W276, 2016.

- LEE, J. Y. *et al.* Engineering cellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of L-lactic acid. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 751-758, 2015.
- LEE, J. J. *et al.* Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by a deletion of *ssb1*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 87-96, 2016.
- LEE, Y.-G; SEO, J.-H. Production of 2, 3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2019.
- LI, G. *et al.* Synthesis and biological application of polylactic acid. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5023, 2020.
- LI, Y. *et al.* Sustainable lactic acid production from lignocellulosic biomass. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 3, p. 1341-1351, 2021.
- LIAN, J. *et al.* Engineered CRISPR/Cas9 system for multiplex genome engineering of polyploid industrial yeast strains. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 1630-1635, 2018.
- LÖÖKE, M.; KRISTJUHAN, K.; KRISTJUHAN, A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. **Biotechniques**, v. 50, n. 5, p. 325-328, 2011.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A. I. *et al.* Challenges in the production of second-generation organic acids (potential monomers for application in biopolymers). **Biomass and Bioenergy**, v. 149, p. 106092, 2021.
- MARTÍN, C.; JÖNSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3-4, p. 386-395, 2003.
- MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; SALGADO, J. M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in food science & technology**, v. 30, p. 70-83, 2013.
- MIMITSUKA, T. *et al.* Production of d-lactic acid in a continuous membrane integrated fermentation reactor by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*: Enhancement in d-lactic acid carbon yield. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 119, n. 1, p. 65-71, 2015.
- MITSUI, R.; YAMADA, R.; OGINO, H. Improved stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR-Cas-mediated genome evolution. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 189, n. 3, p. 810-821, 2019.
- MITSUI, R. *et al.* Construction of lactic acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* by using CRISPR-Cas-mediated genome evolution for efficient d-lactic acid production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 9147-9158, 2020.

MONTAGUE, T. G.; CRUZ, J. M.; GAGNON, J. A.; CHURCH, G. M.; VALEN, E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W401-W407, 2014.

MOJZITA, D.; HOHMANN, S. Pdc2 coordinates expression of the THI regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular genetics and genomics**, v. 276, n. 2, p. 147-161, 2006.

MARULLO, P. *et al.* Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 8, p. 1148-1160, 2009.

NIELSEN, J.; KEASLING, J. D. Engineering cellular metabolism. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1185-1197, 2016

NOVY, V. *et al.* Toward "homolactic" fermentation of glucose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring a kinetically efficient L-lactate dehydrogenase within pdc1-pdc5 deletion background. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 1, p. 163-171, 2017.

NOVY, V.; BRUNNER, B.; NIDETZKY, B. L-Lactic acid production from glucose and xylose with engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: aeration and carbon source influence yields and productivities. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2018.

OWCZARZY, R, *et al.* IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl\_2, p. W163-W169, 2008.

PACHECO, A. *et al.* Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 3, p. 375-381, 2012.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. M. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2014.

PALERMO, G. C. de L. *et al.* Exploring metal ion metabolisms to improve xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 2101-2115, 2021.

PARAPOULI, M. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2020.

PEREIRA, T. C. *et al.* (org.). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016.

PEREIRA, Rui *et al.* Metabolic Engineering of Yeast. **Metabolic Engineering: Concepts and Applications**, v. 13, p. 689-733, 2021.

PIOTROWSKI, J. S. *et al.* Death by a thousand cuts: the challenges and diverse landscape of lignocellulosic hydrolysate inhibitors. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 90, 2014.

RAO, M. G.; BHARATHI, P.; AKILA, R. M. A comprehensive review on biopolymers. **Sci. Revs. Chem. Commun**, v. 4, n. 2, p. 61-68, 2014.

ROMA, J. C. Os objetivos de desenvolvimento do milênio e sua transição para os objetivos de desenvolvimento sustentável. **Ciência e cultura**, v. 71, n. 1, p. 33-39, 2019.

ROMAGNOLI, G. *et al.* Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7538-7548, 2012.

RYU, A. J. *et al.* Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced production of L-lactic acid by co-expression of acid-stable glycolytic enzymes from *Picrophilus torridus*. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 8, p. 1673-1679, 2018

SADASIVUNI, K. K. *et al.* Recent advances in mechanical properties of biopolymer composites: A review. **Polymer Composites**, v. 41, n. 1, p. 32-59, 2020.

SAITOH, S. *et al.* Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2789-2792, 2005.

SCHWARZ, A. E. *et al.* Sources, transport, and accumulation of different types of plastic litter in aquatic environments: a review study. **Marine pollution bulletin**, v. 143, p. 92-100, 2019.

SHI, Shuobo *et al.* A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 33, p. 19-27, 2016.

SINGH, N.; SINGHANIA, R. R.; NIGAM, P. S.; DONG, C.-D.; PATEL, A. K.; PURI, M. Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 344, 126415, 2022.

SOLARTE-TORO, J. C.; ALZATE, C. A. C. Biorefineries as the base for accomplishing the sustainable development goals (SDGs) and the transition to bioeconomy: Technical aspects, challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 340, 125626, 2021.

SONG, J.-Y. *et al.* Introduction of a bacterial acetyl-CoA synthesis pathway improves lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 35, p. 38-45, 2016.

STOVICEK, V.; BORODINA, I.; FORSTER, J. CRISPR–Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Metabolic Engineering Communications**, v. 2, p. 13-22, 2015.

SUGIYAMA, M. *et al.* Overexpression of ESBP6 improves lactic acid resistance and production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 122, n. 4, p. 415-420, 2016.

SUN, L. *et al.* Current advance in biological production of short-chain organic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 9109-9124, 2020.

SUZUKI, T. *et al.* Lactic-acid stress causes vacuolar fragmentation and impairs intracellular amino-acid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 421-430, 2012.

SUZUKI, T. *et al.* Disruption of multiple genes whose deletion causes lactic-acid resistance improves lactic-acid resistance and productivity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 5, p. 467-474, 2013.

TAKAGI, H.; KITAGAKI, H. (Ed.). *Stress Biology of Yeasts and Fungi*. 2015

TOKUHIRO, K. *et al.* Double mutation of the PDC1 and ADH1 genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 883-890, 2009.

TRAN, V. G.; ZHAO, H. Engineering robust microorganisms for organic acid production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2021.

TURNER, T. L. *et al.* Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8023-8033, 2015.

TURNER, T. L. *et al.* Lactic acid production from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 1075-1083, 2016.

TURNER, T. L. *et al.* Conversion of lactose and whey into lactic acid by engineered yeast. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 124-128, 2017.

UNTERGASSER A. Preparation of Electro-Competent Cells. *Untergasser's Lab*, 2008. Disponível em:  
<[http://www.untergasser.de/lab/protocols/competent\\_cells\\_electro\\_v1\\_0.htm](http://www.untergasser.de/lab/protocols/competent_cells_electro_v1_0.htm)>.  
Acesso em: 20 de janeiro de 2022.

UPADHYAYA, B. P.; DEVEAUX, L. C.; CHRISTOPHER, L. P. Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 637-644, 2014.

VAN LEEUWEN, J.; ANDREWS, B.; BOONE, C.; TAN, G.. Rapid and efficient plasmid construction by homologous recombination in yeast. **Cold Spring Harbor Protocols**, n. 9, p. 853- 861, 2015.

VAN MARIS, A. J. A. *et al.* Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2898-2905, 2004

WATCHARAWIPAS, A. *et al.* Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for D-lactic acid production with near theoretical yield. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 4, p. 024, 2021.

WENDLAND, J.. Non-Conventional Yeasts: Genomics and Biotechnology. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 21, 2019.

XU, G. *et al.* Semi-rational evolution of pyruvate carboxylase from *Rhizopus oryzae* for elevated fumaric acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 177, p. 108238, 2022.

YAMADA, R. *et al.* Enhanced d-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 9, p. 2075-2084, 2017.

YAMAKAWA, C. K. *et al.* Exploiting new biorefinery models using non-conventional yeasts and their implications for sustainability. **Bioresource technology**, v. 309, p. 123374, 2020.

YU, T. *et al.* Strategies and challenges for metabolic rewiring. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 15, p. 30-38, 2019.

ZOU, L. *et al.* Efficient lactic acid production from dilute acid-pretreated lignocellulosic biomass by a synthetic consortium of engineered *Pseudomonas putida* and *Bacillus coagulans*. **Biotechnology for biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2021.

ZHANG, W. *et al.* Effects of pyruvate decarboxylase (*pdc 1*, *pdc 5*) gene knockout on the production of metabolites in two haploid *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 62-69, 2022.

ZHONG, W. *et al.* Systematically redesigning and optimizing the expression of D-lactate dehydrogenase efficiently produces high-optical-purity D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 217-226, 2019.

## APÊNDICE A – PLASMÍDEOS UTILIZADOS NAS ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA METABÓLICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA *SACCHAROMYCES CERVEVISIAE* PRODUTORA DE ÁCIDO LÁTICO

Plasmídeo	Descrição	Referência
pJASPR_6A_nat (vetor A)	Gene de resistência a nourseotricina, não replica em levedura	Comunicação pessoal
pJASPR_6B (vetor B)	Replica em levedura, não carrega gene de resistência	Comunicação pessoal
pJACas-K	Gene codificante da endonuclease Cas9	Comunicação pessoal
pLDH – <i>Bos taurus</i>	ORF L-LDH <i>Bos taurus</i> (GenBank: BC146210.1)	Comunicação pessoal
pLDH – <i>L. heveticus</i>	ORF L-LDH <i>Lactobacillus helveticus</i> (UniProtKB/Swiss-Prot: O32765.1)	Comunicação pessoal
pLDH – <i>L. plantarum</i>	ORF L-LDH <i>Lactobacillus plantarum</i> (WCFS1 - P56512.2)	Comunicação pessoal
pLDH – <i>L. casei</i>	ORF L-LDH <i>Lacticaseibacillus casei</i> (UniProtKB P00343.3)	Comunicação pessoal
p2gRNAdelPDC1	vetor A + B unido carregando dois RNA-guia diferentes para deleção do <i>PDC1</i>	Este estudo
p2gRNAdelADH1	vetor A + B unido carregando dois RNA-guia diferentes para deleção do <i>ADH1</i>	Este estudo
pAB_DonPDC1_DonADH1	vetor A + B unido com <i>donors</i> para deletar <i>PDC1</i> e <i>ADH1</i>	Este estudo
pAB_TDHI_LDHI	vetor A + B unido contendo cassete de expressão de L-LDH de <i>Bos taurus</i>	Este estudo
pAB_TDHI_LDHI2	vetor A + B unido contendo cassete de expressão de L-LDH de <i>Lactobacillus helveticus</i>	Este estudo
pAB_TDHI_LDHI3	vetor A + B unido contendo cassete de expressão de L-LDH de <i>Lactobacillus plantarum</i>	Este estudo
pAB_TDHI_LDHI4	vetor A + B unido contendo cassete de expressão de L-LDH de <i>Lacticaseibacillus casei</i>	Este estudo
pAB_DonPDC1_LDHI	Vetor A + B unido contendo <i>donor</i> de integração da L-LDH de <i>B. taurus</i>	Este estudo
pAB_DonADH1_LDHI	Vetor A + B unido contendo <i>donor</i> de integração da L-LDH de <i>B. taurus</i>	Este estudo
p2gRNA_DI-CRISPR	vetor A + B unido carregando um RNA-guia duplicado para integração em várias cópias do L-LDH de <i>B. taurus</i>	Este estudo

Fonte: Elaborado pela autora.

**APÊNDICE B – PRIMERS DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS  
FRAGMENTOS DE DNA UTILIZADOS NA MONTAGEM DOS VETORES  
p2gRNAdelPDC1, p2gRNAdelADH1 e pAB\_DonPDC1\_DonADH1**

Nome	Sequência (5' - 3')
Aa_pdc1a F	ATAAATGATCTCTGTCAATTTTCAGCTGGGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTTAAAATAAGG
Ab_pdc1b R	AGCTCTAAAACCCGCTTTTCGGTATCAACCAAGATCATTTATCTTTCA CTGCGGAGAAGTT
Ba_pdc1b F	GATAAATGATCTTTGGTTGATACCGAAAGCGGGTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAGTTAAAATAAGG
Bb_pdc1a R	AGCTCTAAAACCCCGAGCTGAAATTGACAGAGATCATTTATCTTTCA CTGCGGAGAAGTT
Aa_adh1a F	ATAAATGATCCAAGTCAGTGTGACAGACACGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTTAAAATAAGG
Ab_adh1b R	AGCTCTAAAACCCGATGGATCTGAATAATTCGATCATTTATCTTTCA CTGCGGAGAAGTT
Ba_adh1b F	GATAAATGATCGAATTATTCAGATCCATCGGGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAATAAGG
Bb_adh1a R	AGCTCTAAAACGTGTCTGTCACTGACTTGGATCATTTATCTTTCA CTGCGGAGAAGTT
Vector A_F	AGGCTAGTCCGTTATCAACTTG
Vector A_R rc	ATTACCCGGCTGGCTTAACTA
Pdc1p_vector A_F	CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCGGGTAATAGATTATGT ATGCTCTTCTGACT
Pdc1p_F	AGATTATGTATGCTCTTCTGACT
Pdc1p_R rc	TTGCGTGAGGTTATGAGTAGA
Pdc1p joint t_rc R	ATTAGAGATTAAATCGCTTATTGCTTAGCGTTGGTAGCATTGCGTGA GGTTATGAGTAGA
Pdc1t_F	TGCTACCAACGCTAAGCAATA
Pdc1t_rc R	TTGTATCGAGGTGTCTAGTCT
Pdc1t_vector B_R rc	ACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCTTGATCGA GGTGTCTAGTCT
Vector B_F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
Vector B_R rc	GAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
Adh1p_vector B_F	ACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCGTTGTT GTCTCACCATATCC
ADH1p_F	GTTGTTGTCTCACCATATCC



ADH1p_R rc	TGTATATGAGATAGTTGATTGTATG
ADH1t joint p_F	CAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACAGTTGGTAG ATACGTTGTTGAC
ADH1t_F	GTTGGTAGATACGTTGTTGAC
ADH1t_R rc	CAACTGAAGGCTAGGCTGT
Adh1t_vector A_R rc	CGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTCAACT GAAGGCTAGGCTGT

---

Fonte: Elaborado pela autora.

**APÊNDICE C – PRIMERS DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS  
FRAGMENTOS DE DNA UTILIZADOS NA MONTAGEM DOS VETORES  
pAB\_TDH1\_LDH1, pAB\_TDH1\_LDH2, pAB\_TDH1\_LDH3 e pAB\_TDH1\_LDH4**

Nome	Sequência (5' - 3')
Vector A to B_F	GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCGTTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG
Vector A_R rc	ATTACCCGGCTGGCTTAACTA
TDH1p_vectorA_F	TGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCGGTAATAATGTATAT GCTCATTTACTCTCC
TDH1p_rc_R	TTTGTTTTGTGTGTAATTTAGTGAAG
LDH1_TDH1p_F	AACAGTACTTCACTAAATTTACACACAAAACAAAATGGCAACTCT CAAGGATCA
LDH1_TDH1_R rc	AATCATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATTCAAACACTGCAGTTCTTT CTG
LDH2_TDH1p_F	AACAGTACTTCACTAAATTTACACACAAAACAAAATGGCCAGAGAG GAGAAAC
LDH2_TDH1_R rc	AATCATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATTTATTGTCTTACTTTTAC TCCAG
LDH3_TDH1p_F	AACAGTACTTCACTAAATTTACACACAAAACAAAATGTCAAGTATG CCTAATCATCAG
LDH3_TDH1_R rc	AATCATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATTTACTTGTCTCCAGCTC TG
LDH4_TDH1p_F	AACAGTACTTCACTAAATTTACACACAAAACAAAATGGCATCAATT ACCGATAAGGA
LDH4_TDH1_R rc	AATCATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATTTATTGTCTTGTCTCAAT GTCGT
TDH1t_F	ATAAAGCAATCTTGATGAGGATAATG
TDH1t_vectorB_rc R	CTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCTTGCAAAGG CAGCAATATATTG
Vector B_F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
Vector B to A_R_rc	AGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGAAGATCCTTT GATCTTTTCTACG

Fonte: Elaborado pela autora

**APÊNDICE D – PRIMERS DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS  
FRAGMENTOS DE DNA UTILIZADOS NA MONTAGEM DOS VETORES  
p2gRNA\_DI-CRISPR, pAB\_DonPDC1\_LDH1 e pAB\_DonADH1\_LDH1**

Nome	Sequência (5' - 3')
Donor $\delta$ 1_TDH1p_F	TGGGATTCCATTGTTGATAAAGGCTATAATATTAGGTATACAG AAAATGTATATGCTCATTTACTCTCC
Donor $\delta$ 2_TDH1t_R rc	TAGAGGAAGCTGAAGTGCAAGGATTGATAATGTAATAGGATA ATGTTGCAAAGGCAGCAATATAT
Aa_Ba_gRNA $\delta$ 1e $\delta$ 1 F	ATAAATGATCTGAGGATTCCCTATATCCTCGGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGG
Ab_Bb_gRNA $\delta$ 1e $\delta$ 1_R rc	AGCTCTAAAACCGAGGATATAGGAATCCTCAGATCATTTATCT TTCCTGCGGAGAAGTT
TDH1p_PDC1p_F	CTCAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCAGCAAATGTATAT GCTCATTTACTCTCCAT
TDH1t_PDC1t_R rc	GATTAAATCGCTTATTGCTTAGCGTTGGTAGCATTGCAAAGG CAGCAATATATTG
ADH1p_vector A_F	CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCGGGTAATGTTGT TGTCTCACCATATCCG
TDH1p_ADH1p_F	CCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACAAATGTATATGCTC ATTTACTCTCCA
TDH1t_ADH1t R_rc	CTTATTTAGAAGTGTCAACAACGTATCTACCAACTTGCAAAGG CAGCAATATATTG
ADH1t_vector B_R rc	ACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCAACT GAAGGCTAGGCTGT
Checkdel_ADH1_F	CTATTGAAGTAATAATAGGCGCATG
Checkdel_ADH1_R rc	GTAGATGCAATGAATGACGATG
Checkdel_PDC1_F	ACCCATACCTTCTTAAAAGC
Checkdel_PDC1_R rc	AGAAATCTACGACAACTAGCTT
MXterm_f2	GTTGTTCTATTTTAAATCAAATGTTAGCGTG
MXterm5R	CAGTATAGCGACCAGCATTACATAC
VR	CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTC
AmpPro	CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA

Fonte: Elaborado pela autora.