



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Produção de 2'-fucosil-lactose em *Kluyveromyces lactis*
utilizando manose como fonte de carbono**

Autor: André Soares Campos
Orientadora: Dr^a Nádia Skorupa Parachin

Brasília
2020

André Soares Campos

**Produção de 2'-fucosil-lactose em *Kluyveromyces lactis* utilizando manose
como fonte de carbono**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular (PPGBIOMOL) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Nádía Skorupa Parachin, PhD

Brasília

2020

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores sofrendo de transtornos mentais devido ao ambiente acadêmico. Ainda temos muito a aprender.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Alexandre e Ana, que sempre me apoiaram e me ensinaram a dar valor à minha educação. Vocês me fizeram acreditar que eu era capaz de atingir todos os meus objetivos e sem o suporte e o carinho de vocês, não seria possível eu chegar até aqui.

Aos meus amigos Carol, Clóvis e Roberta por influenciarem quem eu sou hoje e me ensinarem a me aceitar quando eu mesmo não conseguia. Sem vocês, eu não teria conseguido passar pelos momentos mais difíceis.

Também, aos meus amigos Suélen, Marina e Arthur por me acompanharem nesse processo, ouvirem minhas mágoas e me reconfortarem sempre quando foi necessário.

Agradeço à professora Ayla Sant'Ana e o grupo do laboratório de biocatálises do INT pela parceria e o material de trabalho enviado, que permitiu a realização deste estudo.

Ao Guilherme, que ajudou a tirar este trabalho do chão e sempre foi muito solícito, mesmo distante, fosse para falar sobre experimentos ou apenas para desabafar.

À equipe da Universidade Católica de Brasília, que sempre foi aberta às necessidades deste projeto. À Rosiane e Juliana, que tanto me ensinaram e sempre tornaram agradável um ambiente de trabalho externo. Também, à professora Simoni que ajudou com necessidades deste estudo e ao professor Marcelo Ramada por se disponibilizar e ajudar quando foi necessário.

Aos professores e a equipe do departamento de biologia molecular pela contribuição e suporte acadêmico, especialmente às professoras Talita e Janice que sempre me ajudaram com as necessidades do meu trabalho. Também, ao José e o Thompson que ajudaram com todo o processo técnico do trabalho.

Aos grupos de pesquisa da professora Ildinete e Andrea Maranhão, que sempre me ofereceram apoio em equipamentos e materiais. Agradeço também a parceria e os bons momentos compartilhados.

Ao grupo de pesquisa do professor Fernando, não só pelo apoio técnico como pela troca de conhecimento que me proporcionaram. A gentileza e o gosto pelo conhecimento refletem no trabalho de vocês. Agradeço também todos os café passados, vocês foram, muitas vezes, terapia quando eu precisava.

Ao grupo de engenharia de biocatalisadores, vocês são incríveis e me mostraram o que é trabalhar em equipe. À Gabriela e Nadiele, por serem verdadeiras irmãs que mostraram apoio incondicional e por estarem sempre presentes quando precisei e achei que não era capaz. Ao Otávio, por ser solícito, atencioso e demonstrar verdadeiro companheirismo mesmo em meio às suas próprias tribulações. À Kelly e ao João por me ensinarem e me ajudarem a engatinhar nos meus primeiros experimentos, vocês serão sempre muito queridos por mim. À Lyvia pelas risadas e pelas conversas.

À Carlyne (carlos) e ao Daniel, por serem verdadeiras amizades. Muito obrigado pela paciência e o tempo gasto em que me ajudaram no meu processo de escrita. Ao Enzo e Giovana, que sempre foram as melhores companhias de laboratório. À Ana Caroline, que mesmo recém-chegada se mostrou uma grande amiga e sempre disposta a me ajudar. Também agradeço ao Gabriel, que trilhou nesse projeto comigo, foi um companheiro e muitas vezes trouxe alívio para dias sufocantes.

Finalmente, agradeço à Professora Nádia. Muito obrigado por abrir suas portas ao André no quarto semestre de universidade quando necessitava de apoio na sua matéria. Muito obrigado por abrir suas portas quando eu procurava um estágio. Muito obrigado por na minha colação de grau, acreditar em mim e dizer que esperava coisas brilhantes de mim. Muito obrigado por me permitir trabalhar na Artisan e pela quantidade de experiência que eu adquiri num período em que eu me sentia perdido. E muito obrigado por me receber em seu laboratório quando procurei orientação para um projeto de mestrado. À mim, suas portas nunca foram fechadas, fosse para um café ou para me acalmar quando não conseguia mais controlar minha ansiedade e por isso sou eternamente grato.

"A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo de busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria."

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IV
RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Oligossacarídeos do Leite Materno e a 2'-fucosil-lactose.....	3
1.2 Vias de Síntese de 2'FL	5
1.3 A Semente de Açai como Biomassa Oportuna para Utilização em Bioprocessos ..	11
1.4 A Levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> como Produtora de 2'FL.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Materiais.....	19
4.1.1 Microrganismos	19
4.1.2 Vetores Utilizados e Construídos	19
4.1.3 Oligonucleotídeos Iniciadores.....	21
4.1.4 Meios de Cultivo	21
4.1.6 Soluções	24
4.1.7 Tampões.....	27
4.1.8 Enzimas.....	29
4.1.9 Kits.....	30
4.1.10 Equipamentos.....	30
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Crescimentos em Microplaca	30
4.2.2 Crescimentos em Frasco de 1 L.....	31
4.2.3 Crescimentos em Biorreator de 1,3 L.....	32
4.2.4 Desenho de Oligonucleotídeos Iniciadores e Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.2.5 Tratamento com Endonucleases de Restrição.....	33
4.2.6 Análise por Eletroforese em Gel de Agarose	34
4.2.7 Purificação de Reações de Restrição com Endonucleases e Produtos de PCR	35
4.2.8 Ligação de Insertos em Vetores.....	35
4.2.9 Preparo de Células Bacterianas Competentes.....	35
4.2.10 Transformação de Células Bacterianas.....	36
4.2.11 Extração Plasmidial de Bactérias	37
4.2.12 Transformação de Levedura.....	38

4.2.13 Extração de DNA Genômico de Leveduras.....	38
4.2.14 Extração de Metabólitos Intracelulares.....	39
4.2.15 Detecção de Metabólitos	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Estudo de <i>K. lactis</i> como Plataforma de Conversão de Manose em 2'FL	41
5.2 Crescimentos de Leveduras em Microplaca	44
5.3 Cultivos de <i>K. lactis</i> em Frasco	47
5.4 Cultivos de <i>K. lactis</i> em Biorreator de 1.3 L	49
5.5 Construção do Sistema de Expressão de Genes da Via Sintética para Produção de 2'FL	50
5.5.1 Construção dos Cassetes de Expressão dos Genes <i>gmd</i> e <i>fcl</i>	52
5.5.2 Construção de Plasmídeo Contendo os Genes <i>gmd</i> e <i>fcl</i>	56
5.5.3 Clonagem do Gene <i>WcfB</i>	58
5.5.4 Análises do Plasmídeo <i>p2WF</i> por Restrição Enzimática.....	60
5.6 Construção da Cepa <i>K2W</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	63
5.7 Confirmação de Clones Transformados.....	65
5.8 Detecção de 2'-fucosil-lactose	68
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DA 2'-FUCOSIL-LACTOSE COMPOSTA POR TRÊS AÇÚCARES: D-GALACTOSE, D-GLICOSE E L-FUCOSE, SENDO EVIDENCIADA A LIGAÇÃO A-1,2 ENTRE OS RESÍDUOS DE GALACTOSE E FUCOSE E A LIGAÇÃO B1-4 ENTRE OS RESÍDUOS DE GALACTOSE E FUCOSEGLICOSE.....	4
FIGURA 2 - VIAS METABÓLICAS DE SÍNTESE DE GDP-FUCOSE UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE 2'FL.....	7
FIGURA 3 – CONVERSÃO DE GDP-MANOSE EM GDP-FUCOSE. DUAS REAÇÕES GERALMENTE ADICIONADAS NA UTILIZAÇÃO DA VIA DE SÍNTESE <i>DE NOVO</i> DE GDP-FUCOSE TEM COMO SUBSTRATO INICIAL A MANOSE.	11
FIGURA 4 - CONSUMO DE MANOSE ACOPLADO AO METABOLISMO DE LACTOSE EM <i>K. LACTIS</i> PARA PRODUÇÃO DE 2'FL A PARTIR DA VIA DE SÍNTESE <i>DE NOVO</i> DE GDP-FUCOSE.	17
FIGURA 5 - FLUXO DE TRABALHO PARA CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS EM MICROPLACA.	31
FIGURA 6 - METABOLISMO DE MANOSE ANOTADO NO GENOMA DE <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i>	42
FIGURA 7 - VIA SINTÉTICA SUGERIDA PARA PRODUÇÃO DE 2'FL EM <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i>	44
FIGURA 8 – PERFIL DE CRESCIMENTO DE DIFERENTES LEVEDURAS EM MICROPLACA, UTILIZANDO HSA COMO SUBSTRATO DURANTE 72H.	45
FIGURA 9 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> EM MEIO UAB UTILIZANDO HSA COMO SUBSTRATO.....	47
FIGURA 10 - CURVAS DE CRESCIMENTO EM FRASCO DE <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> EM MEIOS CONTENDO GLICOSE E MANOSE.	48
FIGURA 11 – GRÁFICO MOSTRANDO PERFIL DE CO-PRODUTOS DETECTADOS DURANTE CRESCIMENTO EM BIORREATOR DE 1,3L EM A) 500 ML DE UAB MANOSE, B) 500 ML DE UAB AÇAÍ E C) 500 ML DE UAB GLICOSE.....	49
FIGURA 12 - MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO P2WF.	52
FIGURA 13 – PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIAS DA CEPA K12 DE <i>E. COLI</i>	53
FIGURA 14 – RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO PGEM-F COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>ECORI</i> E <i>BAMHI</i>	54
FIGURA 15 – PRODUTOS DE PCR CONTENDO CASSETES DE EXPRESSÃO MONTADOS.....	55
FIGURA 16 - ESTRATÉGIA DE RECOMBINAÇÃO DO PLASMÍDEO P2WF LINEARIZADO COM O PROMOTOR DO GENE <i>LAC4</i> NO CROMOSSOMO B DE <i>K. LACTIS</i> , PARA INSERÇÃO DE GENES DA VIA SINTÉTICA DE PRODUÇÃO DE 2'FL.	56
FIGURA 17 – PRODUTOS DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DOS PLASMÍDEOS PGEM-CG E PGEM-CF.....	57
FIGURA 18 – PRODUTOS DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PKLACG E PFUC.	58

FIGURA 19 – MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO PBSK-WCFB, CONTENDO O GENE SINTÉTICO WCFB OTIMIZADO PARA EXPRESSÃO EM <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i>	59
FIGURA 20 – PRODUTO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO PBSK CONTENDO GENE SINTÉTICO WCFB COM AS ENZIMAS NDEI E STUI.....	60
FIGURA 21 – PRODUTOS DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DO PLASMÍDEO P2WF COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DESSE PLASMÍDEO.....	61
FIGURA 22 – PRODUTOS DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DOS PLASMÍDEOS PFUC E P2WF.	62
FIGURA 23 – MAPA FÍSICO DA SEQUÊNCIA DO GENE GMD E DOS PLASMÍDEOS PFUC E P2WF MOSTRANDO SÍTIO DE RESTRIÇÃO PARA A ENZIMA SACII PRESENTE NO GENE GMD, CIRCULADO EM VERMELHO.....	63
FIGURA 24 - RESTRIÇÃO PARCIAL DO PLASMÍDEO P2WF.....	64
FIGURA 25 - SELEÇÃO DE CLONES TRANSFORMANTES DE <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> EM MEIO SELETIVO YNB ACETAMIDA.....	66
FIGURA 26 - PRODUTOS DE PCR UTILIZANDO O DNA GENÔMICO DE LEVEDURAS TRANSFORMADAS E OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES CASG F E CASG R.....	67
FIGURA 27 – PRODUTOS DE PCR UTILIZANDO O DNA GENÔMICO DE LEVEDURAS TRANSFORMADAS E OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES GMD F, GMD R, FCL F, FCL R, WCFB F E WCFB R.....	68
FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DE ANÁLISES DOS SOBRENADANTES DOS CRESCIMENTOS EM LACTOSE A PARTIR DE DETECTOR POR REFRAÇÃO, MOSTRANDO EM A) CORRIDA DO SOBRENADANTE DE CRESCIMENTO DA CEPA K2W MODIFICADA COM P2WF E EM B) SOBRENADANTE DE CRESCIMENTO DA CEPA CONTROLE GG799.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS CEPAS DE MICRORGANISMOS PRODUTORAS DE 2'- FUCOSIL-LACTOSE EM ESTUDOS DE 2012 ATÉ O PRESENTE.	8
TABELA 2 - CEPAS DE MICRORGANISMO UTILIZADOS NESTE ESTUDO.	19
TABELA 3 - PLASMÍDEO VETORES UTILIZADOS NESTE ESTUDO.	20
TABELA 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR DESTE ESTUDO.	21
TABELA 5 - ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NESTE ESTUDO. .	29
TABELA 6 - VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO AFERIDAS NESTE ESTUDO.	46
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES FINAIS DE METABÓLITOS PRESENTES EM CRESCIMENTOS EM BIORREATOR DE 1,3 L.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ	Taxa de crescimento específica
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
2'-FL	2'-fucosil-lactose
amdS	Gene para produção de acetamidase e seleção com acetamida
BSA	Albumina do soro bovino do inglês " <i>Bovine Serum Albumine</i> "
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi Nucleosídeo Trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food and Drug Agency</i>
g	Aceleração da gravidade
g/L	Gramas por litro
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HSA	Hidrolisado ácido da semente de açaí
HMO	Oligossacarídeo do leite humano, do inglês <i>Human Milk Oligosaccharide</i>
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	Meio Luria-Bertani

LiAc	Acetato de Lítio
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Miliomolar
mL	Mililitro
nm	Nanometro
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina forma reduzida
NaAc	Acetato de sódio
NEB	<i>New England BioLabs Inc.</i> ®
NHEJ	<i>Non-homologous End Joining</i>
Ng	Nanograma
OD	Densidade óptica à 600 nanômetros
p/v	Peso por volume
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PPP	Via das pentoses fosfato
RNAse A	Ribonuclease A
<i>Rpm</i>	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOB	Meio Super Optimal Broth
TBE	Tris-acetato-EDTA-ácido bórico
TE	Tris-EDTA
UAB	Universidade autonoma de barcelona
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β-D-galactopiranosídeo
YP	Meio Yeast Peptone
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
UV	Ultra violeta

RESUMO

Os oligossacarídeos do leite humano (HMOs) possuem papel fundamental no desenvolvimento de recém-nascidos os protegendo contra toxinas e patógenos. O HMO encontrado em maior abundância é a 2'-fucosil-lactose (2'FL), sendo também o açúcar mais estudado e utilizado para suplementação de fórmulas neonatais. A sua via de síntese *de novo* utiliza como molécula precursora a manose, um epímero C2 da glicose. A forma polimérica desse açúcar, a manana, está presente em diversas biomassas vegetais como a semente de açaí, principal resíduo da produção de polpa de açaí. A hidrólise das sementes de açaí realizada pelo INT, recuperou mais de 90% dos açúcares presentes na semente em suas frações monoméricas fermentáveis, principalmente manose. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo foi utilizar manose como fonte de carbono disponível a fim de estabelecer uma nova rota tecnológica para produção de 2'FL. A levedura que mostrou maior velocidade específica de crescimento em hidrolisado (0.0468 h^{-1}) e a menor diferença cinética entre a utilização de glicose e manose foi a levedura *Kluyveromyces lactis*. Ademais, crescimentos em frascos mostraram pouca diferença cinética entre crescimento em manose (0.324 h^{-1}) e glicose (0.348 h^{-1}) nessa espécie. Esses resultados associados a características fisiológicas da espécie como o crescimento em lactose, uma das moléculas necessárias para síntese da 2'FL, tornam *K. lactis* um organismo promissor para o processo visado. Dessa forma, três cassetes de expressão gênica foram construídos para possibilitar a conversão da manose em 2'FL. Os genes *gmd* e *fcl* de *Escherichia coli*, cujas expressões possibilitam a síntese de GDP-fucose, foram inseridos em cassetes de expressão e clonados no plasmídeo pKLAC2. Adicionalmente, foi inserido ao vetor o gene da fucosiltransferase *WcfB* de *Bacteroides fragilis* otimizado para expressão em *K. lactis* que permite a conversão de GDP-Fucose em 2'FL. A cepa GG799 de *K. lactis* foi então transformada com os plasmídeos pFUC e p2WF e colônias selecionadas por crescimento em acetamida. Clones foram verificados em relação à presença dos genes no genoma da levedura. No entanto, análises preliminares de HPLC não detectaram 2'FL em meio contendo lactose.

ABSTRACT

Human milk oligosaccharides (HMOs) play an essential role in neonatal development, as they stimulate bifidobacterial growth and protect newborns from toxins and pathogens. 2'-fucosyllactose (2'FL) is the predominant and most studied HMO in human milk and therefore, it's used as a supplement for infant formula. The *de novo* biosynthesis pathway of 2'FL utilizes mannose, a C2 epimer of glucose, as a precursor. Mannan is a polymeric version of this sugar and is present in many agriculture feedstocks such as the açai seed, the main byproduct in the fruit's pulp processing. The açai seed's hydrolysis conducted by INT was successful to recover more than 90% of the sugars present in the seed in their monomeric form, predominantly mannose. For that reason, the main goal of this study was to utilize mannose as a substrate in order to establish a new technological route for 2'FL production. The yeast *Kluyveromyces lactis* presented the highest specific growth rate in the seed hydrolysate (0.0468 h^{-1}) and the least kinetic difference between the use of glucose and mannose as substrate. Furthermore, shake flask cultivations of this species exhibited a similar kinetic between growth in mannose (0.324 h^{-1}) and glucose (0.348 h^{-1}). These results combined with well-established molecular editing tools and differential traits from *K. lactis* physiology such as the ability to consume lactose, a component of 2'FL, indicates that this species is a strong candidate for 2'FL production. Therefore, three expression cassettes were constructed to enable the conversion of mannose into 2'FL. The expression of the genes *gmd* and *fcl* from *Escherichia coli* allows GDP-fucose synthesis and consequently, these genes were introduced into expression cassettes and then inserted into pKLAC2 plasmid. Additionally, it was also inserted the gene for WcfB fucosyltransferase from *Bacteroides fragilis*, optimized for *K. lactis* expression, which permits GDP-fucose conversion into 2'FL. The *K. lactis* strain GG799 was transformed with the assembled plasmids pFUC and p2WF and colonies were selected by growth in acetamide. As a result, clones were verified for the presence of the genes *gmd* and *fcl* integrated into their genomes. However, preliminary HPLC analysis did not identify 2'FL in culture medium containing lactose.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Oligossacarídeos do Leite Materno e a 2'-fucosil-lactose

Os oligossacarídeos de leite humano (HMOs) são glicanas abundantes no leite materno e de difícil digestão, que quando em contato com o cólon humano funcionam como fibra dietética e promovem a proliferação de bifidobactérias e o desenvolvimento de uma microbiota intestinal saudável (BODE, 2012; GOTOH et al., 2018). Além disso, os HMOs também são os principais elementos que diferem o leite humano ao de outras espécies e possuem papel importante para nutrição, no desenvolvimento do sistema imune e como possíveis fatores que impedem a adesão de patógenos à microbiota intestinal conferindo proteção ao neonatal (BODE, 2012; KULINICH; LIU, 2016).

Além disso, a amamentação contribui para o desenvolvimento neuronal do recém-nascido e é considerada uma questão de saúde pública, sendo recomendada como forma exclusiva de nutrição nos primeiros seis meses de vida pela organização mundial da saúde (WHO) (EIDELMAN; SCHANLER, 2012; MARTIN; LING; BLACKBURN, 2016). Entretanto, a utilização do leite materno é influenciada por diversos fatores e o seu uso como forma exclusiva de alimentação nos primeiros meses nem sempre é possível (KOZHIMANNIL et al., 2014) Por exemplo, em 2007, somente 13% da população alvo nos Estados Unidos conseguiram amamentar durante seis meses (EIDELMAN; SCHANLER, 2012). Também nos Estados Unidos, 24% dos serviços de maternidade administram fórmula infantil como suplemento a recém-nascidos nas 48h após o parto e 67% dos bebês dependem de fórmulas infantis para parte de sua nutrição após 3 meses de idade (EIDELMAN; SCHANLER, 2012; MARTIN; LING; BLACKBURN, 2016). Tais dados reforçam a necessidade de assimilar componentes benéficos presentes no leite materno, como os HMOs, às fórmulas infantis.

Dentre os diversos HMOs identificados, a 2'-fucosil-lactose (2'FL) é o mais abundante chegando na concentração de 3 g/L no leite materno nos 3 primeiros meses de lactação (CASTANY-SMUÑOZ; MARTIN; PRIETO, 2013; CHATURVEDI et al., 2001). Ademais, é a segunda glicana mais abundante, somente em menor quantidade que a lactose. A 2'FL é um trissacarídeo neutro composto por unidades de D-Glicose, D-galactose e L-fucose (Figura 1) e sua formação é proveniente do alongamento da lactose com monossacarídeos fucosilados (CASTANY-SMUÑOZ; MARTIN; PRIETO, 2013). Dessa forma, a presença marcante da 2'FL no leite materno torna esse açúcar o maior alvo de estudos terapêuticos entre os HMOs com fortes evidências do seu papel na modulação do sistema imune e de sua função prebiótica (REVERRI et al., 2018; STORM et al., 2019). A 2'FL é também associada *in vitro* à proteção contra diversos patógenos responsáveis por diarreias em crianças pequenas (MORROW et al., 2004; NEWBURG et al., 2004).

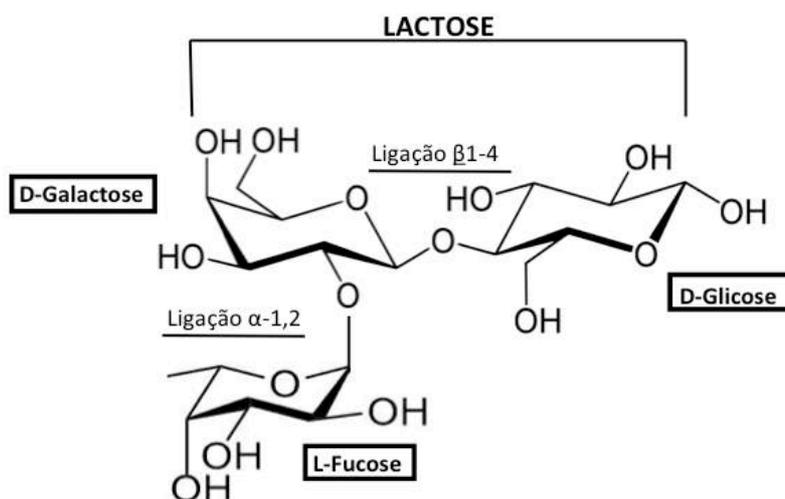


Figura 1 - Estrutura molecular da 2'-fucosil-lactose composta por três açúcares: D-Galactose, D-Glicose e L-Fucose, sendo evidenciada a ligação α -1,2 entre os resíduos de galactose e fucose e a ligação β 1-4 entre os resíduos de galactose e fucose.

Tendo em vista seus benefícios a saúde humana e sua capacidade de aproximar em composição e em função as fórmulas neonatais ao leite materno, existe interesse comercial de produção dessa molécula com intuito de suplementar alimentos para recém-nascidos (REVERRI et al., 2018). A indústria de compostos para fórmulas neonatais foi avaliada em 16,7 bilhões de

dólares em 2019 e está projetada para uma taxa de crescimento anual de 7,3% até 2025 (MARKETSANDMARKETS, 2019). Nos últimos 3 anos, a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (ESFA) e a Agência de alimentos e drogas (FDA) atestaram a segurança de microrganismos geneticamente modificados produtores de 2'FL, de forma a complementar de forma eficiente as diferentes vias de síntese de 2'FL já existentes e assim suprir a crescente demanda (LSRO, 2017; TURCK et al., 2019).

1.2 Vias de Síntese de 2'FL

De forma geral, os HMOs possuem lactose em sua extremidade redutora e são alongados por monômeros de glicose, galactose, fucose, N-acetilglicosamina e ácido siálico (KUNZ et al., 2000). Durante a síntese de oligossacarídeos α -1,2 fucosilados, um monômero de GDP-L-Fucose atua como doador de resíduo de fucose a uma molécula de galactose. Especificamente para a 2'FL, a fucose é adicionada à uma galactose unida a glicose por ligação β 1-4 e difere de outros HMOs α -1,2 fucosilados, onde a fucose é adicionada a um resíduo de galactose unido à N-acetilglicosamina por ligação β 1-3 (CASTANYS-MUÑOZ; MARTIN; PRIETO, 2013). Essa reação é conduzida pela enzima fucosiltransferase 2 (FUT2) que é codificada por gene expresso em todas as mulheres com fenótipo secretor (também conhecido como fator Se+) (ORIOU; LE PENDU; MOLLICONE, 1986).

Uma forma de se obter comercialmente 2'FL é por meio de rotas químicas, enzimáticas ou químico-enzimáticas (AGOSTON et al., 2019; ALBERMANN; PIEPERSBERG; WEHMEIER, 2001). Esses consistem na utilização de moléculas precursoras, conhecidas como "building blocks", que são modificadas a partir da adição de catalisadores a uma reação. A rota enzimática utiliza enzimas de origem biológica como catalisadores da reação para síntese de intermediários ou composto final, porém em um ambiente diferente de sistemas biológicos, com condições controladas e otimizadas para melhor atividade enzimática. Esses métodos possibilitam maior rendimento e pureza de produto final, porém seu escalonamento tem custo elevado visto o

alto custo de purificação de intermediários utilizados na rota química e o alto custo de enzimas purificadas na rota enzimática (CHEN, 2018).

Dessa forma, a rota de síntese mais estudada para produção de 2'FL consiste na utilização de microrganismos como plataforma de expressão de genes heterólogos. Essa estratégia já foi explorada com a utilização de bactérias e leveduras (Tabela 1) (LEE et al., 2012; YU et al., 2018) e, em um caso, o processo pode ser escalonado para um volume de 75 L de crescimento (CHIN et al., 2017). Duas vias metabólicas podem ser inseridas por tecnologia de DNA recombinante para a síntese desse oligossacarídeo em sistemas biológicos: a via de salvaguarda de fucose e a via de síntese *de novo* (Figura 2). As duas vias têm como ponto em comum a produção de GDP-L-Fucose, que após a introdução de uma 2'-Fucosiltransferase consegue agir como doador do resíduo de fucose à molécula de lactose. Até o momento, mais de 10 organismos produtores de 2'FL já foram construídos com concentrações finais variando entre 0.56 g/L e 24 g/L (Tabela 1). As modificações mais recorrentes envolvem a super expressão de genes das vias salvaguarda e de novo e os genes envolvidos no transporte e metabolismo da lactose.

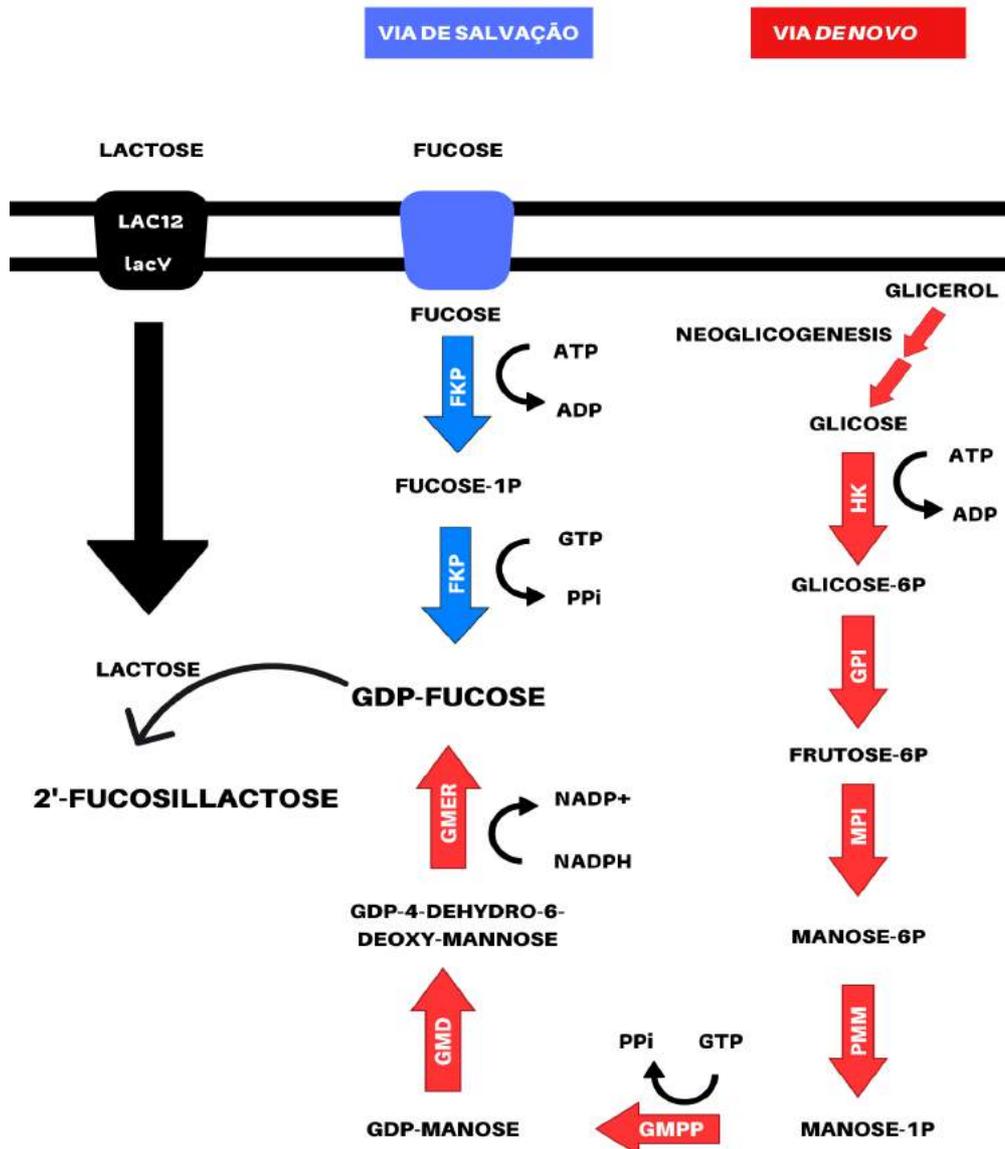


Figura 2 - Vias metabólicas de síntese de GDP-fucose utilizadas para a produção de 2'FL. A via de síntese salvage (em azul) depende da adição de fucose ao meio, enquanto a via de síntese *de novo* (em vermelho) pode ser obtida a partir de diferentes fontes de carbono como a glicose e o glicerol. Enzimas da via: HK – Hexoquinase; GPI – Glicose-6-fosfato isomerase; MPI – Manose-6-fosfato isomerase; PMM – Fosfomanomutase; GMPP – Manose-1-fosfato guaniltransferase; GMD – GDP-manose 4,6-desidratase; GMER – GDP-L-fucose sintase; FKP – L-fucoquinase/ GDP-L-fucose fosforilase.

Tabela 1 - Principais cepas de microrganismos produtoras de 2'-fucosil-lactose em estudos de 2012 até o presente. Em **Vermelho**, genes presentes na via de síntese *de novo* de GDP-fucose e em **Azul** genes presentes na via salvagem de síntese da mesma molécula.

Cepa	Organismo	Fucosiltransferase	Genes Expressos	Fonte de Carbono	2'FL Total	Produtividade Volumétrica de 2'FL	Referência
JM109	<i>Escherichia coli</i>	fucT2 de <i>H. pylori</i>	Genes gmd , wcaG , manB , manC (<i>E. coli</i> K12) dentro do plasmídeo pBGCW	14,5 g/L de Lactose	1,23 g/L	-	(LEE et al., 2012)
gwBC-F2	<i>Escherichia coli</i> JM109	fucT2 de <i>H. pylori</i>	Genes gmd , wcaG , manB , manC (<i>E. coli</i> K12) e fkp (<i>B. fragilis</i>) integrados no genoma. <i>fucI</i> e <i>fucK</i> deletados.	26,42 g/L de Glicerol . Alimentação com Glicerol à 629.08 g/L e Lactose à 150 g/L.	20,28 g/L	0,57 g/L.h ⁻¹	(BAUMGÄRTNER et al., 2013)
ΔL M15 BCGW-D3F	<i>Escherichia coli</i> BL21star(DE3)	fucT2 de <i>H. pylori</i> + 3 Aspartatos	Genes gmd , wcaG , manB , manC (<i>E. coli</i> K12) dentro do plasmídeo pBGCW. Disrupção do operon <i>lacZ</i> .	20 g/L de Glicerol . Alimentação com glicerol à 800 g/L associada a pH. 20 g/L de Lactose .	6,4 g/L	0,118 g/L.h ⁻¹	(CHIN et al., 2015)
ΔLF YA_FF	<i>Escherichia coli</i> BL21star(DE3)	fucT2 de <i>H. pylori</i>	Gene fkp (<i>B. fragilis</i>) dentro do plasmídeo FF. Deleção do operon <i>lacZ</i> .	20 g/L de Glicerol . Alimentação com glicerol à 800 g/L associada a pH. 25 g/L de Lactose e 25 g/L de Fucose . 20 g/L de glicerol	23,1 g/L	0,389 g/L.h ⁻¹	(CHIN et al., 2016)
ΔL YA BCGW-W	<i>Escherichia coli</i> BL21star(DE3)	WcfB de <i>B. fragilis</i>	Genes gmd , wcaG , manB , manC (<i>E. coli</i> K12) dentro do plasmídeo pBGCW. Deleção do operon <i>lacZ</i> .	20 g/L de Glicerol . Alimentação com glicerol à 800 g/L associada a pH. 20 g/L de Lactose .	15,4 g/L	0,530 g/L.h ⁻¹	(CHIN et al., 2017)

BL21ΔlacZ ΔlonΔwcaJ	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	FucT2 de <i>H. pylori</i>	Genes gmd , wcaG , manB , manC (<i>E. coli</i> K12) dentro do plasmídeo pET-CBGF, manA e rcaA dentro do plasmídeo pACYC-AA, zwf e pntAB dentro do plasmídeo pCOLA-zwf-pntAB e lacY dentro do plasmídeo pCDF-futAY.	36 g/L de Glicose e 12 g/L de Lactose .	9,12 g/L	-	(HUANG et al., 2017)
D452- 2_LFF	<i>S. cerevisiae</i>	FucT2 de <i>H. pylori</i>	Genes fkp de <i>B. fragilis</i> dentro do plasmídeo pRS425GPD_BF_fkp e LAC12 de <i>K. lactis</i> dentro do plasmídeo pRS423GPD_LAC12.	20 g/L de Glicose , 40 g/L de Etanol , 2 g/L de Lactose e 2 g/L de Fucose	0,503 g/L	-	(YU et al., 2018)
D452L-gwf	<i>S. cerevisiae</i>	FucT2 de <i>H. pylori</i>	Genes gmd e wcaG de <i>E. coli</i> K12 dentro dos plasmídeos pRS423-pGPD-gmd e pRS425-pGPD-wcaG. Gene LAC12 de <i>K. lactis</i> integrado no genoma.	40 g/L de Glicose e 3 g/L de Lactose	0,56 g/L	0,0058 g/L.h ⁻¹	(LIU et al., 2018)
HS07	<i>S. cerevisiae</i>	FucT2 de <i>H. pylori</i> SUMOstar® tag	Genes gmd e wcaG de <i>E. coli</i> (expressão plasmidial). Gene LAC12 de <i>K. lactis</i> integrado no genoma.	Glicose limitante em batelada alimentada e 10 g/L de Lactose .	15 g/L	0,22 g/L.h ⁻¹	(HOLLANDS et al., 2019)
HY28	<i>Y. lipolytica</i>	FucT2 de <i>H. pylori</i> SUMOstar® tag	Genes gmd e gmer de <i>M. Alpina</i> e LAC12 de <i>K. lactis</i> integrados no genoma.	Glicose limitante em batelada alimentada e 10 g/L de Lactose .	24 g/L	0,44 g/L.h ⁻¹	(HOLLANDS et al., 2019)

A via salvage consiste na introdução de fucose ao sistema e na atividade da enzima bifuncional L-fucoquinase / GDP-L-Fucose pirofosforilase (fkp) que associa uma molécula de GTP à fucose produzindo GDP-L-Fucose. Já a via de síntese *de novo* utiliza GDP-manose como precursor para formação de GDP-L-fucose a partir de duas enzimas que catalisam uma reação de desidratação e uma reação de oxirredução (Figura 3). Dessa forma, a via de síntese *de novo* implica no mesmo custo energético de ATP e GTP que a via salvage, porém requer maior potencial redutor, visto que utiliza o cofator NADPH. Também, GDP-manose intracelular é obtida a partir de manose-6-fosfato e essa por sua vez é produzida a partir de frutose-6-fosfato com a ação de uma isomerase. Todos os modelos microbiológicos implementados utilizando a via de síntese *de novo* dependem dessa reação, visto que utilizam glicose ou glicerol como fonte de carbono para crescimento (Tabela 1). Também, a manose-6-fosfato é um intermediário da via e sua forma defosforilada pode ser utilizada diretamente como fonte de carbono para crescimento. Entretanto, o uso da manose para crescimento microbiológico não é bem explorado na literatura, mesmo com a existência de biomassas vegetais ricas em sua composição e biodisponíveis como a semente de açai (RAMBO; SCHMIDT; FERREIRA, 2015).

A) GDP MANOSE 4,6-DESIDRATASE



B) GDP-L-FUCOSE SINTASE



Figura 3 – Conversão de GDP-manose em GDP-fucose. Duas reações geralmente adicionadas na utilização da via de síntese *de novo* de GDP-fucose tem como substrato inicial a manose. A) Etapa catalisada por uma enzima GDP-manose 4,6-desidratase também conhecida como GMD, liberando uma molécula de água. B) Etapa de oxiredução dependente de NADPH por uma epimerase redutase também conhecida como GDP-L-fucose.

1.3 A Semente de Açaí como Biomassa Oportuna para Utilização em Bioprocessos

O açaí (*Euterpe oleracea*) é um fruto tradicionalmente utilizado na culinária da região Norte e sua produção historicamente mobiliza a economia local, contabilizando por maior parte da produção nacional (ROGEZ, 2000; SANTANA, A. C. DE; PESSOA, J. D. C.; SANTANA, 2012). Nos últimos anos, o açaí foi popularizado globalmente como uma alternativa de alimentação saudável e com ação antioxidante e antienvhecimento (JENSEN et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006), aumentando a demanda no mercado interno e internacional do produto. Somente no estado do Pará, em 2018, a produção de açaí alcançou 1.439.249 toneladas (SEDAP, 2018). O principal resíduo gerado após o processamento da fruta é a semente, que representa em torno de 85% do peso total do fruto (PESSOA et al., 2010; POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009). Essas sementes são frequentemente descartadas e seu descarte incorreto resulta na poluição de

centros urbanos e, conseqüentemente, em alagamentos e assoreamento de rios da região (FAPESP, 2013; FREITAS, 2010).

A disponibilidade dessa biomassa, e o aumento do interesse em explorar novas fontes lignocelulósicas (HOOGWIJK et al., 2003) propulsionaram estudos nacionais que visam estabelecer uma aplicação econômica para as sementes do açaí (FREITAS, 2010; LIMA MESQUITA, 2013; LUCZYNSKI, 2008). Entre as aplicações já estudadas para as mesmas, estão a extração de polifenóis, que possuem diversas propriedades biológicas benéficas a saúde, e a sua utilização como recurso energético (DA SILVA CRISTINO CORDEIRO et al., 2018; ITAI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2006). Além disso, a caracterização estrutural da semente mostrou que 53,8% de sua composição é de manana e isso corresponde à 80% dos carboidratos totais da semente madura (MONTEIRO et al., 2019; ROGEZ, 2000). Recentemente, foi descrito a recuperação de 146 g/L de manose a partir da semente de açaí, com a utilização de hidrólise ácida associada à quebra da manana por enzimas hidrolíticas (MONTEIRO et al., 2019). Esse processo realizado pelo laboratório de biocatálises do Instituto Nacional de Tecnologia apresenta um rendimento de 96,8% de recuperação da manose presente na semente e garante a disponibilidade dos açúcares complexos em suas frações monoméricas, prontos para futuras aplicações.

A manose é um epímero C2 da glicose e está presente em sua forma polimérica, a manana, em diferentes biomassas vegetais e de fungos (BUCKERIDGE, 2010; SANDIN, 1987; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A manana, por sua vez, pode ser encontrada em sua forma linear como também associada a glicose e a galactose em forma de glucomanana, galactomanana ou galactoglucomanana (MOREIRA; FILHO, 2008). Esse polímero é um dos principais compostos da fração hemicelulósica vegetal compondo entre 15-20% da massa total de coníferas – ou softwoods – e sua quebra por enzimas β -mananases e β -manosidases de linhagens de *Aspergillus* é bem caracterizada (MALHERBE et al., 2014). Visando o melhor aproveitamento de biomassas vegetais, é descrito na literatura a construção de cepas de *S. cerevisiae* produtoras dessas enzimas para possibilitar o consumo da manose presente na

fração hemicelulósica e a sua conversão em etanol (ISHII et al., 2016; MALHERBE et al., 2014). Além disso, também já foi descrito o co-consumo de manose e glicose por *Lipomyces starkeyi* a partir de biomassa de levedura para produção de lipídeos (YANG et al., 2014). Entretanto, a predominância de manose na maior fração de biomassas abundantes não é comum e conseqüentemente seu uso para crescimento microbiológico e a aplicação tecnológica do seu metabolismo ainda é pouco explorada (HARA et al., 2017).

Essa hexose quando associada a GDP na forma de GDP-D-manose, é essencial para produção de carboidratos estruturais e modificações pós-traducionais de proteínas, estando presente na camada externa polissacarídica de diversos microrganismos patogênicos (ENGEL; SCHMALHORST; ROUTIER, 2012). Esse açúcar também é um intermediário na formação de GDP-L-fucose, GDP-D-talose e GDP-D-ramnose (LI et al., 2018). Dessa forma, a manose presente em sua forma monomérica quando assimilada pode ser diretamente direcionada à produção de oligossacarídeos como a 2'FL a partir da sua via de síntese *de novo*. Tais fatores tornam vantajosa a utilização do hidrolisado da semente de açaí (HSA) como substrato para crescimento de microrganismos geneticamente modificados para produzir químicos de alto valor agregado.

1.4 A Levedura *Kluyveromyces lactis* como Produtora de 2'FL

A escolha de um microrganismo como biocatalisador de uma rota tecnológica deve ser feita de acordo as especificações do processo desejado. O HSA proposto como matéria orgânica de trabalho é utilizado em estado líquido para cultivo de células em suspensão. Entre os sistemas de expressão heteróloga possíveis para este tipo de cultivo estão presentes sistemas em procariotos (bactérias) e em eucariotos (leveduras e células de mamíferos). Visto a necessidade de organismos mais resistentes ao ambiente industrial e de um processo escalonável dependente da taxa de crescimento celular, é preferível a escolha de um microrganismo modelo entre bactérias e leveduras já que o processo de síntese sugerido não justifica como organismo de expressão células de mamífero, um processo mais oneroso e com várias dificuldades tecnológicas

para ser escalonado (FERRER-MIRALLES et al., 2009; GLACKEN; FLEISCHAKER; SINSKEY, 1983).

O processo de produção de um componente para suplementação de fórmula infantil implica na implementação do mesmo dentro da indústria alimentícia, a qual possui extenso histórico de utilização de leveduras (QUEROL, AMPARO; FLEET, 2006). O sistema de expressão em *Escherichia coli* – sistema bacteriano mais utilizado e com maior sucesso na produção de 2^oFL – pode acarretar na presença de endotoxinas no produto final (WALLACE et al., 2016) e conseqüentemente pode ser uma barreira para esta indústria já que é necessária a remoção de todos os possíveis compostos alergênicos. Ademais, existem diversas linhagens de leveduras já adaptadas para o processo produtivo alimentício e diferente dos sistemas de expressão bacterianos, não estão suscetíveis à contaminação por fagos (BLOUNT; WEENINK; ELLIS, 2012). Outro fator que corrobora o uso de leveduras é o teor ácido do hidrolisado da semente, visto que geralmente esses organismos apresentam crescimento ótimo em pH ácido (MOUNTNEY; GOULD; WEISER, 1988).

Por muito tempo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada como plataforma para produção de alimentos (BEATO et al., 2016). Seu caráter respiratório crabtree-positivo associado a traços fisiológicos excepcionais da espécie a tornam um organismo com grande potencial para fermentação etílica (MOHD AZHAR et al., 2017; PFEIFFER; MORLEY, 2014). Tal fato associado à fácil manipulação de seu genoma através de recombinação homóloga, propulsionaram a adoção de *S. cerevisiae* como organismo modelo e essa é hoje a espécie de levedura com fisiologia mais estudada e caracterizada (HANSON, 2018; KARATHIA et al., 2011). Assim, diversos processos de produção de enzimas recombinantes utilizando *S. cerevisiae* como hospedeira são aplicados em escala industrial (NANDY; SRIVASTAVA, 2018). Em contrapartida, o avanço no estudo fisiológico de demais organismos possibilitou o desenvolvimento de novas ferramentas de edição molecular e expressão gênica em leveduras classificadas como não convencionais (do inglês “Non conventional yeasts” - NCY), o que tornou possível a aplicação industrial de outras espécies e salientou

vantagens dessas em relação a *S. cerevisiae* (MILTON et al., 2018; WAGNER; ALPER, 2016; WOLF, 1996). Por exemplo, a via para produção de 2'FL quando introduzida em *Yarrowia lipolytica*, uma levedura NCY, resultou numa concentração final de 25 g/L, quase 10 g/L a mais do que a produção da mesma via quando inserida em *S. cerevisiae* (HOLLANDS et al., 2019).

Dentro do grupo de NCY, a levedura *Kluyveromyces lactis* tem despontado como hospedeiro promissor para produção heteróloga de proteínas em escala industrial (SPOHNER et al., 2016). Inicialmente identificada como *Saccharomyces lactis* por possuir morfologia similar à *Saccharomyces cerevisiae*, *K. lactis* compartilha com *S. cerevisiae* alguns traços genéticos clássicos como o ciclo de vida haplóide estável e a possibilidade de fazer análises a partir de tétrades (BONEKAMP; OOSTEROM, 1994; RODICIO; HEINISCH, 2013). Assim, esse organismo é proposto por alguns autores como organismo modelo para trabalho e é uma das NCY mais estudadas tendo seu genoma completamente sequenciado (CHUZEL et al., 2017; DUJON et al., 2004). Um desafio inicial na sua utilização para estudos é a preferência da espécie por reparo não homólogo (NHEJ) do DNA, o que dificulta a transformação por recombinação homóloga e resulta atualmente numa menor quantidade de deleções anotadas em cepa isogênica quando comparado a *S. cerevisiae* (RODICIO; HEINISCH, 2013; WAGNER; ALPER, 2016). Porém, técnica já bem estabelecida para integração no genoma a partir de homologia através de locus LAC4 modificado e cepas com deleção do gene *Klku80* envolvido no reparo NHEJ permitem contornar esse problema (KOOISTRA; HOOYKAAS; STEENSMA, 2004; KRIJGER et al., 2012). Ademais, *K. lactis* não possui o genoma duplicado como *S. cerevisiae* e, portanto, possui menor redundância de genes e padrões de expressão gênica diferentes em relação ao metabolismo central (RODICIO; HEINISCH, 2013; WOLFE; SHIELDS, 1997).

O cultivo de *K. lactis* em larga escala já é bem estabelecido e crescimentos em quimostato conseguem ser atingidos com essa espécie, sendo possível evidenciar nos mesmos que seu maior diferencial em relação a *S. cerevisiae* diz respeito ao metabolismo energético (DIAS et al., 2018; INCHAURRONDO;

FLORES; VOGET, 1998; KIERS et al., 1998). Enquanto *S. cerevisiae* apresenta perfil crabtree positivo e conduz fermentação etílica em aerobiose, *K. lactis* apresenta perfil crabtree negativo e possui metabolismo respiratório mais ativo. Também classificada na literatura como crabtree-positiva em curto prazo, *K. lactis* produz etanol em aerobiose quando introduzida alimentação de um açúcar a uma cultura limitante e quando há limitações na via respiratória do microrganismo (HAGMAN; SÄLL; PIŠKUR, 2014; MERICO et al., 2009). Entretanto, a produção de etanol nesse organismo difere da observada em *S. cerevisiae* pois está relacionada ao controle fino por álcool desidrogenases mitocondriais que regulam o balanço entre o NAPH produzido pela via das pentoses fosfato (PPP), que é mais ativa em *K. lactis*, e o NADP⁺ produzido através de NADPH desidrogenases mitocondriais (GONZÁLEZ SISO; FREIRE PICOS; CERDÁN, 1996; OVERKAMP et al., 2002; SALIOLA et al., 2006; TARRÍO et al., 2006). Dessa forma, as concentrações de etanol produzidas dependem do metabolismo respiratório e quando suprida concentração de oxigênio ideal, não é possível ver formação de etanol por essa espécie em batelada (KIERS et al., 1998; MERICO et al., 2009). O acúmulo de NADPH proveniente da alta atividade da PPP e o menor desvio de carbono para produção de etanol no metabolismo respiratório, permitem o crescimento em maiores densidades celulares e a maior produção de enzimas recombinantes nessa espécie (SPOHNER et al., 2016). Também, altas concentrações de NADPH são essenciais para a produção de 2'FL e favorece a adoção de *K. lactis* como organismo de produção (LEE et al., 2012).

Outro fator que contribui para a escolha dessa levedura é a sua utilização industrial, onde a mesma é amplamente descrita na literatura como segura e possui classificação GRAS pela FDA (COENEN et al., 2000; RODICIO; HEINISCH, 2013; ZHAN et al., 2014). Até 2016, aproximadamente 100 proteínas heterólogas haviam sido produzidas em *K. lactis* com principais aplicações dentro da indústria alimentícia e farmacêutica (SPOHNER et al., 2016). A sua utilização mais extensa é na indústria alimentícia, especificamente na produção de sua β -galactosidase endógena para o mercado de restrição alimentar de lactose e na produção de quimosina recombinante para produção de queijo (ALMEIDA et al., 2014; CZERMAK et al., 2004; GUERRERO et al., 2015; VAN DEN BERG et al.,

1990). Tal fato evidencia o traço fisiológico mais marcante da espécie que é o consumo de lactose, um dos componentes da 2'FL (Figura 1). Os genes envolvidos nesse processo já são bem descritos e seus elementos genéticos como o promotor altamente induzível por lactose do gene LAC4 e o gene para transportador de lactose LAC12 já foram inseridos em outras espécies (DOMINGUES; GUIMARÃES; OLIVEIRA, 2010). Assim, quando associada à introdução de lactose intracelular, o consumo de manose por *K. lactis* é proposto neste estudo como rota tecnológica para produção de 2'FL (Figura 4).

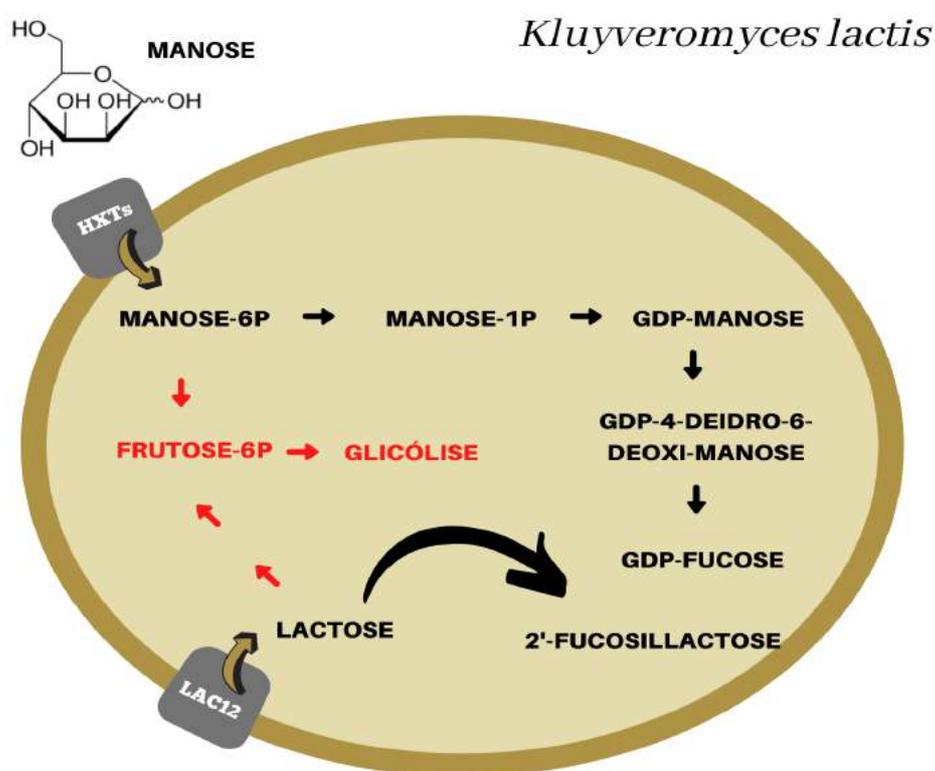


Figura 4 - Consumo de manose acoplado ao metabolismo de lactose em *K. lactis* para produção de 2'FL a partir da via de síntese *de novo* de GDP-fucose. Em vermelho, desvio da via de produção de 2'FL para o metabolismo energético.

2. JUSTIFICATIVA

É de extrema importância desenvolver tecnologias capazes de solucionar a poluição causada por sementes de açaí descartadas de maneira errônea na região Norte do Brasil sendo que um dos maiores obstáculos na utilização dessas

sementes é a falta de valor econômico das mesmas. A produção de 2'FL utilizando hidrolisado de semente de açaí surge então como uma possibilidade para agregar valor na cadeia de produção de açaí com concomitante redução de resíduo gerado. Além disso, o processo de síntese da 2'FL conduzido em *K. lactis* contribui com a indústria nacional como a única rota biotecnológica de produção dessa molécula, favorecendo também o custo do produto final sem taxas de importação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Construir cepa K2W de *Kluyveromyces lactis* com via sintética capaz de converter manose presente no hidrolisado da semente do açaí (HSA) em 2'FL, um oligossacarídeo de aplicação na indústria alimentícia.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar o genoma de *K. lactis* a fim de identificar os genes que precisam ser inseridos na levedura para produção de 2'FL.
- Delinear padrão de crescimento de *K. lactis* utilizando o HSA como única fonte de carbono assim como utilizando somente manose como fonte de carbono.
- Construir vetor de expressão p2WF para produção de 2'FL, contendo os cassetes de expressão de *gmd*, *fcl* e *WcfB*
- Inserir sistema de expressão construído no genoma da cepa GG799 de *K. lactis*
- Confirmar a integração do sistema construído na cepa GG799 de *K. lactis* e a estabilidade da mesma.
- Detectar produção de 2'FL por HPLC, a partir de clones transformados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos

Todos os microrganismos utilizados durante a realização deste estudo estão listados na tabela 2.

Tabela 2 - Cepas de microrganismo utilizados neste estudo.

Cepa	Espécie	Modificações	Origem
Bactérias			
DH5- α	<i>Escherichia coli</i>	-	MCLAB (Molecular Cloning Laboratoires)
DH10- β	<i>Escherichia coli</i>	-	MCLAB (Molecular Cloning Laboratoires)
Leveduras			
GG799	<i>Kluyveromyces lactis</i>	-	NEB
JP1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	(DA SILVA FILHO et al., 2005)
GS115	<i>Pichia pastoris</i>	-	Invitrogen
K2W	<i>Kluyveromyces lactis</i>	GG799 + p2WF	Este Estudo

4.1.2 Vetores Utilizados e Construídos

As etapas de clonagem e subclonagens realizadas neste estudo foram conduzidas com a utilização de plasmídeos vetores listados na tabela 3.

Tabela 3 - Plasmídeo vetores utilizados neste estudo.

Vetor	Descrição	Referência
pGEM®-T Easy	Vetor linearizado com pontas T que permite a ligação de produtos de PCR poliadenilados	Promega
p424GPD	Vetor com sítio de múltipla clonagem entre a região promotora GPD e o terminador CYC utilizado para construção do cassete de expressão do gene <i>gmd</i>	ATCC
p424TEF	Vetor com sítio de múltipla clonagem entre a região promotora TEF e o terminador CYC utilizado para construção do cassete de expressão do gene <i>fcl</i>	ATCC
pKLAC2	Vetor para integração de genes no genoma de células da cepa GG799 de <i>Kluyveromyces lactis</i>	NEB
pGEM-G	Vetor derivado do pGEM-T Easy contendo o gene <i>gmd</i> amplificado do genoma da cepa K12 de <i>E. coli</i>	Este estudo
pGEM-F	Vetor derivado do pGEM-T Easy contendo o gene <i>fcl</i> amplificado do genoma da cepa K12 de <i>E. coli</i>	Este estudo
pGEM-CG	Vetor derivado do pGEM-T Easy contendo o cassete de expressão do gene <i>gmd</i>	Este estudo
pGEM-CF	Vetor derivado do pGEM-T Easy contendo o cassete de expressão do gene <i>fcl</i>	Este estudo
p424GPD-G	Vetor derivado de p424GPD contendo o cassete de expressão do gene <i>gmd</i>	Este estudo
p424TEF-F	Vetor derivado de p424TEF contendo o cassete de expressão do gene <i>fcl</i>	Este estudo
pKLACG	Vetor derivado de pKLAC2 contendo o cassete de expressão do gene <i>gmd</i>	Este estudo
pFUC	Vetor derivado de pKLACG contendo o cassete de expressão do gene <i>fcl</i>	Este estudo
pBSK-WcfB	Vetor contendo o gene sintético WcfB de <i>B. fragilis</i>	Este estudo
p2WF	Vetor derivado de pFUC contendo o gene WcfB de <i>B. fragilis</i>	Este estudo

4.1.3 Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo possuem seqüências em suas extremidades do sítio de ação catalítica de diferentes enzimas de restrição, sendo referidos como ponta de restrição na tabela 4.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR deste estudo. Em vermelho, sítio de ancoragem para restrições nas extremidades da seqüência. Em azul, sítio de ação catalítica para enzima de restrição.

Oligonucleotídeo Iniciadores		
Nome	Seqüência	Ponta de restrição
gmd F	ATCC CGG GTT ATG ACT CCA GCG C	<i>SmaI</i>
gmd R	GGAC TAG TAT GTC AAA AGT CGC TCT CAT	<i>SpeI</i>
fcl F	CAG AAT TCT TAC CCC CGA AAG CG	<i>EcoRI</i>
fcl R	CAG GAT CCA TGA GTA AAC AAC GAG TTT TT	<i>BamHI</i>
Casg F	GTC AGA TCT ATA GGG CGA ATT GGG T	<i>BglII</i>
Casg R	CGC AGA TCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG	<i>BglII</i>
Casf F	TA CCT GAG GCT CAC TAT AGG GCG AAT TG	<i>Bsu36I</i>
Casf R	TA CCT CAG GCG CAA TTA ACC CTC ACT AA	<i>Bsu36I</i>
WcfB F	CAT ATG TTG TAC GTC ATC TTG AGA	<i>NdeI</i>
WcfB R	AGG CCT TTA CAT GTT CTT CTT CCT	<i>StuI</i>

4.1.4 Meios de Cultivo

- **Meio Mínimo [MM]**

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5%	(p/v)
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05%	(p/v)
KH ₂ PO ₄	0,3%	(p/v)
Fonte de carbono	2%	(p/v)
pH ajustado para 5,0		

As fontes de carbono utilizadas na formulação deste meio variaram entre Glicose (MMD), Manose (MMM) e HSA (MMA). Quando utilizado o HSA como fonte de carbono, o cálculo foi estipulado para a concentração final

de 2% de manose baseado nas concentrações do hidrolisado obtidas por HPLC.

- **UAB**

Ácido Cítrico	0,18%	(p/v)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,002%	(p/v)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,26%	(p/v)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05%	(p/v)
KCl	0,09%	(p/v)
Elementos traço	0,435%	(v/v)
Fonte de carbono	4%	(p/v)

pH ajustado para 5,0

Os elementos traço foram diluídos no meio a partir de solução estoque previamente filtrada com filtro de 0,22 µm.

As fontes de carbono utilizadas na formulação deste meio variaram entre glicose, manose e o HSA. Quando utilizado o HSA como fonte de carbono, o cálculo foi estipulado para a concentração final de 4% de manose baseado nas concentrações do hidrolisado obtidas por HPLC.

- **YP**

Extrato de levedura	1%	(p/v)
Peptona	2%	(p/v)
Fonte de carbono	2%	(p/v)

As fontes de carbono utilizadas na formulação deste meio variaram entre Glicose (YPD) e Manose (YPM).

Para YP ágar, é adicionado ágar até a concentração final de 1,5% (p/v)

- **LB**

Extrato de levedura	1%	(p/v)
Peptona	2%	(p/v)

NaCl 1% (p/v)

Para LB ágar, é adicionado ágar até a concentração final de 1,5% (p/v)

- **SOB**

Triptona 2% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCL 0,05% (p/v)

KCl 2,5 mM

MgCl₂ 10 mM

pH ajustado para 7,2

Os sais MgCl₂ e KCl foram diluídos no meio a partir de solução estoque 1M previamente filtrada com filtro de 0,22 µm.

Para SOB ágar, é adicionado ágar até a concentração final de 1,5% (p/v)

- **YNB Acetamida**

YNB sem sulfato de amônio e aminoácidos 0,27% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Acetamida 5 mM

O YNB sem sulfato de amônio e aminoácidos e a acetamida foram diluídos no meio a partir de soluções estoques 10X e 100X respectivamente, filtradas com filtro de 0,22 µm.

Para YNB Acetamida ágar, é adicionado ágar até a concentração final de 1,5% (p/v)

- **YNB 10x**

YNB sem sulfato de amônio e aminoácidos 2,7% (p/v)

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

4.1.5 Antibiótico

- **Ampicilina 1000x**

Ampicilina 100 mg/mL

Para meios contendo ampicilina, é adicionado 1 µL/mL

4.1.6 Soluções

- **Glicose 10X**

Glicose 20% (p/v)

- **Manose 10X**

Manose 20% (p/v)

- **HSA**

O hidrolisado utilizado neste estudo foi produzido e fornecido pelo laboratório de biocatálises (Labic) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT). Os açúcares presente no HSA são os seguintes: manose, glicose, xilose, galactose e arabinose (MONTEIRO et al., 2019). A composição do HSA utilizado para o crescimento em frasco foi de 32,175 g/L de manose, 0,53 g/L de arabinose e 0,37 g/L de glicose. A composição do HSA utilizado para o crescimento em biorreator de 1,3 L foi de 101,8 g/L de manose e 6,84 g/L de glicose.

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Elementos traço**

CuSO₄5H₂O 0,6% (p/v)

NaI 0,008% (p/v)

MnSO₄ 0,3% (p/v)

Na₂MoO₄2H₂O 0,02% (p/v)

H₃BO₃ 0,002% (p/v)

CoCl₂ 0,05% (p/v)

ZnCl₂ 2% (p/v)

FeSO ₄ 7H ₂ O	6,5%	(p/v)
Biotina	0,02%	(p/v)
H ₂ SO ₄ (95-98%)	0,5%	(v/v)
Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.		

- **Xgal**

Xgal	4%	(p/v)
------	----	-------

- **IPTG**

IPTG	34,03%	(p/v)
------	--------	-------

- **MgCl₂ 1M**

MgCl ₂	9,52%	(p/v)
-------------------	-------	-------

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **KCl 1M**

KCl	7,45%	(p/v)
-----	-------	-------

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Acetamida 100X**

Acetamida	5,9%	(p/v)
-----------	------	-------

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **BSA**

BSA	0,5%	(p/v)
-----	------	-------

- **Brometo de Etídio**

EtBr	1%	(p/v)
------	----	-------

- **Marcador molecular para DNA**

1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™ (100pb-15Kb)

1Kb DNA Ladder, Kasvi (250pb-10Kb)

- **NaOAc 3M**
NaOAc 24,6% (p/v)
- **Solução I**
Glicose 50mM
Tris-Hcl 25mM pH 8
EDTA 10mM pH 8
- **Solução II**
NaOH 0,2M
SDS 1% (p/v)
- **Solução III**
KAc 3M
Ácido acético glacial 11,5% (v/v)
- **LiAc 1M**
LiAc 6,6% (p/v)
Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **PEG**
PEG 3350 50% (p/v)
- **NaCl 1M**
Nacl 5,8% (p/v)
- **EDTA 0,5M**
EDTA 2H₂O 18,61% (p/v)
pH da solução ajustado para 8,0 com NaOH.
- **Tris-Hcl 1M**
Tris Base 12,11% (p/v)
pH da solução ajustado para 8,0 com HCl.

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **SDS 100X**

SDS	10%	(p/v)
-----	-----	-------

- **Fenol / Clorofórmio / Ácido Isoamílico**

Fenol	25%	(p/v)
-------	-----	-------

Clorofórmio	24%	(p/v)
-------------	-----	-------

Ácido Isoamílico	1%	(p/v)
------------------	----	-------

- **Ácido Sulfúrico 5 mM**

Ácido Sulfúrico	0,049%	(p/v)
-----------------	--------	-------

4.1.7 Tampões

- **Tampão de PCR (Phoneutria) 10X**

KCl	500 mM
-----	--------

Tris HCl pH 8,4	100 mM
-----------------	--------

Triton X-100	1%	(v/v)
--------------	----	-------

- **Tampão TBE**

Tris Base	10,78%	(p/v)
-----------	--------	-------

EDTA	0,58%	(p/v)
------	-------	-------

Ácido Bórico	0,55%	(p/v)
--------------	-------	-------

pH da solução ajustado para 8,0.

- **Tampão de Amostra**

TE 20X	50%	(v/v)
--------	-----	-------

Glicerol	30%	(v/v)
----------	-----	-------

Azul de Bromofenol	0,25%	(p/v)
--------------------	-------	-------

- **Tampão TE 10X**

EDTA 0,5M pH 8,0	2%	(v/v)
Tris-HCl 1M pH 8,0	10%	(v/v)

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Tampão CCMB80**

NaAc 1M pH 7,0	0,1%	(v/v)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,18%	(p/v)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,4%	(p/v)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2%	(p/v)
Glicerol	10%	(v/v)

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Tampão de Transformação**

PEG 3350	240 µL
LiAc 1M	36 µL
DNA carreador (Esperma de Salmão)	50 µL
DNA plasmidial	34 µL
Total	360 µL

- **Tampão de Lise para Levedura**

Triton 100X	2%	(v/v)
SDS 100X	10%	(v/v)
NaCl 1M	10%	(v/v)
EDTA 0,5M	0,2%	(v/v)
Tris-HCl 1M	1%	(v/v)

- **Tampão de ligação (Thermo Fisher Scientific®) 10X**

Tris-HCl	400 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	5 mM
pH 7,8	

4.1.8 Enzimas

As seguintes enzimas foram utilizadas durante diferentes etapas deste estudo:

- Taq DNA Polimerase (Phonectria)
- T4 DNA Ligase (Invitrogen)
- RNase A (ThermoFischer)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermofischer)

Além dessas enzimas, foram também utilizadas as seguintes endonucleases de restrição para as reações de restrição enzimática feitas neste estudo, listadas na tabela 5.

Tabela 5 - Endonucleases de restrição utilizadas neste estudo.

Enzima	Sítio de Clivagem 5'-3'	Tampão (Thermo Fischer Scientific®)	Temperatura	Tempo de Incubamento
<i>SpeI</i>	A CTAGT	Fast Digest Green	37 °C	5 minutos
<i>SmaI</i>	CCC GGG	Fast Digest Green	37 °C	5 minutos
<i>EcoRI</i>	G AATTC	Fast Digest Green	37 °C	15 minutos
<i>BamHI</i>	G GATCC	Fast Digest Green	37 °C	5 minutos
<i>BglII</i>	A GATCT	Buffer O	37 °C	1-16 horas
<i>Bsu36I</i>	CC TNAGG	Buffer Tango	37 °C	1-16 horas
<i>StuI</i>	AGG CCT	Buffer B	37 °C	1-16 horas

<i>NdeI</i>	CA TATG	Buffer O	37 °C	1-16 horas
<i>BspHI</i>	T CATGA	Buffer O	37 °C	1-16 horas
<i>XhoI</i>	C TCGAG	Fast Digest Green	37 °C	5 minutos
<i>SacII</i>	CCGC GG	Buffer Tango 2X	37 °C	10 minutos - 1 hora

4.1.9 Kits

- GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) – purificação e limpeza de soluções contendo DNA
- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) – purificação de DNA a partir de bandas de gel de agarose

4.1.10 Equipamentos

Todas as amostras contendo material genético foram quantificadas com o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) e todas as leituras de densidade óptica foram realizadas com o equipamento SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices®) utilizando cubetas de plástico transparentes de 12,5 mm X 12,5 mm – A leitura foi realizada com emissão de onda à 600nm em temperatura ambiente e utilizando água destilada como branco e líquido de diluições.

4.2 Métodos

4.2.1 Crescimentos em Microplaca

O crescimento das diferentes cepas de levedura utilizadas neste estudo (Tabela 2) foi realizado conforme fluxograma presente na figura 5. Células foram retiradas de estoque em freezer -80 °C e cultivadas em placa de petri contendo

meio YPD ágar à 30 °C por 60 horas. Colônias isoladas em placas foram transferidas com auxílio de um palito estéril à 5mL de meio YPD em tubo falcon de 50 mL para crescimento inicial à 30 °C e 200 rpm por 24 horas. Após, 250 µL desse crescimento foi passado para 5 mL de meio a ser testado (MMA, MMD ou MMM) em tubo falcon de 50 mL para aclimatação ao meio.

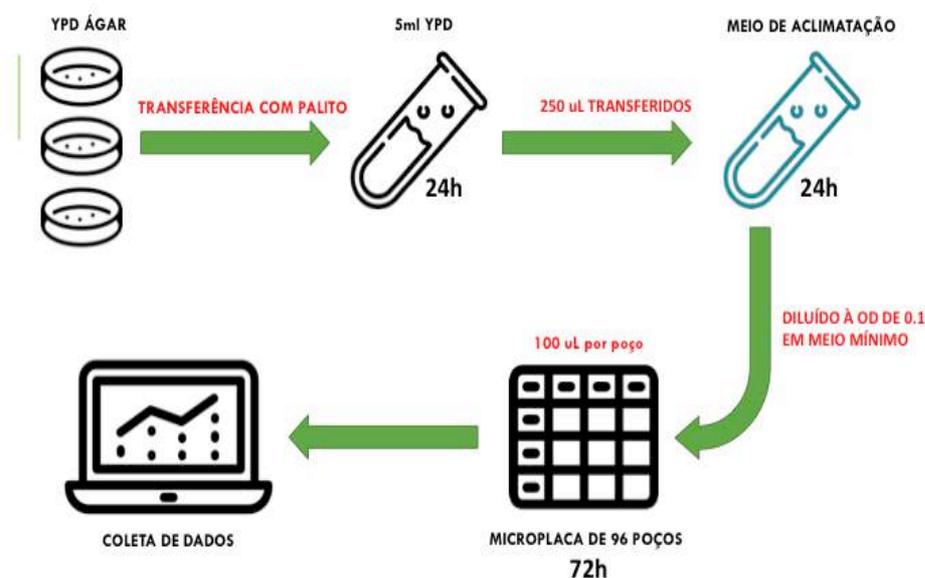


Figura 5 - Fluxo de trabalho para crescimento de microrganismos em microplaca.

Crescimentos em MMA, MMD e MMM foram transferidos para seus respectivos meios com intuito de diluir suspensão celular a uma OD_{600nm} inicial de 0,1. Imediatamente após crescimento de aclimatação ser diluído nessa OD, 100 µL foram adicionados a placa de 96 poços. As células cresceram a 30°C por 72 horas em agitação de 200 rpm com a utilização de aparelho eón.

4.2.2 Crescimentos em Frasco de 1 L

Células de cepa GG799 de *Kluyveromyces lactis* foram cultivadas em placas contendo meio YPD ágar a partir de estoque em freezer -80 °C a 30 °C por 60 horas. Colônias isoladas foram transferidas com auxílio de um palito estéril para 5 mL de meio utilizado em frasco (YPD, YPM, UAB Glicose, UAB Manose e UAB Açai) em tubo falcon de 50 mL e incubadas em incubadora rotacional a 30

°C em agitação de 200 *rpm* por 24 horas. Após crescimento, foi transferido volume necessário da suspensão celular para erlenmeyer aletado de 1 L, a fim de obter OD_{600nm} inicial de 0,1. Erlenmeyer de 1 L foram então colocados em incubadora rotacional à 30 °C e agitação de 200 *rpm* por 24 horas. O volume utilizado para crescimento foi 100 mL, correspondente a 10% da capacidade total do frasco. Foram retiradas alíquotas de suspensão celular a cada 2 horas para avaliar OD_{600nm} em espectrofotômetro.

4.2.3 Crescimentos em Biorreator de 1,3 L

Células de cepa GG799 de *Kluyveromyces lactis* foram crescidas em frasco conforme 4.2.2 e durante o período exponencial de crescimento, células foram injetadas em biorreatores de 1,3 L (New Brunswick BioFlo[®] 115 - Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) na Universidade Católica de Brasília (UCB), de forma a iniciar o crescimento em OD 0,1 num volume de 500 mL. O crescimento foi ajustado para rotação de pás à 200 *rpm* e 30 °C de temperatura. A rotação das pás foi ajustada para manter aeração mínima de 30% de oxigênio dissolvido, podendo ser ajustada até 700 *rpm*. O pH foi mantido à 5,0 com a utilização de hidróxido de amônio conectado ao fermentador através de bombas acionadas por sensores. Amostras de crescimento foram obtidas durante início da fase exponencial de crescimento, a cada duas horas, através de janela de observação com pressão negativa para manter esterilidade do meio de cultivo. As mesmas foram centrifugadas à 13000 *rpm* durante 5 minutos e sobrenadante foi mantido à -20 °C.

4.2.4 Desenho de Oligonucleotídeos Iniciadores e Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para obtenção de oligonucleotídeos iniciadores dos genes para produção de fucose a serem utilizados em reações PCR, foram utilizadas sequências de cepa K12 de *Escherichia coli* obtida de banco de dados GeneBank e inseridas no website Primer3 (KORESSAAR, T.; REMM, 2007; UNTERGASSER,

A.;CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, 2012). Com auxílio do programa oligoanalyzer, os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram então selecionados levando em conta temperaturas de anelamento e a energia necessária para formação de heterodímeros, homodímeros e grampos (do inglês "hairpins"). Os demais oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando sequências criadas neste estudo.

As reações de PCR neste estudo foram realizadas em tubo de 0.2 mL com auxílio de um termociclador. O volume utilizado para as reações foi de 20 μ L contendo (a) 2 μ L de tampão de PCR concentrado 10 vezes; (b) 1,6 μ L de MgCl₂ 25 mM; (c) 1,6 μ L de BSA; (d) 1,6 μ L de dNTPs 10 mM; (e) 1 μ L de oligonucleotídeo iniciador Forward 10 mM; (f) 1 μ L de oligonucleotídeo iniciador Reverse 10 mM; (g) 0,3 μ L de enzima Taq DNA Polimerase; (h) 30-50 ng de DNA molde e água ultra pura deionizada até completar o volume final desejado. O termociclador foi ajustado para as seguintes condições: (a) 1 ciclo de 96 °C por 5 minutos; (b) 35 ciclos de 96 °C por 30 segundos, seguido de temperatura de anelamento por 30 segundos e após 72 °C por 1 minuto correspondente à 1000 pares de base de sequência a ser amplificada; (c) 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos e (d) resfriamento indefinido à 4.

4.2.4.1 PCR de Colônia

Para obtenção de genes utilizados na construção de cassetes, a reação de PCR foi construída conforme tópico acima com modificações em (b) x de MgCl₂ 25mM e em (h) colônia foi transferida diretamente à reação com auxílio de um palito ao invés de uma quantidade determinada de material gênico. Reação no termociclador também foi alterada em relação a (a) 1 ciclo de 100 por 10 minutos.

4.2.5 Tratamento com Endonucleases de Restrição

As reações de restrição por endonucleases realizadas neste estudo foram conduzidas em tubos de 0,2 mL contendo 20 μ L de volume de reação constituído por: (a) 2 μ L de Buffer indicado por manual da enzima concentrado 10 vezes; (b) 1 μ L de enzima de restrição 3'; (c) 1 μ L de enzima de restrição 5'; (d) 1-2 μ g de material genético (vetor ou inserto); (e) água ultrapura deionizada necessária para completar volume final de reação.

As reações foram incubadas a 37 °C por tempo referente a recomendado por manual da respectiva enzima. Em caso de reações de restrição de corte único em vetores plasmídeos circulares, isto é, com a utilização de apenas uma endonuclease, a letra (c) foi composta por 1 μ L de enzima Fosfatase AP (ThermoFischer) no local de segunda enzima de restrição. Em caso de restrição de insertos com corte único, a letra (c) não fez parte do volume de reação.

4.2.6 Análise por Eletroforese em Gel de Agarose

Amostras de materiais genéticos utilizados para construção de engenharia genética foram todas analisadas em gel composto por malha de agarose. Para a visualização de materiais genéticos maiores que 5 mil pares de base e restrições onde a diferença entre fragmentos gerados é inferior à 2 mil pares de bases foi utilizada malha de agarose a 0,8%. Para os demais materiais genéticos foi utilizado malha de agarose a 1% . A malha a 0,8% foi obtida a partir da adição de 0,32g de agarose à 40 mL de tampão TBE e à mistura por aquecimento até ponto de ebulição. Brometo de etídio foi adicionado à solução antes de solidificação para obter concentração final de 0,5 μ g/mL. Após solidificar, malha foi colocada em cuba e submersa em tampão de corrida TBE. Amostras de DNA diluídas em tampão de carregamento foram aplicadas no gel juntamente a um marcador "1Kb plus DNA Ladder" e foi aplicada corrente de 70 Volts 60 minutos. Após corrida, gel foi analisado com uso de radiação UV.

4.2.7 Purificação de Reações de Restrição com Endonucleases e Produtos de PCR

As reações de restrição com endonucleases e materiais genéticos obtidos por PCR ou retirados de gel de agarose foram purificados de tampões, sais e restos de enzimas inativadas utilizando o produto "GeneJet PCR Purification Kit" (Thermo Scientific) conforme recomendações do manual do fabricante.

Alternativamente, as reações de purificações acima também foram realizadas a partir de precipitação por acetato de sódio onde é adicionado à solução 2 volumes de isopropanol ou etanol 100% e é adicionado a solução acetato de sódio 3M até a concentração final de 0,3M. A solução é deixada em freezer à -20 °C por um pernoite e após é centrifugada na velocidade máxima da centrífuga (13400 *rpm*) por 20 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet formado é lavado com 1 mL de etanol 70% 2 vezes com centrifugações à 13400 *rpm* por 5 minutos. Após o pellet secar, esse é ressuspendido em quantidade desejada de H₂O Milli-q proporcional a quantidade de material genético trabalhado e a finalidade do seu uso.

4.2.8 Ligação de Insertos em Vetores

As ligações foram conduzidas em tubos de 0,2 mL contendo 10 µL de volume de reação constituído por: (a) 1 µL de Buffer para T4 DNA Ligase concentrado 10 vezes; (b) 30 ng de vetor digerido; (c) quantidade de inserto digerido estipulada para 30 ng de vetor a ser integrado estipulado pelo website ligationcalculator (LIGATION CALCULATOR, [s.d.]); (d) 1 µL de enzima T4 DNA Ligase; (e) água ultra pura deionizada necessária para completar volume final de reação. As reações foram incubadas a 4 °C durante a noite.

4.2.9 Preparo de Células Bacterianas Competentes

Células de *Escherichia coli* de cepa DH5-α e DH10-β foram manipuladas conforme método de hanahan com alterações (GREEN; SAMBROOK, 2018).

Células destas cepas foram retiradas de estoque armazenado em freezer -80 °C e cultivadas em meio LB ágar. Colônias foram selecionadas e inoculadas em tubos tipo eppendorf e inoculadas contendo 2 mL de meio SOB. Os tubos foram incubados em uma incubadora rotaciona a 23 °C em agitação de 200 *rpm*. Após as 16 horas, 1 mL do volume do tubo foi transferido para erlenmeyer de 1L contendo 250 mL de meio SOB e incubado em incubadora rotacional a 20 °C em agitação de 200 *rpm* por aproximadamente 16 horas até que OD_{600nm} chegasse a 0.26.

As células foram passadas para tubos 50 mL com fundo cônico pré-gelados e então centrifugadas por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuscitado gentilmente em 20 mL de buffer CCMB80 gelado com movimentos circulares no gelo. Após maior parte do pellet ser ressuscitado, 60 mL adicionais do buffer CCMB80 foram adicionados e misturado gentilmente em movimentos circulares no gelo. A suspensão celular foi incubada no gelo por 20 minutos e transferida rapidamente à tubos pré-gelados em alíquotas de 50 µL e armazenada a -80 °C. A competência das células foi testada com uso de plasmídeos de resistência à ampicilina.

4.2.10 Transformação de Células Bacterianas

Para replicação de plasmídeos de coleção e construídos neste estudo, foram utilizadas células de *Escherichia coli* competentes em estoque (4.2.9) conforme método de hanahan com alterações (GREEN; SAMBROOK, 2018). As alíquotas foram retiradas de freezer -80 °C e descongeladas em banho de gelo durante 10 minutos. Após descongeladas, a quantidade desejada de plasmídeo ou os 10 µL da reação de ligação foram adicionadas as células e incubado em gelo. Passados 30 minutos, as células foram submetidas a choque térmico, sendo inseridas em banho seco a 42 °C entre 90 e 120 segundos e depois retornadas imediatamente ao gelo por 2 minutos. As células são então suspensas em 950 µL de meio SOB e incubadas em incubadora rotacional a 37 °C com agitação de 200 RPM durante 1 hora. Após recuperação em incubadora rotacional, 100 µL da suspensão é cultivado em placa de petri contendo meio LB ágar mais marca de

seleção (Ampicilina 100 µL/mL) durante 16 horas. A eficácia da transformação é verificada pela presença de colônias em meio seletivo.

Clones transformantes foram selecionados em meio seletivo por 16 horas à 37 °C em rotação de 200 *rpm* e são estocados a -80 °C após a adição de glicerol até concentração final de 30 % (v/v)

4.2.11 Extração Plasmidial de Bactérias

Os vetores transformados em *E. coli* foram extraídos após crescimento microbiano utilizando protocolo já descrito (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Colônias de bactéria contendo plasmídeo de resistência foram transferidas de meio seletivo sólido e transferidas para 5 mL de meio LB em tubo com fundo cônico de 15 mL e incubadas em incubadora rotacional à 37 °C com agitação de 200 *rpm* durante 16 horas. Após cultivo, as células foram centrifugadas à 4.500 *g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspendidas em 100 µL de solução I juntamente à 40 µL de RNase A e após, foram transferidas à um tubo tipo eppendorf de 2 mL. Foi adicionado 200 µL de solução II feita na hora aos tubos e misturado por inversão 10 vezes. Após, os tubos foram transferidos imediatamente a banho de gelo por 3 minutos e então foram adicionados 150 µL de solução III e misturado por inversão. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos na velocidade máxima da centrífuga. O sobrenadante foi repassado por um outro tubo tipo eppendorf de 2 mL onde foi adicionado 2 vezes do volume de sobrenadante de Etanol 100% gelado e misturado com auxílio de pipeta. Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 13400 *g* até que fosse verificada a presença de pellet. O sobrenadante foi descartado e pellet foi então lavado com 1 mL de Etanol 70% por centrifugação a 13000 *g* por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido 3 vezes. Após último descarte, pellet foi deixado em temperatura ambiente até que todo o etanol houvesse evaporado e foi então suspenso em 100 µL de água ultrapura deionizada. Após a extração, amostras foram quantificadas com auxílio de um Nanodrop (ThermoFischer).

4.2.12 Transformação de Levedura

O plasmídeo construído neste estudo foi integrado no genoma de células de *K. lactis* cepa GG799 por choque térmico seguindo o protocolo utilizando acetato de lítio e PEG (GIETZ; WOODS, 2002). Colônias isoladas da cepa GG799 foram retiradas de placa de YPD e transferidas para 10 mL de meio YPD em falcon de 50 mL. Falcon com células em suspensão foi inoculado em incubadora rotacional em rotação de 200 rpm à 30 °C por 24h. Após crescimento, foi verificada a densidade óptica da suspensão e quantidade calculada para iniciar crescimento em OD 0.5 foi inoculada em 50 mL de meio YPD em erlenmeyer de 500 mL aletado. Células foram inoculadas em incubadora rotacional em rotação de 200 rpm à 30 °C até que a suspensão atingisse a OD de 2. Suspensão foi centrifugada à 3000g por 5 minutos até a formação de pellet. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas em H₂O ultrapura estéril duas vezes onde suspensão em água foi centrifugada à 20 °C, 3000g por 5 minutos. O pellet de células foi então suspenso em 1 mL de H₂O ultrapura estéril e transferido para tubo plástico tipo eppendorf de 1,5 mL. Suspensão foi centrifugada em micro centrífuga à 13000g por 30 segundos e foi descartado o sobrenadante. O pellet foi novamente suspenso em 1 mL de H₂O ultrapura estéril e 100 µL da suspensão foi transferido para novo tubo plástico eppendorf de 1,5 mL. Células foram mais uma vez centrifugadas em micro centrífuga à 13000g por 30 segundos e foi descartado o sobrenadante. Foi adicionado ao pellet 360 µL do mix de transformação e as células foram ressuspendidas com auxílio de um vortex e em seguida incubadas à 42 °C por 40 minutos para efetuar choque térmico. Após, foi realizada mais uma etapa de centrifugação à 13.000g por 30 segundos e sobrenadante foi descartado. O pellet foi suspenso em 1 mL de H₂O ultrapura estéril e 200 µL foram plaqueados em YNB Acetamida com auxílio de pérolas de vidro estéreis. Placas foram colocadas em estufa por 76h e clones foram selecionados conforme crescimento em meio seletivo.

4.2.13 Extração de DNA Genômico de Leveduras

O DNA genômico de leveduras utilizado em reações de PCR (4.2.3) foi obtido conforme protocolo "bust n grab" com alterações (HARJU; FEDOSYUK; PETERSON, 2004). Colônias foram transferidas de suas placas para meio líquido (YPD ou YNB acetamida) e incubadas para crescimento em rotação de 200 rpm à 30 °C por 24h. Após, crescimentos foram centrifugados à 4500g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Células foram suspensas em 400 µL de tampão de lise e transferidas para tubo plástico eppendorf de 1,5 mL. Foram adicionadas ao tubo pérolas de vidro e tubos foram agitados com vortex por 30 segundos. Os tubos foram então transferidos para freezer -80 °C por 5 minutos e depois foram colocados em banho seco à 95 °C por 2 minutos. Esse processo de resfriamento e fervura foi repetido quatro vezes com 30 segundos de agitação com vortex entre cada repetição. Após o último ciclo, amostra foi agitada com vortex por 30 segundos e foi adicionado 200 µL de fenol clorofórmio ácido isoamílico (25:24:1). A amostra foi agitada com vortex mais uma vez e foi centrifugada por 10 minutos na velocidade máxima da centrífuga (13400 rpm). A fase aquosa na parte de cima do tubo foi coletada e transferida para outro tubo onde foi adicionado 3 µL de RNase A. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Foi adicionado a amostra 1 volume de fenol clorofórmio ácido isoamílico (25:24:1) e estas foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos na velocidade máxima da centrífuga. A fase aquosa na parte de cima foi coletada e transferida para outro tubo onde foi adicionado 1 mL de Isoprpanol. A amostra foi deixada em temperatura ambiente por 10 minutos e depois foi centrifugada à 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e pellet foi lavado com etanol 70% duas vezes. Após os pellets estarem secos, foram suspensos entre 30-50 µL de H₂O ultrapura. As amostras foram quantificadas com auxílio de um Nanodrop (ThermoFischer).

4.2.14 Extração de Metabólitos Intracelulares

Para verificar se as células transformadas eram capaz de produzir 2'FL, foi utilizado protocolo para extração de metabólitos com adaptações (CANELAS et al., 2009). As células foram retiradas de estoque à -80 °C e crescidas em meio

seletivo YNB Acetamida ágar. Colônias isoladas das transformantes juntamente a colônias de células não transformadas em YPD ágar foram transferidas para 25 mL de YP contendo 20 g/L de lactose em frasco haletado de 250 mL e crescidas durante a noite em incubadora rotacional à 30 °C e 200 *rpm*. Após 24 horas de crescimento, 1 mL de cultura foi transferido para um tubo tipo eppendorf de 2 mL e centrifugado à 13400 *rpm* por 10 minutos. O pellet ressuspendido em água ultrapura foi armazenado à -20 °C. A partir ainda desse cultivo, uma quantidade de células foi transferida para 50 mL de meio UAB contendo 40 g/L de lactose em frasco haletado de 500 mL, de forma que o crescimento começasse numa OD de 0,1. Os frascos foram colocados numa incubadora rotacional e foram crescidos à 30 °C e 200 *rpm*, tendo 1 mL de cultura retirados nos pontos de 0h e 24h de crescimento. As amostras foram centrifugadas e os pellets foram ressuspendidos em água ultrapura e juntamente ao pellet do crescimento em YP, foi adicionado micropérolas de vidro aos tubos e esses foram agitados com um vórtex durante 30 segundos. Após, tubos foram transferidos para freezer à -80 °C por 5 minutos e depois para banho seco à 95 °C. Esse processo foi repetido 4 vezes e após os tubos foram centrifugados à 13400 *rpm* por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e congelado à -20 °C.

4.2.15 Detecção de Metabólitos

As amostras de sobrenadante de crescimentos e do conteúdo de pellets foram analisadas com um cromatógrafo de alta performance (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna de ácidos orgânicos HPX-87H (Shimadzu, Kyoto, Japão) e um detector de índice de refração (RI). Foi injetado no equipamento 20 µL de cada amostra diluída 4 vezes e as amostras foram eluídas da coluna aquecida à 60 °C com ácido sulfúrico 5 mM em um fluxo 0,6 mL/minuto. As concentrações de metabólitos dos sobrenadantes de cultivos em biorreatores foram aferidas através de curva de calibração do equipamento a partir de padrão contendo glicose, manose, etanol, glicerol e acetato. A biomassa de fermentações em biorreatores de 1,3 L foi calculada com a fórmula $(0,0002 \text{ mg/L} \times \text{OD}) + 0,0001 \text{ mg/L}$ a partir de OD do meio obtida por espectrofotômetro.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo de *K. lactis* como Plataforma de Conversão de Manose em 2'FL

Para a construção de um sistema de expressão heteróloga eficiente, é necessário conhecer bem a fisiologia do organismo escolhido como plataforma de trabalho e as ferramentas de edição moleculares existentes para o mesmo. O primeiro passo para desenhar o sistema de produção de 2'FL a partir de manose em *K. lactis* foi a busca do metabolismo de manose dessa espécie no banco de dados KEGG (Figura 6) (KEGG, [s.d.]). Tendo essas anotações como base, foi concluído que *K. lactis* possui a via metabólica para conversão de manose em GDP-manose. Entretanto, a levedura precisa de duas reações enzimáticas que permitirá converter GDP-manose em GDP-L-fucose. Além disso, é necessária a adição de uma enzima fucosiltransferase ao organismo para completar a rota de síntese e possibilitar a conversão de manose em 2'-FL (Figura 4).

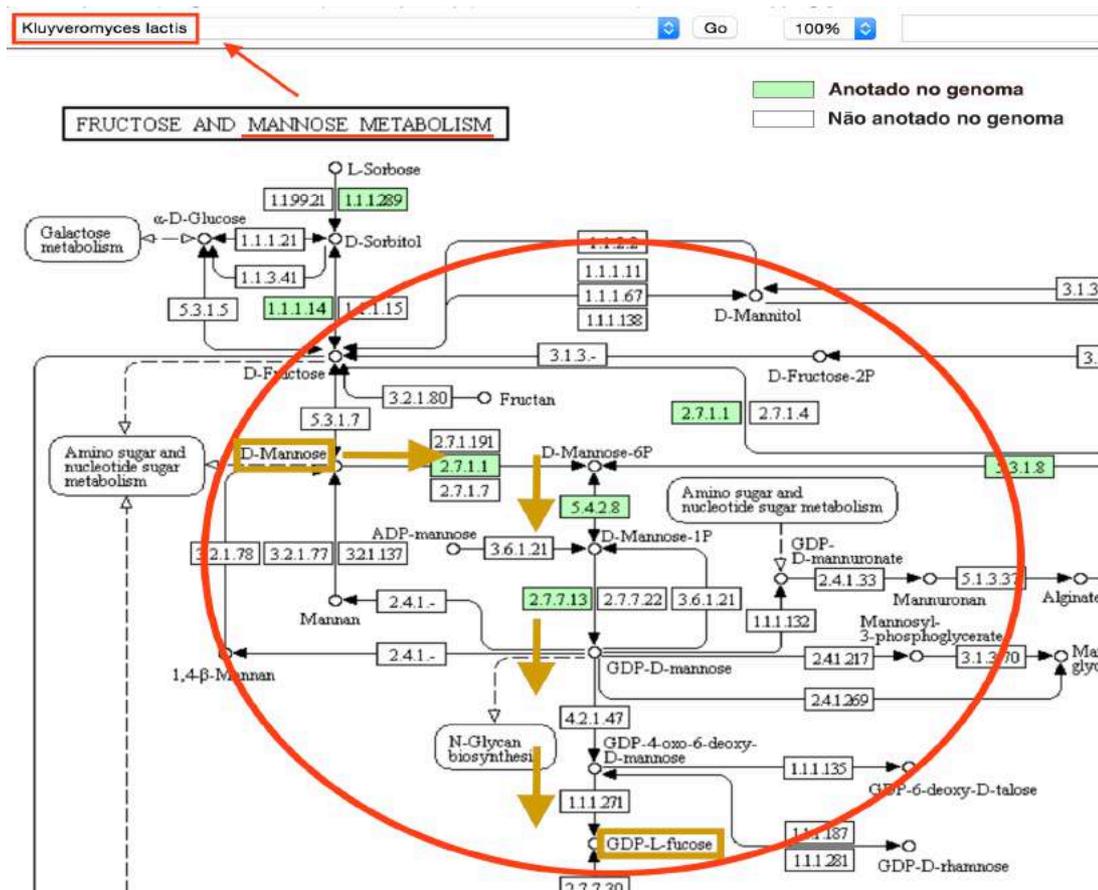


Figura 6 - Metabolismo de manose anotado no genoma de *Kluyveromyces lactis*. Conforme as vias metabólicas descritas no metabolismo de manose de acordo com a plataforma KEGG, o organismo *Kluyveromyces lactis* é capaz de converter Manose em GDP-Manose porém não possui os genes para a síntese de GDP-fucose anotados em seu genoma.

As reações enzimáticas que precisam ser introduzidas ao organismo são obtidas com a inserção de genes responsáveis pela produção das enzimas ausentes. A primeira reação necessária para a conversão de GDP-manose em GDP-L-fucose é uma reação de desidratação catalisada por uma enzima GDP-Manose 4,6-desidratase (GMD). A segunda etapa nesse processo é uma reação de oxirredução por uma enzima GDP-fucose sintase ou GDP-4-ceto-6-deoxi-D-mannose-3,5-epimerase-4-redutase (GMER) (Figura 3). Essas duas enzimas não estão presentes em leveduras, porém fazem parte do metabolismo de *Escherichia coli* visto que GDP-fucose é um componente de parede celular nesse organismo (STEVENSON et al., 1996). Dessa forma, as cepas de *E. coli* construídas para produção de 2'FL produzem as enzimas GMD e GMER a partir da expressão ou superexpressão de seus genes nativos **gmd** e **fcl**. Concomitante, visto a disponibilidade da cepa K12 de *E. coli* em laboratórios e o

emprego dos genes *gmd* e *fcl* nas construções bacterianas prévias, esses genes também foram utilizados nas primeiras construções de *S. cerevisiae* produtoras de 2'FL (LIU et al., 2018; YU et al., 2018). Apenas o último estudo publicado com construção de cepas de leveduras recombinantes para produção de 2'FL explora uma diversidade de GMD e GMER de outros organismos e nesse é observado maior produção de 2'FL em *Saccharomyces* utilizando os genes *gmd* e *fcl* de *E. coli* (HOLLANDS et al., 2019).

O último gene necessário para ser introduzido ao vetor deve expressar uma fucosiltransferase. A variante dessa enzima predominante nos organismos construídos para produção de 2'FL é a FUCT2 de *Helicobacter pylori* (Tabela 1). Apesar disso, foi observado maior produção de 2'FL na mesma cepa de *E. coli* utilizando a enzima fucosiltransferase **WcfB** de *Bacteroides fragillis* quando comparada a FUCT2 de *H. pylori* (CHIN et al., 2017). Até o início deste estudo presente, só haviam sido publicados estudos de produção de 2'FL em leveduras expressando o gene para FUCT2. Entretanto, essa enzima possui baixa solubilidade intracelular e, dessa forma, o gene para *WcfB* foi escolhido para expressão em *K. lactis*. Esse gene, em conjunto ao *gmd* e o *fcl*, compõe uma via sintética a ser inserida nesse organismo (Figura 7).

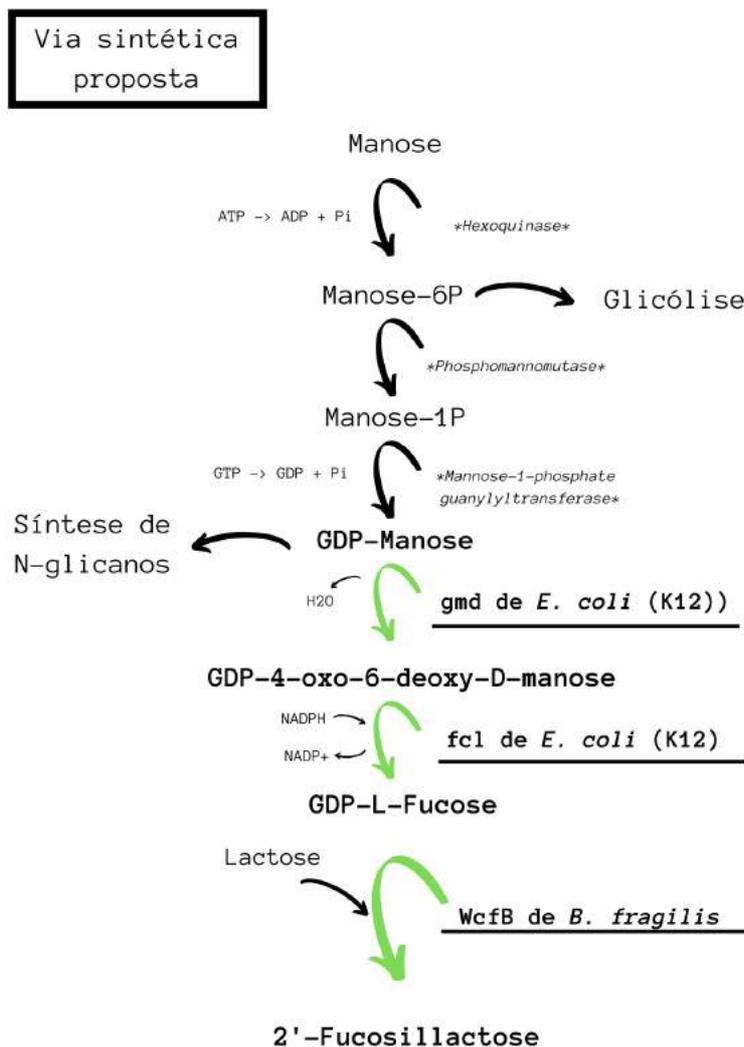


Figura 7 - Via sintética sugerida para produção de 2'FL em *Kluyveromyces lactis*. Genes propostos para inserção em *K. lactis* estão sublinhados e são responsáveis pela via sintética representada em verde.

5.2 Crescimentos de Leveduras em Microplaca

O primeiro passo no estabelecimento do processo proposto neste estudo foi determinar a velocidade de crescimento de *K. lactis* cepa GG799 em meio mínimo contendo HSA em microplaca durante 72 h. Dessa forma, foi possível verificar o comportamento da espécie na fonte de carbono proposta para o trabalho. Além disso, foi determinado também o perfil de crescimento de mais duas espécies de leveduras amplamente utilizadas como plataforma de

expressão heteróloga – *Saccharomyces cerevisiae* cepa JP1 e *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) cepa GS115 – . Foi possível então fazer uma avaliação comparativa do desempenho de crescimento da espécie escolhida com as demais espécies (Figura 8).

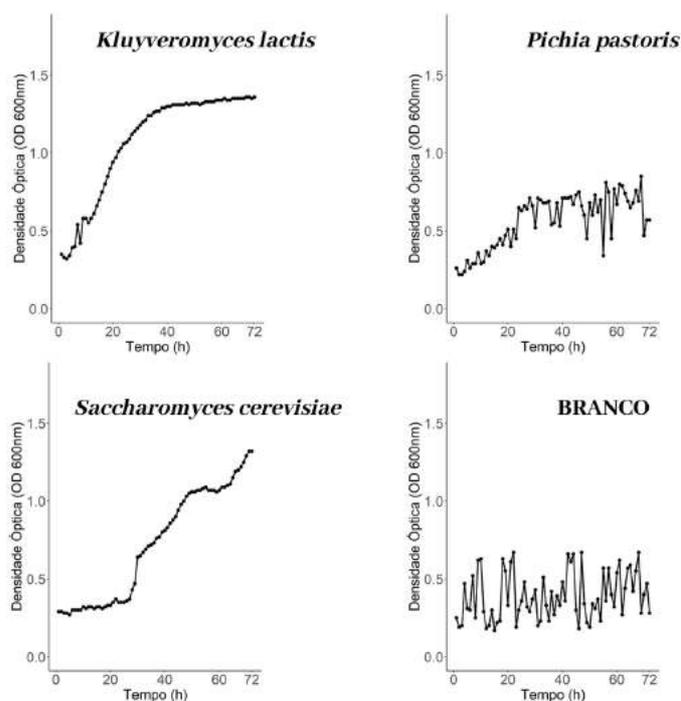


Figura 8 – Perfil de crescimento de diferentes leveduras em microplaca, utilizando HSA como substrato durante 72 h. Pontos representam média de valores da triplicata biológica.

Apesar da cepa GS115 de *Pichia pastoris* crescer no HSA, não foi possível aferir taxa exponencial do seu crescimento. Além disso, o crescimento dessa espécie também foi inferior ao de *S. cerevisiae* e de *K. lactis*. A taxa exponencial de crescimento em *S. cerevisiae* só começa após 30 horas de cultivo, o que indica uma grande fase lag de crescimento dessa espécie no HSA. Ademais, a taxa de crescimento específica de *S. cerevisiae* em HSA foi inferior à de *K. lactis* (Tabela 6)

Tabela 6 - Velocidades específicas de crescimento aferidas neste estudo.

Organismo	Meio de Cultivo	Velocidade de Crescimento (μ máximo)	Método
<i>S. cerevisiae</i>	MMD	0,0854	Microplaca
<i>S. cerevisiae</i>	MMM	0,1157	Microplaca
<i>S. cerevisiae</i>	MMA	0,0268	Microplaca
<i>K. lactis</i>	MMD	0,0543	Microplaca
<i>K. lactis</i>	MMM	0,0497	Microplaca
<i>K. lactis</i>	MMA	0,0458	Microplaca
<i>K. lactis</i>	YPD	0,2945	Frasco de 1 L
<i>K. lactis</i>	YPM	0,3318	Frasco de 1 L
<i>K. lactis</i>	UAB Glicose	0,348	Frasco de 1 L
<i>K. lactis</i>	UAB Manose	0,324	Frasco de 1 L
<i>K. lactis</i>	UAB Açai	0,326	Frasco de 1 L
<i>K. lactis</i>	UAB Glicose	0,1143	Biorreator de 1,3 L
<i>K. lactis</i>	UAB Manose	0,0886	Biorreator de 1,3 L
<i>K. lactis</i>	UAB Açai	0,1749	Biorreator de 1,3 L

*MMD = Meio mínimo com dextrose; MMM = Meio mínimo com manose; MMA = Meio mínimo com HSA; YPD = Meio YP com dextrose; YPM = Meio YP com manose.

5.3 Cultivos de *K. lactis* em Frasco

Uma vez confirmada maior velocidade de crescimento de *K. lactis* no HSA, os demais crescimentos foram conduzidos somente com essa espécie. A investigação do crescimento em escala de frasco (25-100 mL) permite melhores condições de crescimento, como a aeração, quando comparado ao crescimento em microplaca, especialmente para uma levedura com fisiologia eficientemente direcionada ao metabolismo aeróbio como *K. lactis*. Assim, foi conduzida uma curva de crescimento de 24 h em frascos haletados contendo meio de sais UAB e quantia de HSA equivalente à 40 g/L de manose (Figura 9). A escolha do meio UAB para esse experimento é decorrente da maior presença de sais e cofatores em sua formulação, o que pode favorecer o crescimento em maior escala.

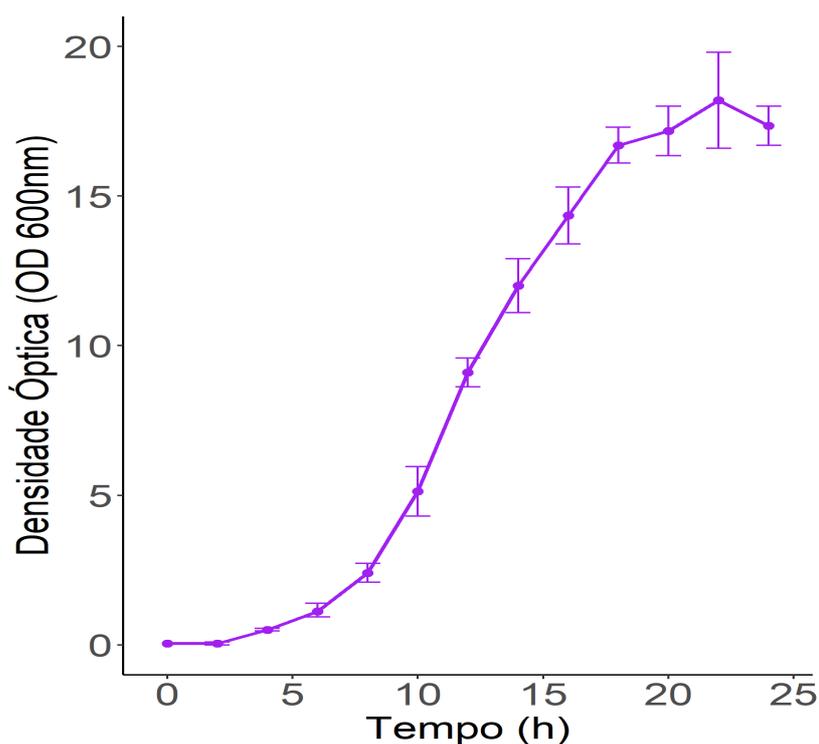


Figura 9 - Curva de crescimento de *Kluyveromyces lactis* em meio UAB utilizando HSA como substrato. Pontos representam média de valores da triplicata biológica.

O crescimento nesse meio demora 8 horas para atingir fase exponencial e chega na fase estacionária após 18 horas. Visto que o açúcar presente em maior quantidade no hidrolisado é a manose e que seu uso como fonte de crescimento microbiano não é bem descrito na literatura, sua utilização como fonte energética

foi averiguada de forma comparativa a glicose. Foram conduzidas curvas de crescimento de 24 h em YP e em UAB contendo somente manose como açúcar presente assim como em YP e em UAB contendo somente glicose (Figura 10).

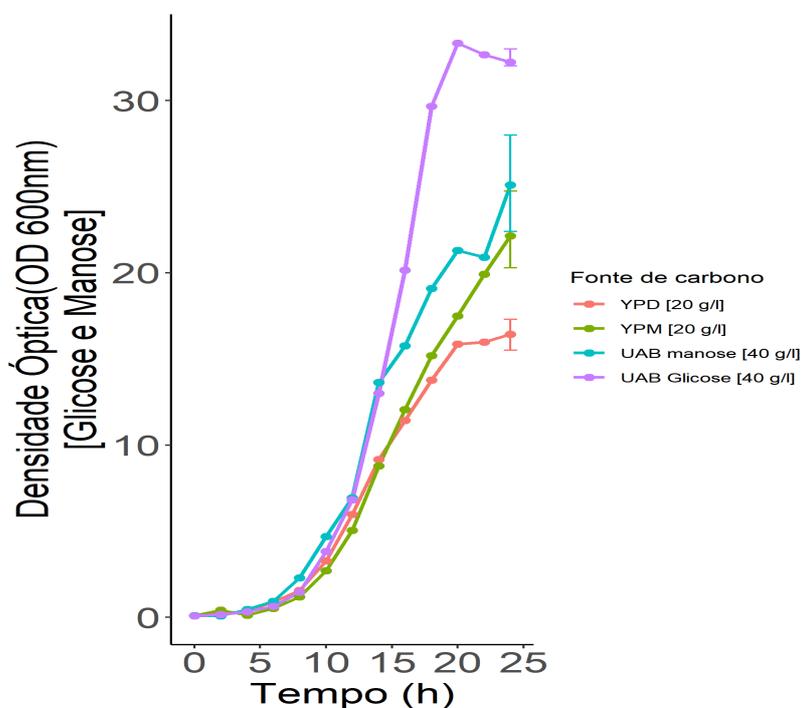


Figura 10 - Curvas de crescimento em frasco de *Kluyveromyces lactis* em meios contendo glicose e manose. Pontos representam média de triplicata biológica.

As curvas em meio rico (YP) não apresentaram padrão exponencial de crescimento diferente, porém o crescimento em glicose apresenta perfil de fase estacionária mais rápido, perto de 20h. Quando comparado os crescimentos em meio sintético (UAB), a densidade celular final obtida em glicose é maior que em manose porém alcança o estado estacionário mais rápido, perto de 20h, enquanto em manose não há como confirmar estado estacionário antes de 24h. Entretanto, para afirmar se os crescimentos diferem ou não entre si, foi aferida a taxa de crescimento específica da fase exponencial de crescimento nas três diferentes fontes de carbono (Tabela 6). Como pode ser observado, não houve grande discrepância na taxa de crescimento específica em glicose (0,348) quando comparada as demais. Também, a taxa específica de crescimento em HSA (0,326) foi praticamente equivalente com a taxa específica de crescimento em manose (0,324).

5.4 Cultivos de *K. lactis* em Biorreator de 1,3 L

Visto as velocidades de crescimento similares, aferidas nos crescimentos em frasco, o próximo passo foi tentar estabelecer o crescimento de *K. lactis* nos meios UAB Glicose, UAB Manose e UAB Açai em fermentador de 1,3 L. O crescimento com controle de pH e aeração, nos permite melhor entendimento do metabolismo respiratório quando verificado a distribuição de co-produtos resultantes do crescimento celular. Dessa forma, células da cepa GG799 de *K. lactis* em fase exponencial de crescimento foram introduzidas em biorreator de 1,3 L contendo 500 mL de meio. Após aproximadamente 40 horas de crescimento, foi possível traçar perfis fermentativos preliminares para os diferentes meios (Figura 11).

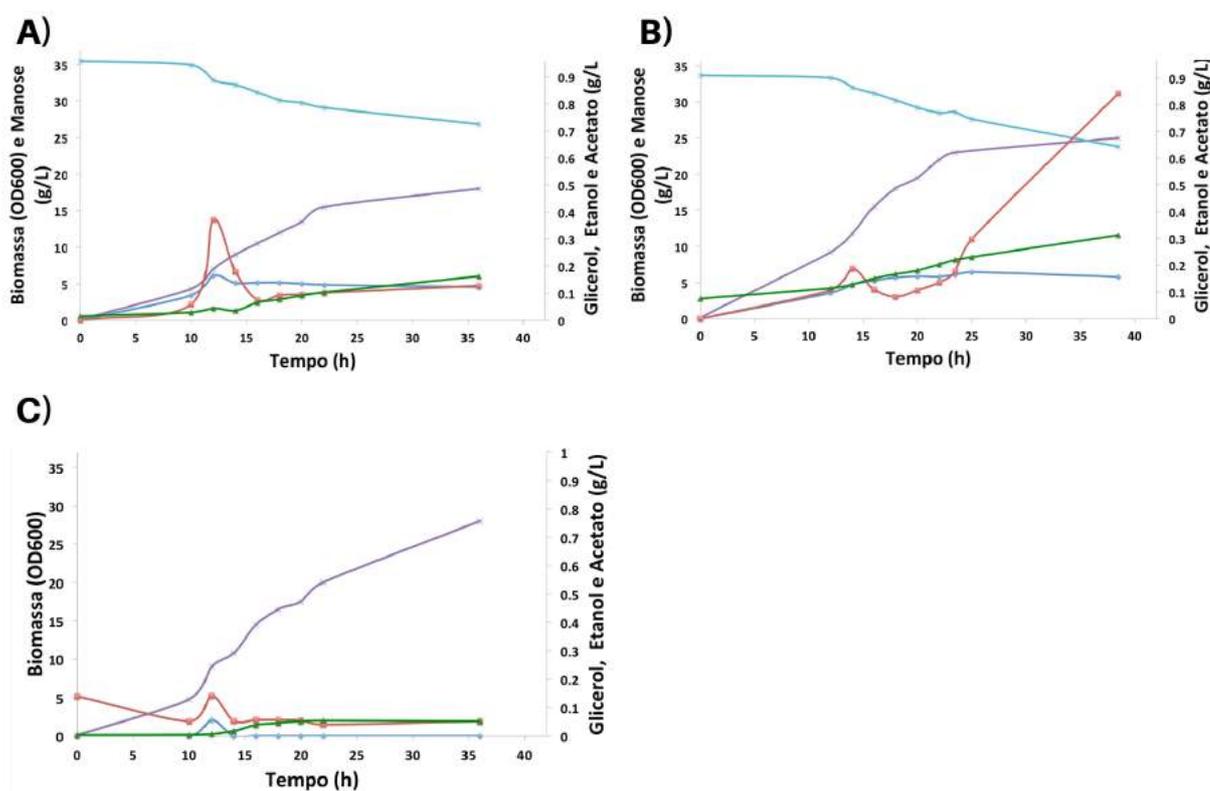


Figura 11 – Gráfico mostrando perfil de co-produtos detectados durante crescimento em biorreator de 1,3L em A) 500 mL de UAB Manose, B) 500 mL de UAB Açai e C) 500 mL de UAB Glicose. A cor **roxa** representa a biomassa formada, a cor **azul clara** representa a concentração de manose,

a cor **azul escura** representa a concentração de glicerol, a cor **vermelha** representa a concentração de etanol e a cor **verde** representa a concentração de acetato.

O crescimento preliminar em biorreator apontou velocidades de crescimento menores do que as aferidas em frasco (Tabela 6). Foi possível detectar por HPLC (4.2.15) todos os metabólitos investigados em padrão, com exceção da glicose consumida em UAB Glicose, o que impossibilitou uma comparação preliminar entre rendimentos e produtividades. Foi observado durante o crescimento em manose, menor formação de biomassa e maior acúmulo de etanol, acetato e glicerol, quando comparado ao crescimento em glicose. Além disso, todos os crescimentos mostraram produção de etanol após aproximadamente 10 horas de cultivo e tanto em glicose como em manose, o etanol é consumido após sua produção. Em contrapartida, o crescimento em HSA gerou maior concentração final de etanol (Tabela 7) sem apresentar perfil de consumo de etanol. Também, o crescimento em HSA resultou na formação de biomassa similar ao crescimento em glicose, porém também ocasionou no acúmulo de acetato e glicerol assim como o crescimento em manose (Tabela 7). Ademais, o crescimento em manose e HSA aparentam estacionar após 20 horas de crescimento enquanto o crescimento em glicose não.

Tabela 7 - Concentrações finais de metabólitos presentes em crescimentos em biorreator de 1,3 L.

Metabólito	Manose	HSA	Glicose
Etanol	0,128 g/L	0,911 g/L	0,0538 g/L
Acetato	0,1625 g/L	0,3411 g/L	0,0514 g/L
Glicerol	0,123 g/L	0,147 g/L	0 g/L
Biomassa	3,7 g/L	5,3 g/L	5,7 g/L

5.5 Construção do Sistema de Expressão de Genes da Via Sintética para Produção de 2'FL

É possível expressar genes heterólogos em *K. lactis* de duas maneiras: Com a introdução de plasmídeos epissomais ou com a integração direcionada por homologia ao seu genoma (SPOHNER et al., 2016). Os plasmídeos epissomais são vetores autoreplicativos que permitem a expressão de maior número de cópias dos genes introduzidos. Entretanto, tal expressão é dependente da marca de seleção visto que cópias do plasmídeo são perdidas na ausência da mesma. Dentre esses, o vetor disponível mais utilizado em *K. lactis* é o plasmídeo de 2 μ m pKD1 isolado da variante *drosophilarum* da espécie (CHEN, 2018; SPOHNER et al., 2016). Esse vetor apresenta pouca estabilidade quando comparado aos de 2 μ m de *S. cerevisiae* e também quando comparado a um vetor de integração como evidenciado na produção de lisozima em *K. lactis* (IWATA et al., 2004). Dessa forma, a estratégia preferível para expressão gênica estável é a utilização de um vetor direcionado para integração ao genoma. O vetor integrativo mais utilizado nessa espécie é o pKLAC2 disponibilizado por kit comercial da NEB (NEB, [s.d.]), contendo o promotor do gene LAC4 mutado que possibilita a replicação e clonagem em células bacterianas (COLUSSI; TARON, 2005).

Após a escolha do vetor, os genes escolhidos devem ser inseridos em cassetes de expressão, compostos por uma unidade promotora e uma unidade terminadora. No caso dos genes *gmd* e *fcl* de *E. coli*, os cassetes foram montados com promotores de leveduras fortes e constitutivos de forma que durante todo o crescimento microbiano ocorra a produção de GDP-L-fucose. Para o gene *WcfB* de *B. fragilis*, o cassete de expressão foi montado com o promotor de *K. lactis* pLAC4 que é fortemente induzido na presença de lactose. Logo, quando a lactose for introduzida ao sistema ela irá acarretar forte expressão da fucosiltransferase e, conseqüentemente, a união da lactose à GDP-L-fucose para produção de 2'FL. O sistema foi desenhado para integração no genoma de *K. lactis* cepa GG799 utilizando o plasmídeo pKLAC2 como base, onde devem ser inseridos os cassetes de expressão de *gmd* e *fcl*. Ao final, a fucosiltransferase *WcfB* é inserida no sítio de múltipla clonagem sob ação do promotor LAC4 para construção do plasmídeo p2WF (Figura 12).

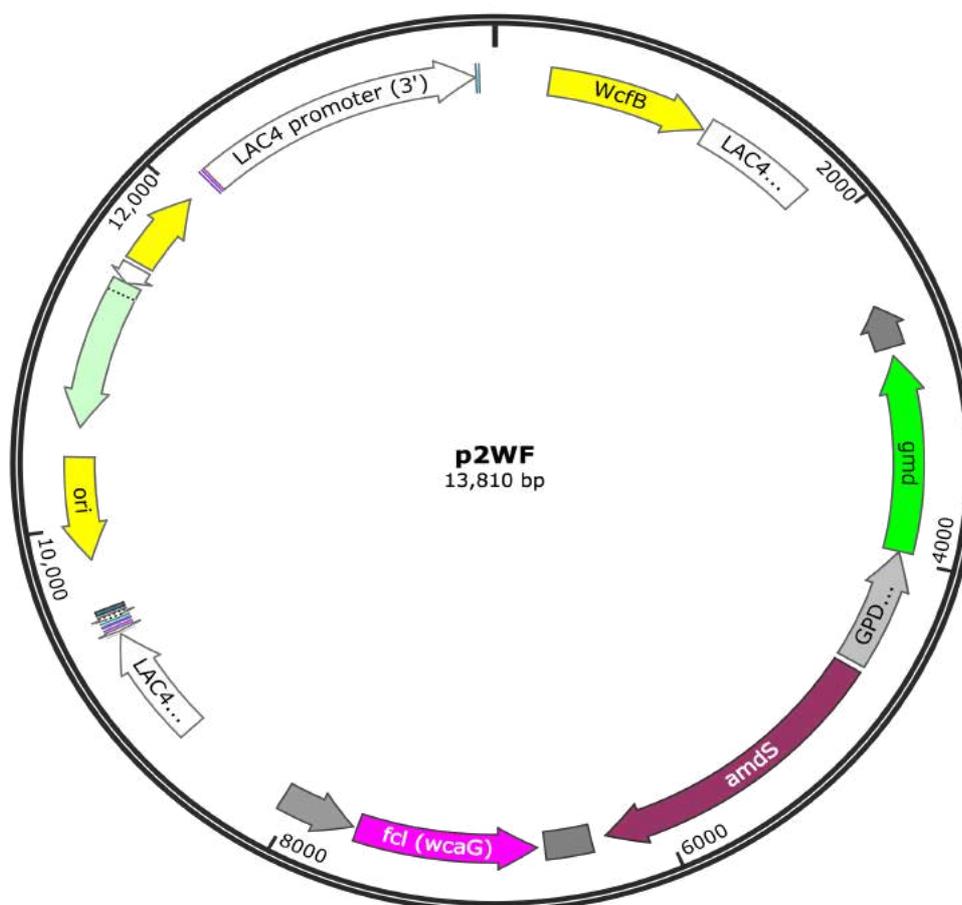


Figura 12 - Mapa Físico do plasmídeo p2WF.

Dessa forma, o plasmídeo p2WF possui sítios 5' e 3' para integração direcionada no promotor LAC4 no cromossomo B de *K. lactis*. Esse plasmídeo também possui sítio para replicação em células bacterianas, marca de resistência à ampicilina para bactérias e marca de seleção dominante *amdS*, o gene da acetamidase *Aspergillus nidulans*, regulado pelo promotor ADH1 de *S. cerevisiae* que permite a seleção em meio com acetamida como única fonte de nitrogênio (COLUSSI; TARON, 2005). Tal marca de seleção permite a construção de uma cepa final sem resistência a antibióticos, além de permitir a visualização de clones com mais cópias integradas a partir do tamanho das colônias (READ et al., 2007).

5.5.1 Construção dos Cassetes de Expressão dos Genes *gmd* e *fcl*

O primeiro passo para criação dos cassetes dos genes *gmd* e *fcl* foi a obtenção desses genes de interesse. Os genes *gmd* e *fcl* mais utilizados na literatura são provenientes de *Escherichia coli*, cepa K12 e resultados significativos são obtidos em leveduras com a inserção desses genes (1.5). Os oligonucleotídeos iniciadores *fcl* F, *fcl* R, *gmd* F e *gmd* R (Tabela 4) foram então desenhados para amplificação dos genes a partir do genoma da cepa K12 de *E. coli*, adicionando sítios para enzimas de restrição em suas pontas. Os genes *gmd* e *fcl* foram então amplificados a partir de PCR de colônia (4.2.3.1) nos tamanhos aproximados de 1130 e 970 pares de base, em acordo com as anotações do genoma da cepa (Figura 13).

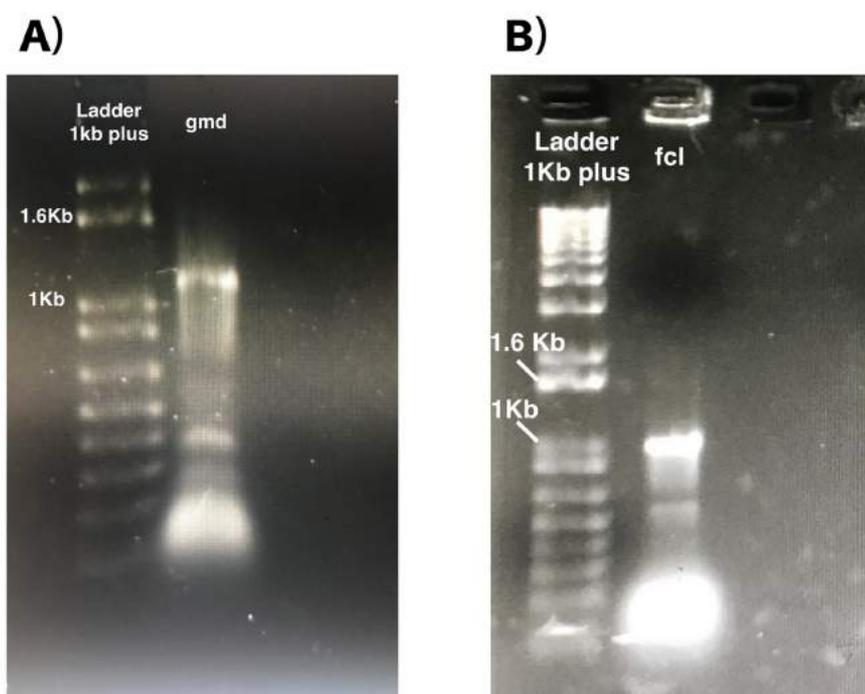


Figura 13 – Produtos de PCR de colônias da cepa K12 de *E. coli*. Visualização da corrida de eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando marcador molecular "1Kb plus" (Invitrogen™) e em A) produto da reação de PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *gmd* F e *gmd* R e em B) produto da reação de PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *fcl* F e *fcl* R.

Após amplificados, os genes foram inseridos no vetor pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 14). O pGEM®-T Easy é um vetor linearizado com a presença de uma base nitrogenada timina em extremidades adesivas e isso permite a ligação do vetor à materiais genéticos amplificados por PCR onde há uma

adenina adicional ao fim da sequência, o que ocorre por erro da taq polimerase. A inserção do material genético ao vetor pode ser verificada pela interrupção do operon lac no plasmídeo em um sistema de seleção branco-azul com a adição de Xgal e IPTG ao meio.

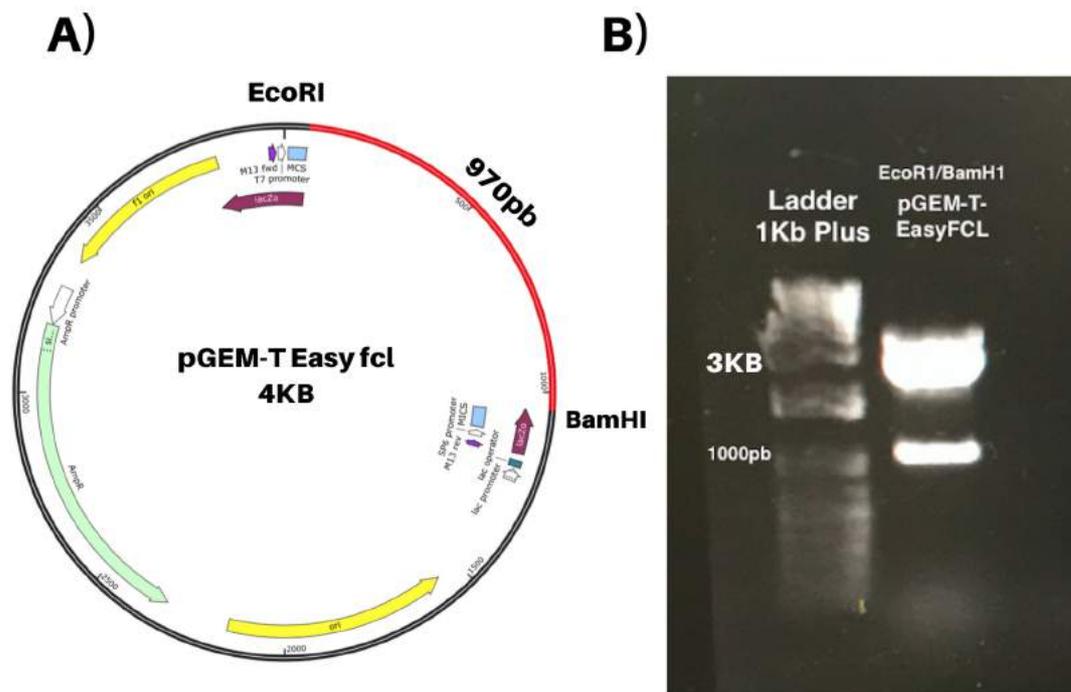


Figura 14 – Restrição do plasmídeo pGEM-F com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI. A) Mapa físico do plasmídeo pGEM-F mostrando sítios de restrição para EcoRI e BamHI. B) Visualização da corrida de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando marcado "1Kb plus" (Invitrogen™) e produto de restrição do plasmídeo pGEM-F com EcoRI e BamHI.

Para a construção do cassete de expressão de *gmd*, o plasmídeo p424 GPD (ATCC) foi escolhido como base. Dentro desse plasmídeo há uma região de múltipla clonagem flanqueada por uma região promotora GPD – promotor constitutivo forte da via glicolítica de *S. cerevisiae* – e um terminador CYC. Esse plasmídeo também possui sítio de replicação em bactérias e marca de resistência a antibiótico, o que possibilita a clonagem do cassete construído dentro de células bacterianas. Para inserção do gene dentro da região de múltipla clonagem, o gene *gmd* foi retirado do pGEM com as enzimas *Sma*I e *Spe*I e recuperado após separação por eletroforese. O vetor p424 GPD foi digerido com as mesmas enzimas e ligado ao gene purificado para montar o cassete de expressão dentro do plasmídeo. O cassete de tamanho aproximado de 2150 pares de base foi

então amplificado por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores Casg F e Casg R, desenhados para adição de sítios de restrição (Tabela 4).

A construção do cassete de expressão de fcl seguiu o mesmo fluxo da construção anterior, porém utilizando o plasmídeo p424 TEF (ATCC) como base. Esse plasmídeo possui uma região de múltipla clonagem flanqueada por uma região promotora TEF – outro promotor constitutivo forte de fator de alongamento da tradução em *S. cerevisiae* – e um terminador CYC. Para essa construção, o gene e o plasmídeo foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI. O cassete de tamanho aproximado de 1760 pares de base montado dentro do plasmídeo foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Casf F e Casf R, desenhados também para adição de sítios de restrição (Figura 15).

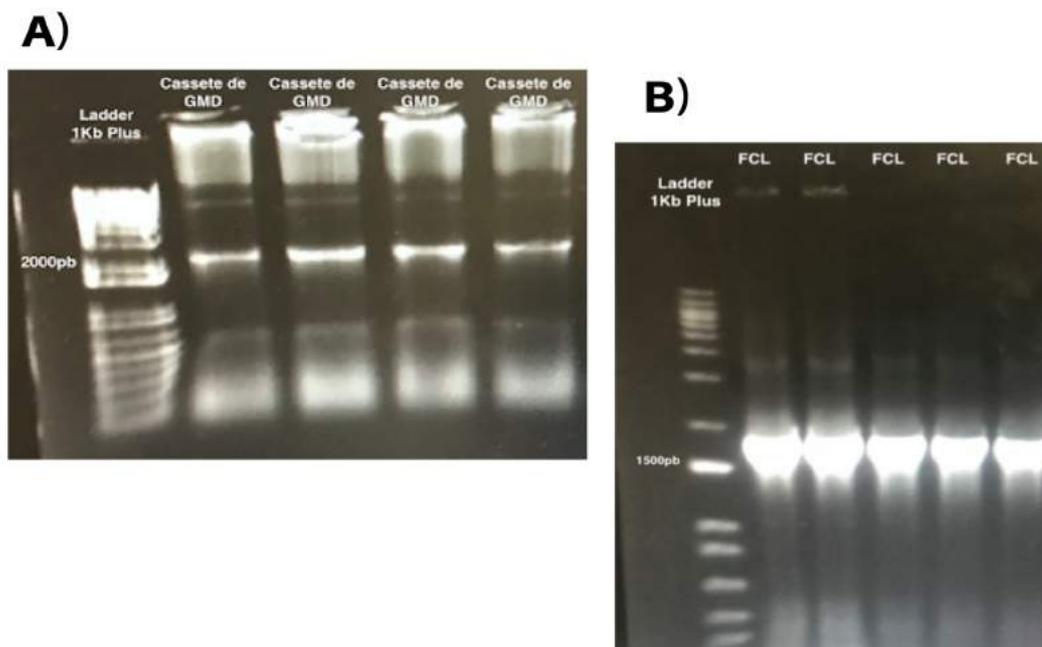


Figura 15 – Produtos de PCR contendo cassetes de expressão montados. Visualização da corrida de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando marcador molecular "Ladder 1Kb plus" (Invitrogen™) e em A) produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Casg F e Casg R e o plasmídeo p424GPD-G como molde, e em B) Produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Casf F e Casf R e o plasmídeo p424TEF-F como molde.

5.5.2 Construção de Plasmídeo Contendo os Genes *gmd* e *fcl*

Uma vez que é possível sintetizar GDP-fucose com a expressão dos genes *gmd* e *fcl*, os dois cassetes montados neste estudo devem ser inseridos no genoma de *K. lactis* para construir de uma cepa recombinante produtora de GDP-fucose. Assim, para serem introduzidos no genoma da cepa GG799 de *K. lactis*, os cassetes foram introduzidos no vetor integrativo pKLAC2. Esse vetor possui extremidades 5' e 3' do promotor LAC4 e quando linearizado permite a integração do conteúdo entre essas duas regiões dentro da região análoga genoma (Figura 16).

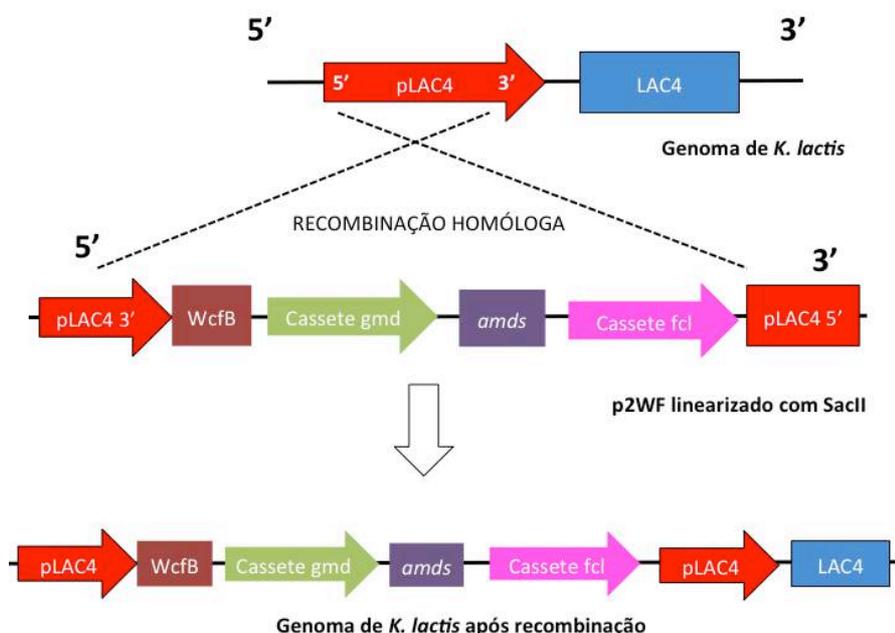


Figura 16 - Estratégia de recombinação do plasmídeo p2WF linearizado com o promotor do gene LAC4 no cromossomo B de *K. lactis*, para inserção de genes da via sintética de produção de 2'FL.

Os cassetes de *gmd* e *fcl* amplificados por PCR foram introduzidos no vetor pGEM®-T Easy assim como seus respectivos genes. Após a introdução nesse vetor, o cassete de *gmd* foi removido com a enzima de restrição BglII e purificado após separação por eletroforese (Figura 17). Da mesma forma, o plasmídeo pKLAC2 foi linearizado com essa enzima e ligado ao cassete resultando na construção do plasmídeo pKLACG (Figura 18). Utilizando o mesmo procedimento, o cassete de *fcl* foi retirado do vetor pGEM®-T Easy com a enzima de restrição

Bsu36I e separado por eletroforese (Figura 17). O plasmídeo pKLACG foi então linearizado utilizando a mesma enzima e ligado ao cassete de fcl resultando na construção do plasmídeo pFUC com as construções necessárias para síntese de GDP-fucose (Figura 18).

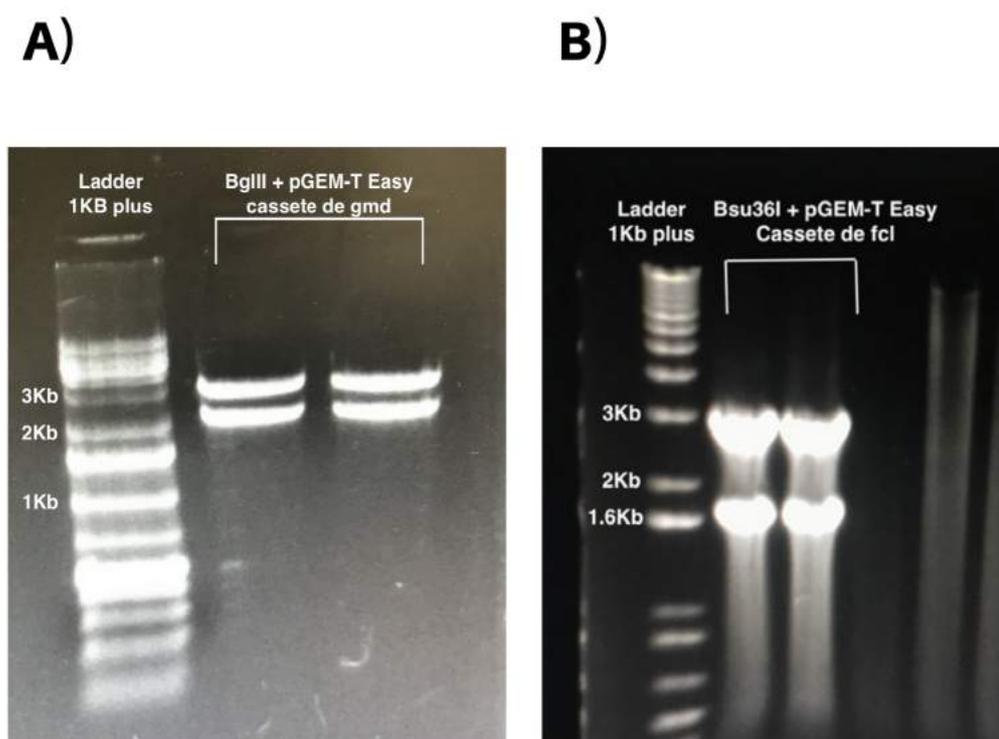


Figura 17 – Produtos de restrição enzimática dos plasmídeos pGEM-CG e pGEM-CF. Visualização das corridas de eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando marcador molecular "Ladder 1Kb plus" (Invitrogen™) e em A) produto de restrição do plasmídeo pGEMCG por BglIII e em B) produto de restrição do plasmídeo pGEM-CF por Bsu36I.

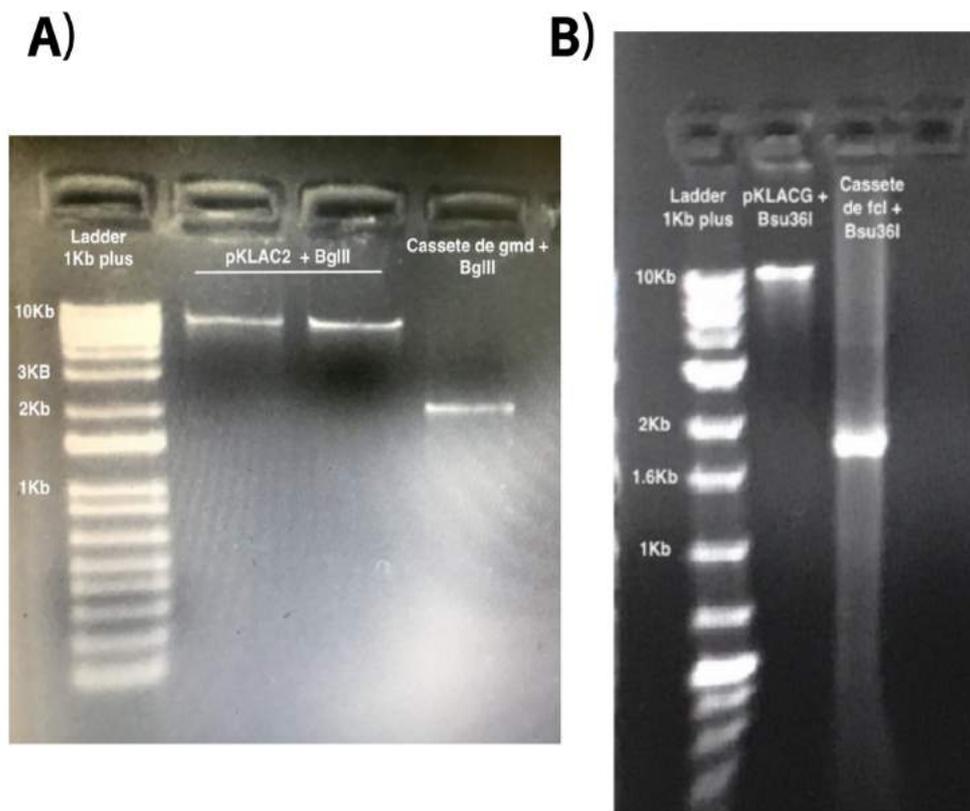


Figura 18 – Produtos de restrição enzimática utilizados na construção dos plasmídeos pKLACG e pFUC. Visualização das corridas de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo marcador "1Kb plus" (Invitrogen™) e em A) produtos da restrição de pKLAC2 e do cassete de gmd por BgIII, utilizados para construção do plasmídeo pKLACG, e em B) produtos da restrição de pKLACG e do cassete de fcl por Bsu36I, utilizados na construção do vetor pFUC.

5.5.3 Clonagem do Gene WcfB

Possuindo a construção necessária para a produção de GDP-fucose, o próximo passo necessário para síntese de 2'FL é a introdução de um gene que expresse uma fucosiltransferase. A fucosiltransferase escolhida neste estudo foi a WcfB de *Bacteroides fragilis* e seu gene foi sintetizado com a sequência otimizada para expressão em *K. lactis*. O gene WcfB utilizado possui 873 pares de base e foi adquirido dentro do vetor pBSK com origem de replicação bacteriana e marca de resistência a antibiótico possibilitando a clonagem e seleção em bactérias. Além disso o gene inserido neste vetor foi flanqueado por sítios de restrição para as enzimas Stul e NdeI (Figura 19).

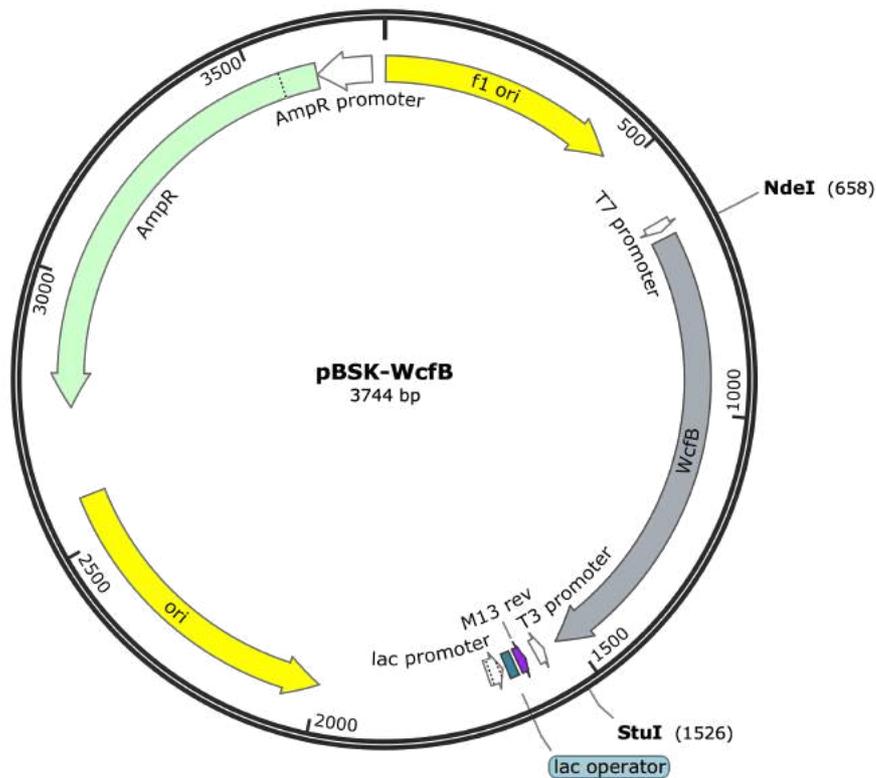


Figura 19 – Mapa físico do plasmídeo pBSK-WcfB, contendo o gene sintético WcfB otimizado para expressão em *Kluyveromyces lactis*. Em evidência, sítios de restrição em suas extremidades 5'e 3' para as enzimas NdeI e StuI.

Assim, o gene WcfB foi retirado do vetor pBSK com as enzimas de restrição mencionadas e foi separado e recuperado por eletroforese (Figura 20). O plasmídeo pFUC foi tratado com as mesmas enzimas para ser ligado ao gene, porém inicialmente as ligações não foram bem-sucedidas. Assim, o protocolo de ligação (4.2.8) foi alterado para utilização de 40 ng de vetor para que fosse possível a inserção do gene ao pFUC resultando no plasmídeo p2WF e assim finalizando a construção proposta (Figura 12).

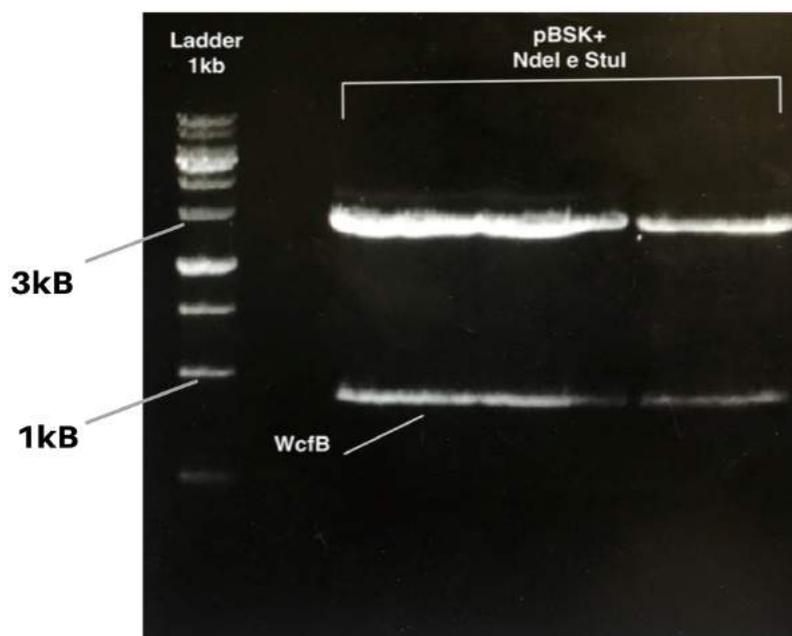


Figura 20 – Produto de restrição do plasmídeo pBSK contendo gene sintético WcfB com as enzimas NdeI e StuI. Visualização da corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, contendo marcador molecular "Ladder 1Kb" (KASVI).

5.5.4 Análises do Plasmídeo p2WF por Restrição Enzimática

Durante as etapas anteriores, alguns processos foram atrasados por contaminação cruzada de pGEM após recuperação a partir de gel de agarose. Tal contaminação gerava clones falso positivos com pGEM®-T Easy e em alguns casos com pGEM®-T Easy e inserto religado. O último pode resultar em falsos positivos em uma PCR e para confirmar que o plasmídeo construído era correspondente ao esperado pelo mapa físico (Figura 12), foi feita uma análise com enzimas de restrição para confirmar se os padrões de corte esperados eram reproduzidos.

Primeiro, o plasmídeo foi tratado com as enzimas BglII e Bsu36I usadas anteriormente para introdução dos cassetes de expressão ao plasmídeo. Dessa forma, é possível visualizar se os cassetes estão presentes após separação em gel de agarose. Em seguida, o plasmídeo foi tratado com as enzimas StuI e NdeI para visualizar se é possível excisar o gene do plasmídeo. Após a corrida de eletroforese em gel de agarose, foi possível verificar a presença dos cassetes e

do gene inseridos após excisão e uma banda correspondente ao tamanho do plasmídeo sem o cassete ou o gene (Figura 21).

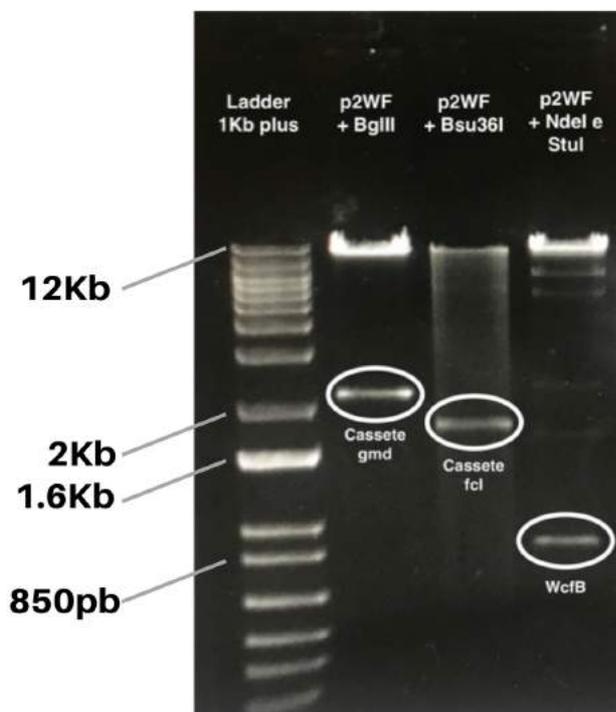


Figura 21 – Produtos de restrição enzimática do plasmídeo p2WF com enzimas de restrição utilizadas na construção desse plasmídeo. Visualização da corrida de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo marcador molecular "1Kb plus" (Invitrogen™).

Também, para confirmar se o plasmídeo obtido corresponde à estrutura correta da sequência comercial, outras análises por restrição foram feitas. As enzimas de restrição BspHI, EcoRI, BamHI e XhoI foram utilizadas nesta etapa. O corte por BspHI permite a retirada da marca de seleção de ampicilina do plasmídeo liberando uma região em torno de 1000 pares de base. As demais enzimas possuem sítios de restrição que permitem visualizar se os genes foram inseridos na região esperada. Os cortes realizados mostram o padrão previsto pelo programa SnapGene, com exceção da enzima XhoI (Figura 22).

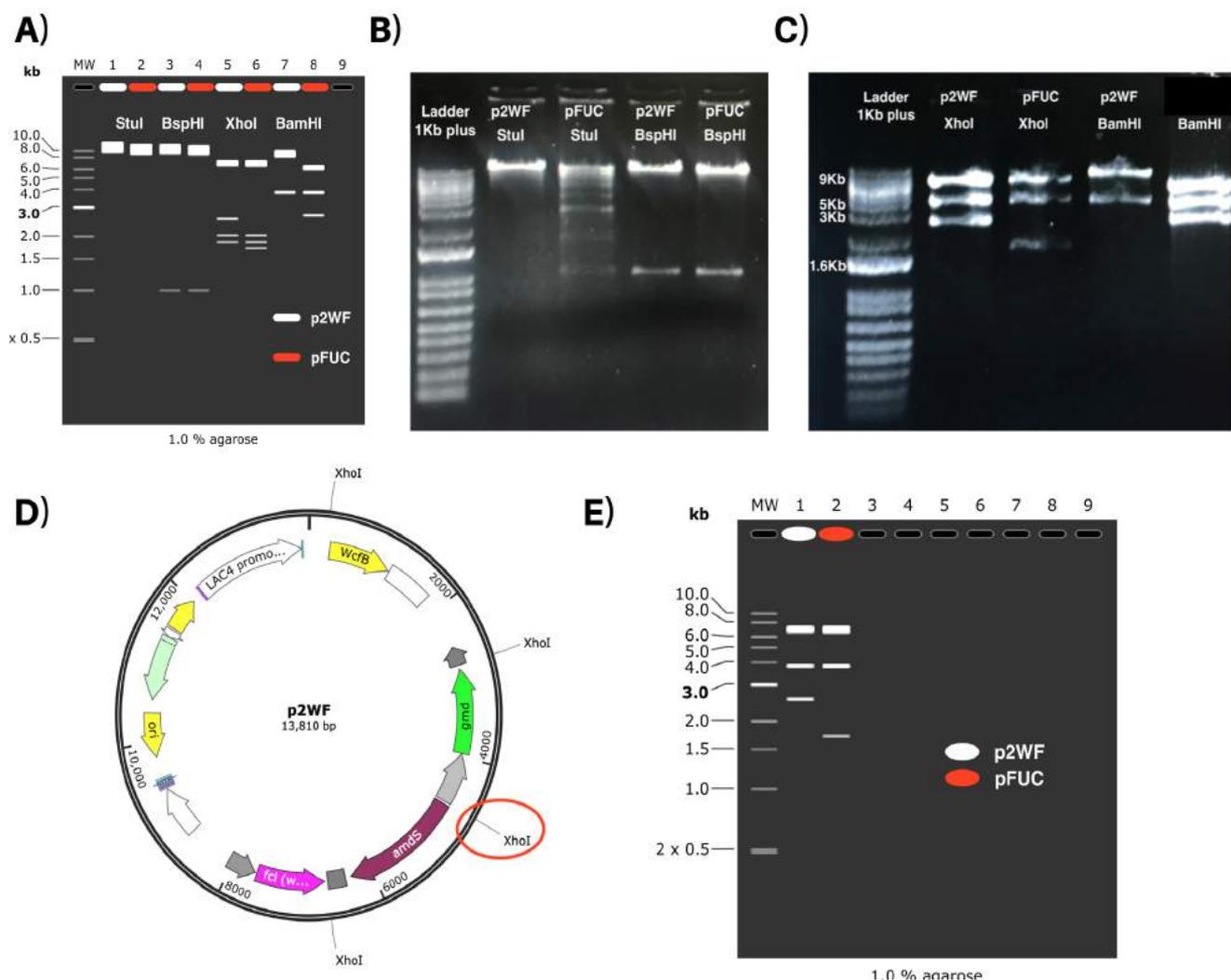


Figura 22 – Produtos de restrição enzimática dos plasmídeos pFUC e p2WF. A) Simulação *in silico* da corrida de eletroforese a partir do software SnapGene, mostrando fragmentos preditos para restrição dos plasmídeos pFUC e p2WF por Stul, BspHI, XhoI e BamHI. Visualização das corridas de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo marcador "Ladder 1Kb plus" (Invitrogen™) mostrando em B) produtos de restrição enzimática do plasmídeo pFUC e p2WF por Stul e BspHI e em C) produtos de restrição enzimática do plasmídeo pFUC e p2WF por XhoI e BamHI. D) Mapa físico do plasmídeo p2WF com possível sítio de restrição para XhoI mutado em evidência. E) Simulação de corrida de eletroforese *in silico* dos plasmídeos p2WF e pFUC sem sítio de restrição para XhoI evidenciado, utilizando o software SnapGene.

O padrão de corte observado pela enzima XhoI possui um fragmento a menos do que o esperado e um fragmento num tamanho não predito. Esse fragmento no tamanho destoante possui o tamanho de dois fragmentos combinados, indicando que o corte no início da região promotora GPD predito pela sequência não está ocorrendo. Para verificar se esse padrão de corte observado ocorria somente nesse plasmídeo construído, foi simulado o perfil de restrição dos plasmídeos p2WF e pFUC com a perda do sítio de restrição

estipulada (Figura 22). O padrão de corte predito se assemelha aos resultados obtidos com a restrição dos plasmídeos e posteriormente foi verificado que a sequência do promotor GPD obtida para construção do cassete também não possui o sítio para o corte por XhoI.

5.6 Construção da Cepa K2W de *Kluyveromyces lactis*

Os plasmídeos montados neste estudo (Tabela 3) para serem integrados no genoma de *K. lactis* necessitam ser linearizados pela enzima SacII que corta o plasmídeo nas extremidades das regiões 5' e 3' do promotor e elimina a região de clonagem e seleção bacteriana. Tal fato não foi levado em consideração quando desenhada a estratégia de amplificação do gene *gmd* a partir do genoma de *E. coli* (4.2.4) e conseqüentemente os plasmídeos montados pFUC e p2WF possuem um sítio de SacII adicional presente na sequência do *gmd* (Figura 23).

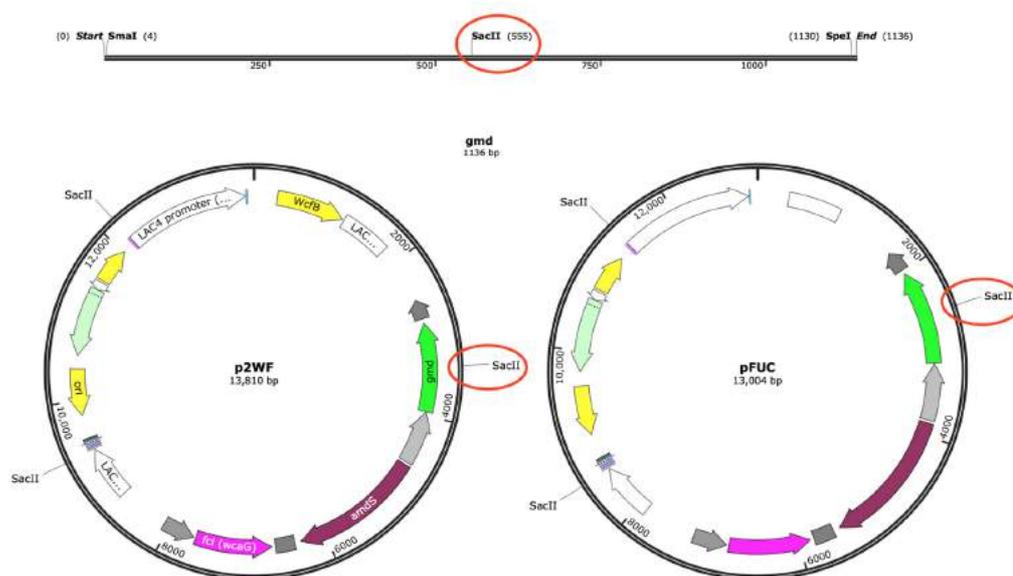


Figura 23 – Mapa físico da sequência do gene *gmd* e dos plasmídeos pFUC e p2WF mostrando sítio de restrição para a enzima SacII presente no gene *gmd*, circulado em vermelho.

Como uma alternativa para integração, durante o protocolo de transformação de levedura (4.2.12), o material genético utilizado para transformar as células foi o plasmídeo circular intacto. Plasmídeos circulares podem recombinar com uma única região de sequência recíproca, porém numa

frequência inferior à fragmentos lineares (ORR-WEAVER; SZOSTAK; ROTHSTEIN, 1981). Uma das desvantagens desse processo é não saber em qual região recíproca do genoma a sequência estará integrada e por conseguinte também não saber se a integração será estável ou se ocorrerá da forma esperada. Utilizando esse método para transformar a levedura com o plasmídeo pFUC, foi possível verificar poucas colônias na placa e não foi possível confirmar por PCR a presença dos dois genes em seus genomas.

Outra estratégia utilizada para integração dos plasmídeos foi a de restrição parcial. De acordo com o site da ThermoFischer, A enzima *SacII* apresenta entre 20-50% de atividade no buffer Tango concentrado 2X. Assim, utilizando essas condições foi observado que de acordo com a atividade parcial da enzima, é possível separar por eletroforese fragmentos liberados em caso de 3 cortes, fragmentos liberados em caso de corte duplo (uma delas sendo a desejada para uso) e o plasmídeo linearizado em diferentes regiões (Figura 24).

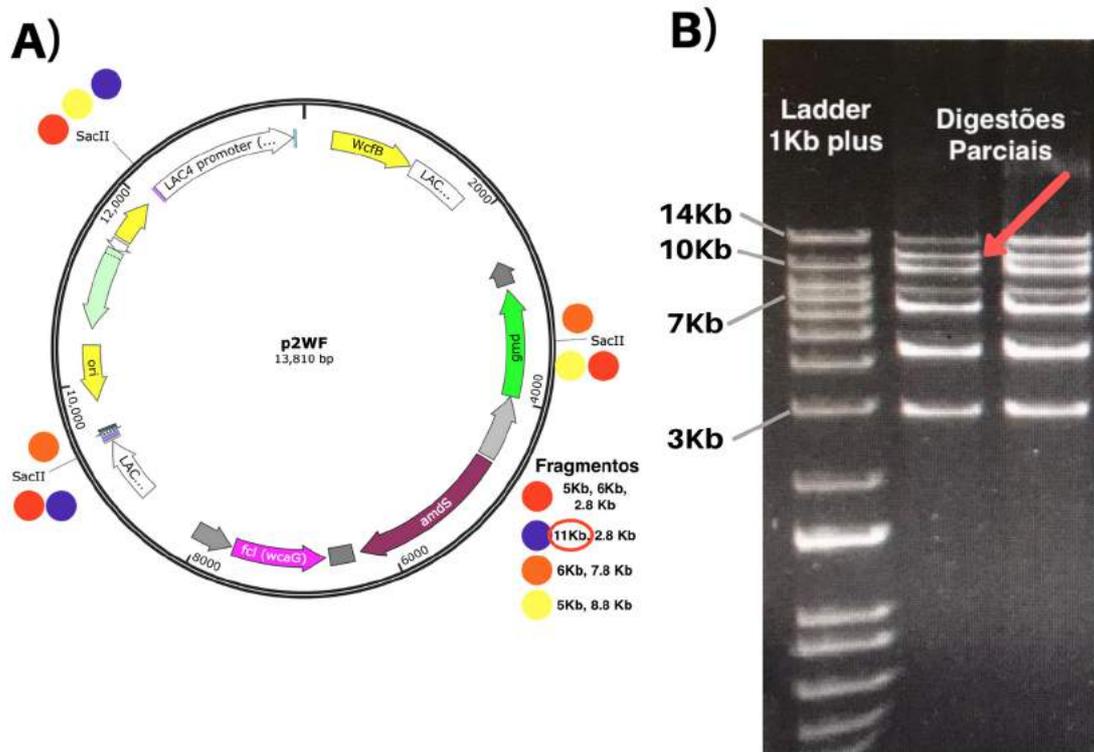


Figura 24 - Restrição parcial do plasmídeo p2WF. A) Mapa físico do plasmídeo p2WF com destaque para os sítios de restrições para a enzima *SacII* e todos os possíveis fragmentos liberados em caso de corte duplo ou triplo. O fragmento desejado no caso do corte duplo azul está em evidência. B) Corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo,

mostrando marcador molecular "Ladder 1Kb plus" (Invitrogen™) e produto da restrição parcial do plasmídeo p2WF. O fragmento desejado está em evidência com uma seta vermelha.

As restrições parciais de cada plasmídeo foram então purificadas e utilizadas como material genético para o protocolo de transformação de levedura. Com essa condição foi possível obter maior quantidade de colônias nas placas de seleção com acetamida. Essas colônias foram repassadas com auxílio de um palito para outra placa com meio seletivo para inserir maior pressão seletiva às colônias e garantir a estabilidade da integração da sequência doada ao genoma.

5.7 Confirmação de Clones Transformados

Após o protocolo de transformação, as colônias que cresceram em meio seletivo YNB Acetamida ágar (4.2.12). As colônias transformantes foram repassadas para uma nova placa de meio seletivo contendo divisórias numeradas. Clones isolados foram crescidos em meio seletivo YNB acetamida e congelados à -80 °C. Os clones congelados foram então cultivados em placa de meio seletivo a partir do estoque à -80 °C. (Figura 25).



Figura 25 - Seleção de clones transformantes de *Kluyveromyces lactis* em meio seletivo YNB Acetamida.

O DNA das colônias transformadas com o plasmídeo pFUC e com o plasmídeo p2WF foi utilizado como molde para PCR a fim de verificar se o plasmídeo havia de fato integrado no genoma. Primeiramente, foi feito protocolo para detecção do cassete de *gmd* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Casg F e Casg R. Após realizar esse protocolo utilizando o plasmídeo pFUC como molde, foi verificado que esse par de oligonucleotídeos iniciadores permite a amplificação não só do cassete de *gmd* como o de *fcl*. Não foi possível amplificar o cassete de *gmd* utilizando o DNA de nenhuma colônia como molde, porém em uma das colônias transformadas com o plasmídeo p2WF foi possível ver amplificação de uma banda num tamanho próximo ao do cassete de *fcl* (Figura 26). Além disso foram vistas diversas bandas de amplificação inespecífica em tamanhos menores.

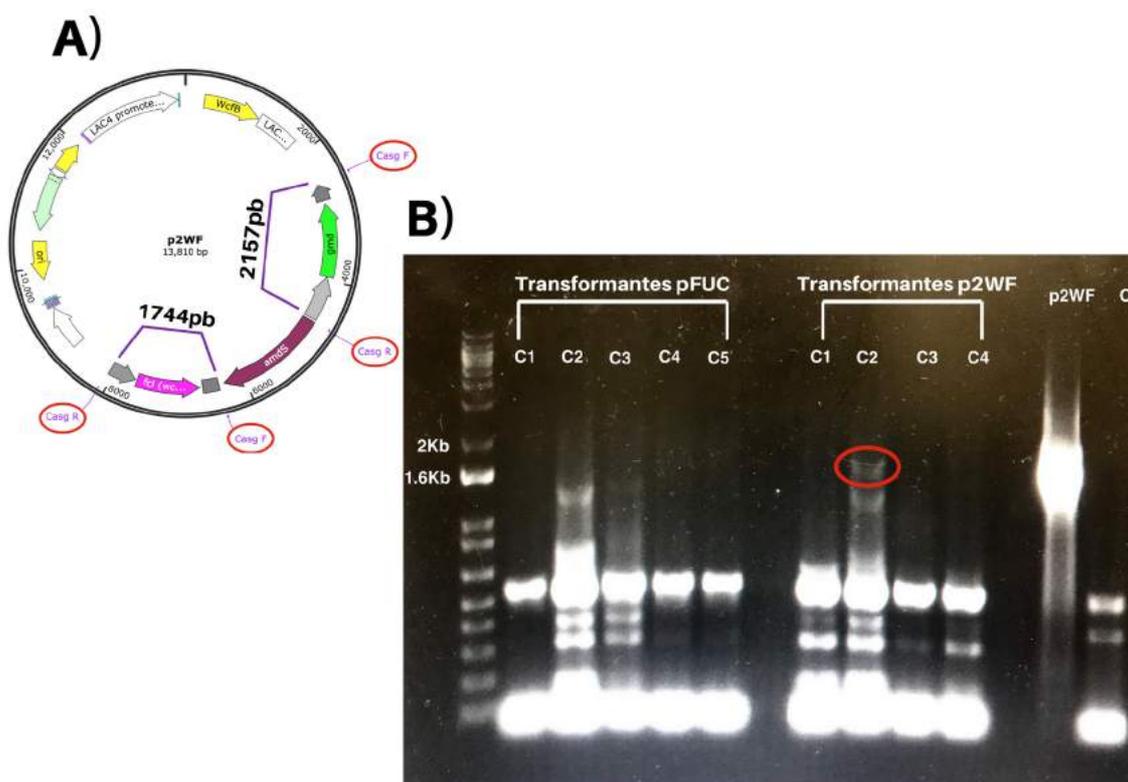


Figura 26 - Produtos de PCR utilizando o DNA genômico de leveduras transformadas e os oligonucleotídeos iniciadores Casg F e Casg R. A) Mapa físico do plasmídeo p2WF mostrando as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores Casg F e Casg R e evidenciando a amplificação dos dois cassetes. B) Corrida de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando marcador "Ladder 1Kb plus" (Invitrogen™) e produtos de PCR. Circulado em vermelho, fragmento no tamanho do cassete de fcl.

A amplificação de um fragmento no tamanho do cassete de expressão do gene fcl foi visto como um indicativo de que o plasmídeo estava integrado nessa colônia. Dessa forma, foram escolhidas mais uma colônia transformada com o plasmídeo p2WF e mais duas colônias transformadas com o plasmídeo pFUC para verificar a presença dos genes gmd e fcl. Utilizando o DNA das colônias transformadas com o plasmídeo p2WF, foi possível amplificar os dois genes no tamanho correto, enquanto com o DNA das colônias transformadas com o plasmídeo pFUC não houve amplificação no tamanho correto do gene gmd (Figura 27). Entretanto, em nenhuma colônia foi possível amplificar o gene WcfB com os primers wcfF e wcfR.

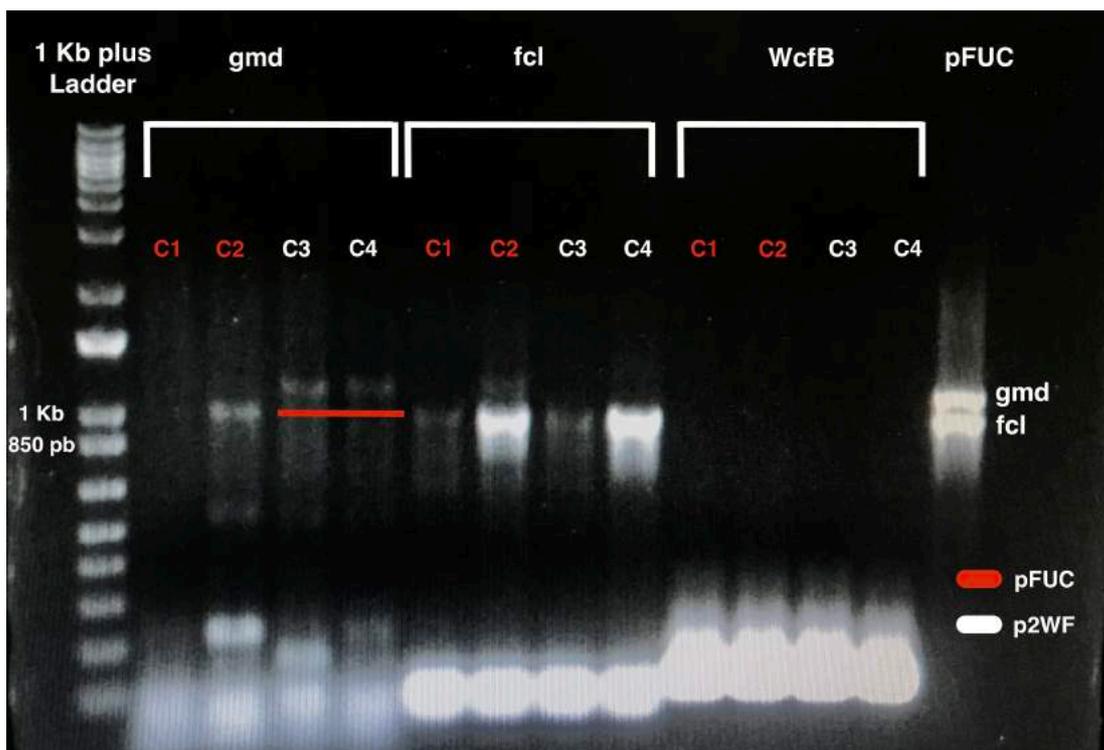


Figura 27 – Produtos de PCR utilizando o DNA genômico de leveduras transformadas e os oligonucleotídeos iniciadores gmd F, gmd R, fcl F, fcl R, wcfB F e wcfB R. Em vermelho, ampliações a partir de DNA genômico de colônias transformadas com o plasmídeo pFUC. Em branco, ampliações a partir de DNA genômico de colônias transformadas com o plasmídeo p2WF. Visualização da corrida de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo marcador molecular "1Kb plus" (Invitrogen™).

5.8 Detecção de 2'-fucosil-lactose

A presença dos genes gmd e fcl confirmada em uma das colônias indica uma possível construção da cepa K2W capaz de produzir 2'FL sob a indução de lactose. Esse clone foi então congelado e estocado para possibilitar futuros cultivos e avaliar a produção de 2'FL. Após crescimento dessa colônia em lactose, o sobrenadante e o pellet foram analisados por HPLC (4.2.15). Os resultados das amostras de sobrenadantes em YP e em UAB após 24 h da colônia transformada foram sobrepostos com os resultados das amostras de uma colônia não transformada (Figura 28).

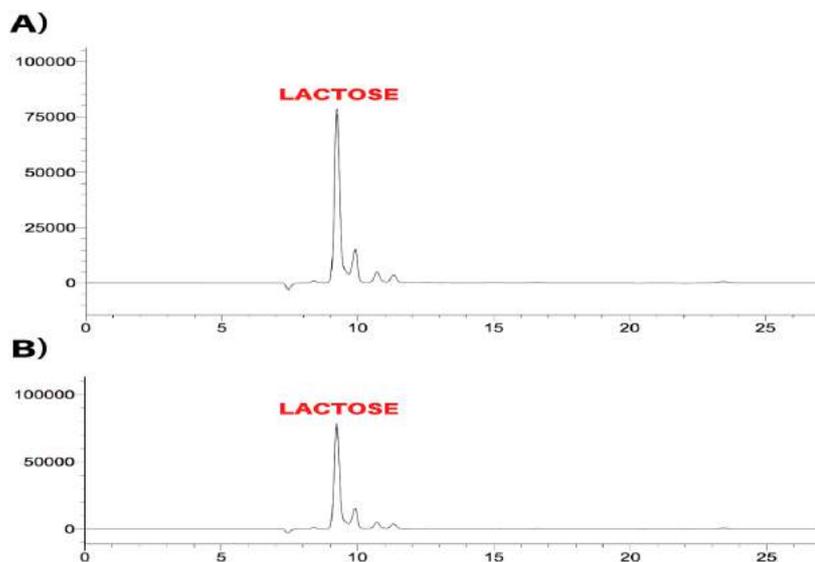


Figura 28 - Cromatograma de detecção dos compostos presentes no sobrenadante dos crescimentos em lactose na coluna HPX-87H, a partir de detector por refração, mostrando em A) corrida do sobrenadante de crescimento da cepa K2W modificada com p2WF e em B) sobrenadante de crescimento da cepa controle GG799.

Não foi possível identificar diferença de perfis cromatográficos entre as duas amostras, nem uma área de integração adicional na amostra da colônia transformada, indicando que a essa colônia não produz 2'FL. Entretanto, tal afirmação não pode ser feita pois não foi possível obter um padrão, que permite visualizar em qual tempo ocorre a detecção de 2'FL e se a mesma está sobreposta com a área de outro composto.

6. DISCUSSÃO

A utilização eficiente de resíduos industriais e biomassas lignocelulósicas aplicada à cadeia produtiva é um passo essencial na transição para bioeconomia (IEA, 2014). Atualmente, a produção de biocombustíveis de segunda geração desempenha um papel importante nesse passo, visto sua melhor performance ambiental na utilização de biomassas quando comparada à produção de biocombustíveis de primeira geração (FLEMING; HABIBI; MACLEAN, 2006). Esse processo geralmente consiste do uso da fração celulósica, composta por glicose, para produção de biocombustíveis por microrganismos, visando assim, diminuir a

dependência de recursos fósseis (BERNDES; HANSSON, 2007). Quando possível, o uso da fração hemicelulósica é geralmente associado ao mesmo propósito da fração celulósica. Em contrapartida, este estudo explora a utilização de manose – um açúcar abundante na fração hemicelulósica – a partir de uma rota bioquímica desse açúcar, visto que até o momento existem poucas aplicações tecnológicas do mesmo.

Assim, a rota tecnológica construída neste estudo pode ser empregada para valorizar diferentes biomassas com alto teor de manana. A manana está presente principalmente em sementes e na fração hemicelulósica de coníferas e, dessa forma, pode servir como fonte para extração de manose em produções nacionais como a de óleo de palmiste (DAUD; JARVIS, 1992). O mesmo é obtido a partir da amêndoa do fruto da palma, onde essa é prensada e a torta gerada possui conteúdo de fibra rico em manose, sendo uma biomassa abundante no território nacional visto que o Brasil é um dos dez maiores produtores mundiais de palma (ABDELTAWAB; KHATTAB, 2018; ABRAPALMA, 2020). Outro resíduo de semente produzido no Brasil é a borra residual do café, onde o Brasil é o maior produtor mundial dessas sementes e já é descrito processo de recuperação de manose a partir dessa borra (NGUYEN et al., 2019; VOLSI et al., 2019). Além disso, o processo kraft para produção de polpas celulósicas a partir de cavacos de coníferas do gênero *Populus*, apresentam alto teor de manose (BUZAŁA et al., 2015). O cultivo de coníferas no Brasil é composto majoritariamente de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. para o setor de papel e celulose (FRANCISCO JURADO BELLOTE et al., 1998). No caso de *Pinus radiata*, a maior parte de sua fração hemicelulósica é composta por galactomanana e a mesma pode ser extraída a partir dos cavacos de madeira antes do processo kraft para produção de polpa celulósica (REYES et al., 2013). Tais exemplos enfatizam a necessidade de mais estudos e desenvolvimento de tecnologias para aplicação da manose presente em resíduos vegetais nacionais como a semente de açai.

Dentre os estudos existentes na utilização de manose para crescimento microbiano, foi observado em *S. cerevisiae* expressando β -mananases para conversão de manose em etanol, uma maior fase lag de crescimento em manose

quando comparada a glicose (ISHII et al., 2016). Essa fase lag estendida em manose também foi observada para essa espécie nos crescimentos em microplaca realizados neste estudo. Ademais, crescimentos da levedura *Lipomyces starkeyi* utilizando manose e glicose para crescimento mostraram que não há diferença cinética de utilização desses açúcares para crescimento nessa espécie (YANG et al., 2014). O mesmo foi observado para *K. lactis* nos crescimentos realizados neste estudo e dessa forma, esse organismo foi escolhido para o consumo da manose presente no HSA. Um fator que poderia influenciar nesse consumo, é a presença de compostos inibitórios para o crescimento microbiano resultantes do processo de tratamento de biomassas lignocelulósicas como amônio furfural e o ácido acético (HELLE et al., 2003; LIU, 2011). O ácido acético é considerado um inibidor de crescimento microbiano, onde a adaptação de microrganismos a esse composto já foi realizada para produção de etanol, e está presente em pequenas quantidades no HSA (LIU et al., 2017; MONTEIRO et al., 2019). Entretanto, nos crescimentos realizados neste estudo, não foi observada inibição do crescimento de *K. lactis* em HSA decorrente da presença de ácido acético.

Apesar da manose ser o açúcar predominante no HSA, esse também possui em menores concentrações glicose, xilose, arabinose, galactose e possivelmente ramnose (MONTEIRO et al., 2019; RAMBO; SCHMIDT; FERREIRA, 2015). Dessa forma, o co-consumo dos diferentes açúcares no HSA é uma característica desejável para aplicação biotecnológica do mesmo. Neste estudo, a levedura que apresentou maior velocidade de crescimento nessa fonte de carbono foi *Kluyveromyces lactis*. Concomitante com a literatura, leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam maior vantagem na co-utilização de açúcares quando comparadas a *S. cerevisiae*, onde já foi descrito o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* em xilose, xilitol, arabinose e celobiose (NONKLANG et al., 2008; SPOHNER et al., 2016).

Uma outra vantagem proposta neste estudo para utilização de *K. lactis* é a preferência pela respiração ao invés da fermentação (perfil crabtree-negativa). Entretanto, durante todos os crescimentos em biorreatores realizados com essa

espécie, foi verificado o acúmulo de etanol, glicerol e acetato. A produção de etanol e acetato em *K. lactis* já foi proposta como um mecanismo para manutenção do balanço redox neutro, quando o oxigênio é limitante, e pode indicar desbalanço redox e limitações do metabolismo respiratório durante esses crescimentos (SALIOLA et al., 2007). Além disso, o consumo de etanol sem crescimento diáuxico em *K. lactis* foi estipulado como uma razão para desbalanço redox e menor crescimento, o que justificaria menor densidade celular final observada no crescimento em manose, onde houve maior consumo de etanol, quando comparado aos demais crescimentos (SALIOLA et al., 2007).

Dessa forma, o acúmulo de etanol em todos os crescimentos em biorreatores e a manose não consumida em sua totalidade, indicam um déficit no metabolismo respiratório durante o cultivo e explicaria a menor velocidade específica de crescimento em relação às observadas em frasco. O padrão respirofermentativo aqui observado já foi visto também em cultivo contínuo em diluições próximas à velocidade de crescimento aferidas aqui, quando o oxigênio foi limitante (KIERS et al., 1998). As produções de etanol verificadas aqui ocorreram no início da fase exponencial de crescimento e concomitante, o aumento da aeração manualmente para 60% durante esse período de crescimento resultou em produção nula de etanol (DIAS et al., 2018). Assim, um fator importante para ser verificado no crescimento de *K. lactis*, são os elementos que permitam o metabolismo respiratório eficiente. Entre esses, estão os sais e vitaminas que devem ser adicionados ao meio de cultivo durante o crescimento microbiano, de forma que não haja limitações no metabolismo respiratório do microrganismo e desvio de carbono para etanol (VERDUYN et al., 1992). Também, a deficiência de fósforo no meio é relacionada a maior produção de etanol pela espécie e a suplementação do meio com ácido nicotínico é associada ao melhor desempenho do metabolismo respiratório e, conseqüentemente, a ausência de etanol (INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994; KIERS et al., 1998).

Tanto o conteúdo de fósforo quanto o ácido nicotínico estão relacionado com a síntese de NADPH, que é abundante em *K. lactis* devido à alta expressão

da PPP. Essa via é um dos principais caminhos na oxidação de hexoses nessa espécie e, diferente de *S. cerevisiae*, ainda consegue crescer quando a via glicolítica é bloqueada (GONZÁLEZ SISO; FREIRE PICOS; CERDÁN, 1996). Também, quando o gene KIZWF1, responsável pela primeira etapa da PPP, é deletado, a espécie tem o crescimento afetado, diferente de *S. cerevisiae* (SALIOLA et al., 2007). Tal fato é importante para ser considerado na produção microbiológica de GDP-fucose e 2'FL, visto que é descrito na literatura a importância de altas concentrações intracelulares de NADPH para a síntese dos mesmos (LEE et al., 2012). A possibilidade de aumentar a produção de 2'FL a partir de modificações visando suprir demandas de NADPH, também já foi descrita em cepa de bactéria com a introdução de genes como o *zwf*, análogo ao KIZWF1 (HUANG et al., 2017).

Também na produção de 2'FL, o transporte de lactose ao meio intracelular é uma etapa fundamental do processo. O gene LAC12 de *Kluyveromyces lactis*, que codifica o transportador de lactose da espécie, foi inserido em todas as leveduras já construídas para a síntese de 2'FL (HOLLANDS et al., 2019; LIU et al., 2018; YU et al., 2018). O sistema de indução por lactose, entretanto, ainda não foi explorado na síntese dessa molécula em leveduras. Tal construção permite acoplar a introdução de lactose ao meio com a produção de uma fucosiltransferase e por conseguinte a síntese de 2'FL quando presente a GDP-fucose. Essa estratégia resulta em altas produtividades em bactérias com o operon *lac* deletado (CHIN et al., 2015, 2016, 2017), porém exige que a fonte de carbono para crescimento seja completamente depletada antes da indução visto que o sistema de indução por lactose normalmente é reprimido por glicose (INADA; KIMATA; AIBA, 1996). Em contrapartida, foi observado que a cepa GG799 de *K. lactis* obtém expressão gênica eficiente sob a ação do promotor pLAC4, induzível por lactose, sem repressão por glicose (SCHAFFRATH; BREUNIG, 2000; SPOHNER et al., 2016).

Dessa forma, o gene da fucosiltransferase *WcfB* foi inserido sob ação do promotor pLAC4 neste estudo, o que permite a indução da expressão do mesmo antes da depleção completa dos açúcares do meio. Essa fucosiltransferase é

proveniente de *B. fragilis* e sua utilização quando comparada à FucT2 em bactéria contendo a via de síntese *de novo* de 2'FL, resultou numa maior produtividade da molécula (CHIN et al., 2017). Sua atividade só é verificada *in vivo*, o que impossibilita sua ação quando secretada e de um processo enzimático com a mesma purificada (ALBERMANN; PIEPERSBERG; WEHMEIER, 2001; CHIN et al., 2017). Por outro lado, a fucosiltransferase FucT2 – a enzima mais bem caracterizada e amplamente utilizada para esse processo – é responsável pela maior produtividade volumétrica de 2'FL descrita, porém utilizando a via salvage (BAUMGÄRTNER et al., 2013). A utilização dessa enzima também resultou na produção de difucosil-lactose em bactérias e leveduras, diminuindo a concentração final de 2'FL (CHIN et al., 2017; YU et al., 2018). Além disso, essa enzima possui baixa solubilidade intracelular e os melhores resultados utilizando a mesma adicionam alguma sequência adicional "tag" para aumentar sua solubilidade e conseqüentemente sua eficiência catalítica (CHIN et al., 2015; HOLLANDS et al., 2019).

Os demais genes manipulados neste estudo, *gmd* e *fcl*, codificam para via de síntese *de novo* de GDP-fucose. Mesmo resultando em menor produção volumétrica de 2'FL em bactérias, tal via apresenta vantagem econômica sob a via salvage, já que não há necessidade de adição de fucose ao meio e esse é um composto oneroso para o processo (HUANG et al., 2017). Além disso, uma produtividade volumétrica competitiva ao processo em bactéria já foi obtida a partir da inserção da via de síntese *de novo* de 2'FL em levedura (HOLLANDS et al., 2019).

Assim, os plasmídeos construídos neste estudo para inserção na cepa GG799 de *K. lactis* possuem dois cassetes de expressão desses genes contendo promotores de expressão constitutiva de *S. cerevisiae*. Tais promotores como pGAP1, pTEF1, pGPD1 e pPGK1 já foram previamente inseridos em *K. lactis* e os mesmos foram capazes de atingir altos níveis de transcrição (ROSA et al., 2013; SAKHTAH et al., 2019). Os cassetes possuem também uma região terminadora CYC1, visto que na literatura é descrito a necessidade de um eficiente sinal de término da transcrição para evitar a colisão transcricional de dois

genes localizados em regiões próximas (PRESCOTT; PROUDFOOT, 2002). Observando também que os dois cassetes possuem a mesma região terminadora de 248 pb, esses foram colocados de forma intercalada à marca de seleção amdS, de forma que caso haja a recombinação homóloga entre essas duas regiões, a levedura remova também a marca de seleção.

A transformação de *K. lactis* pode ser realizada por choque térmico ou por eletroporação a partir de protocolos já descritos e modificados para maior eficiência (WOLF, KLAUS; BREUNIG, KARIN; BARTH, 2003). Especificamente para cepa GG799 de *K. lactis*, o choque térmico é recomendado para transformação, pois as células já são disponibilizadas termocompetentes pelo fabricante do kit. Quando comparada a eficiência de transformação nessas células, utilizando protocolos de choque térmico e de eletroporação, os primeiros resultaram numa maior eficiência e assim em maior número de clones transformados (VIEIRA GOMES, 2016). Além disso, também é descrito para essa cepa maior número de transformantes com múltiplas cópias integradas quando utilizado a marca de seleção amdS ao invés do antibiótico G418, amplamente utilizado para seleção nessa espécie (READ et al., 2007). Entretanto, tais protocolos para a cepa GG799 levam em consideração apenas a integração direcionada por homologia no promotor LAC4, contendo os braços de homologia num DNA linear.

O DNA utilizado para o protocolo de transformação neste estudo foi, alternativamente, o plasmídeo tratado ineficientemente pela enzima de restrição SacII ou o plasmídeo montado intacto. Apesar de ser possível verificar clones transformantes e selecionados em acetamida utilizando o plasmídeo intacto para transformação, não foi possível confirmar a presença dos genes inseridos. A transformação com plasmídeo intacto circular já foi descrita em *Hansenula polymorpha*, que possui preferência por reparo não homólogo NHEJ, com eficiência menor que fragmentos lineares (FABER et al., 1994; KIM et al., 2003). Entretanto, neste estudo não foi possível confirmar a integração em *K. lactis* utilizando essa técnica.

A transformação com o plasmídeo cortado com SacII em tampão inadequado para a enzima acarretou em maior número de clones, onde foi possível verificar a presença de dois genes. Porém, não foi possível confirmar a inserção de alguns elementos da construção inserida como o gene da fucosiltransferase WcfB e o cassete de gmd. Isso pode ser explicado pela preferência por reparo NHEJ em *K. lactis* e conseqüentemente, menor eficiência de integração direcionada (KOOISTRA; HOOYKAAS; STEENSMA, 2004; STARK; MILNER, 1989; ZEEMAN; STEENSMA, 2003). O reparo NHEJ é essencial para o reparo de quebras cromossômicas e resulta em integrações randômicas (TSAKRAKLIDES et al., 2015). Assim, é possível que os transformantes selecionados em acetamida possuam inserção de fragmentos menores da restrição parcial contendo a marca de seleção amdS. A integração não direcionada de fragmentos de p2WF contendo a marca de seleção amdS implica também na possibilidade da marca de seleção estar integrada com genes próximos a mesma no plasmídeo construído, como o gmd e o fcl.

A integração direcionada por reparo usando homologia apresenta dificuldades em *K. lactis* quando comparada à *S. cerevisiae*, visto que na última, a recombinação ocorre com apenas 40 pb de homologia em cada ponta enquanto na primeira pelo menos 400 pb de homologia são necessários (KOOISTRA; HOOYKAAS; STEENSMA, 2004; WOLF, KLAUS; BREUNIG, KARIN; BARTH, 2003). No processo de reparo por *K. lactis*, existe competição entre rad52p, envolvida no reparo por homologia, e o heterodímero ku, envolvido no reparo NHEJ (HABER, 1999). O aumento na eficiência da integração por homologia já foi descrito a partir da deleção do gene KIKu80 e possibilitou integração direcionada utilizando entre 50 e 100 pb de homologia (KOOISTRA; HOOYKAAS; STEENSMA, 2004). Entretanto, cepas deletadas para esse mecanismo de reparo são propensas a instabilidade genômica (TSAKRAKLIDES et al., 2015). Uma alternativa já proposta é o tratamento com hidroxauréia pré-transformação, que permite a sincronização do ciclo celular, onde foi possível aumentar a eficiência de integração direcionada em *K. lactis* (TSAKRAKLIDES et al., 2015). Outra forma também descrita para aumentar a eficiência de recombinação direcionada em *K. lactis* é a utilização do plasmídeo Ti (do inglês, "Tumor-Inducing") de

Agrobacterium tumefaciens, onde a utilização do mesmo resultou em eficiência 10 vezes superior à integração de um vetor introduzido por eletroporação (BUNDOCK et al., 1999).

Após crescimento em lactose, não foi possível verificar a detecção de 2'FL em HPLC devido à falta de um padrão da molécula e a mesma configuração de perfis cromatográficos entre as amostras de sobrenadante do cultivo de células selvagens e transformadas. Em estudos prévios de leveduras modificadas para produção de 2'FL, foi verificado que a maior parte da 2'FL produzida não é secretada ao meio e fica mantida intracelular (HOLLANDS et al., 2019). Assim, também é possível que a baixa produção no sobrenadante quando diluída para corrida de HPLC não tenha possibilitado a visualização clara de uma área de detecção diferente entre as amostras controle e transformada. Os lisados celulares para detecção de compostos intracelulares nesses mesmos estudos foram todos feitos de forma mecânica com utilização de beads ou de choque térmico. Porém, a partir do protocolo utilizado neste estudo, não foi possível verificar perfil de detecção em HPLC quando comparado a água, revelando que o método não foi eficaz para detecção de compostos intracelulares (Dado não mostrado).

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, foi possível crescer diferentes espécies de leveduras utilizando somente manose como fonte de carbono e também utilizando o hidrolisado de uma biomassa vegetal onde a manose é predominante. A levedura *Kluyveromyces lactis* não apresentou fase lag estendida no crescimento em HSA ou diferença estatística entre a velocidade de crescimento em glicose e manose, o que evidencia a possibilidade de estabelecer bioprocessos baseados no consumo de manose.

Entretanto, para a obtenção do mesmo, é necessário estabelecer o crescimento microbiano em batelada utilizando manose como fonte de crescimento. Dessa forma, os crescimentos em biorreator realizados neste estudo deverão ser reexecutados a fim de descrever os principais co-produtos na

utilização de manose para crescimento e as principais diferenças no consumo desse açúcar, como possíveis diferenças no conteúdo intracelular de GDP-manose entre células crescidas em glicose e manose. Tais dados permitirão o desenho de novas estratégias na engenharia de microrganismos para utilização da manose. Além disso, a metodologia para crescimento e o meio de cultivo devem ser reformulados para suprir demandas metabólicas da espécie, sendo proposto a suplementação com ácido nicotínico em experimentos em maior escala (DIAS et al., 2018; KIERS et al., 1998).

O plasmídeo p2WF, contendo os genes que compõem a via sintética proposta para introdução em *K. lactis*, foi confirmado a partir de restrições enzimáticas porém, o promotor GPD obtido a partir do plasmídeo p424GPD apresenta divergências com a sequência presente no NCBI, onde não é observado o corte por XhoI. Ademais, a integração desse plasmídeo no genoma da cepa GG799 de *K. lactis* não pode ser confirmada, já que não foi possível verificar a amplificação por PCR do gene WcfB e do cassete de expressão de *gmd* a partir do genoma de cepas transformadas.

Para possibilitar a maior quantidade do plasmídeo p2WF linearizado por SacII sem os demais fragmentos de restrição parcial, o sítio de SacII presente no gene *gmd* pode ser deletado com a técnica de PCR de sobreposição (em inglês, "Overlap PCR"). Após o sítio ser deletado, o cassete deverá ser re-inserido no plasmídeo p2WF no lugar da construção antiga. Dessa forma, será possível fazer novas transformações com maior quantidade de DNA alvo para integração e aumentar o direcionamento para recombinação homóloga, possivelmente sem interferência pelo mecanismo de reparo NHEJ. Entretanto, outras técnicas podem ser empregadas para novas tentativas de integração do plasmídeo p2WF, como a o tratamento com hidroxirúria pré-transformação (TSAKRAKLIDES et al., 2015) e a utilização do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* para direcionar a sequência alvo (BUNDOCK et al., 1999).

Também, para detecção de 2'FL em HPLC, é necessário a investigação de adaptações no protocolo utilizado para avaliar conteúdo intracelular ou a

utilização de uma nova metodologia que permita investigar a presença de conteúdos intracelulares como a espectrometria de massa associada a cromatografia líquida (LC/MS). Uma futura modificação que pode ser adicionada ao processo, é a introdução do transportador CDT2 de *Neurospora crassa*, que previamente possibilitou a maior quantidade de 2'FL no conteúdo extracelular (HOLLANDS et al., 2019).

A amplificação dos genes *gmd* e *fcl* por PCR utilizando o DNA de colônias transformantes, pode significar na construção de uma cepa produtora de apenas GDP-fucose ao invés de 2'FL. Após estabelecido o processo de detecção de compostos extracelulares, as mesmas amostras podem ser analisadas por HPLC para detecção de GDP-fucose com a utilização de uma coluna C18 eluída com acetonitrila, conforme protocolos utilizados na detecção dessa molécula (BAUMGÄRTNER et al., 2013; HUANG et al., 2017).

Após a construção p2WF deste estudo ser integrada no genoma de *K. lactis*, demais modificações podem ser introduzidas à cepa K2W para otimizar a produção de 2'FL. A deleção do operon *lac* em bactérias resultou em maiores produtividades dessa molécula e assim, a deleção do gene *LAC4*, que expressa a enzima β -galactosidase e permite o consumo de lactose em *K. lactis*, é uma possível modificação a ser introduzida no sistemas descrito aqui. Outra possível modificação é a superexpressão de genes endógenos responsáveis na síntese de GDP-manose, já resultou em maior produção de proteína recombinante previamente (UCCELLETTI et al., 2005). Ao fim da construção final, também será necessário avaliar se a galactose é capaz de modular a expressão do sistema induzível por lactose da construção integrada (RODICIO; HEINISCH, 2013; ZACHARIAE; KUGER; BREUNIG, 1993).

Finalmente, a construção da cepa K2W de *Kluyveromyces lactis* é um passo importante para valorização de um resíduo vegetal na produção nacional e, conseqüentemente, para bioeconomia nacional. A implementação da rota tecnológica proposta aqui permitirá maiores elucidções sobre a produção de oligossacarídeos por microrganismos e sobre a produção de 2'FL por leveduras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELTAWAB, A. M.; KHATTAB, M. S. A. Utilization of Palm Kernel Cake as a Ruminant Feed for Animal: A Review. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p. 157–164, 1 abr. 2018.

ABRAPALMA. **Palm in Brazil and the world | ABRAPALMA – Brazilian Association of Palm Oil Producers**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/en/palm-in-brazil-and-the-world/>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

AGOSTON, K. et al. Kilogram scale chemical synthesis of 2'-fucosyllactose. **Carbohydrate Research**, v. 476, p. 71–77, 1 abr. 2019.

ALBERMANN, C.; PIEPERSBERG, W.; WEHMEIER, U. F. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. **Carbohydrate Research**, v. 334, n. 2, p. 97–103, 23 ago. 2001.

ALMEIDA, C. M. et al. Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 269–281, 2014.

BAUMGÄRTNER, F. et al. Construction of Escherichia coli strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, 1 maio 2013.

BEATO, F. B. et al. Physiology of Saccharomyces cerevisiae strains isolated from Brazilian biomes: New insights into biodiversity and industrial applications. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 7, 1 nov. 2016.

BERNDES, G.; HANSSON, J. Bioenergy expansion in the EU: Cost-effective climate change mitigation, employment creation and reduced dependency on imported fuels. **Energy Policy**, v. 35, n. 12, p. 5965–5979, dez. 2007.

BLOUNT, B. A.; WEENINK, T.; ELLIS, T. Construction of synthetic regulatory networks in yeast. **FEBS Letters**, v. 586, n. 15, p. 2112–2121, 16 jul. 2012.

BODE, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1147–1162, set. 2012.

BONEKAMP, F. J.; OOSTEROM, J. On the safety of Kluyveromyces lactis - a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 1–3, mar. 1994.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017–1023, nov. 2010.

BUNDOCK, P. et al. T-DNA from Agrobacterium tumefaciens as an efficient tool for gene targeting in Kluyveromyces lactis. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 1, p. 115–121, 1999.

BUZAŁA, K. et al. Production of glucose-rich enzymatic hydrolysates from cellulosic pulps. **Cellulose**, v. 22, n. 1, p. 663–674, 18 dez. 2015.

- CANELAS, A. B. et al. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 17, p. 7379–7389, 1 set. 2009.
- CASTANYS-MUÑOZ, E.; MARTIN, M. J.; PRIETO, P. A. 2'-fucosyllactose: An abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 12, p. 773–789, dez. 2013.
- CHATURVEDI, P. et al. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 365–372, 2001.
- CHEN, R. Enzyme and microbial technology for synthesis of bioactive oligosaccharides: an update. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 3017–3026, 1 abr. 2018.
- CHIN, Y. W. et al. Enhanced production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* BL21star(DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 107–115, 1 ago. 2015.
- CHIN, Y. W. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce 2'-fucosyllactose via salvage pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP)-l-fucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 11, p. 2443–2452, 1 nov. 2016.
- CHIN, Y. W. et al. Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative α -1,2-fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 192–198, 10 set. 2017.
- CHUZEL, L. et al. Complete genome sequence of *Kluyveromyces lactis* strain GG799, a common yeast host for heterologous protein expression. **Genome Announcements**, v. 5, n. 30, 1 jul. 2017.
- COENEN, T. M. M. et al. Safety evaluation of a lactase enzyme preparation derived from *Kluyveromyces lactis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 8, p. 671–677, ago. 2000.
- COLUSSI, P. A.; TARON, C. H. *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7092–7098, nov. 2005.
- CZERMAK, P. et al. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. **Journal of Membrane Science**, v. 232, n. 1–2, p. 85–91, 15 mar. 2004.
- DA SILVA CRISTINO CORDEIRO, V. et al. Euterpe oleracea Mart. seed extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive rats: role of inflammation and oxidative stress. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 817–832, 1 mar. 2018.
- DA SILVA FILHO, E. A. et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 481–486, 2005.
- DAUD, M. J.; JARVIS, M. C. Mannan of oil palm kernel. **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 463–464, 1 fev. 1992.
- DIAS, O. et al. Quantitative physiology and elemental composition of *Kluyveromyces*

- lactis CBS 2359 during growth on glucose at different specific growth rates. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 183–195, 1 fev. 2018.
- DOMINGUES, L.; GUIMARÃES, P. M. R.; OLIVEIRA, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 3, p. 164–171, maio 2010.
- DUJON, B. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35–44, 1 jul. 2004.
- EIDELMAN, A. I.; SCHANLER, R. J. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 129, n. 3, p. e827–e841, mar. 2012.
- ENGEL, J.; SCHMALHORST, P. S.; ROUTIER, F. H. Biosynthesis of the fungal cell wall polysaccharide galactomannan requires intraluminal GDP-mannose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 53, p. 44418–44424, 28 dez. 2012.
- FABER, K. N. et al. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. **Current Genetics**, v. 25, n. 4, p. 305–310, abr. 1994.
- FAPESP. **Açaí: Do pé para o lanche | Revista Pesquisa Fapesp**. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2013/01/11/acai-do-pe-para-o-lanche/>>. Acesso em: 1 fev. 2020.
- FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 17, 2009.
- FLEMING, J. S.; HABIBI, S.; MACLEAN, H. L. Investigating the sustainability of lignocellulose-derived fuels for light-duty vehicles. **Transportation Research Part D: Transport and Environment**, v. 11, n. 2, p. 146–159, 2006.
- FRANCISCO JURADO BELLOTE, A. et al. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE CELULOSE EM PLANTIOS FLORESTAIS. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 37, p. 99–106, 1998.
- FREITAS, D. M. DE. **EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO CAROÇO DE AÇAÍ (Euterpe oleracea)**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2010.
- GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 87–96, 2002.
- GLACKEN, M. W.; FLEISCHAKER, R. J.; SINSKEY, A. J. Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up. **Trends in Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 102–108, 1983.
- GONZÁLEZ SISO, M. I.; FREIRE PICOS, M. A.; CERDÁN, M. E. Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by *Kluyveromyces lactis* rag2 mutants. **FEBS Letters**, v. 387, n. 1, p. 7–10, 27 maio 1996.
- GOTOH, A. et al. Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 13958, 1 dez. 2018.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. The hanahan method for preparation and transformation of competent *Escherichia coli*: High-efficiency transformation. **Cold**

Spring Harbor Protocols, v. 2018, n. 3, p. 183–190, 1 mar. 2018.

GUERRERO, C. et al. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 70, p. 9–17, 1 mar. 2015.

HABER, J. E. Gatekeepers of recombination. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 665–667, 22 abr. 1999.

HAGMAN, A.; SÄLL, T.; PIŠKUR, J. Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. **FEBS Journal**, v. 281, n. 21, p. 4805–4814, 2014.

HANSON, P. K. *Saccharomyces cerevisiae*: A Unicellular Model Genetic Organism of Enduring Importance. **Current Protocols in Essential Laboratory Techniques**, v. 16, n. 1, 1 maio 2018.

HARA, K. Y. et al. Transporter engineering in biomass utilization by yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 7, 1 nov. 2017.

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON, K. R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. **BMC Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 8, 2004.

HELLE, S. et al. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 786–792, 5 nov. 2003.

HOLLANDS, K. et al. Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose. **Metabolic Engineering**, v. 52, p. 232–242, 1 mar. 2019.

HOOGWIJK, M. et al. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 2, p. 119–133, 2003.

HUANG, D. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement. **Metabolic Engineering**, v. 41, p. 23–38, 1 maio 2017.

IEA. **Sustainable and synergetic processing of biomass into marketable food & feed ingredients, products (chemicals, materials) and energy (fuels, power, heat)**. [s.l.: s.n.].

INADA, T.; KIMATA, K.; AIBA, H. Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. **Genes to Cells**, v. 1, n. 3, p. 293–301, mar. 1996.

INCHAURRONDO, V. A.; FLORES, M. V.; VOGET, C. E. Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 291–298, 1998.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast Growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 47–54, 1994.

ISHII, J. et al. From mannan to bioethanol: cell surface co-display of β -mannanase and β -mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 188, 2 dez. 2016.

ITAI, Y. et al. Numerical and experimental assessment of a downdraft gasifier for electric power in Amazon using açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) as a fuel.

Renewable Energy, v. 66, p. 662–669, jun. 2014.

IWATA, T. et al. Efficient secretion of human lysozyme from the yeast, *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 23, p. 1803–1808, dez. 2004.

JENSEN, G. S. et al. In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8326–8333, 24 set. 2008.

KARATHIA, H. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: A comparative study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

KEGG. **KEGG PATHWAY: Fructose and mannose metabolism - *Kluyveromyces lactis***. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?k1a00051>. Acesso em: 1 fev. 2020.

KIERS, J. et al. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, v. 14, n. 5, p. 459–469, 30 mar. 1998.

KIM, S. Y. et al. Efficient library construction by in vivo recombination with a telomere-originated autonomously replicating sequence of *Hansenula polymorpha*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4448–4454, 1 ago. 2003.

KOOISTRA, R.; HOOYKAAS, P. J. J.; STEENSMA, H. Y. Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 21, n. 9, p. 781–792, 15 jul. 2004.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1289–91, 2007.

KOZHIMANNIL, K. B. et al. Medically complex pregnancies and early breastfeeding behaviors: A retrospective analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 13 ago. 2014.

KRIJGER, J. J. et al. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 112, 20 ago. 2012.

KULINICH, A.; LIU, L. Human milk oligosaccharides: The role in the fine-tuning of innate immune responses. **Carbohydrate Research**, v. 432, p. 62–70, 2016.

KUNZ, C. et al. OLIGOSACCHARIDES IN HUMAN MILK: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 699–722, jul. 2000.

LEE, W.-H. et al. Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 48, 2012.

LI, L. et al. Expression of manB gene from *Escherichia coli* in *Lactococcus lactis* and characterization of its bifunctional enzyme, phosphomannomutase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 1293–1298, 1 ago. 2018.

LIGATION CALCULATOR. **LIGATION CALCULATOR**. Disponível em: <http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html>. Acesso em: 3 fev. 2020.

LIMA MESQUITA, A. DE. **ESTUDOS DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS DO FRUTO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* MART.) DA AMAZÔNIA PARA PRODUÇÃO DE ECOPAINEL DE PARTÍCULAS HOMOGÊNEAS DE MÉDIA DENSIDADE**. [s.l.] Universidade Federal do Pará (UFPA),

2013.

LIU, J. J. et al. Biosynthesis of a Functional Human Milk Oligosaccharide, 2'-Fucosyllactose, and 1-Fucose Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, n. 11, p. 2529–2536, 16 nov. 2018.

LIU, Y. F. et al. Effect of acetic acid on ethanol production by *Zymomonas mobilis* mutant strains through continuous adaptation. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, 1 ago. 2017.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809–825, maio 2011.

LSRO. **COMPREHENSIVE GRAS ASSESSMENT Of the Proposed Uses of 2'-O-FUCOSYLLACTOSE In Term Infant Formulas, Toddler Formulas, and Foods Targeted to Toddlers**. [s.l.: s.n.].

LUCZYNSKI, M. **ESTUDO DA VIABILIDADE ECONÔMICA PARA A UTILIZAÇÃO DA SEMENTE DA *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) COMO RECURSO ENERGÉTICO**. [s.l.] Universidade Federal do Pará (UFPA), 2008.

MALHERBE, A. R. et al. Expression and evaluation of enzymes required for the hydrolysis of galactomannan. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1201–1209, 2014.

MARKETSANDMARKETS. **Infant Formula Ingredients Market Size 2019-2025 | Industry Share and Forecast**. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/infant-formula-ingredients-market-198132825.html>>. Acesso em: 1 fev. 2020.

MARTIN, C. R.; LING, P. R.; BLACKBURN, G. L. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. **Nutrients**, v. 8, n. 279, 11 maio 2016.

MERICO, A. et al. The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 5, p. 749–756, ago. 2009.

MILTON, A. et al. Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. 2018.

MOHD AZHAR, S. H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 1 jul. 2017.

MONTEIRO, A. F. et al. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 10939, 1 dez. 2019.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165–178, maio 2008.

MORROW, A. L. et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. **Journal of Pediatrics**, v. 145, n. 3, p. 297–303, set. 2004.

MOUNTNEY, G. J.; GOULD, W. A.; WEISER, H. H. (HARRY H. **Practical food microbiology and technology**. [s.l.] Van Nostrand Reinhold, 1988.

NANDY, S. K.; SRIVASTAVA, R. K. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. **Microbiological Research**, v. 207, p. 83–90, 1 mar. 2018.

NEB. **pKLAC2 Vector | NEB**. Disponível em:
<[https://international.neb.com/products/n3742-pklac2-vector#Product Information](https://international.neb.com/products/n3742-pklac2-vector#Product%20Information)>.
Acesso em: 1 fev. 2020.

NEWBURG, D. S. et al. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. **Glycobiology**, v. 14, n. 3, p. 253–263, mar. 2004.

NGUYEN, Q. A. et al. Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 209–216, 1 jan. 2019.

NONKLANG, S. et al. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7514–7521, dez. 2008.

ORIOLO, R.; LE PENDU, J.; MOLLICONE, R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and Related Antigens. **Vox Sanguinis**, v. 51, n. 3, p. 161–171, 1986.

ORR-WEAVER, T. L.; SZOSTAK, J. W.; ROTHSTEIN, R. J. Yeast transformation: A model system for the study of recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 10 I, p. 6354–6358, 1981.

OVERKAMP, K. M. et al. Two mechanisms for oxidation of cytosolic NADPH by *Kluyveromyces lactis* mitochondria. **Yeast**, v. 19, n. 10, p. 813–824, 2002.

PESSOA, J. D. C. et al. Characterization of Açaí (*E. oleracea*) fruits and its processing residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1451–1460, nov. 2010.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, n. OCT, 21 out. 2014.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, dez. 2009.

PRESCOTT, E. M.; PROUDFOOT, N. J. Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 13, p. 8796–8801, 25 jun. 2002.

QUEROL, AMPARO; FLEET, G. H. **Yeasts in Food and Beverages**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2006.

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, v. 144, p. 696–703, 17 jul. 2015.

READ, J. D. et al. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5088–5096, ago. 2007.

REVERRI, E. J. et al. Review of the clinical experiences of feeding infants formula containing the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose. **Nutrients**, v. 10, n. 1346, 1 out. 2018.

- REYES, P. et al. Extração e caracterização de hemiceluloses de pinus radiata e sua viabilidade para a produção de bioetanol. **Revista Arvore**, v. 37, n. 1, p. 175–180, jan. 2013.
- RODICIO, R.; HEINISCH, J. J. Yeast on the milky way : genetics , physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis* †. p. 165–177, 2013.
- RODRIGUES, R. B. et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4162–4167, 14 jun. 2006.
- ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém PA: EDUFPA, 2000.
- ROSA, J. C. C. et al. Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, 22 jun. 2013.
- SAKHTAH, H. et al. A Novel Regulated Hybrid Promoter That Permits Autoinduction of Heterologous Protein Expression in *Kluyveromyces lactis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 14, 15 jul. 2019.
- SALIOLA, M. et al. KIADH3, a gene encoding a mitochondrial alcohol dehydrogenase, affects respiratory metabolism and cytochrome content in *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 8, p. 1184–1192, dez. 2006.
- SALIOLA, M. et al. Deletion of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene KIZWF1 affects both fermentative and respiratory metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 19–27, jan. 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANDIN, R. L. Studies on cell adhesion and concanavalin A-induced agglutination of *Candida albicans* after mannan extraction. **Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 145–150, 1987.
- SANTANA, A. C. DE; PESSOA, J. D. C. ; SANTANA, A. L. DE. **O mercado de açaí e os desafios tecnológicos da Amazônia**. [s.l: s.n.].
- SCHAFFRATH, R.; BREUNIG, K. D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, n. 3, p. 173–190, 2000.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2 jun. 2010.
- SEDAP. **AÇAÍ | SEDAP**. Disponível em: <<http://www.sedap.pa.gov.br/content/açaí>>. Acesso em: 1 fev. 2020.
- SPOHNER, S. C. et al. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 104–116, 20 mar. 2016.
- STARK, M. J. R.; MILNER, J. S. Cloning and analysis of the *Kluyveromyces lactis* TRP1 gene: A chromosomal locus flanked by genes encoding inorganic pyrophosphatase and histone H3. **Yeast**, v. 5, n. 1, p. 35–50, 1989.
- STEVENSON, G. et al. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4885–4893, 1996.

STORM, H. M. et al. 2'-Fucosyllactose Is Well Tolerated in a 100% Whey, Partially Hydrolyzed Infant Formula With *Bifidobacterium lactis*: A Randomized Controlled Trial. **Global pediatric health**, v. 6, p. 2333794X19833995, 2019.

TARRÍO, N. et al. Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 3, p. 371–380, maio 2006.

TSAKRAKLIDES, V. et al. Improved Gene Targeting through Cell Cycle Synchronization. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.

TURCK, D. et al. Safety of 2'-fucosyllactose/difucosyllactose mixture as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA Journal**, v. 17, n. 6, 1 jun. 2019.

UCCELLETTI, D. et al. Enhanced secretion of heterologous proteins in by overexpression of the GDP-mannose pyrophosphorylase, KIPsa1p. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 8, p. 735–746, maio 2005.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

VAN DEN BERG, J. A. et al. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of prochymosin. **Bio/Technology**, v. 8, n. 2, p. 135–139, 1990.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, n. 7, p. 501–517, 1992.

VIEIRA GOMES, A. M. **Produção Heteróloga de Ácido Hialurônico em *Kluyveromyces lactis***. [s.l.] Universidade de Brasília, 2016.

VOLSI, B. et al. The dynamics of coffee production in Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219742, 23 jul. 2019.

WAGNER, J. M.; ALPER, H. S. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. **Fungal Genetics and Biology**, v. 89, p. 126–136, 1 abr. 2016.

WALLACE, R. J. et al. Risks associated with endotoxins in feed additives produced by fermentation. **Environmental Health**, v. 15, n. 1, p. 5, 15 dez. 2016.

WOLF, KLAUS; BREUNIG, KARIN; BARTH, G. **Non-Conventional Yeasts in Genetics, Biochemistry and Biotechnology**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2003.

WOLF, K. **Nonconventional Yeasts in Biotechnology**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1996.

WOLFE, K. H.; SHIELDS, D. C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 708–713, 1997.

YANG, X. et al. Simultaneous utilization of glucose and mannose from spent yeast cell mass for lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 383–387, 2014.

YU, S. et al. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 101, 27 dez. 2018.

ZACHARIAE, W.; KUGER, P.; BREUNIG, K. D. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator LA1C9 (K1GAL4). **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 1, p. 69–77, 11 jan. 1993.

ZEEMAN, A. M.; STEENSMA, H. Y. The acetyl co-enzyme a synthetase genes of *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 20, n. 1, p. 13–23, 15 jan. 2003.

ZHAN, F. X. et al. Developing a xylanase XYNZG from *Plectosphaerella cucumerina* for baking by heterologously expressed in *Kluyveromyces lactis*. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, 16 dez. 2014.