

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

**Validação da cepa K2W para produção de 2'-Fucosillactose em
*Kluyveromyces lactis***

Autor: Gabriel Feitosa Rodrigues Carneiro
Orientadora: Dra. Nádia Skorupa Parachin

Brasília
2021

Gabriel Feitosa Rodrigues Carneiro

**Melhoramento do vetor p2WF para produção de 2'-
Fucosil-lactose em *Kluyveromyces lactis***

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

Orientadora: Nádia Skorupa Parachin, PhD

Brasilia
2021

Dedico este trabalho a todos que sofreram pela pandemia da COVID-19. À todos que se debruçam sob a luz da ciência, e que, mesmo aos constantes problemas, trabalharam bravamente em meio ao desgoverno.

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer a toda minha família mas em especial à meus pais, Ivonei Calado e Paulo Carneiro, por todo o suporte desde berço, sou grato pela criação sob os olhos de uma educação libertadora, a mesma que questiona, instiga e abraça o erro em prol de evoluir. À meu irmão, Pedro Carneiro, por todo o amor e por me inspirar. Aos meus avós, e em especial, a Odete Calado, avó e primeira educadora que antes mesmo de qualquer instituição me ensinou as primeiras sílabas, cores e a contagem, saiba que só cheguei hoje onde estou por sua causa.

Aos meus amigos de longa data por sempre apoiarem meus sonhos. Sempre ajudaram a moldar meus objetivos para poder traça-los da melhor forma possível, fora todo o carinho dado e palavras amigas em dias difíceis. Sem vocês nada disso seria possível.

À todos que fazem ou fizeram da companhia de dança, o qual faço parte, dividir o amor pelo dançar e fazer desse sentimento algo comum fez as minhas noites sempre mais felizes e me enchiam de vontade de viver o amanhã.

À meus colegas e amigos do Laboratório de Biocatalisadores (LABIOCAT) por todo o suporte com a demanda de bancada e por sempre serem solícitos para ajudar, vocês foram muito importantes durante meu desenvolvimento quanto pesquisador. Em especial, muito obrigado Carolynne, Ana Caroline, e Kelly, pelas risadas na copa e por serem presentes durante meu trajeto. Agradecer ao meu ex-colega e amigo de longa data, André Soares por ter começado este projeto e ter construído grande parte do material, obrigado por me ensinar tanto e por ter dividido comigo parte do meu trabalho.

Obrigado ao grupo de pesquisa dos professores: Andrea Maranhão, Fernando Araripe, Ildinete Pereira, Marcelo Brigido, Talita Souza e Elida Campos por todo o espaço cedido e na utilização de equipamentos.

Aos técnicos do Departamento de Biologia Molecular, José e Thompson por todo o apoio técnico e segurança no ambiente de trabalho.

Obrigado ao professor Hugo Costa Paes que abraçou a idéia do projeto e me ensinou muito ao longo do meu caminhar, a admiração que criei por ti não cabe em meros agradecimentos e espero um dia ser exemplo assim como você foi para mim.

E finalmente meu muito obrigado a minha orientadora, Prof(a) Nádia Skorupa Parachin. Desde a graduação a minha admiração só cresceu por ti, obrigado por todo o zelo com seus orientandos, gostaria de dizer que você abriu portas, mas na realidade, foram fronteiras diante de todas as oportunidades que foram fundamentadas ao longo deste mestrado, obrigado por sempre me por em contato com desafios e por sempre me manter motivado mesmo em dias difíceis. O mestrado não me trouxe apenas uma orientação diante do novo, mas sim, uma amiga, mãe e colega de trabalho que espero manter pela vida.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”. (Roger Von Oech)

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Oligossacarídeos do Leite Materno (OLMs) e a 2- ['] FL.....	17
1.2 <i>Kluyveromyces lactis</i> — uma possível plataforma para síntese de oligossacarídeos.....	19
1.3 Microorganismos geneticamente modificados para síntese de 2- ['] FL.....	23
1.4 A construção da cepa K2W.....	26
1.5 Melhoramento do plasmídeo p2WF.....	29
1.5.1 Métodos de detecção da molécula de 2- ['] FL da cepa K2W.....	30
1.6 Estratégias para otimização da produção de 2- ['] FL.....	31
1.6.1 Deleção da enzima Beta-galactosidase (Lac4).....	32
1.6.2 Adição do transportador Cdt2 de <i>Neurospora crassa</i> de 2- ['] FL.....	32
1.6.3 Deleção ou hiperexpressão de enzimas que envolvem a manose.....	33
2.JUSTIFICATIVA.....	34
3.OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Materiais.....	35
4.1.1 Microrganismos	35
4.1.2 Vetores Utilizados e Construídos	35
4.1.3 Oligonucleotídeos Iniciadores.....	36
4.1.4 Meios de Cultivo	38
4.1.6 Soluções	40
4.1.7 Tampões.....	41
4.1.8 Enzimas	43
4.1.9 Kits.....	43
4.1.10 Equipamentos.....	44
4.2 Métodos.....	44
4.2.1 Cultivo celular de <i>E.coli</i> em Erlenmeyer 500 mL	44
4.2.2 Cultivo celular de <i>K. lactis</i> em Erlenmeyer 500 mL.....	44
4.2.3 Desenho de Oligonucleotídeos Iniciadores.....	45
4.2.4 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) e Mutagenese Sitio-Dirigida...45	
4.2.5 Eletroforese em gel de agarose.....	47
4.2.6 Preparo de células bacterianas termocompetentes	47
4.2.7 Transformação Bacteriana.....	48
4.2.8 Extração plasmidial (Bactérias)	48
4.2.9 Purificação de fragmentos de restrição e amplicons.....	49
4.2.10 NEB Hifi-Assembly	49
4.2.11 Ligação de insertos em vetores	49
4.2.12 Tratamento com endonucleases de restrição.....	50

4.2.13 Transformação em <i>K. lactis</i>	51
4.2.14 Extração de DNA genômico de <i>K. lactis</i>	51
5.RESULTADOS	52
5.1 Clivagens Alternativas do plasmídeo p2WF com as endonucleases de restrição BspHI e BseRI	52
5.2 Estudo <i>in silico</i> para mutagenese sitio-dirigida do sitio de SacII na região do <i>gmd</i>	55
5.3 Mutagenese sitio-dirigida para deleção do sitio de SacII utilizando o plasmídeo p2WF	57
5.4 Método NEB Hi-Fi Assembly utilizando o plasmídeo p2WF para eliminação do sitio de SacII	59
5.5 Mutagenese sitio-dirigida do sitio de SacII utilizando pGEN-GMD	63
5.6 Ligação de fragmento nutado aos vetores pKLAC2 e P2WF.....	65
5.7 Transformação do plasmídeo p2WF, pKLACG_SacII e p2WF_SacII em <i>K. lactis</i>	66
5.7.1 Transformação utilizando plasmídeo p2WF tratado com BspHI.....	66
5.7.2 Transformação utilizando pKLACG_SacII tratado com SacII.....	67
5.7.3 Transformação utilizando p2WF_SacII tratado com SacII.....	68
6.DISSCUSSÃO.....	69
7.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	75
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 — REPRESENTAÇÃO DE POSSÍVEIS OLM'S FORMADOS COM OS 5 TIPOS DE MONÔMEROS QUE ESTÃO PRESENTES NO LEITE MATERNO, EM ESPECIAL A 2'-FUCOSIL-LACTOSE

FIGURA 02 — REPRESENTAÇÃO DO METABOLISMO DE MANOSE, GLICOSE COM FOCO NA BIOSÍNTESE DE 2'-FL DA CEPA K2W DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

FIGURA 03 — PLASMÍDEO P2WF REPRESENTADO COM OS TRÊS SÍTIOS DE CLIVAGEM PERANTE A ENZIMA SACII

FIGURA 04 — PADRÃO DE CLIVAGEM COM AS ENDONUCLEASES BSPHI E BSERI A FIM DE DIMINUIR A REGIÃO NÃO HOMÓLOGA DO SÍTIO DE INTEGRAÇÃO DA LEVEDURA NO PLASMÍDEO P2WF

FIGURA 05 — PRODUTO DO TRATAMENTO COM ENDONUCLEASES BSPHI E BSERI

FIGURA 06 — AVALIAÇÃO DO SÍTIO DE BSERI PRESENTE NA REGIÃO INTERGÊNICA DO GENE WCFB

FIGURA 07 — DESENHO *IN-SILICO* REALIZADO PELO SNAPGENE COM A ANELAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES NO SÍTIO DE SACII.

FIGURA 08 — PRODUTO DO TRATAMENTO COM ENDONUCLEASE SACII UTILIZANDO O PLASMÍDEO P2WF_KO

FIGURA 09 — AVALIAÇÃO DO PLASMÍDEO P2WF_KO EM GEL DE AGAROSE 1%

FIGURA 10 — PRODUTO DO TRATAMENTO DE ENDONUCLEASES STUI E AATII EM GEL DE AGAROSE 1%

FIGURA 11 — PRODUTO DE PCR RESULTANDO NOS AMPLICONS PARA FORMAÇÃO DO GIBSON ASSEMBLY UTILIZANDO PLASMÍDEO P2WF COMO DNA AMPLIFICADOR,

FIGURA 12 — PRODUTO DO TRATAMENTO COM ENDONUCLEASE SACII UTILIZANDO O PLASMÍDEO P2WF-ASSEMBLY MUTADO, COMPARANDO COM O PLASMÍDEO P2WF ORIGINAL E O P2WF_KO

FIGURA 13 — PRODUTO DO TRATAMENTO COM ENDONUCLEASE STUI E KPNI UTILIZANDO O PLASMÍDEO P2WF_ASSEMBLY MUTADO

FIGURA 14 — PRODUTO DO TRATAMENTO COM ENDONUCLEASE BGLLL PARA CONFIRMAÇÃO DA LIGAÇÃO DO CASSETE DE GMD NO PLASMÍDEO PGEN-T-EASY

FIGURA 15 — PRODUTO DO TRATAMENTO COM ENDONUCLEASE SACII PARA AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL DISRRUPÇÃO DO SÍTIO DE SACII NA REGIÃO INTERGÊNICA DO GMD NO PLASMÍDEO PGEN-T-EASY MUTADO

FIGURA 16 — PRODUTO DO TRATAMENTO PROMOVIDO POR ENDONUCLEASE BGLLL PARA CONFIRMAÇÃO DA LIGAÇÃO DO CASSETE DE GMD NO PLASMÍDEO PKLAC2

FIGURA 17 — PRODUTO DE PCR RESULTANDO NOS AMPLICONS PARA GMD UTILIZANDO O DNA GENÔMICO DE CADA LEVEDURA TRANSFORMADA (C1-C20)

FIGURA 18 — RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO SACII, PARA AVALIAR PADRÃO DE CORTE DO PLASMÍDEO P2WF_ΔSACII E PRODUTO DE PCR UTILIZANDO O DNA GENÔMICO DAS COLÔNIAS TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO P2WF_ΔSACII PARA CONFIRMAR A INSERÇÃO DOS GENES.

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 — REPRESENTAÇÃO DE TODAS AS CEPAS PRODUTORAS DE 2'-FL ATUALMENTE RELATADAS COM SUAS DIFERENTES MODIFICAÇÕES GENÉTICAS E A PRODUÇÃO EM G/L DE 2'-F

TABELA 02 — MICRORGANISMOS UTILIZADOS DURANTE OS PROCESSOS DE CLONAGEM E SUBCLONAGEM. CEPAS PRODUZIDAS DURANTE O ESTUDO DA BIOSÍNTESE DE 2'-FL

TABELA 03 — VETORES UTILIZADOS DURANTE O PROCESSO DE CLONAGEM E SUBCLONAGEM PARA A PRODUÇÃO DE 2'-FL.

TABELA 04 — OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES E CASSETES UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE 2'-FL

TABELA 05 — ENDONUCLEASES UTILIZADAS NO TRABALHO PARA A PRODUÇÃO DE 2'-FL

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ	Taxa de crescimento específica
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
oC	Graus Celsius
2'-FL	2'-Fucosil-lactose
amdS	Gene para produção de acetamidase e seleção com acetamida
BSA	Albumina do soro bovino do inglês "Bovine Serum Albumine"
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi Nucleosídeo Trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Agency
g	Aceleração da gravidade
g/L	Gramas por litro
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HSA	Hidrolisado ácido da semente de açaí HMO
OLM	Oligossacarídeo do leite Materno
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio

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	New England BioLabs Inc.®
NHEJ	Non-homologous End Joining
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
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SOB	Meio Super Optimal Broth
TBE	Tris-acetato-EDTA-ácido bórico
TE	Tris-EDTA
YP	Meio Yeast Peptone
YNB	Yeast Nitrogen Base
SPM	Single Primer Mutation
UV	Ultra-violeta

RESUMO

A 2'-fucosil-lactose (2'-FL) corresponde a cerca de 80% dos oligossacarídeos presentes do leite materno (OLMs) . É um trissacarídeo neutro composto por unidades de L-fucose, D-galactose e D-glicose que se destaca por sua atividade imunomodulatória; por atenuar processos inflamatórios ao servir como uma fibra dietética ao diminuir interações entre patógenos com a mucosa gastrointestinal em recém-nascidos. A cepa K2W foi construída utilizando a levedura *Kluyveromyces lactis* como plataforma biológica, pelo Laboratório de Engenharia de Biocatalisadores (LABIOCAT) da Universidade de Brasília (UnB) para produção de 2'-FL. A cepa é capaz de produzir, em tese, o oligossacarídeo 2'-FL usando como substrato lactose e hidrolisado ácido seguido de tratamento enzimático provindo da semente do açaí composto majoritariamente por manose. O vetor de expressão, o plasmídeo integrativo pKLAC2 (NEB) foi usado para a inserção de três genes exógenos que codificam enzimas que viabilizam a produção de 2'-FL: manose 4,6-desidratase (*gmd*) e GDP-L-fucose-sintase (*fcl*), clonadas diretamente do genoma de *Escherichia coli*; e uma fucosiltransferase putativa (*wcfB*), produzida por síntese gênica e originária do genoma da bactéria *Bacterioides fragilis*. O plasmídeo final foi chamado de p2WF, contudo, além da presença de sítios de SacII que liberam as regiões de homologia do vetor para a integração ao genoma, revelou-se a existência de um terceiro sítio na região do gene *gmd* impossibilitando um processo de integração. Assim, o presente estudo descreve estratégias para a integração do plasmídeo p2WF no genoma da levedura *K. lactis* e o melhoramento do vetor de expressão para o processo de integração. As tentativas de eliminar o sítio de SacII no gene *gmd* foram realizadas através da técnica de mutagênese sítio-dirigida e técnicas como Montagem Gibson. Os 3 cassetes de expressão foram confirmados na cepa K2W_ΔSACII, validando assim a integração genica e confirmando a construção da cepa. Estudos seguem para a detecção do açúcar.

ABSTRACT

2'-fucosyl-lactose (2'-FL) corresponds to about 80% of the oligosaccharides present in breast milk (OLMs). It is a neutral trisaccharide composed of L-fucose, D-galactose and D-glucose units that stands out for its immunomodulatory activity; for attenuating inflammatory processes by serving as a dietary fiber by decreasing interactions between pathogens with the gastrointestinal mucosa in newborns. The K2W strain was built using the yeast *Kluyveromyces lactis* as a biological platform, by the Biocatalyst Engineering Laboratory (LABIOCAT) of the University of Brasília (UnB) for the production of 2'-FL. The strain is capable of producing, in theory, the oligosaccharide 2'-FL using lactose and acid hydrolyzate as substrate, followed by enzymatic treatment from the açai seed, mainly composed of mannose. The expression vector, the integrative plasmid pKLAC2 (NEB) was used to insert three exogenous genes that encode enzymes that enable the production of 2'-FL: mannose 4,6-dehydratase (*gmd*) and GDP-L-fucose- synthase (*fcl*), cloned directly from the genome of *Escherichia coli*; and a putative fucosyltransferase (*wcfB*), produced by gene synthesis and originating from the genome of the bacterium *Bacterioides fragilis*. The final plasmid was called p2WF, however, in addition to the presence of *SacII* sites that release the homology regions of the vector for integration into the genome, it was revealed the existence of a third site in the region of the *gmd* gene, making an integration process impossible . Thus, the present study describes strategies for the integration of the p2WF plasmid into the *K. lactis* yeast genome and the improvement of the expression vector for the integration process. Attempts to eliminate the *SacII* site in the *gmd* gene were carried out using the technique of site-directed mutagenesis and techniques such as Gibson Assembly. The 3 expression cassettes were confirmed in the *K2W_ΔSACII* strain, thus validating the genetic integration and confirming the construction of the strain. Studies continue to detect sugar.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Oligossacarídeos do Leite Materno (OLM's) e a 2'-FL.

Oligossacarídeos do Leite Materno (OLM's) são uma classe de carboidratos que fazem parte da composição do leite e consequentemente da dieta de neonatos (ANDREAS et al., 2015). Avaliados como o terceiro grupo mais abundante, constituem cerca de 15-20 g/L do leite ao longo do período de lactação (COPPA et al., 1993; MUSILOVA et al., 2014). Os OLM's são resultado da condensação de monossacarídeos e seus derivados, sendo estes a glicose (Glc), galactose (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucose (Fuc) e ácido siálico (Sia). OLM's são relativamente estáveis em pH ácido e permanecem inalterados durante a passagem pelo estômago e intestino delgado devido à falta de sialidases e fucosidases, enzimas necessárias para sua hidrólise (PLAZA-DÍAZ et al., 2018). Quando atingem o intestino grosso, podem ser metabolizados pela microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias comensais em detrimento das patogênicas, tendo assim um efeito probiótico positivo (MATSUKI et al., 2016). Visto que a maioria dos patógenos entéricos utilizam glicanos na superfície celular para reconhecer e se ligar às células-alvos, os OLM's em neonatos desempenham um efeito imunoprotetor, funcionando como uma fibra dietética e impedindo-os de invadir a mucosa intestinal infantil, auxiliando na defesa contra doenças infecciosas e inibindo o primeiro passo crítico da patogênese (MOROZOV et al., 2018). Mais de duzentos OLM's diferentes já foram identificados até o momento (BODE, 2014).

A 2'-fucosil-lactose (2'-FL) corresponde a cerca de 80% dos OLM's (ANDREAS et al., 2015). É um trissacarídeo neutro composto por unidades de L-fucose, D-galactose e D-glicose ($\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$; CASTANYS-MUÑOZ et al., 2013) (Figura 01). A lactose, quando presente nos OLM's, se apresenta sempre na extremidade redutora da

biomolécula (KOBATA, 2003). Apesar de não existirem informações detalhadas a respeito do processo de alongamento da lactose na formação dos OLM's, estudos indicam que a biossíntese de 2'-FL é catalisada por fucosiltransferases que adicionam grupos fucosil à lactose, gerando uma família de oligossacarídeos solúveis (CASTANYS-MUÑOZ et al., 2013).

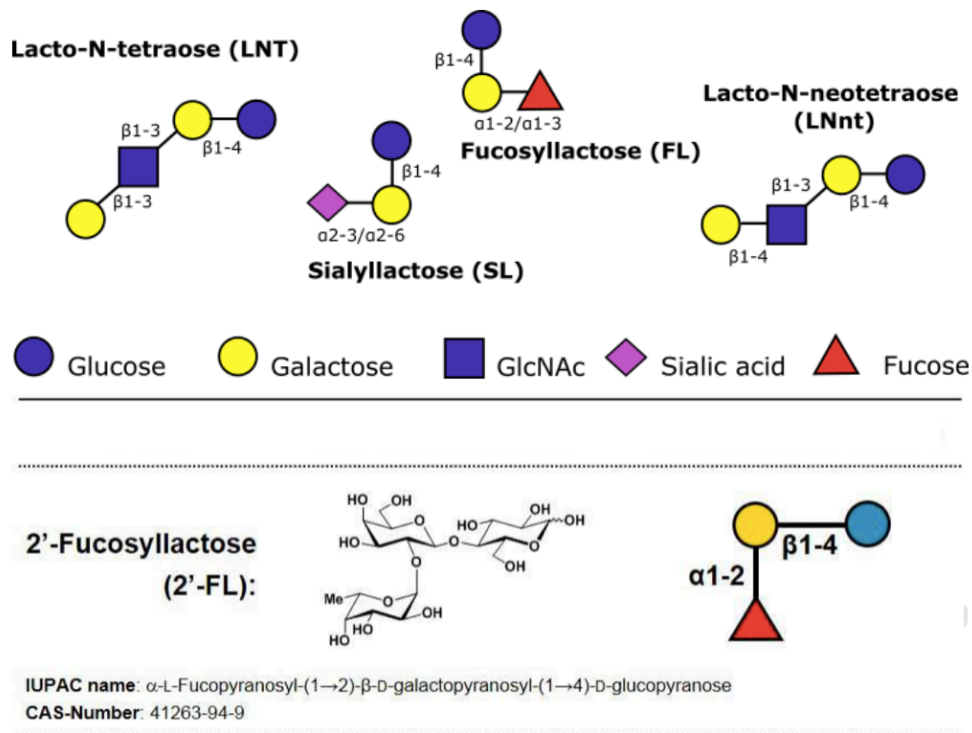


Figura 01 — Representação de possíveis OLM's formados com os 5 tipos de monômeros que estão presentes no leite materno, em especial a 2'-Fucosil-lactose. O açúcar é formado pelos monômeros glicose, galactose e fucose. Apresenta a lactose em sua extremidade redutora ligado a molécula de fucose por uma ligação tipo α -1,2.

A presença majoritária da 2'-FL comparada a outros OLM's e suas propriedades benéficas ao desenvolvimento e saúde humanos a tornam objeto preferencial de estudos científicos dentre os OLM's. Além disso, esse açúcar também se destaca por modular a produção de linfocinas; atenuar processos inflamatórios ao diminuir interações mediadas por selectinas entre leucócitos e células da mucosa gastrointestinal; e na

disponibilização de potenciais nutrientes para o desenvolvimento cerebral e de cognição de recém-nascidos (BODE, 2014).

Outro ponto a ser levantado é o aleitamento materno e a utilização de OLMs como alimentações suplementares neonatais. Sabe-se que há dificuldade de as mulheres realizarem a amamentação exclusiva no Brasil e em outros países. Dados de 127 países de baixa e média renda e de 37 países de alta renda revelam que, em quase todos esses países, a oferta de leite materno aos recém-nascidos fica acima de 80%, porém, na sua maioria, a oferta exclusiva de leite materno é bem abaixo de 50%, principalmente em casos relatados com países de baixa e média renda, essa diminuição envolve questões sociais, econômicas, culturais e psicológicas (VICTORA et. al, 2016)

Dessa forma existe um grande interesse comercial na produção de 2'-FL para formulações dietéticas neonatais e insumos para suplementação alimentar (REVERRI et al., 2018). A indústria de compostos para fórmulas neonatais foi avaliada em 13,9 bilhões de dólares em 2019 e projeta-se um crescimento anual de 9,4% até 2025 (Markets & Markets, 2019). Instituições como a European Safety Food Authority (ESFA) e a Food and Drug Agency (FDA) já aprovaram o uso de microrganismos geneticamente modificados produtores de 2'-FL para complementar de forma eficiente os diferentes processos de síntese química já existentes e suprir a crescente demanda no mercado. (TURCK et al., 2019; LSRO, 2017)

1.2 *Kluyveromyces lactis* — uma possível plataforma para síntese de oligossacarídeos.

Kluyveromyces lactis é uma levedura heterotática com ciclo de vida predominantemente haplóide, e emergiu como uma das espécies importantes de leveduras na a área de biotecnologia industrial. Apesar de considerada uma levedura não convencional (do inglês *Non-*

Conventional Yeast — *NCY*), é utilizada como plataforma biológica para produção de proteínas heterólogas por sua capacidade de atingir alta densidade celular, além de demonstrar boa eficiência para secretar proteínas para o meio extracelular, sendo atraente para produções em larga escala. Até 2016, aproximadamente 100 proteínas heterólogas haviam sido produzidas em *K. lactis* com aplicações principalmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SPOHNHER et al., 2016). Seu uso na indústria foi disseminado a partir da expressão heteróloga de quimosina (van den BERG et al., 1990) e alfa-amilase (TOKUNAGA et al., 1997); e da extração e purificação da beta-galactosidase nativa (RODRIGUEZ et al., 2006), enzima responsável pela quebra da molécula de lactose. Leveduras deste gênero, além de bem estabelecidas em processos industriais, também são atraentes por terem status GRAS (no inglês *Generally Regarded as Safe*, “universalmente tido como seguro”), que autoriza o desenvolvimento de bioprodutos com segurança para o produtor e o consumidor final nos EUA (COENEN et al., 2000; SPOHNHER et al., 2016). *K. lactis* apresenta outras características desejáveis para uma plataforma biológica, qual sejam: seu genoma não duplicado garante que a maioria das proteínas e enzimas não apresenta isoformas (BHARADWAJ et al., 2010; GONZALEZ & CERDAN, 2012); e possui a intrínseca capacidade de assimilar lactose e outras como fonte de carbono, como manose, glicerol e glicose, assegurando-lhe utilidade em aplicações versáteis e inovadoras (SPOHNHER et al., 2016). Além disso, avaliando do ponto de vista de desempenho de crescimento, *K. lactis* em comparação com outras leveduras como *S. cerevisiae* e *Picchia pastoris* (*Komagataella phaffi*) demonstrou maior taxa de crescimento específico além de apresentar a menor fase lag utilizando manose como substrato (CAMPOS, 2020)

Em comparação com a levedura-modelo *Saccharomyces cerevisiae*, a maior diferença para *K. lactis* é o metabolismo *Crabtree*-negativo negativo desta última, que prioriza a formação de biomassa em aerobiose; em contraste, *S. cerevisiae* prioriza um processo fermentativo

alcoólico produzindo etanol e outros metabólitos nas mesmas condições, sendo, portanto, Crabtree-positiva (FLORES et al., 2000). De acordo com a literatura, *K. lactis* é alternativamente classificada como Crabtree-positiva de curto prazo, pois é capaz de produzir etanol em aerobiose quando na presença de açúcares em uma cultura limitante e quando há limitações na via respiratória do microrganismo (HAGMAN, et al., 2014; MERICO et al., 2009). Entretanto, os níveis de produção de etanol em *K. lactis* diferem bastante dos de leveduras como *S. cerevisiae*. Conjuntamente com a glicólise, a PPP é uma das vias preferenciais do fluxo de carbono em *K. lactis* e mais ativa comparada com a levedura *S. cerevisiae* (TARRIO et al., 2006). Assim, as concentrações de etanol produzidas, mesmo que baixas, dependem do metabolismo respiratório e, quando a concentração de oxigênio no meio de cultura é ideal, não se observa formação de etanol por esta espécie (KIERS et al., 2004; MERICO et al., 2009). Quando presente a formação de etanol, o metabolismo fermentativo de *K. lactis* é regulado pela ação de álcool desidrogenases mitocondriais que geram moléculas de NADP⁺ e, conseqüentemente, contrabalançam o NADPH produzido pela via das pentoses fosfato (PPP), promovendo um equilíbrio oxiredutor no sistema e regulando uma produção de álcool de curto prazo.

K. lactis também é alvo de estudos para um melhor entendimento de seus mecanismos fisiológicos e genéticos básicos (SPOHNHER et al., 2016). Através do sequenciamento e da anotação genômica, já foram identificados pelo menos 1759 genes ligados às suas funções metabólicas (DIAS et al., 2012). Parte dos estudos envolvendo a levedura versam sobre o uso e a otimização de plasmídeos como vetores de expressão e sobre a caracterização de possíveis promotores (COLUSSI & TARON, 2015) para manipulação genética. Estes estudos resultaram numa gama de vetores disponíveis para uso nesta levedura. Eles incluem tanto vetores epissomais, que se baseiam na replicação plasmidial de forma autônoma, quanto vetores que se integram no genoma. Os vetores epissomais mais utilizados são derivados do

plasmídeo pKD1 de *Kluyveromyces drosophilum* (FALCONE et al., 1986; CHEN et al., 1986). Este se assemelha ao plasmídeo 2 μ de *S. cerevisiae* quanto à estabilidade e à estrutura e são mantidos de forma estável, com de 60 a 80 cópias por célula (FALCONE et al., 1986). Já os vetores integrativos carregam sequências homólogas às regiões de um cromossomo intrínseco de *K. lactis* que, por meio de recombinação, se inserem diretamente na região-alvo do genoma. Um dos *loci* mais usados para integração é o do gene *LAC4* no cromossomo B, a sequência de cujo promotor a inserção por homologia da construção gênica de interesse (van den BERG et al., 1990; SWINKELS et al., 1993). Promotores constitutivos do genoma de *K. Lactis*, como P_{ADH4} , P_{PDC1} e P_{PGK2} , também já foram caracterizados e se mostraram eficazes para super-expressão de genes heterólogos (SALIOLA et al., 1999; MENART & BOLOTIN, 1997). Um grande benefício do uso de vetores integrativos é o aumento da estabilidade genética da cepa transformada em comparação aos epissomais (SPOHNHER et al., 2016), o que é mais favorável para processos industriais de larga escala. Atualmente, um dos plasmídeos integrativos otimizados para inserção no *locus LAC4* é o pKLAC2, vetor comercial desenvolvido pela New England Biolabs (NEB). O gene *LAC4* codifica a enzima beta-galactosidase, responsável pela quebra e aproveitamento da lactose como fonte de carbono para a levedura (PEREIRA-RODRIGUEZ et al., 2012). Por sua alta atividade transcricional, induzível pelo uso de lactose como fonte de carbono (PEREIRA-RODRIGUEZ et al., 2012), o promotor de *LAC4* é excelente para expressão de proteínas heterólogas (PEREIRA-RODRIGUEZ et al., 2012). Além disso, o vetor confere auxotrofia para acetamida como fonte exclusiva de nitrogênio devido à presença do gene da acetamidase do fungo *Aspergillus niger* (van OUYEN et al., 2006).

Além da produção de proteínas heterólogas, *Kluyveromyces lactis* vem sendo usada cada vez mais como plataforma de produção de biocompostos em vista de sua versatilidade fisiológica. Exemplos são a produção de L-ácido ascórbico (ROSA et al., 2013), ácido hialurônico

(GOMES et al., 2019) e D-xilonato (Y NYGARD et al., 2011), que a confirmam como um hospedeiro viável para inserção vias metabólicas heterólogas completas. A disponibilidade de ferramentas moleculares para manipular vias metabólicas e a capacidade de produção de compostos de alto valor agregado tornam *K. lactis* um microrganismo promissor para a biossíntese de 2'-FL.

1.3 Microrganismos geneticamente modificados para síntese de 2'-FL.

Para suprir a demanda de produção de 2'-FL no mercado, é preferível o uso de plataformas microbianas bem estabelecidas industrialmente, resistentes e escalonáveis (RODICIO et al., 2013). Atualmente, a produção industrial de 2'-FL se restringe a sistemas bacterianos e leveduras geneticamente modificadas (Tabela 01). No contexto da produção de oligossacarídeos, *Kluyveromyces lactis* é vantajosa por sua capacidade de assimilar lactose de forma espontânea, composto chave para a produção de 2'-FL; pelo perfil *Crabtree*-negativo que permite direcionar as fontes de carbono preferencialmente para produção de biomassa; e por ser uma levedura consolidada no mercado biotecnológico industrial.

Tabela 01 - Representação de todas as cepas produtoras de 2'-FL atualmente relatadas com suas diferentes modificações genéticas e a produção em g/L de 2'-FL

Cepa 2'FL	Organismo	Genes Expressos	Fonte de Carbono	2'FL Total	Taxa Volumétrica de 2'-FL	Referencias
JM109	<i>Escherichia coli</i>	Genes gmd , wcaG , manB e manC provindos da cepa <i>E.coli</i> K12 conjuntamente com a fucosiltransferase FUCT2 de <i>Helicobacter pylori</i>	14.5 g/L de Lactose	1.23 g/L	N/A	<u>Lee et al., 2012</u>
gwBC-F2	<i>Escherichia coli</i> JM109	Genes gmd , wcaG , manB e manC provindos da cepa <i>E.coli</i> K12 além do gene fkp de <i>Bacterioides fragilis</i> conjuntamente com a fucosiltransferase FUCT2 de <i>Helicobacter pylori</i> . Genes fucl e fucK 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	<u>Baumgartner et al., 2013</u>
ΔL M15 BCGW-D3F	<i>Escherichia coli</i> BL21Star(DE3)	Genes gmd , wcaG , manB e manC provindos da cepa <i>E.coli</i> K12 conjuntamente com FUCT2 de <i>Helicobacter pylori</i> + 3 Aspartatos. Operon LacZ sofreu disrupção	20 g/L de Glicerol . Alimentação com glicerol à 800 g/L associada a pH. 20	6.4 g/L	0.118 g/L.h.-1	<u>Chin et al., 2015</u>
ΔLF YA_FF	<i>Escherichia coli</i> BL21Star(DE3)	Gene fkp de <i>Bacterioides fragilis</i> conjuntamente com FUCT2 de <i>Helicobacter pylori</i> . Deleção do operon LacZ	20 g/L de Glicerol . Alimentação com glicerol à 800 g/L associada a pH. 25g/L de Lactose e 25 g/L de Fucose .	23.1 g/L	0.389 g/L.h.-1	<u>Chin et al., 2016</u>
ΔL YA BCGW-W	<i>Escherichia coli</i> BL21Star(DE3)	Genes gmd , wcaG , manB e manC provindos da cepa <i>E.coli</i> K12 conjuntamente com wcfB de <i>Bacterioides fragilis</i> . Deleção do operon LacZ	20 g/L de Glicerol . Alimentação com glicerol à 800 g/L associada a pH. 20	15.4 g/L	0.530 g/L.h.-1	<u>Chin et al., 2017</u>
BL21ΔlacZ ΔlonΔwcaJ	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Genes gmd , wcaG , ManB , ManC , mana , rcaA , zwf e pentAB e lacY provindos de <i>E. coli</i> K12 conjuntamente com FUCT2 de <i>Helicobacter pylori</i>	36 g/L de Glicose e 12 g/L de Lactose .	9.12 g/L	N/A	<u>Huang et al., 2017</u>

Tabela 01 - Representação de todas as cepas produtoras de 2'-FL atualmente relatadas com suas diferentes modificações genéticas e a produção em g/L de 2'-FL

D452L-gwf	Saccharomyces cerevisiae	Genes kfp de <i>B. fragilis</i> e LAC12 de <i>K. lactis</i> conjuntamente com FUCT2 de <i>Helicobacter pylori</i>	20g/L de Glicose , 40g/L de Etanol , 2g/L de Lactose e 2g/L de Fucose	0.503 g/L	N/A	Yu et al., 2018
D452L-gwf	Saccharomyces cerevisiae	Genes gmd e wcaG e <i>E. coli</i> K12 e gene LAC12 de <i>K. lactis</i> integrado no genoma conjuntamente com FUCT2 de <i>Helicobacter pylori</i>	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
HS 07	Saccharomyces cerevisiae	Genes gmd e wcaG provindos de <i>E. coli</i> K12 e gene LAC12 provindo de <i>K. lactis</i> conjuntamente com FUCT2 SUMOstar® tag de <i>Helicobacter pylori</i>	15g/L de Glicose em batelada alimentada e 10g/L por Lactose	15 g/L	0.22 g/L.h.-1	Hollands et al., 2019
HY 28	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Genes gmd e gmer provindos de <i>M. alpina</i> e LAC12 provindo de <i>K.lactis</i> conjuntamente com FUCT2 SUMOstar® tag de <i>Helicobacter pylori</i>	15g/L de Glicose em batelada alimentada e 10g/L por Lactose	24 g/L	0.44 g/L.h.-1	Hollands et al., 2019

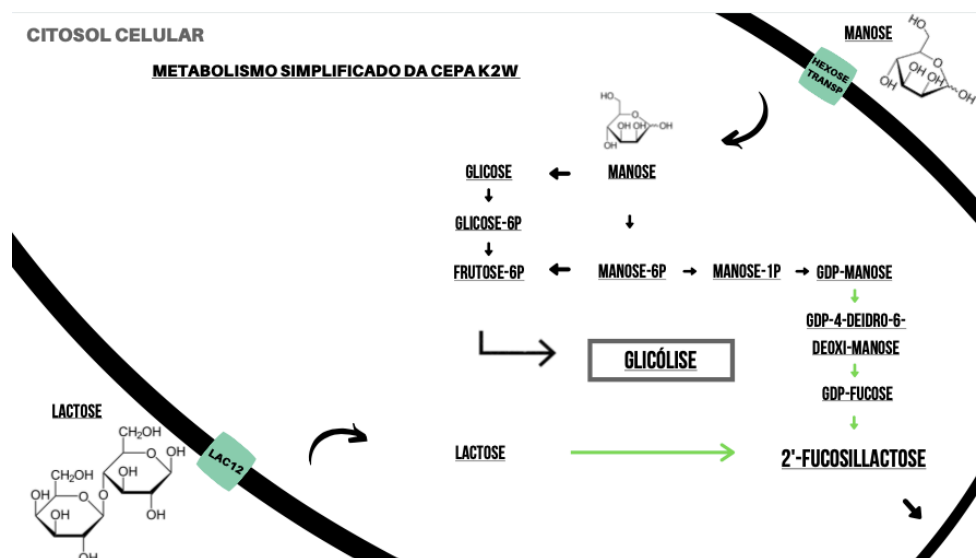
1.4 — A construção da cepa K2W

Tendo em vista a capacidade e as vantagens de *K. lactis*, a cepa K2W foi construída pelo Laboratório de Engenharia de Biocatalisadores (LABIOCAT) da Universidade de Brasília (UnB). A cepa é capaz de produzir, em tese, o oligossacarídeo 2'-FL por meio de uma via de produção *de novo* (CAMPOS, 2020). Para a construção do vetor de expressão, o plasmídeo integrativo pKLAC2 (NEB) foi manipulado para a inserção de três genes exógenos que codificam enzimas que viabilizam a produção de 2'-FL: manose 4,6-desidratase (*gmd*) e GDP-L-fucose-sintase (*fcl*), clonadas diretamente do genoma de *Escherichia coli*; e uma fusosiltransferase putativa (*wcfB*), produzida por síntese gênica e originária do genoma da bactéria *Bacterioides fragillis*. O plasmídeo final foi chamado de p2WF e integrado ao genoma da levedura, gerando assim, a cepa K2W. (CAMPOS, 2020)

A estratégia de produção de 2'-FL prevê o uso majoritariamente de manose e lactose como substratos (CAMPOS, 2020). A fonte de manose provém de um hidrolisado ácido-enzimático da semente de açaí (HSA) produzido pelo Laboratório de Biocatálises (LABIC) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), instituição colaboradora do projeto. Cerca de 85% do peso total do açaí é a semente, resíduo do fruto que frequentemente é descartado após o processamento da polpa (SEPAD, 2020; PESSOA et al., 2010). Há evidências de que o descarte incorreto da semente do açaí causa diversos problemas ambientais na região Norte do Brasil pela elevada quantidade de resíduos não aproveitados. Estes acabam avariando sistemas de saneamento básico e provocando assoreamento de rios da região e consequentes alagamentos (FREITAS, 2010). O principal constituinte do HSA, numa concentração aproximada de 146 g/L, é a manose, proveniente da manana, polímero lignocelulósico presente na semente do açaí. Além da manose, existem frações menores de alguns outros açúcares presentes no hidrolisado (MONTEIRO et al., 2019). O HSA representa ainda a possibilidade de se usar uma

tecnologia nacional e sustentável com o potencial de converter um material, a semente de açaí, que outrora eram considerado resíduo descartável, em um produto de alto valor agregado, para geração de biomassa e para aplicações tecnológicas no metabolismo de microrganismos, um campo pouco explorado (HARA et al., 2017). Outro ponto importante é a disponibilidade de frações hemicelulosicas constituídas de manana além da semente de açaí, fazendo com que esse processo não se torne dependente apenas de um resíduo. Grandes quantidades de manana são encontradas na semente do café, árvores do gênero *Pinus* e na torta de palma (HOLTZAPPLE, 2003).

A partir da utilização do HSA e da lactose como fontes de carbono, a cepa K2W possui uma rota metabólica para produzir 2'-FL (CAMPOS, 2020). O processo de biossíntese da 2'-FL inicia-se com a captação da manose por um transportador de hexose nativo presente na membrana plasmática da levedura. Uma hexoquinase a fosforila a manose-6-fosfato (M6P), que, em dois passos enzimáticos presentes no metabolismo de *K. lactis*, é convertida em GDP-manose (Figura 02). A Gmd então a converte em GDP-4-oxi-6-deoxi-D-manose, a partir da qual uma oxido-redução catalisada pela Fcl gera a GDP-L-fucose no citosol. A segunda etapa do processo ocorre após captação da lactose pelo transportador Lac permease (Lac12). A fucosiltransferase correspondente então adiciona o grupo fucosil da GDP-L-Fucose à lactose, completando a síntese da 2'-FL (CAMPOS, 2020). O esquema mostrado abaixo simplifica a via de síntese (Figura 02)



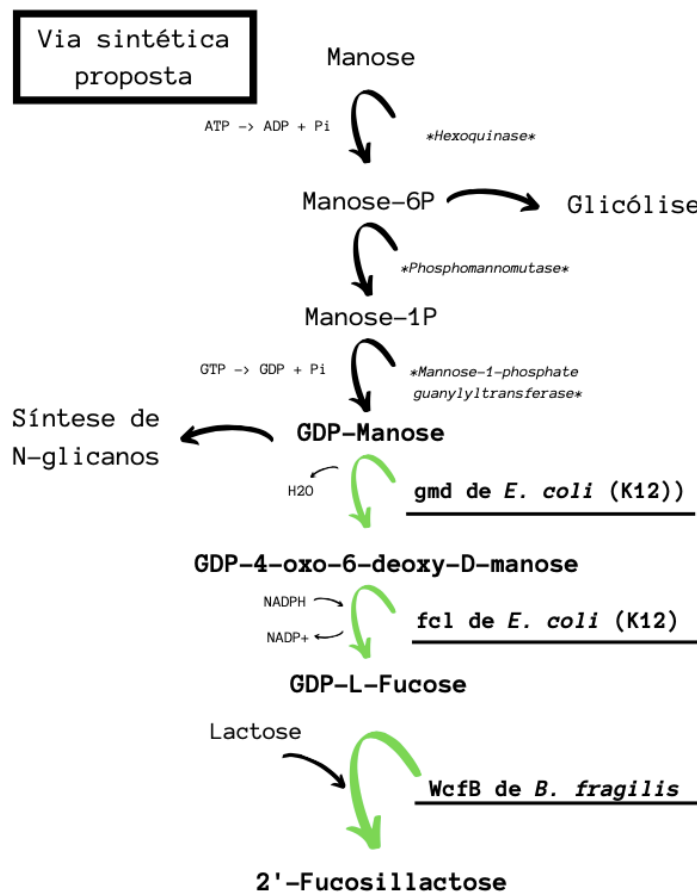


Figura 02 — Representação do metabolismo de manose, glicose com foco na biossíntese de 2'-FL da cepa K2W de *Kluyveromyces lactis*. As reações apontadas utilizando as setas pretas são representações de enzimas que são parte do metabolismo nativo do microorganismo. As setas em verde representam as modificações feitas na cepa K2W para biossíntese de 2'-FL em relação a cepa selvagem não produtora.

O processo de integração do plasmídeo pKLAC2 necessita da liberação do cassete gênico em um grande fragmento com os braços de homologia para o *locus* de destino no genoma da levedura posicionados nas extremidades. Este fragmento é gerado pela tratamento do vetor com a enzima de restrição SacII.



Figura 03 — Plasmídeo p2WF representado com os três sítios de clivagem perante a enzima SacII. Todos os processos de transformação utilizando o plasmídeo resultaram em transformações de baixa ou nenhuma eficiência.

1.5. Melhoramento do plasmídeo p2WF

O plasmídeo P2WF, contudo, além dos sítios de SacII do vetor, revelou a existência de um terceiro sítio na região do gene *gmd* (Figura 03). A presença deste sítio impossibilitaria o uso da estratégia usual de clivagem com endonuclease. Sendo assim, para produzir 2'-FL em *K. Lactis*, é necessário primeiramente melhorar o plasmídeo p2WF deletando a região intragenica de SacII e confirmar a integração dos três genes em seu genoma. Foram desenvolvidas diversas estratégias para determinar a melhor. A primeira teria como princípio transformar a levedura com o cassete gerado a partir do vetor p2WF após se eliminar o sítio de SacII extra. A linearização correta do cassete permitiria uma

maior possibilidade de cópias vir a ser integradas ao genoma da levedura (ORR-WEAVER et al., 1981).

Outro ponto a ser levantado é quem predomina, no reparo de quebras de dupla fita, em *K. Lactis*, se a recombinação homóloga (HR) ou a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ), que ocorrem com frequência variável no ciclo celular de diferentes leveduras (MAASSEN et al., 2008). Não é possível extrapolar as observações de outras leveduras como *S. cerevisiae* para *K. lactis*, cujo processo de recombinação homóloga não é necessariamente priorizado durante o processo de transformação, o que impede a integração direcionada em loci genômicos específicos (KOOISTRA et al., 2004). Estudos mostram que deleções de genes como o *KU80* podem suprimir NHEJ e favorecer HR na levedura (KRIJGER et al., 2012; KOOISTRA et al., 2004). Contudo, mutações em vias de reparo podem prejudicar a viabilidade celular ou gerar cepas extremamente instáveis para processos de integração de DNAs exógenos (FATTAH et al., 2008). É possível contornar o uso de modificações permanentes com o emprego de métodos alternativos, como o uso de hidróxiureia (HU). Esta inibe a enzima ribonucleotídeo redutase e provoca um bloqueio do ciclo celular na fase S, fase em que se observa a maior atividade de HR (TSAKRAKLIDES et al., 2015). HU já foi usada para sincronizar o ciclo celular de populações de diversos microrganismos (TSAKRAKLIDES et al., 2015; APRAIZ et al., 2017) e se mostrou eficiente no aumento de eventos de recombinação homóloga (TSAKRAKLIDES et al., 2015). O uso de HU também poderia resolver os problemas de integração do cassete gênico no genoma da levedura.

1.5.1 Métodos de detecção da molécula de 2'-FL da cepa K2W

Por ser um açúcar fucosilado, a 2'-FL pode ser identificada por técnicas baseadas em propriedades físico-químicas (BALOGH et al., 2015). A literatura relata, na maioria dos casos, a detecção de 2'-FL em

organismos geneticamente modificados por cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massa (GC/MS; do inglês *gas chromatography/mass spectrometry*; YU et al., 2018). Esta técnica se baseia na separação e análise de moléculas voláteis advindas do processo de gaseificação sequencial de compostos contidos nas amostras analisadas, de acordo com sua afinidade pela matriz de colunas de retenção, que determina diferentes tempos de eluição. Os analitos passam por um detector, que gera um espectro temporal da amostra. Quando a GC é acoplada à MS, os analitos da cromatografia são bombardeados por elétrons e fragmentados, gerando cátions, ânions e radicais que, ao serem separados por um campo elétrico, passam por um detector e são caracterizados a partir da razão entre sua massa e carga (COSTA & BAPTISTA, 2009). Uma técnica alternativa é a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) para a detecção do açúcar (YU et al., 2018). Esta também se baseia no princípio de afinidade diferencial dos analitos pela matriz de uma coluna de retenção, após cuja eluição eles são caracterizados de acordo com o espectro de absorção de UV e luz visível gerado (COSTA & BAPTISTA, 2009). Ensaio enzimáticos também podem ser usados e estão disponíveis em sistemas comerciais que utilizam um sistema de duas etapas, primeiramente pela ação de uma α -(1-2,3,4,6)-L-fucosidase na liberação da L-Fucose provinda da 2'-FL seguida da ação de uma L-fucose-desidrogenase permitindo medir os níveis de oxidação da L-Fucose pela formação de NADPH. Esta técnica tem como vantagens a rapidez e a possibilidade de se processarem simultaneamente múltiplas amostras, e a desvantagem relativa de que se a amostra gerar valores maiores que o padrão de L-fucose utilizado para construir a curva de calibração, a diluição das amostras será necessária (SEYDAMETOVA et al., 2018).

1.6 Estratégias para Otimização da produção de 2'-FL

Um dos grandes benefícios da engenharia metabólica como ferramenta para otimização de bioprocessos é sua versatilidade em estudar e modular o fluxo metabólico de uma dada via por meio da inserção, deleção, inibição ou superexpressão de genes, o que permite aumentar a produtividade de compostos de interesse (FISHER et al., 2014; CHOI et al., 2019). Intervenções no metabolismo de *K. lactis* têm o potencial de ensejar uma maior produção do oligossacarídeo em estudo. A partir da cepa K2W, existem estratégias viáveis para uma produção mais eficiente de 2'-FL.

1.6.1 Deleção da Enzima Beta-galactosidase (LAC4)

Concebendo-se um cenário com uma produção estabelecida da 2'-FL, a deleção do gene *LAC4* pode resultar num aumento da produção de 2'-FL, pois o consumo de lactose por outra via remove um dos precursores do OLM de interesse (KIM et al., 2003). A literatura relata que em uma cepa de *E. coli* geneticamente modificada para produzir 2'-FL, a deleção da beta-galactosidase aumentou a concentração final do oligossacarídeo de 23.1 g/L para 44 g/L (JUNG et al., 2019), uma estratégia que provavelmente terá efeito semelhante em *K. lactis*.

1.6.2 Adição de um transportador CDT2 de *Neurospora crassa* para efluxo de 2'-FL

Há um importante obstáculo à produção de 2'-FL em organismos geneticamente modificados, que é a inexistência de um mecanismo que permita a secreção do oligossacarídeo após sua síntese no citosol, com o resultado de que grande parte da 2'-FL fica retida intracelularmente e apenas uma pequena parcela é detectada no meio extracelular (HOLLANDS et al., 2019). Em bioprocessos, é favorável que a plataforma produtora exporte com eficiência o produto para o meio de cultura a fim de facilitar o processo de detecção e purificação. De acordo com a literatura, gene do fungo *Neurospora crassa* que codifica um

transportador de hexoses putativo (LIAN et al., 2014) poderia ser integrado ao genoma de *K. lactis* a fim de diminuir a retenção intracelular e aumentar o efluxo da 2'-FL, o que foi confirmado experimentalmente em *S. cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica* (HOLLANDS et al., 2019). O produto desse gene, chamado Cdt2, é um membro da grande família de transportadores de açúcares e atua como facilitador nos processos de difusão de hexoses entre o citosol e o meio extracelular (GALAGAN et al., 2003).

1.6.3 Deleção ou hiperexpressão de vias que envolvem a manose

Uma análise do metabolismo da manose em *K. lactis* indica que existem enzimas cuja deleção pode aumentar a produtividade da 2'-FL. Apesar de o metabolismo de manose ser pouco explorado, principalmente na levedura *K. lactis*, suas enzimas constituintes já foram identificadas (PITKÄNEN et al., 2004). Modificações no fluxo de metabólitos poderiam aumentar a disponibilidade de precursores da 2'-FL. Primeiramente, estimou-se que a deleção da enzima fosfomanose isomerase (Pmi40), que converte manose-6-fosfato (M6P) em frutose-6-fosfato (F6P), impediria o desvio da manose para a via da glicólise, que consome F6P. Sem a Pmi40, e utilizando-se o HSA como fonte de carbono, toda a M6P seria mantida na via de produção de GDP-fucose e de 2'-FL.

Outra possível medida a ser explorada seria a superexpressão de genes de enzimas endógenas de *K. lactis*. Estudos em *K. lactis* mostraram que a superexpressão do gene *PSA1*, que codifica a enzima GDP-manose-pirofosforilase, aumentaram a formação de GDP-manose (UCCELLETTI et al., 2005). A enzima codificada pelo gene em questão promove a conversão da manose-1-fosfato (M1P) em GDP-manose (GDP-Man). A superexpressão dela poderia aumentar o *pool* de GDP-Man disponível para que Gmd e Fcl produzam GDP -Fucose.

2. JUSTIFICATIVA

Pela necessidade de atender à demanda por 2'-FL para a formulação de suplementos neonatais, e de expandir a tecnologia nacional em bioprocessos industriais pela inovação do uso de um hidrolisado da semente de açaí como fonte originária de carbono para produção do oligossacarídeo, é notável a necessidade de expansão de tecnologias utilizando-se de plataformas biológicas. Diante da construção do plasmídeo p2WF, vê-se a oportunidade de explorar possíveis modificações no vetor a fim de validar a construção da cepa K2W, ponto de partida para um processo nacional de produção de 2'-Fucosil-lactose e da valorização de um resíduo de baixo valor agregado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Melhorar o vetor de expressão p2WF e desenvolver estratégias para sua integração ao genoma de *K.lactis*

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e aplicar estratégias no plasmídeo p2WF com fins de deletar o sítio de SacII intergênico
- Inserir o cassete de expressão do p2WF no genoma da cepa GG799 de *K. lactis*
- Confirmar integração do cassete no genoma da levedura

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

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

4.1.1 Microrganismos

Tabela 02 — Microrganismos utilizados durante os processos de clonagem e subclonagem. Cepas produzidas durante o estudo da biossíntese de 2'-FL

Cepa	Espécie	Modificações	Referências
		Bacterias	
DH10-β	<i>E. coli</i>	-	MCLAB (Molecular Cloning Laboratories)
BL-21	<i>E.coli</i>	-	MCLAB (Molecular Cloning Laboratories)
XL-10GOLD	<i>E.coli</i>	-	MCLAB (Molecular Cloning Laboratories)
		Leveduras	
GG799	<i>K. lactis</i>	-	NEB
K2W	<i>K. lactis</i>	p2WF + GG799	Soares et al ., 2020
K_GMDΔSaclI	<i>K. lactis</i>	PKLAGΔSaclI + GG799	Este Estudo
K2W-ΔSaclI	<i>K. lactis</i>	p2WFΔSaclI_gmd + GG799	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 03 — Vetores utilizados durante o processo de clonagem e subclonagem para a produção de 2'-FL.

Vetores	Descrição	Referencia
pKLAC2	Vetor comercial da cepa GG799 de K.lactis para integração de genes ao genoma da levedura	NEB
p2WF	Vetor comercial PKLAC2 com a inserção dos cassetes de gmd, fcl e gene wcfb em regiões do plasmídeo	Soares et al ., 2020
pGEN-T-Easy	Vetor linearizado com pontas T que permitem clonagem a partir de produtos de PCR	Promega
p2WF_KO	Vetor resultante da mutação sitio dirigida utilizando o plasmídeo p2WF como molde	Este Estudo
p2WF_Assembly	Vetor resultante da tecnica de Gibson Assembly utilizando o plasmídeo p2WF como molde	Este Estudo
pGEN-G	Vetor comercial linearizado com pontas T adicionado do produto de PCR resultante da amplificação do cassete de gmd do plasmídeo p2WF	Este Estudo
pGEN-ΔG	Vetor resultante da mutação sitio dirigida utilizando o plasmídeo pGEN-G como molde	Este Estudo
PKLACG_ΔSacII_gmd	Vetor comercial PKLAC2 acrescido do cassete de gmd mutado provindo do plasmídeo pGEN-ΔG	Este Estudo
p2WFΔSacII_gmd	Plasmídeo contendo os cassetes de gmd, sendo este provindo do plasmídeo pGEN-ΔG, fcl e gene wcfb.	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 04 — Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes e cassetes utilizados para a produção de 2'-FL, além dos oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese sítio-dirigida. As cores em azul e vermelho presentes nas sequências representam as pontas de restrição enzimáticas. O hachurado presente nos primers de *overlapping* em vermelho representa a região que ocorre a modificação da mutagênese sítio dirigida,

Nº	PRIMERS	SEQUENCIA (5' → 3')	Ponta de Restrição
3	GMD_F	ATCC CGG GTT ATG ACT CCA GCG C	SmaI
4	GMD_R	GGAC TAG TAT GTC AAA AGT CGC TCT CAT	SpeI
5	FCL_F	CAG AAT TCT TAC CCC CGA AAG CG	EcoRI
6	FCL_R	CAG GAT CCA TGA GTA AAC AAC GAG TTT TT	BamHI
7	Cas_GMD_F	GTC AGA TCT ATA GGG CGA ATT GGG T	BglII
8	Cas_GMD_R	CGC AGA TCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG	BglII
9	Cas_FCL_F	TA CCT GAG GCT CAC TAT AGG GCG AAT TG	Bsu36I
10	Cas_FCL_R	TA CCT CAG GCG CAA TTA ACC CTC ACT AA	Bsu36I
11	WcfB_F	CAT ATG TTG TAC GTC ATC TTG AGA	NdeI
12	Wfcb_R	AGG CCT TTA CAT GTT CTT CTT CCT	StuI
1	F_GMD_OVERLAPPING	AAC GAA GGT TTC GCC TCG GCG CGG GGA TTC ATG GTT	—
2	R_GMD_OVERLAPPING	AAC CAT GAA TCC CCG CGC CGA GGC GAA ACC TTC GTT	—
13	G_AatII_R	CACCAGAATATACCGCTGA CGTCGACGCGATGGGTAC GCT	—
14	G_StuI_F	GAAAGAAGAATATGTGAAG GCCTTGAATCGAGAATTTAT ACTTAG	—

4.1.4 Meios de Cultivo

• 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, adiciona-se ágar à 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, adiciona-se ágar à 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
MgCl ₂	10 mM
pH ajustado para	7,2

Para SOB ágar, adiciona-se ágar à concentração final de 1,5% (p/v).

• SOC

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 1 M previamente filtrada com filtro de 0,22 µm.

Para SOC ágar, adiciona-se ágar à 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, adiciona-se ágar à 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, a concentração final do antibiótico é de 1 µL/mL.

4.1.6 Soluções

- **Glicose 10X**

Glicose 20% (p/v)

- **MgCl₂ 1M**

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **KCl 1M**

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Acetamida 100X**

Acetamida 5,9% (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **BSA**

BSA 0,5% (p/v)

- **Brometo de Etídio**

EtBr 1% (p/v)

- **Marcadores moleculares para DNA**

1Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (250pb-14Kb); 1Kb Plus DNA Ladder, Sinapse Biotecnologia (100pb-10kb)

- **NaOAc 3M**

- **LiOAc 1M**

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **PEG**

PEG 3350 50% (p/v)

- **NaCl 1M**

- **EDTA 0,5M**

pH da solução ajustado para 8,0 com NaOH.

- **Tris-Hcl 1M**

pH da solução ajustado para 8,0 com HCl.

Esterilizada 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)

- **CaCl₂ 1M**

- **CaCl₂ 0.1M**

- **CaCl₂ 0.1M + 15% Glicerol**

4.1.7 Tampões

- **Tampão de PCR (Sinapse) 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)

• **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.

• **Mix 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

MgCl₂ 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:

- **Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)**
- **Taq DNA Polimerase (Sinapse)**
- **T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific)**
- **RNase A (Thermo Fisher Scientific)**

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

Tabela 5 — Endonucleases utilizadas no trabalho para a produção de 2'-FL.

Enzimas	Sítio de Clivagem (5'-3')	Tampão	Temperatura	Tempo de Incubamento
<i>Bsu36I</i>	CC↓TNAGG	Buffer Tango / Buffer G	37°C	1-16 horas
<i>KpnI</i>	GGTAC↓C	FastDigest Buffer	37°C	5 minutos
<i>SacII</i>	CCGC↓GG	Buffer Tango	37°C	1-16 horas
<i>DpnI</i>	GAm6↓TC	FastDigest Buffer	37°C	5 minutos
<i>BspHI</i>	T↓CATGA	Buffer O	37°C	1-16 horas
<i>BseRI</i>	ACTGGN↓	Buffer B	37°C	1-16 horas
<i>StuI</i>	AGG↓CCT	Buffer G	37°C	1-16 horas
<i>AatII</i>	GACGT↓C	Buffer Tango	37°C	1-16 horas
<i>BglII</i>	A↓GATCT	FastDigest Buffer	37°C	20 minutos

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 menores que 10kb
- Aurum™ Plasmid Mini Kit (Bio-Rad) - Purificação de plasmídeos após transformações de sub-clonagem.
 - 1.
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel) - Purificação de DNA a partir de bandas de gel de agarose maiores que 10kb

4.1.10 Equipamentos

Todas as amostras contendo material genético foram quantificadas com espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific) e todas as leituras de densidade óptica foram realizadas a 600 nm com o equipamento SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices®) utilizando cubetas de plástico transparentes de 12,5 mm X 12,5 mm.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo celular de *E. coli* em Erlenmeyer 500 mL

Para o cultivo celular de *E. coli*, erlenmeyers de 500 mL foram autoclavados a 121 °C por 20 min e incubados em estufas a 60 °C por 12 h. O estoque da cepa selvagem armazenada em ultracongeladores a -80 °C foi usado para semear placas de LB-ágar, que foram incubadas a 37 °C por 16 h. Colônias isoladas foram então inoculadas em 100 mL de meio LB e as culturas líquidas foram incubadas a 37 °C com rotação de 250 rpm por 16 h.

4.2.2 Cultivo celular de *K. lactis* em Erlenmeyer 500 mL

Para o cultivo celular de *K. lactis*, erlenmeyers aletados de 500 mL foram autoclavados a 121 °C por 20 min e incubados em estufas a 60 °C por 12 h. O estoque da cepa selvagem armazenada em ultracongeladores a -80 °C foi usado para semear placas YPD-ágar, que foram incubadas a 30 °C por 72 h. Colônias isoladas foram então inoculadas em 100 mL de meio YPD e as culturas líquidas foram incubadas a 30 °C com rotação de 200RPM por 16 h.

4.2.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi assistida pelos programas [Primer3Plus](#) e [Oligoanalyzer](#) (Integrated DNA Technologies) para uma análise *in silico* das sequências geradas. O Primer3Plus gerou possíveis iniciadores para amplificar os fragmentos desejados a partir da sequência do gene *gmd* (GenBank ID #946562) da cepa *E. coli* K12. Eles foram então submetidos ao Oligoanalyzer para determinar os melhores quanto às temperaturas de anelamento e menor formação de estruturas secundárias ou dímeros. Já os iniciadores para a técnica de Montagem de Gibson foram desenhados através do [NEBuilder Assembly Tool](#) (New England Biolabs) para a geração dos amplicons 3' e 5'. Os demais iniciadores provêm de estudos anteriores (SOARES, 2020). No processo de síntese, o iniciador 5' (GMD_OVERLAPPING_F) e o 3' (GMD_OVERLAPPING_R) para mutagênese sítio-dirigida foram purificados comercialmente por HPLC.

4.2.4 Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) e Mutagênese Sítio-dirigida.

As reações de PCR foram feitas em tubos de 0,2 mL. O volume usado em cada tubo foi de 20 µL contendo em cada tubo: i. 2 µL de tampão de PCR 10x; ii. 1,6 µL de MgCl₂ 25mM ; iii. 1,6 µL de dNTPs 10 mM; iv. 1 µL de iniciador 5' 10 mM e 1 µL de iniciador 3' 10 mM; v. 50-300 ng de DNA como molde, sendo 50 ng para ampliações com DNA

plasmidial e 300 ng para amplificações utilizando DNA genômico; e água ultra pura deionizada para completar a o volume final de reação. Foi utilizado um termociclador para promover a reação de PCR nos seguintes parâmetros:

- i. 1 ciclo de 96°C por 5 minutos;
- ii. 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, seguido de temperatura de anelamento por 30 segundos de acordo com os parametros de cada oligonucleotideo iniciador seguido de 72°C por 1 minuto correspondente à 1000 pares de base de sequência a ser amplificada;
- iii. 1 ciclo de 72°C por 2 minutos
- iv. Resfriamento a 4°C por tempo indefinido.

Para as PCRs de mutagênese sítio-dirigida, foram feitas duas reações de PCR separadas. O volume usado em cada tubo foi de 25µL contendo em cada tubo: i. 5µL de tampão de Q5 5x; ; ii. 1.0µL de dNTPs 10mM; iv. 4µL de oligonucleotíeo iniciador foward 10mM e 4µL de oligonucleotíeo iniciador reverse 10mM; v. 500ng de DNA como molde; vi. 0.25µL da polimerase Q5 Hot Start High-Fidelity e água ultra pura deionizada para completar a o volume final de reação. As reações seguiram com os seguintes parâmetros:

- i. etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min
- ii. PCR foi conduzida por 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento dos oligonucleotideos iniciadores a 55°C por 45s seguido por síntese de DNA a 72°C por 1 para cada 1 kb de sequência a ser amplificada
- iii. 1 ciclo de 72°C por 2 minutos
- iv. Resfriamento a 4°C por tempo indefinido

Após a amplificação do plasmídeo pela técnica de PCR de forma separada, os amplicons foram misturados em uma única solução e

passaram por um gradiente de temperatura para induzir uma nova desnaturação e reanelamento das fitas seguindo os parâmetros:

- i. 95°C por 5 minutos
- ii. 90°C por 1 minuto
- iii. 80°C por 1 minuto
- iv. 70°C por 30 segundos
- v. 60°C por 30 segundos
- vi. 50°C por 30 segundos
- vii. 40°C por 30 segundos
- viii. 37°C por tempo indeterminado

Após o processo de reanelamento, a suspensão de fragmentos de DNA passou por tratamento com a enzima DpnI. (4.1.8 - Tabela 5).

4.2.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Todos os amplicons e produtos de reações de restrição foram analisados em geis de agarose e TBE corados com brometo de etídio. A concentração das malhas de agarose variavam entre 0,8% e 1%, dependendo do tamanho dos fragmentos em análise. Para determinação dos tamanhos, usaram-se marcadores comerciais de DNA. A documentação fotográfica foi feita por transiluminação ultravioleta.

4.2.6 Preparo de células bacterianas termocompetentes

As linhagens DH10-B, BL21 e XL10 Gold foram preparadas pelo método de cloreto de cálcio (CaCl_2) com modificações (CHANG et al., 2017). Para cada cepa fez-se um pré-inoculo em 5 ml de meio SOC, incubado a 37 °C e 200 rpm por 16 h. Deste pré-inóculo, 1 mL foi inoculado em 99 mL de meio SOC, incubados nas mesmas condições até que a OD_{600} da cultura chegasse a 0,35. Esta então foi acomodada em gelo por 20 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e procedeu-se à lavagem com as soluções de cloreto de cálcio: o sedimento foi ressuspensionado em 20 mL de solução gelada de CaCl_2 0,1 M e incubado no gelo por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm e 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de solução gelada de CaCl_2 0.1M com glicerol a 15%. A suspensão celular foi transferida para gelo seco, distribuída em tubos pré-congelados em alíquotas de 100 μL , que foram imediatamente armazenados a -80 °C. A competência das células foi medida com o uso de plasmídeos intactos com marca de resistência à ampicilina.

4.2.7 Transformação Bacteriana

Para amplificação de plasmídeos, alíquotas das bactérias termocompetentes eram retiradas do ultracongelador e descongeladas em banho de gelo por 20 minutos. Após o descongelamento, de 10 a 50ng de plasmídeo ou sistema de ligação eram adicionados e a suspensão, incubada em gelo por mais 10 minutos. Em seguida, as células eram submetidas a um choque térmico em banho maria a 42 °C por 45 segundos e retornadas ao gelo por mais 2 minutos. Adicionavam-se então 900 μL de meio SOC à suspensão, que era incubada a 37 °C com rotação de 200 rpm por 80 minutos. Por fim, 100-200 μL da suspensão eram espalhados em placa de Petri contendo SOC ágar e antibiótico (ampicilina 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) por 16h. No dia seguinte, avaliava-se a presença de colônias isoladas.

4.2.8 Extração Plasmidial (Bactérias).

Os vetores transformados em *E.coli* foram extraídos utilizando um sistema comercial Aurum™ Plasmid Mini Kit (Bio-Rad). As colônias crescidas em meio seletivo eram inoculadas novamente em 5 mL de SOC com antibiótico em tubo de fundo cônico de 50 mL e incubados a 37 °C e 200 rpm por 16h. Após crescimento, o meio era centrifugado a

12000 g por 3 minutos e então processado de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.8 Purificação de fragmentos de restrição e amplicons

Os sistemas de restrição e PCR foram purificados com o sistema GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific) para fragmentos menores que 10kb, conforme recomendações do fabricante. Para fragmentos maiores que 10kb, usou-se o sistema NucleoSpin Gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel) conforme recomendações do fabricante. Alternativamente, as purificações foram feitas por precipitação com acetato de sódio a uma concentração de 0,3 M, seguido da adição de dois volumes de isopropanol ou etanol 100%. A precipitação foi feita por incubação a -20 °C por uma noite, seguida de centrifugação a 13400 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%, cada uma seguida de uma centrifugação a 13400 rpm por 5 minutos. Após se descartar o último sobrenadante e se secar o sedimento de DNA ao ar, o mesmo foi ressuscitado em quantidade de H₂O ultrapura apropriada para o rendimento de material genético e o uso pretendido para ele.

4.2.10 NEB Hifi (Amplificação por Montagem Gibson)

A reação foi realizada segundo as recomendações do fabricante, em tubos de 0,2 mL com um volume final de 20 µL, constituído por: 50 ng de vetor digerido; fragmentos a serem inseridos, totalizando n uma razão molar de 1:2 de cada fragmento em relação ao vetor; 10 µL do mix NEB HiFi Assembly Master; água ultrapura necessária para o volume final de 20 µL. Os sistemas foram incubados em um termociclador a 50 °C por 15 minutos e armazenados a -20 °C até o uso posterior, quando 2 µL foram utilizados para transformação bacteriana.

4.2.11 Ligação de insertos em vetores

As ligações foram feitas em tubos de 0,2 mL contendo 10 µL de volume de reação final constituído por: 1 µL de tampão 10x da T4 DNA ligase; 30 ng de vetor digerido; quantidade de inserto digerido estipulada pelo sítio [Ligation Calculator](#) numa proporção molar de 3:1 ou 1:7 em relação ao vetor; 1 µL de enzima T4 DNA Ligase; água ultrapura deionizada necessária para completar o volume final de reação. As reações foram incubadas a 4 °C durante até o dia seguinte, quando 2 µL foram utilizados para transformação bacteriana.

4.2.12 Tratamento com endonucleases de restrição

As reações de restrição realizadas neste estudo foram feitas em tubos de 0,2 mL contendo 20 µL de volume de reação constituído por:

- (a) 2 µL do tampão 10X indicado pelo manual da enzima (tabela 5);
- (b) 1 µL de enzima de restrição específica;
- (c) 1-2 µg de material genético (vetor ou inserto);
- (d) água ultrapura deionizada necessária para completar volume final de reação.

As reações foram incubadas a 37 °C pelo tempo recomendado pelo fabricante da respectiva enzima. Caso fosse necessário aumentar o rendimento, as quantidades de DNA e enzima eram modificadas respeitando-se a proporção padrão. Em caso de duplo tratamento com endonucleases, estas foram feitas sequencialmente: após a primeira, o fragmento de restrição era purificado de gel de agarose com sistemas comerciais de purificação de DNA, e então submetido à segunda clivagem.

4.2.13 Transformação em *K. Lactis*

Os cassetes gênicos contidos nos plasmídeos construídos neste estudo foram integrados ao genoma da cepa *K. lactis* GG799 através do protocolo de choque térmico na presença de acetato de lítio e PEG3350 (GIELTZ, 2017). Colônias isoladas frescas da levedura foram colhidas de placas de YPD ágar e semeadas em 10 mL de meio YPD em tubos de fundo cônico de 50 mL. Estes pré-inóculos foram incubados a 30 °C e 200 rpm por 24 h. Aferiu-se a OD₆₀₀ e calculou-se o volume necessário para o novo inóculo iniciar seu crescimento com OD₆₀₀ de 0.3 num volume de 50mL de YPD em erlenmeyer de 500mL aletado estéril. O inóculo foi incubado a 30 °C e 200 rpm até a OD₆₀₀ chegar a 2. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 25 mL de água ultrapura estéril gelada e centrifugado a 4 °C e 3000 g por 5 minutos. A lavagem foi repetida e o sedimento final foi ressuspensionado em 1 mL de água ultrapura estéril gelada e transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril. A suspensão foi novamente centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi resuspensionado novamente em 1 mL de água ultrapura estéril e distribuído em alíquotas de 100 µL em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estéreis. Cada tubo recebeu 360 µL do mix de transformação, o sistema foi misturado brevemente em vórtice mecânico e então incubado a 42 °C por 40 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada novamente a 12000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi resuspensionado em 1 mL de água ultrapura estéril gelada e foram plaqueadas alíquotas de 100, 200 e 700 µL em YNB-ágar contendo acetamida. As alíquotas foram espalhadas com auxílio de pérolas de vidro estéreis. As placas foram incubadas em estufas a 30 °C por 76 h e os clones foram selecionados conforme apareciam no meio de seleção auxotrófica.

4.2.14 Extração de DNA genômico de *K. lactis*

O DNA genômico usado no trabalho foi obtido de acordo com o protocolo "Bust N Grab", com alterações (HARJU et. al, 2004). Colônias em ágar foram semeadas em 5 mL de meio líquido (YNB-acetamida ou YPD) e incubadas a 30 °C e 200 rpm por 18 h. Após crescimento, 2 mL da suspensão foram centrifugados a 4000 g por 10 minutos. O sedimento então foi suspenso em 200 µL de tampão de lise e vortexado por 3 minutos. O tubo foi mantido a -80 °C por 3 minutos e depois colocado em banho-maria a 95 °C por 2 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes, com 1 minuto de agitação em vórtice entre cada repetição. Adicionaram-se então 200 µL de fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (25:24:1) à suspensão. A amostra foi vortexada novamente e centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm. A fase superior da suspensão foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e acrescentou-se a este 1 mL de etanol absoluto. A amostra foi então incubada a -80 °C por 1 hora e centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, lavado com etanol 70% duas vezes e secado ao ar. Os sedimentos secos foram ressuspensos em de 30 a 50 µL de H₂O ultrapura, e a concentração de DNA foi aferida com auxílio de um espectrofotômetro Nanodrop (ThermoFischer).

5. Resultados

5.1 Clivagens alternativas do plasmídeo p2WF com as endonucleases de restrição BspHI e BseRI

Na impossibilidade de se usar SacII, várias enzimas foram testadas como primeira estratégia para liberar o cassete gênico e promover sua integração ao genoma da levedura. Ao analisar o mapa de restrição do plasmídeo, duas possíveis endonucleases foram identificadas para minimizar o tamanho das regiões não homólogas e consequentemente aproximar das extremidades os braços de homologia à região de

integração no promotor LAC4 do genoma de *K. lactis*. Dentre as alternativas, a primeira testada foi BspHI (Figura 04, representado em 1). Analisando-se o mapa de restrição pelo programa SnapGene®, a clivagem resultaria em um cenário com a liberação da marca de seleção de Ampicilina (Amp⁺) do plasmídeo, diminuindo a área não homóloga e possivelmente viabilizando a integração do cassete ao genoma. A segunda alternativa foi a endonuclease BseRI (Figura 04, representado em 2). O padrão de corte resulta em um cenário onde somente um dos braços de homologia do plasmídeo (proveniente da região 3') seria liberado para integração. O outro braço de homologia (proveniente da região 5') não seria liberado.

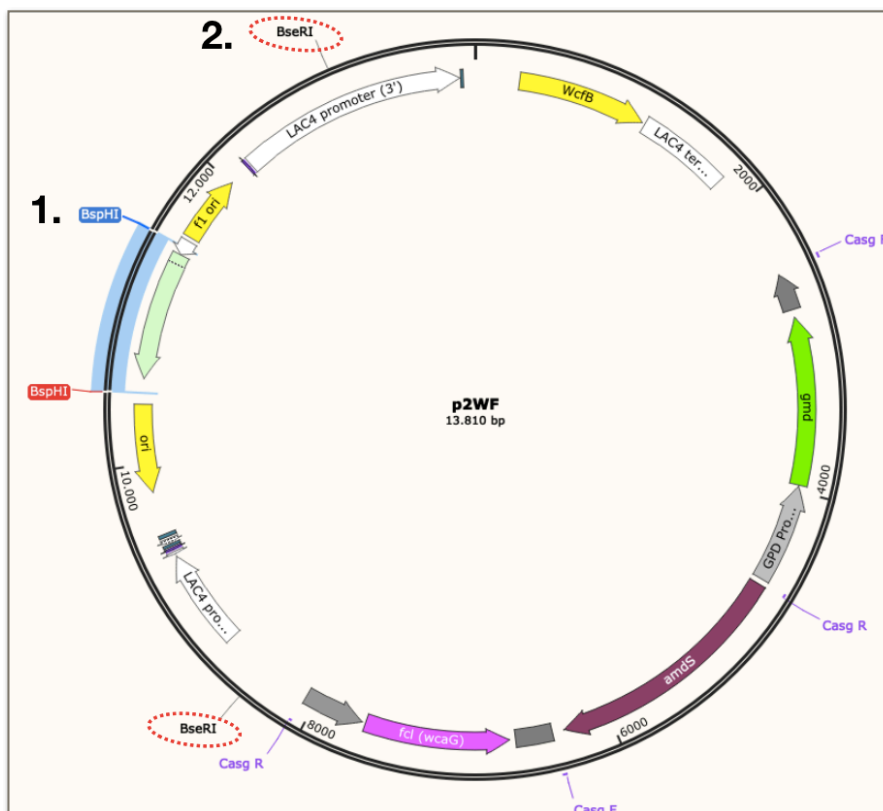


Figura 04 — Padrão de clivagem com as endonucleases BspHI (número 01) e BseRI (número 02) a fim de diminuir a região não homóloga do sítio de integração da levedura no plasmídeo P2WF.

Ao se analisar o padrão de bandas geradas por BspHI à eletroforese (4.2.5), notou-se a liberação prevista do fragmento de 1 kb correspondente à região da marca de seleção de ampicilina e, conseqüentemente, o fragmento de 12,8 kb correspondente ao restante do vetor e contendo o cassete gênico. A clivagem com BseRI gerou 3 bandas (7,7kb, 4,5kb e 1,6 kb) com tamanhos diferentes do previsto no modelo predito pelo software (liberação de apenas dois fragmentos de 9,3kb e 4,5 kb) (Figura 05).

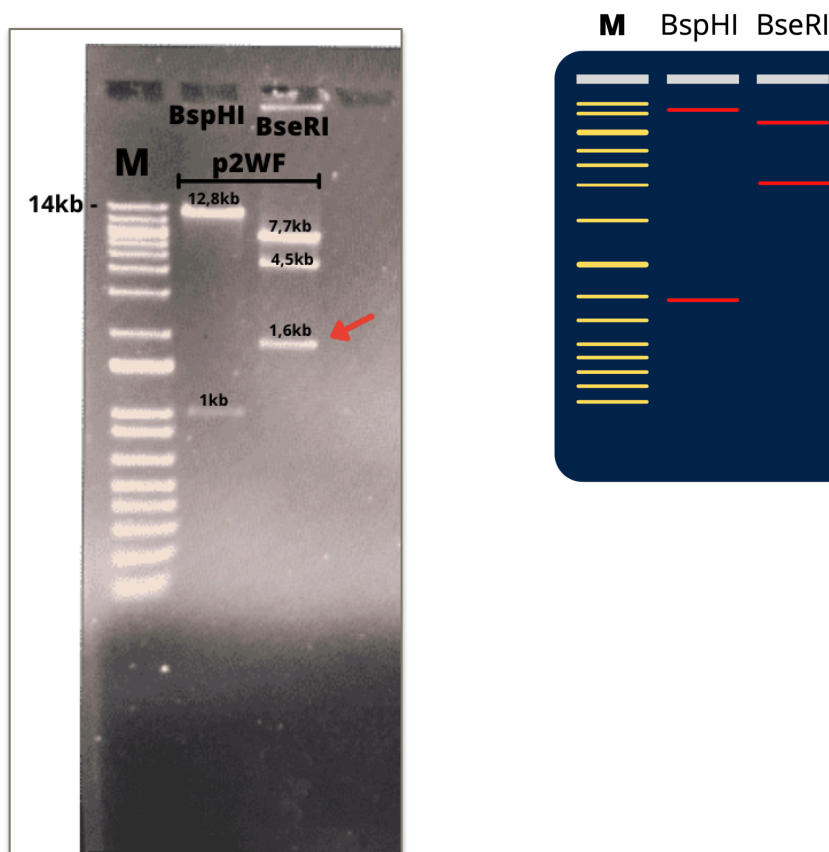


Figura 05 — Produto do tratamento com endonucleases BspHI e BseRI, respectivamente, em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Invitrogen). No gel, o poço com a clivagem de BspHI há liberação de 2 fragmentos (12,8kb e 1kb, respectivamente) previstos no modelo *in silico*, ao passo que o poço de BseRI, liberou 03 fragmentos (7,7kb, 4,5kb, 1,6kb). Projeção *in silico* a direita

Diante do imprevisto, hipotetizou-se a possibilidade de haver outros sítios de BseRI no plasmídeo. A região do *wcfb* foi reanalisada, visto que este gene foi sintetizado e otimizado para *K. lactis*, podendo ter

modificações em sua sequência gênica (SOARES et. al., 2020). Ao se verificar a sequência sintética do gene, encontrou-se um sítio de BseRI. Refazendo-se a análise levando-se em conta o novo sítio (Figura 06), o padrão de bandas alinhou-se com o que foi observado no gel de agarose explicando assim o resultado da eletroforese da Figura 05. Com a presença de um terceiro sítio de BseRI, esta enzima foi descartada e se prosseguiu somente com a estratégia de BspHI.

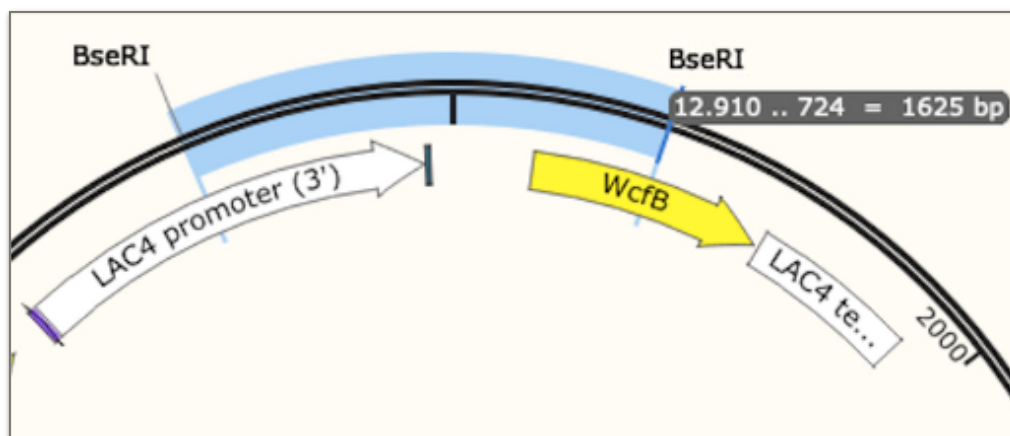


Figura 06 — Avaliação do sítio de BseRI presente na região intergênica do gene WcfB (sequência otimizada).

5.2. Estudo *in silico* para mutagênese sítio-dirigida do sítio de SacII na região do gene *gmd*

Diante da necessidade de integrar o plasmídeo, além das tentativas através de tratamentos com endonucleases (5.1), estudou-se também a possibilidade de eliminar o sítio de SacII no gene *gmd* através da técnica de mutagênese sítio-dirigida. Com o programa SnapGene®, simulou-se o alinhamento de oligonucleotídeos iniciadores (F_GMD_OVERLAPPING e R_GMD_OVERLAPPING) com modificação em uma única base, a mudança de uma guanina para uma timina na região de clivagem a fim de eliminar o sítio de SacII (Figura 07). A mudança de base para eliminar o sítio acontece na terceira base de um códon de arginina, e não muda o aminoácido (mutação silenciosa).

5.3 Mutação sítio-dirigida para deleção do sítio de SacII utilizando o plasmídeo p2WF

O produto da mutagênese sítio-dirigida (4.2.4) logo passou por um tratamento enzimático utilizando a endonuclease DpnI para a clivagem das fitas não metiladas resultantes do processo de reanelamento e a obtenção somente do plasmídeo contendo a disrupção do sítio de SacII. O material foi utilizado para transformação bacteriana na linhagem DH10-B de *E. coli* e realizada uma extração de DNA para análise do plasmídeo mutado, chamado de p2WF_KO. Após tratamento com a endonuclease SacII (4.2.8) seguida de eletroforese em gel de agarose (4.2.5), observaram-se dois fragmentos de DNA, em vez de três como no plasmídeo p2WF original. No entanto, apesar de o número de bandas corresponder ao modelo *in silico* do plasmídeo mutado, os tamanhos dos fragmentos, de 8kb e 2,9 kb, não condiziam com o esperado (Figura 08).

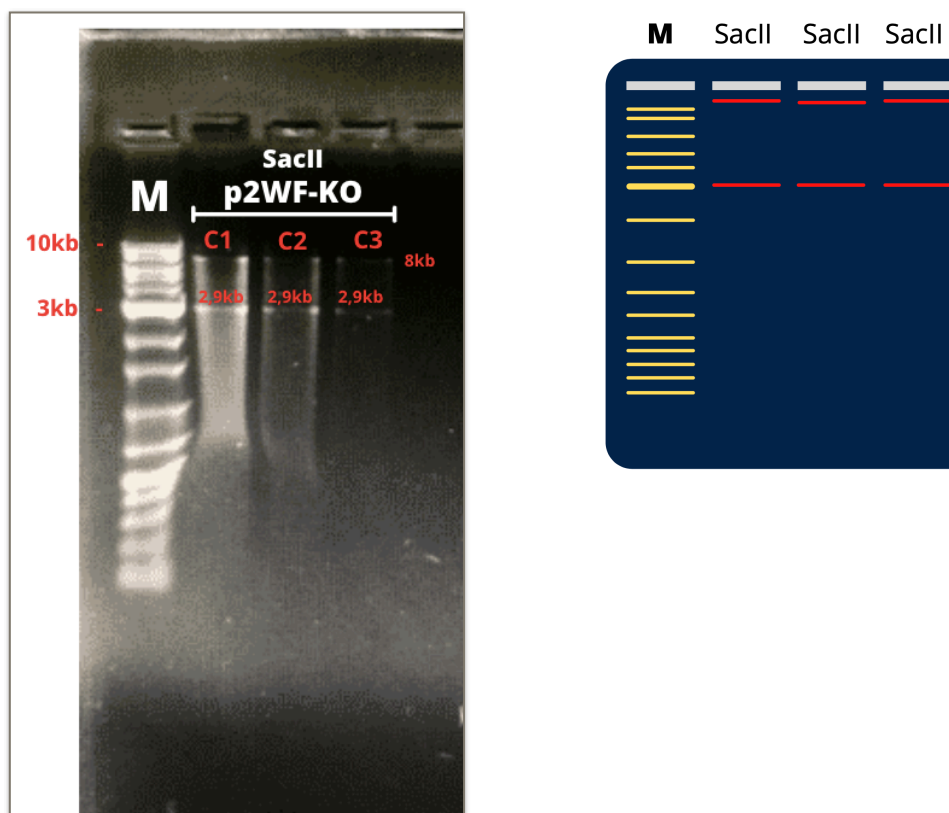


Figura 08 — Produto do tratamento com endonuclease SacII utilizando o plasmídeo p2WF_KO em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse). No gel há liberação de 02 fragmentos (8kb e 2,2kb, respectivamente). Projeção *in silico* a direita

Diante da situação, buscou-se descobrir o motivo para o tamanho do plasmídeo diferir do previsto. Fez-se um tratamento com a endonuclease BamHI, escolhida por ter sítio na região do gene *gmd*, permitindo avaliar um perfil de restrição distinto do de SacII. O fragmento de restrição esperado de 3,8 kb, porém, não foi observado à eletroforese.

Também foram feitas PCRs para amplificar o cassete de *gmd* no plasmídeo mutado, porém não houve amplificação da região, em contraste com o controle positivo usando o vetor não mutado, que mostrou um amplicon de 2,1 kb condizente com o tamanho esperado. Ou seja, tanto o tratamento com BamHI quanto a PCR indicaram uma perda na região do gene *gmd*. Postulou-se que, durante a mutagênese sítio-dirigida, o plasmídeo perdeu parte de sua sequência na região do cassete de *gmd*, o que explicaria o menor tamanho de plasmídeo obtido e inviabiliza seu uso para transformação da levedura (Figura 09).

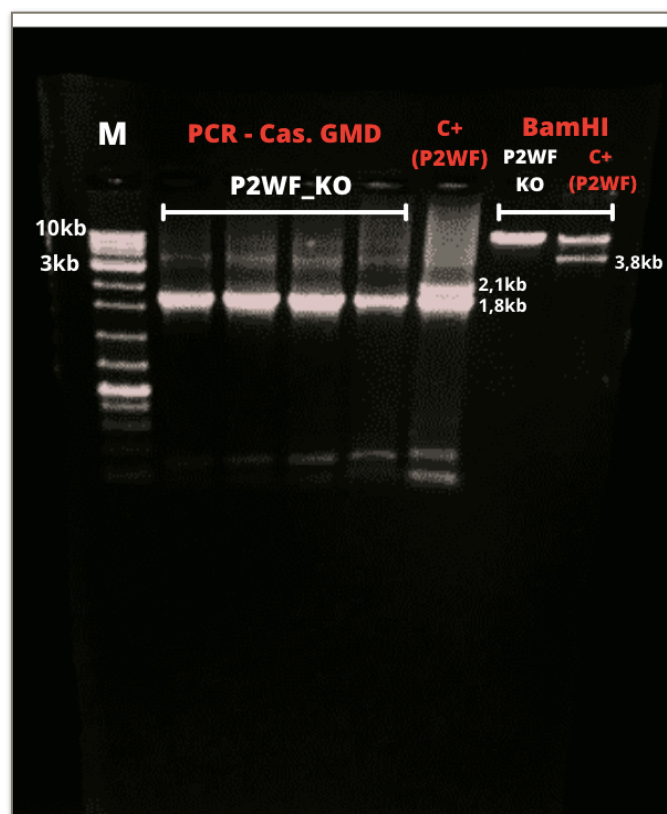
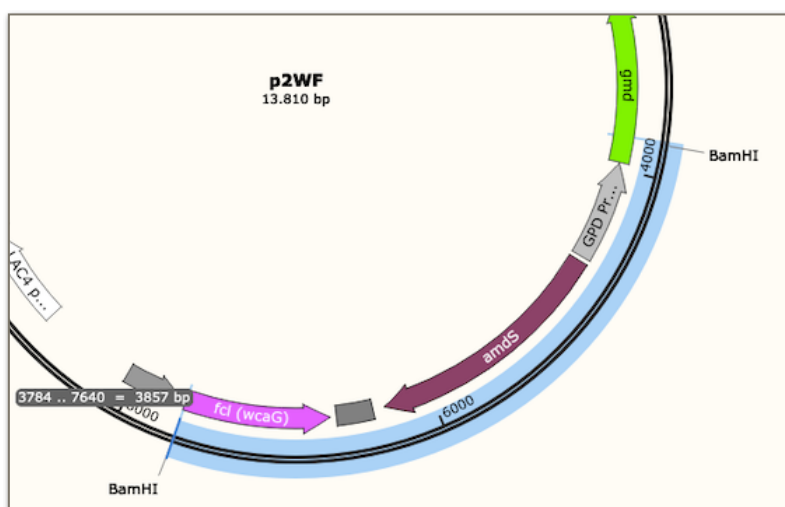


Figura 09 — Avaliação do plasmídeo P2WF_KO. Cinco primeiros poços após o Marcador: produtos de PCR com amplicons respectivos ao cassete de GMD (2,1kb) e FCL (1,8kb) . Em seguida aos poços, produto do tratamento com endonuclease BamHI (3,8kb) do plasmídeo p2WF mutado (P2WF_KO) e controle, respectivamente. Gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse)

5.4 Método NEB HiFi (Montagem Gibson) utilizando o plasmídeo p2WF para a disrupção do sítio de SacII

Diante da falha da mutagênese sítio-dirigida com o p2WF, outra técnica foi implementada para tentar solucionar o problema do sítio de SacII. Desenhou-se uma nova estratégia utilizando o sistema de montagem NEBuilder Hifi (4.2.10), baseado no princípio de montagem de Gibson, técnica molecular que permite a união de múltiplos fragmentos de DNA em uma única reação (GIBSON et. al, 2009). A estratégia teve três etapas:

1) A liberação de parte do vetor através de um tratamento duplo com as endonucleases AatII e StuI (Figura 10);

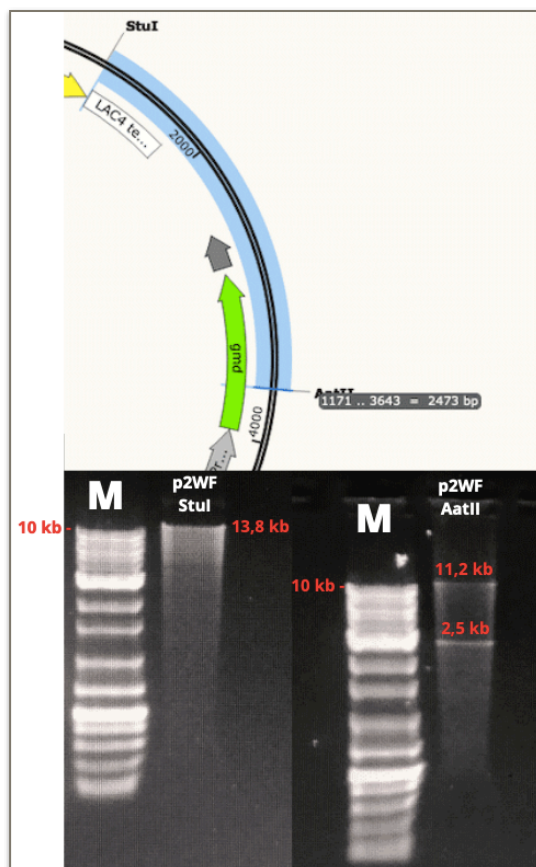


Figura 10 — Produto de clivagens seriadas de endonucleases StuI (13,8kb), linearizando o plasmídeo, seguida da clivagem com a endonuclease AatII (11,3kb e 2,5kb), respectivamente. Realizado em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse)

2) A amplificação de fragmentos da região 5' (StuI-SacII) e 3' (AatII-

SacII) partindo da sequência da região do sítio de SacII do cassete de *gmd* como ponto de sobreposição entre os amplicons. Reaproveitaram-se os iniciadores usados na mutagênese sítio-dirigida (F_SACII_OVERLAPPING e R_SACII_OVERLAPPING) juntamente com novos oligonucleotídeos, contendo caudas 5' não-pareadas, e tendo como alvos as regiões dos sítios de StuI e AatII (G_StuI_F e G_AatII_R; Figura 11).

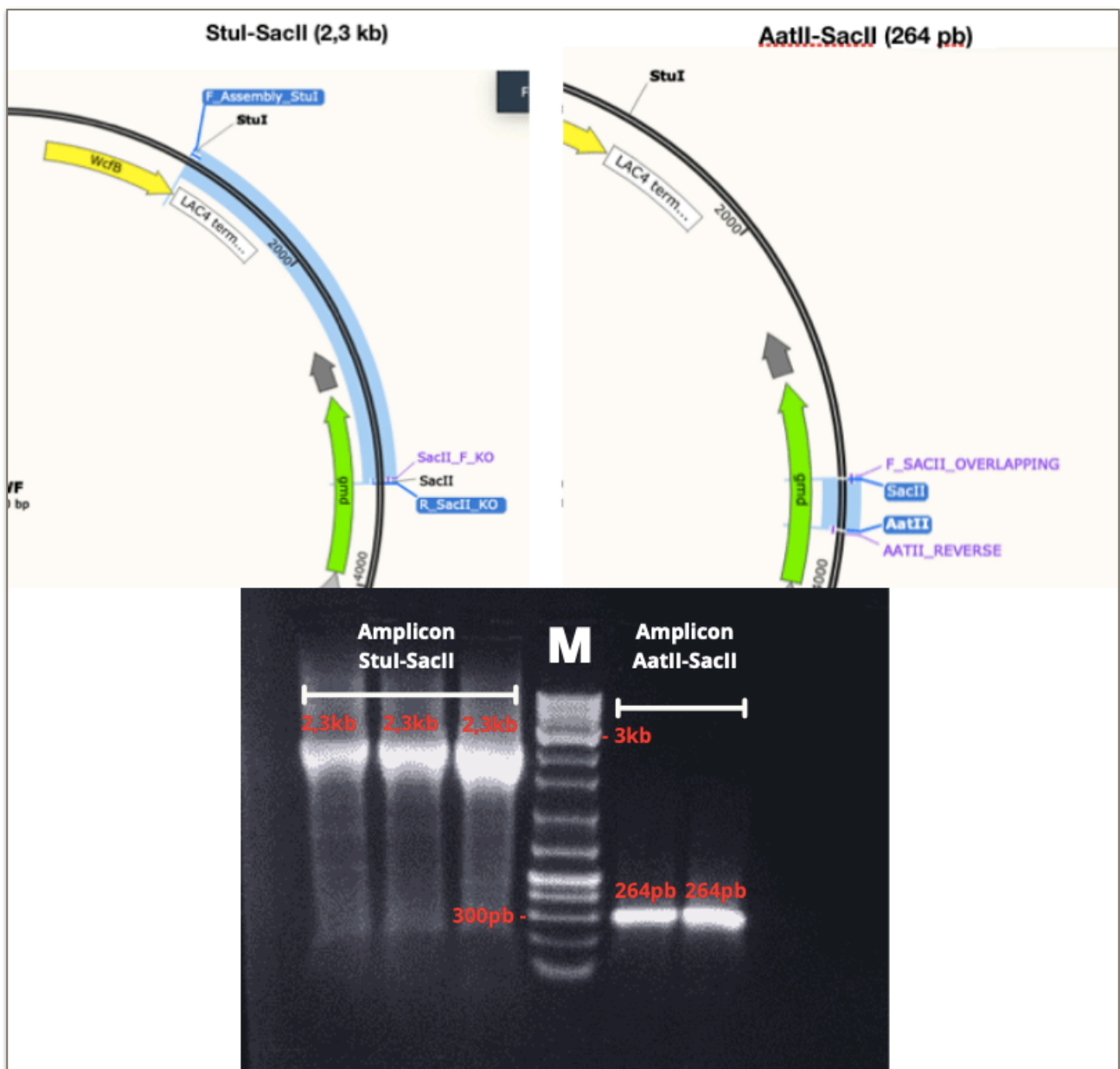


Figura 11 — Produto de PCR resultando nos amplicons para formação do Gibson Assembly (2,3kb e 264pb, respectivamente) utilizando plasmídeo p2WF como DNA amplificador, em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse)

3) Ligação dos amplicons com a base mutada ao vetor descrito na etapa 1 através da técnica de montagem de Gibson.

O produto da montagem foi utilizado para transformação bacteriana na linhagem DH10-B de *E. coli*. Após a extração plasmidial de cultura líquida da única colônia obtida, digeriu-se o plasmídeo gerado, denominado de P2WF_Assembly, com SacII. O perfil de restrição obtido diferiu do previsto pelo modelo *in silico*, apresentando três fragmentos, de 8kb, 4kb e 2,8 kb, indicando que o sítio não foi eliminado (Figura 12).

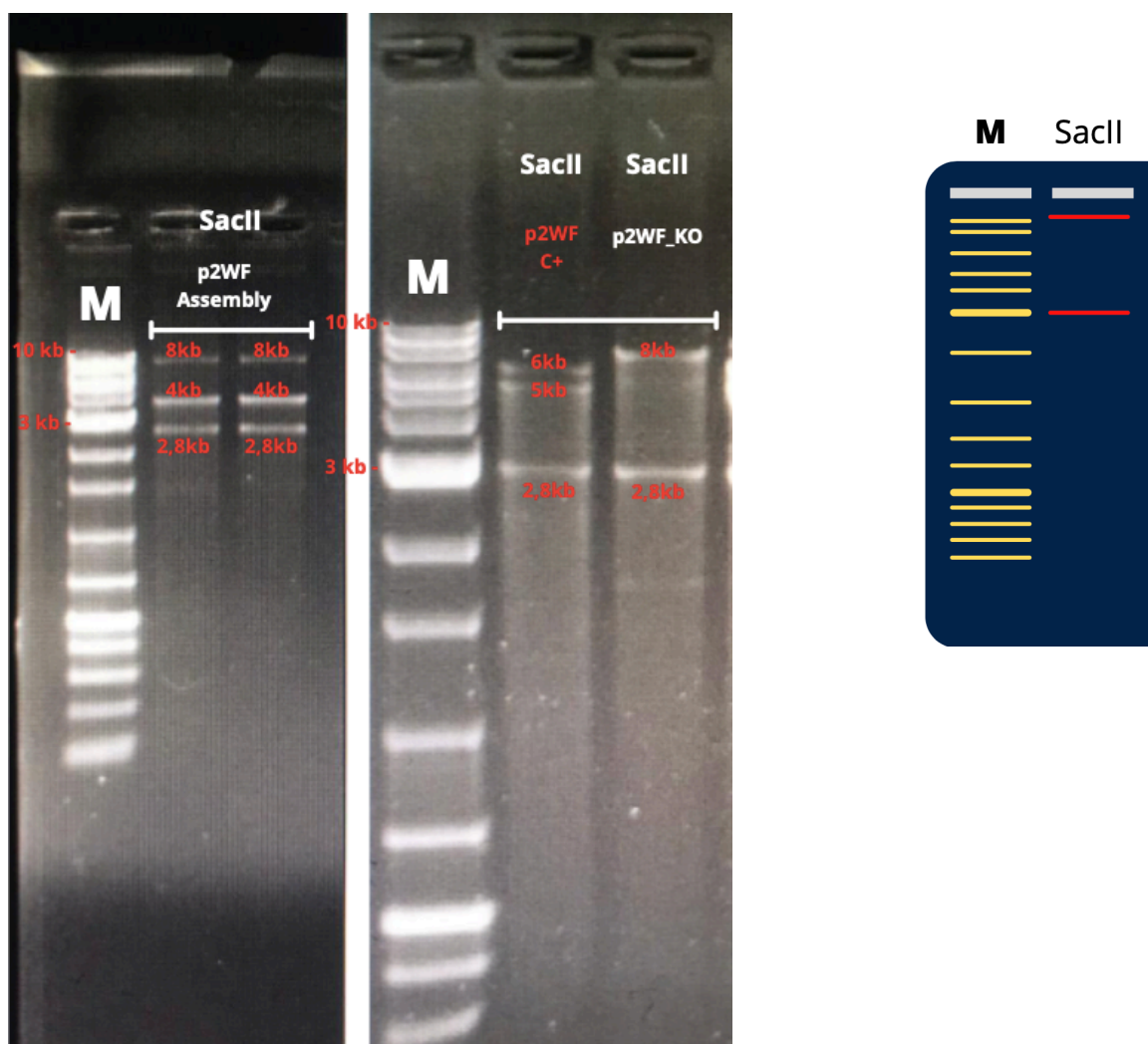


Figura 12 — Produto do tratamento com endonuclease SacII utilizando o plasmídeo p2WF-Assembly mutado, comparando com o plasmídeo p2WF original e o p2WF_KO respectivamente, em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse). Projeção *in silico* a direita

Tratamentos adicionais foram feitas com as endonucleases *StuI* e *KpnI* para melhor entender o ocorrido, com a hipótese de rearranjos aleatórios entre os amplicons durante a montagem. O tratamento com *StuI* liberou dois fragmentos de tamanhos 1,5kb e 500pb, quando o esperado seria uma simples linearização. A com *KpnI* provocou uma série de clivagens semelhantes a um efeito estrela no plasmídeo, quando deveria ter sido liberado um fragmento de 3,9 kb. Uma PCR para o cassete de 2,1 kb do *gmd* não gerou o amplicon esperado, confirmando que o plasmídeo obtido foi produto de um rearranjo (Figura 13).

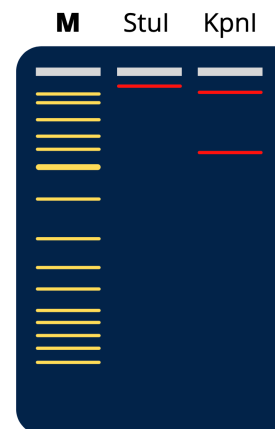
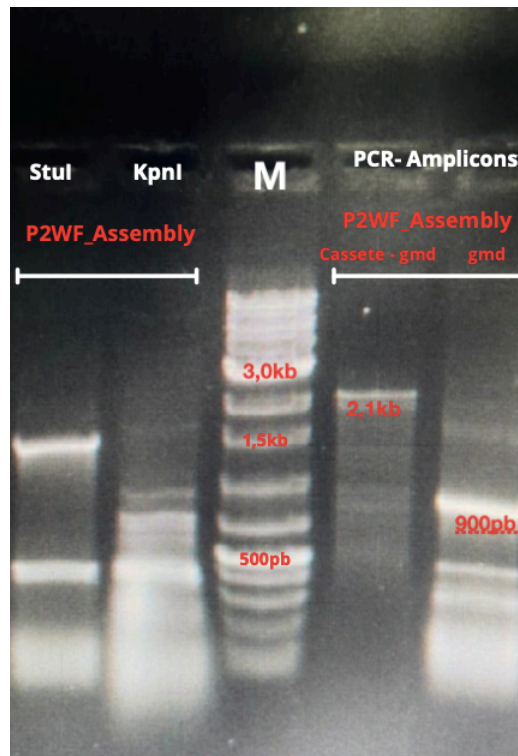
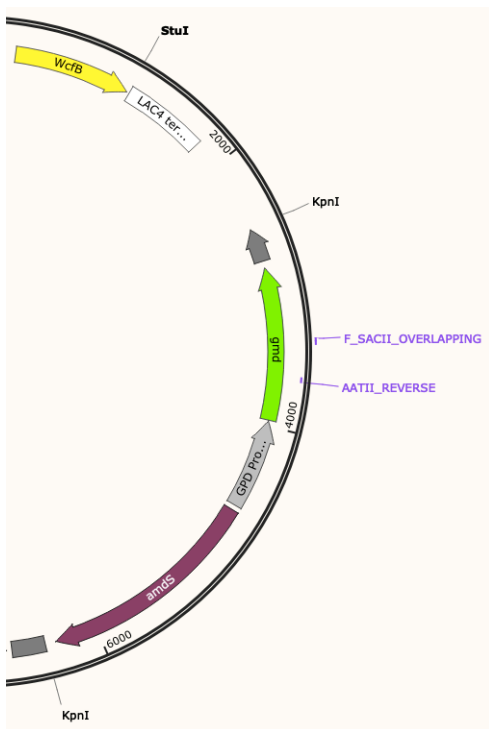


Figura 13 – Produto de tratamento com endonuclease *StuI* e *KpnI* utilizando o plasmídeo p2WF_Assembly mutado, respectivamente, em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse). Ao lado direito do marcador produto de PCR do cassete de *gmd* e do gene *gmd* utilizando o plasmídeo p2WF_Assembly como molde. Projeção *in silico* a direita

5.5 Mutagênese sítio-dirigida do sítio de SacII utilizando pGEN-GMD

Em busca de outras formas de eliminar o sítio de SacII, optou-se novamente pela técnica de mutagênese sítio-dirigida, mas partindo de um plasmídeo intermediário menor. Amplificou-se o cassete de *gmd* e este foi ligado a um vetor pGEN®-T-Easy. A ligação foi confirmada por eletroforese do plasmídeo resultante digerido pela endonuclease BglIII, que relibera o fragmento de 2,1 kb correspondente ao cassete e um de cerca de 3 kb correspondente ao vetor (Figura 14).

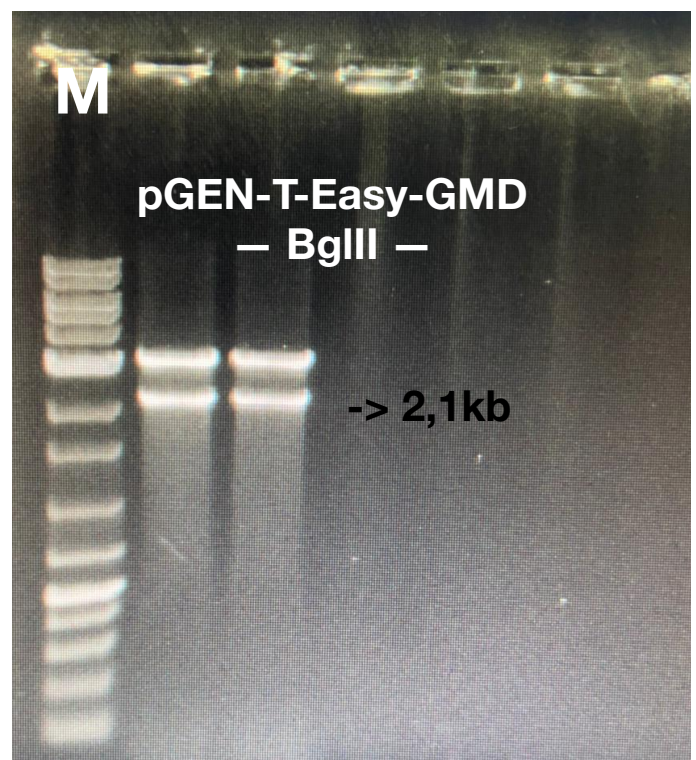
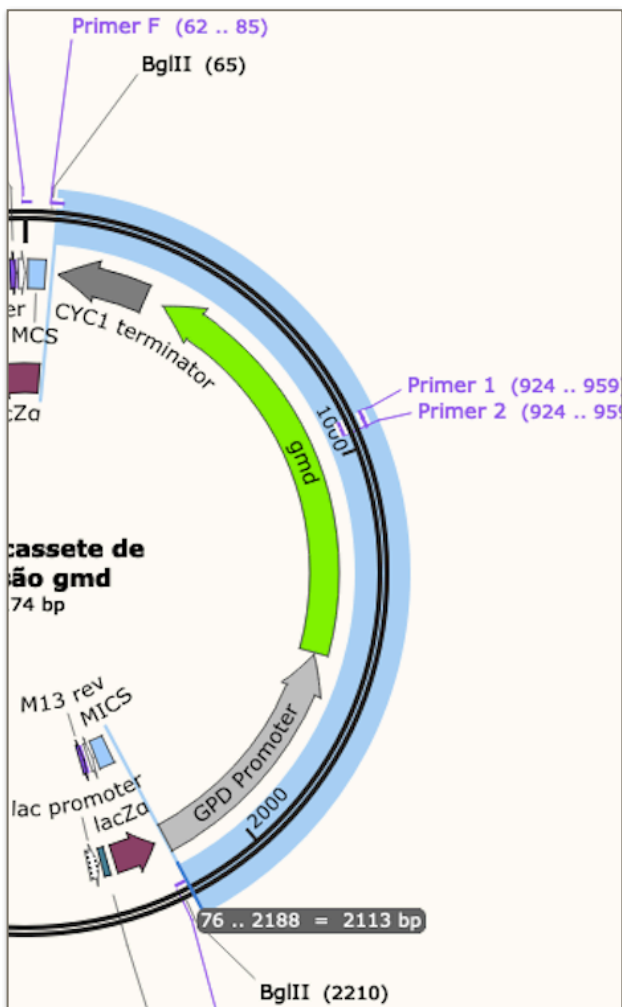


Figura 14 — Produto do tratamento com endonuclease BglIII para confirmação da ligação do cassete de GMD no plasmídeo pGEN-T-Easy. Gel de agarose, 1% corado com brometo de etídio . Ladder 1kb Plus (Sinapse)

O vetor resultante, chamado pGEN[®]-GMD, foi molde para nova mutagênese com a técnica de SPM. Duas colônias de transformantes foram obtidas e tiveram seu plasmídeo extraído para confirmação da presença do cassete e do próprio gene *gmd* por PCR (Figura 15). Também realizou-se clivagens com *Sac*II para determinar o perfil de restrição. À eletroforese, os amplicons de ambos os transformantes corresponderam aos tamanhos esperados do gene e do cassete. O perfil de restrição com *Sac*II mostrou uma série de clivagens parciais do plasmídeo com diferentes perfis de bandas, em contraste com o controle de plasmídeo não mutado que liberou um fragmento de 900 pb condizente com o predito pelo programa SnapGene[®]. Tratamentos com *Sac*II somente são eficientes quando dois ou mais sítios estão presentes no DNA alvo (GOWERS et. al, 2004). A ocorrência de clivagens inespecíficas suscitou a hipótese de que o sítio de *Sac*II do *gmd* tivesse sido efetivamente eliminado como esperado, causando um perfil de anômalo pela ação da enzima num plasmídeo com apenas um sítio de restrição. O plasmídeo com a possível eliminação do sítio foi chamado de pGEN-ΔGMD. (Figura 15)

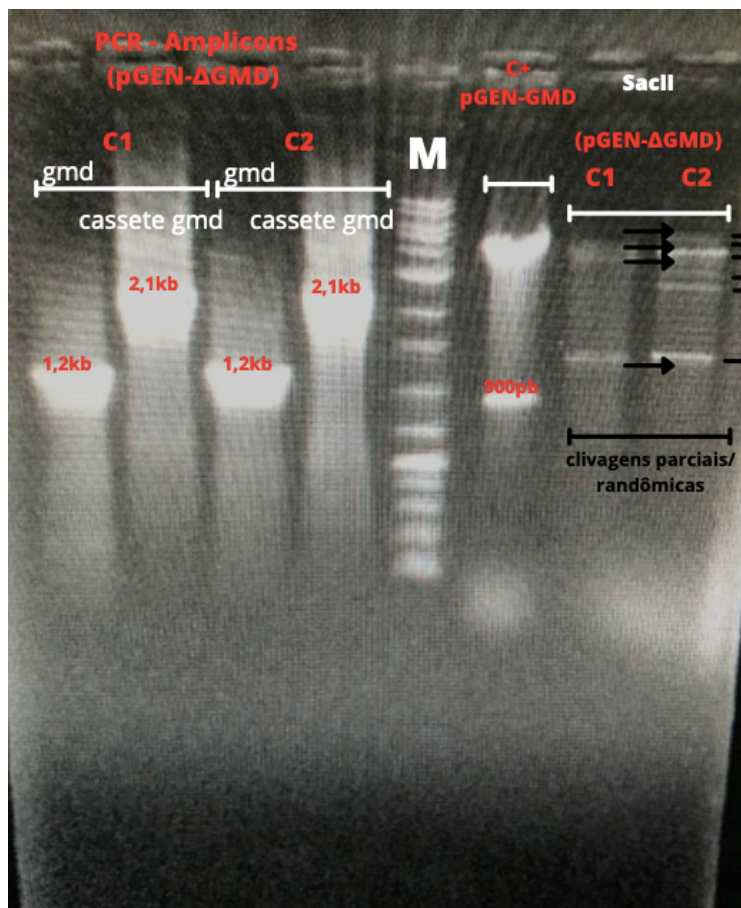


Figura 15 — Produto do tratamento promovido por endonuclease *SacII* para avaliação da possível disrupção do sítio de *SacII* na região intergênica do GMD no plasmídeo pGEN-T-Easy mutado. A esquerda, produtos de PCR mostrando que tanto o cassete de *gmd* quando o gene se preservaram no processo da técnica de SPM. Gel de agarose, 1% corado com brometo de etídio . Ladder 1kb Plus (Sinapse)

5.6 Ligação do fragmento mutado aos vetores pKLAC2 e p2WF.

O plasmídeo pGEN- Δ GMD foi digerido com *BglIII* para liberar o cassete de *gmd*, agora possivelmente livre do sítio de *SacII*. O fragmento correspondente ao cassete foi separado por eletroforese e purificado com um sistema comercial (4.2.8). O produto da purificação foi ligado primeiramente ao vetor vazio pKLAC2, nova clivagem com *BglIII* confirmou a inserção do cassete, gerando o plasmídeo pKLACG. Em seguida, para verificar a possível eliminação do sítio, o plasmídeo foi digerido com *SacII*. À eletroforese, viram-se dois fragmentos, de 8,4kb e 2,9 kb, condizentes com esperado na ausência de um terceiro sítio de *SacII*, e em contraste com o controle, confirmando que a enzima não possuía mais um sítio no cassete *gmd*, permitindo o uso deste para gerar o vetor final e da enzima para liberar o cassete completo dos três genes e com regiões de homologia ao promotor LAC4 nas extremidades. O plasmídeo com sítio mutado foi chamado de pKLACG_ Δ SACII (Figura 16).

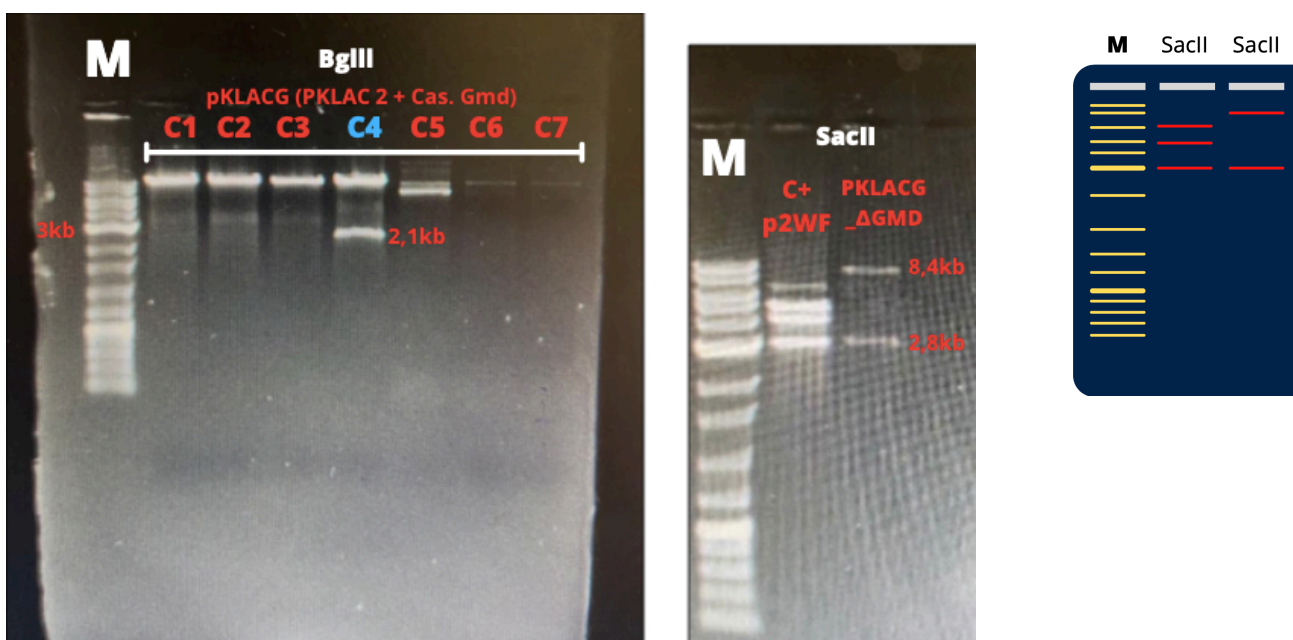


Figura 16 — Produto do tratamento promovido por endonuclease *BglIII* para confirmação da ligação do cassete de GMD no plasmídeo pKLAC2. Gel de agarose, 1% corado com brometo de etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse). Projeção *in silico* a direita

Confirmada a eliminação do sítio no novo cassete, o plasmídeo p2WF original foi digerido com BglII para liberar o cassete de *gmd* antigo. O plasmídeo digerido foi purificado de gel de agarose com um sistema comercial (4.2.8) e ligado ao cassete de *gmd* mutado provindo do plasmídeo pGEN-ΔGMD. Após a clonagem em bactéria e extração de DNA plasmidial, o plasmídeo foi novamente digerido com SacII e, à eletroforese, observou-se a liberação de uma banda de 2,9kb e um fragmento de 10,2 kb, correspondente ao perfil predito (Figura 18). O plasmídeo final sem o sítio de SacII no cassete *gmd* foi renomeado de p2WF_ΔSACII.

5.7 Transformação do plasmídeo p2WF, pKLACG_ΔSACII e p2WF_ΔSACII em *Kluyveromyces lactis*

5.7.1 Transformação utilizando o p2WF tratado com BspHI

A produto da clivagem com BspHI foi usado para transformar *K. lactis*. Estimava-se que com a liberação do fragmento de ampicilina, os braços de homologia do vetor poderiam ser suficientes para recombinar com a região do promotor LAC4. Ao se avaliarem os transformantes, as poucas colônias obtidas eram muito pequenas. Cinco foram então selecionadas para cultivo em meio líquido em YNB Acetamida. Nenhum dos inóculos cresceu após 24 h de incubação, sugerindo a possibilidade de serem colônias falso-positivas que tiveram crescimento adjacente por uma possível sobre de meio líquido provindo do processo de transformação e que se desenvolveram na placa de forma simultânea sob as colônias em contato com o meio auxotrófico.

5.7.2 Transformação utilizando PKLACG_ΔSacII tratado com SacII.

Confirmada a eliminação do sítio de SacII, o plasmídeo foi linearizado e transformado na levedura. Analisaram-se 20 clones (C1-C20) por PCR de seu DNA genômico para o gene *gmd*. Constatou-se amplicon em três (C10, C12 e C15), cujo tamanho de 1,2 kb corresponde ao tamanho do gene (Figura 17). Com a confirmação da integração ao genoma da levedura e da possibilidade de se transformar *K. lactis* com eficiência, procedeu-se à substituição do cassete *gmd* no plasmídeo p2WF original (5.6).

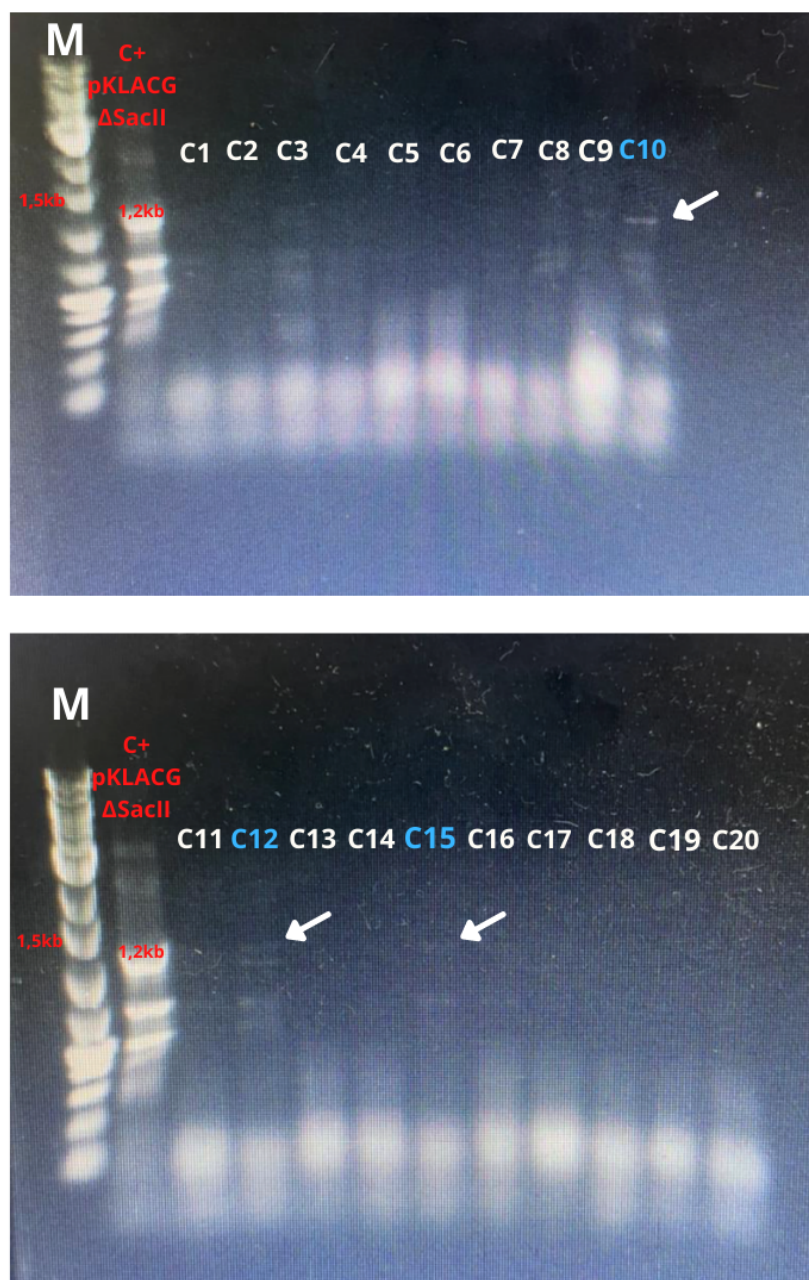


Figura 17 — Produto de PCR resultando nos amplicons para *gmd* utilizando o DNA genômico de cada levedura transformada (C1-C20) como DNA amplificador, em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse)

5.7.3 Transformação utilizando p2WF_ΔSACII tratado com SacII.

Confirmada a geração do cassete completo linear (Figura 18), o mesmo foi transformado em *K. lactis*. Após extração do DNA genômico das colônias transformantes, verificou-se por PCR a presença dos cassete de *gmd* e *fcl*, e do gene *wcfb* usando iniciadores específicos (CAS_FCL_F, CAS_FCL_R, CAS_GMD_F, CAS_GMD_R, WCFB_F e WCFB_R respectivamente). Confirmou-se à eletroforese a presença dos três genes em uma colônia (C2), enquanto que as demais apresentam apenas alguns dos amplicons. A presença dos respectivos amplicons de 1,8kb e 2,1kb e de 860pb na C2 confirma a integração dos três genes ao genoma da levedura. A cepa foi denominada K2W_ΔSACII e criopreservada a -80 °C em glicerol 30%.

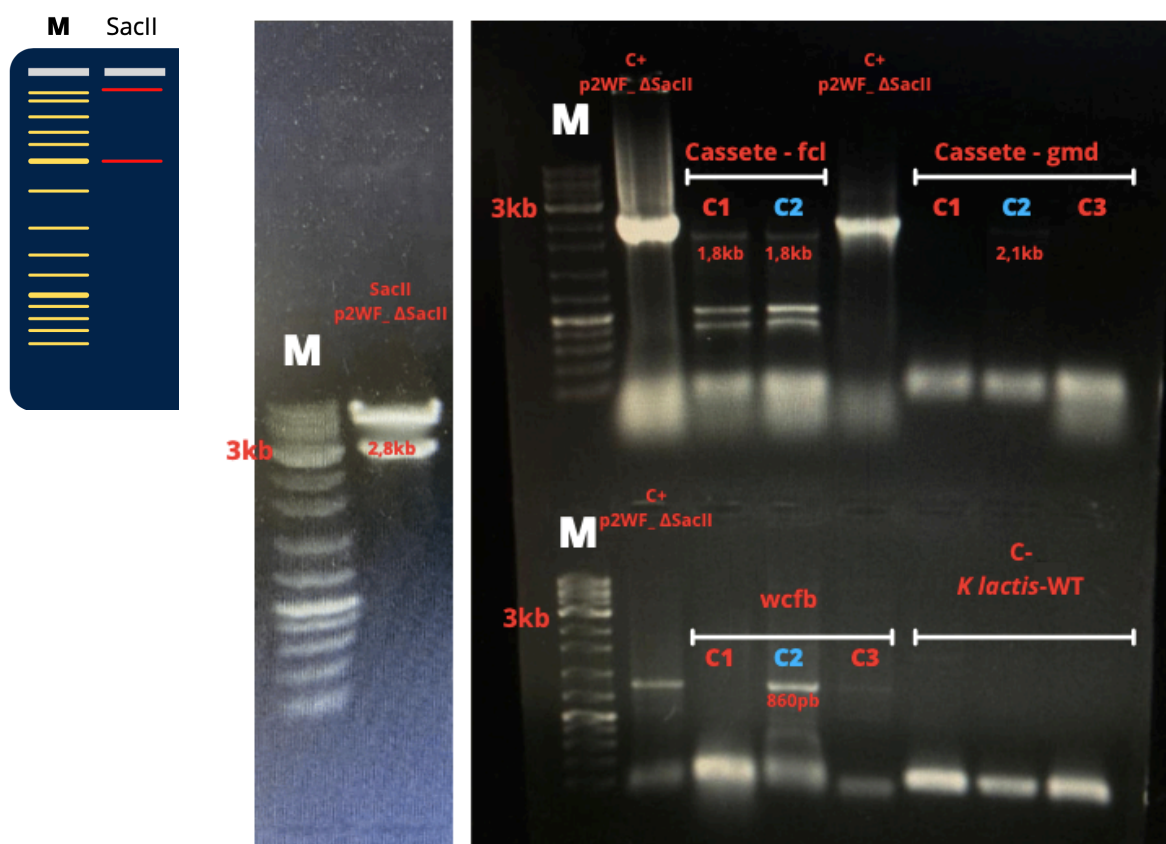


Figura 18 — A direita, restrição enzimática utilizando SacII, para avaliar padrão de corte do plasmídeo p2WF_ΔSACII. A esquerda, produto de PCR utilizando o DNA genômico das colônias transformadas com o plasmídeo p2WF_ΔSACII transformada (C1-C3) como DNA amplificador, em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Ladder 1kb Plus (Sinapse). Na colônia C2, os amplicons (1,8kb, 2,1kb e 860pb) apresentam os mesmos tamanhos do cassete de *fcl*, *gmd* e o gene *wcfb*, respectivamente. Projeção *in silico* a esquerda

6. Discussão

A utilização de resíduos industriais e biomassas de baixo valor agregado em processos biotecnológicos é um avanço para bioeconomia e criação de tecnologias sustentáveis (FEED et. al, 2007). Em destaque para a utilização de recursos nacionais, o HSA a ser usado neste projeto provém da semente de açaí, que corresponde a aproximadamente 85% do peso do fruto e representa cerca de 1,1 milhão de toneladas métricas de resíduos acumulados anualmente na região amazônica, resultando em um grave problema ambiental e urbano (MONTEIRO et. al, 2019). A possibilidade da utilização desses resíduos como fonte de matéria-prima em extrações químico-enzimáticas para obtenção de monossacarídeos (MONTEIRO et. al, 2019), como a manose, torna-se mais palpável a possibilidade do desenvolvimento de tecnologias nacionais a partir dessas fontes hemicelulósicas.

O metabolismo e o uso de manose como fonte de carbono em leveduras seguem sendo pouco explorados. Dentre os estudos existentes sobre o uso de manose para crescimento microbiano, já se construiu uma linhagem de *S. cerevisiae* expressando β -mananases para conversão de mananas em etanol (ISHII et. al, 2016), e o uso da levedura *Lipomyces starkeyi* utilizando manose e glicose para produção de compostos lipídicos (YANG et, al, 2016). Estudos acerca do metabolismo e o uso de manose para crescimento celular também foram feitos em *K. lactis*, que apresentou maior velocidade de crescimento em comparação a outras leveduras como *Komagataella phaffii* e *S. cerevisiae* (SOARES, 2020).

Apesar de a manose ser o açúcar predominante no HSA, este também contém menores concentrações de glicose, xilose, arabinose, galactose e possivelmente ramnose (RAMBO et. al, 2015; MONTEIRO et. al, 2019). De acordo com a literatura, leveduras do gênero *Kluyveromyces* apresentam melhor desempenho na co-utilização de

açúcares quando comparadas a *S. cerevisiae*, já tendo sido descrito o crescimento de *K. marxianus* em xilose, xilitol, arabinose e celobiose (SPOHNER et. al, 2016; NONKLANG et. al, 2008). Assim, o co-consumo de diferentes açúcares é uma característica desejável para a aplicação biotecnológica do HSA, visto que parte da manose consumida pode ser direcionada à produção de 2'-FL.

As rotas de produção de 2'-FL em microrganismos geneticamente modificados podem ser por vias *de novo* e de resgate (LU et. al, 2021) a partir de glicose, glicerol e/ou fucose, além da própria lactose (YU et. al, 2018 ; LIU et. al, 2018 ; HOLLANDS et. al, 2019). A captação de lactose é uma etapa fundamental do processo. O gene *LAC12*, que codifica o transportador de lactose inserido em todas as leveduras já modificadas para a síntese de 2'-FL (YU et. al, 2018; LIU et. al, 2018; HOLLANDS et. al, 2019), é nativo da própria levedura usada neste projeto, destacando seu potencial para a produção deste oligossacarídeo.

O sistema de indução por lactose, entretanto, ainda não foi explorado em leveduras. No sistema da cepa K2W, após introdução de lactose no meio é possível ativar a síntese de uma fucosiltransferase e, por conseguinte, de 2'-FL quando na presença de GDP-fucose. Demonstrou-se que esta estratégia resulta em produtividades maiores em bactérias com o operon *lac* deletado (BAUMGARTNER et. al, 2013; CHIN et al, 2015; CHIN et. al, 2016), mas isto exige que a fonte de carbono usada para crescimento seja completamente depletada antes da indução, visto que o sistema de indução por lactose normalmente é reprimido por glicose (INADA et. al, 1996). Em contrapartida, observou-se que a cepa GG799 de *K. lactis* atinge expressão gênica eficiente sob a ação do promotor pLAC4, induzível por lactose, sem repressão por glicose (SPOHNER et. al, 2016; Schaffrath et. al, 2000)

Estudos anteriores também relatam grande disponibilidade de GDP-Manose no sistema como fator-chave para a produção de 2'-FL

(MATTILA et. al, 2000; HOLLANDS et. al, 2019). Sendo intermediário da via de manose, a GDP-Manose é um precursor de processos de glicosilação de proteínas e da síntese da parede celular de leveduras (YODA et. al, 2000). No sistema da cepa K2W, a introdução de uma via *de novo* abastecida majoritariamente por manose promove um direcionamento à produção de 2'-FL via GDP-Manose em comparação ao uso de glicose, glicerol ou outras fontes de carbono.

No tocante a técnicas moleculares, a mutagênese sítio-dirigida inclui a adição ou exclusão de bases, bem como mutações pontuais, alterando uma sequência de nucleotídeos específica (ISHII et. al, 1998 ; ADERETH et. al, 2005). A técnica é bastante utilizada também para alterar precisamente a estrutura de proteínas e entender propriedades físico-químicas dos aminoácidos em determinadas conformações (Edelheit et. al, 2009). A Q5 DNA polimerase de alta fidelidade (New England Biolabs) foi a DNA polimerase escolhida devido a sua termoestabilidade, alta fidelidade, atividade de exonuclease 3'-5' e a presença de um domínio Sso7d de aumento de processividade para suportar amplificação de DNA robusta. Por causa de sua baixa taxa de erro, a polimerase Q5 foi desenvolvida para sintetizar amplicons longos ou difíceis. Estudos relatam a metodologia SPM utilizando uma polimerase *Pwo* provinda da arqueia extremofílica *Pyrococcus woesei* com eficiência de mutagênese sítio-dirigida de cerca de 72% dos transformantes (EDELHEIT et. al, 2009) utilizando como DNA molde um plasmídeo de cerca de 3kb. De acordo com o fabricante, a Q5 DNA polimerase tem alta fidelidade com uma taxa de erro que é 100 vezes menor do que a *Taq* DNA polimerase e 12 vezes menor do que a *Pfu* DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus*, a cuja classe pertence a *Pwo* (LASKEN et. al, 1996).

A mutagênese sítio-dirigida utilizando a polimerase Q5 pode variar de acordo com o tamanho do plasmídeo. Mutações geradas em plasmídeos de 6,4 kb alcançaram taxas sucesso de 100%, mas o valor foi de 83,3% para um plasmídeo maior (12,3 kb) (LIU et al, 2014). A menor eficiência

também foi vista com outras polimerases como a *Pwo* (EDELHEIT et. al, 2009). A relação entre o tamanho do plasmídeo e a eficiência da mutação pode ser notada neste trabalho ao se utilizar o plasmídeo P2WF como molde: a dificuldade de amplificar plasmídeos muito grandes explicaria a falha em se recuperar um plasmídeo contendo o cassete de *gmd* intacto a partir do p2WF, ao passo que a tentativa utilizando um plasmídeo menor como pGEM-GMD foi bem-sucedida. Em outros trabalhos, análises por sequenciamento mostraram que, em alguns casos, as regiões mutadas apresentavam perda de segmentos curtos de regiões vizinhas (EDELHEIT et. al, 2009), o que implica a necessidade de sequenciar o gene *gmd* após a eliminação do sítio SacII no futuro.

Ainda sobre processos moleculares, endonucleases do tipo IIP (Tipo-2 Palindrômicas) geralmente reconhecem sítios com de 4 a 6 pares de bases e clivam cada fita numa reação distinta (BILCOCK et. al, 1999). A endonuclease SacII, originária do organismo *Citrobacter freundii*, pertencente à família IIP e cliva as seqüências-alvos com eficiência quando presentes mais de um sítio de clivagem. Quando presente apenas um, a clivagem pode ser lenta e, em alguns casos, incompleta, pela necessidade das moléculas de enzimas de interagir com os sítios formando ponte entre eles, ou seja, em duas ou mais regiões da molécula de DNA ao mesmo tempo. A eficiência diminui vertiginosamente também em baixas concentrações de DNA (GOWERS et. al, 2004; XU et. al, 2005). Outros fatores, como aumento da saturação enzimática sobre os sítios, tensões e estruturas secundárias em alça no DNA, causam restrições conformacionais ao reconhecimento de múltiplos sítios de clivagem. Além disso, há alguns casos em que o aumento da concentração da enzima efetivamente reduz a concentração relativa do substrato, causando atividades de efeito estrela (WEI et. al, 2008; PINGOUD et. at, 2014).

Neste trabalho viram-se clivagens do tipo efeito-estrela no plasmídeo pGEN-ΔGMD, após a mutagênese sítio-dirigida (Figura 15). A atividade

causada pelo feito estrela já foi relatada em enzimas da família IIP em situações de saturação de sítios por alta concentração da enzima no ambiente (PINGOUD et. al, 2014). Isso poderia explicar a degradação do plasmídeo pGEN- Δ GMD após a eliminação do sítio de SacII, conforme visto à eletroforese. Ao se diminuir a quantidade de sítios presentes no DNA-alvo, a alta concentração de enzimas presente poderia resultar em clivagens inespecíficas em regiões que se assemelham ao padrão palindrômico de corte da endonuclease.

Testou-se ainda a montagem de Gibson como estratégia de mutagênese sítio-dirigida. A técnica combina três diferentes enzimas modificadoras de DNA de maneira otimizada para montar fragmentos de DNA de fita dupla (ds): 1) uma exonuclease 5', que encurta a extremidade 5' dos fragmentos de DNA e expõe saliências 3' nas fitas que podem então se anelar por complementaridade a saliências em outras fitas de DNA; 2) uma DNA polimerase que preenche lacunas de nucleotídeos no DNA após o anelamento; e 3) uma ligase de DNA que repara covalentemente quebras entre bases adjacentes para formar uma única molécula de DNA (GIBSON et. al, 2009). O relato inicial da técnica demonstrou montagens com até 12 fragmentos de DNA de forma eficiente, mas a literatura já descreve construções a partir de até 45 fragmentos de DNA em uma única reação, após modificações de alguns parâmetros do protocolo tradicional (BIRLA et. al, 2015; DORMITZER et. al, 2013).

A técnica foi utilizada para combinar os amplicons gerados sem o sítio de SacII e introduzi-los no vetor de destino. O duplo tratamento com AatII e StuI, seguida de purificação do plasmídeo, mostrou-se desafiadora e acompanhada de degradação plasmidial (Figura 10), o que pode ter levado a um desbalanço de proporções molares dos fragmentos de DNA durante a montagem. Este desbalanço entre os amplicons mutados e o plasmídeo linearizado pod ter contribuído para a ocorrência constatada de rearranjos aleatórios envolvendo mais de um fragmento, o

que explicaria o aumento do plasmídeo e os perfis de restrição inesperados utilizando outras endonucleases de restrição quando comparadas ao vetor original em programas como SnapGene®. Apesar de muito eficiente em diversos trabalhos relatados na literatura, a técnica não promoveu modificações esperadas para eliminar o sítio de SacII.

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 et. al, 2003). Quando comparados, protocolos de choque térmico resultaram num maior número de clones transformados que os de eletroporação (VIEIRA GOMES et. al, 2016). Além disso, também é descrito para essa cepa um maior número de transformantes com múltiplas cópias integradas quando se usa a marca de seleção amdS em vez do antibiótico G418, amplamente utilizado para seleção nesta espécie (READ et. al, 2007).

A integração direcionada por reparo por homologia apresenta dificuldades em *K. lactis* em comparação a *S. cerevisiae*, visto que na última a recombinação ocorre com apenas 40 pb de homologia em cada ponta, enquanto a primeira requer pelo menos 400 pb de homologia (KOOISTRA et. al, 2004; WOLF et. al, 2003).

O vetor pKLAC2, usado para clonar os três genes para produção de 2'-FL após a mutagênese sítio-dirigida, resultou numa integração bem-sucedida deles ao genoma da levedura. O plasmídeo pKLACG_ΔSACII gerou cerca de 30 colônias, três das quais tinham o gene *gmd* integrado, ao passo que o plasmídeo p2WF_ΔSACII gerou três colônias, apenas uma das quais apresentou a integração dos três genes. Considerando-se uma possível instabilidade do vetor devido ao tamanho, é importante ressaltar que na maioria dos processos de expressão heteróloga em *K. lactis*, os vetores carregavam apenas um gene a ser integrado e expresso (SPOHNER et. al, 2016; van den BERG et al., 1990). Trabalhos

envolvendo vetores expressando mais de um gene, apesar de ainda poucos, já foram relatados nesta levedura (VIEIRA GOMES et. al, 2016; ROSA et. al, 2013), mas mais estudos são necessários sobre a eficiência de transformação de plasmídeos maiores em *K. lactis*.

7. Conclusão e Perspectivas

A 2'-FL segue sendo um dos oligossacarídeos mais estudados para produção em plataformas biológicas, em vistas de suas diversas propriedades benéficas na suplementação alimentar de neonatos. Atualmente se vê uma grande necessidade em diversificar a produção diante da oferta limitada à produção por bactérias geneticamente modificadas a nível industrial (CHIN et al, 2015; CHIN et. al, 2016). Estudos utilizando leveduras ainda são muito recentes, tendo a primeira cepa sido produzida em 2018 (YU et. al, 2018). Diante do cenário, a criação da cepa K2W faz jus a uma nova expansão de possibilidades biotecnológicas acoplada à utilização de fontes de carbono provindas de resíduos hemicelulósicos por uma tecnologia nacional, agregando valor e inovação ao estudo realizado.

Neste trabalho, foi possível desenvolver diversas estratégias para corrigir um vetor de expressão defeituoso. Dentre elas, a mutagênese sítio-dirigida num plasmídeo de tamanho menor foi a mais exitosa. Uma confirmação da sequência final será necessária para excluir a possibilidade de mutações adicionais indesejadas (EDELHEIT et. al, 2009), pois até o momento apenas se observaram os perfis de restrição previstos *in silico*.

O processo de transformação em *K. lactis* segue sendo um desafio, pois esta ainda é uma levedura não convencional. Alguns fatores tornam sua manipulação genética mais difícil, como a necessidade de regiões de homologia mais longas para recombinação por via de reparo, em contraste com leveduras como *S. cerevisiae* (KOOISTRA et. al, 2004).

Apesar de o trabalho ter mostrado evidências sob integração dos genes ao genoma da levedura, a eficiência de transformação e a proporção de colônias com inserção correta foram baixas. Um ponto interessante a ser abordado sobre os processos de integração em *K. lactis* é que, em sua grande maioria, os processos de integração se limitam à expressão heteróloga de um único gene (van den BERG et al., 1990) e há poucos estudos acerca de integração de vários genes ao mesmo tempo (VIEIRA GOMES et. al, 2016; ROSA et. al, 2013). A cepa criada neste trabalho conta como experiência destes processos integrativos utilizando este vetor comercial e organismo hospedeiro.

Estratégias para o melhoramento da cepa também foram vislumbradas nesse trabalho. Estas têm por intuito aumentar a produtividade da cepa e incluem modificações e superexpressão de enzimas intermediárias da via de 2'-FL, adição de transportadores para efluxo de 2'-FL e a deleção da beta-galactosidase, responsável pela metabolização da lactose, precursora da 2'-FL (1.6).

Por fim, a construção da cepa K2W_ΔSACII de *Kluyveromyces lactis* é um passo importante para a produção futura de 2'-FL e pode vir a representar um impulso para bioeconomia nacional. A implementação da rota tecnológica proposta aqui permitirá elucidar questões teóricas e práticas sobre a produção de oligossacarídeos por microrganismos em geral e sobre a produção de 2'FL por leveduras em particular.

8. Referências Bibliográficas

1. Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629–635.
2. Coppa, G. V, Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A., & Giorgi, P. L. (1993). Changes in Carbohydrate Composition in Human Milk Over 4 Months of Lactation. *Pediatrics*, 91(3), 637 LP – 641.

3. Musilova, S.; Rada, V.; Vlkova, E.; Bunesova, V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Benef. Microbes* 2014, 5, 273–283.
4. Plaza-Díaz, J., Fontana, L., & Gil, A. (2018). Human milk oligosaccharides and immune system development. *Nutrients*, 10(8).
5. Matsuki, T., Yahagi, K., Mori, H., Matsumoto, H., Hara, T., Tajima, S., ... Kurokawa, K. (2016). A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nature Communications*, 7(May), 1–12.
6. Morozov, V., Hansman, G., Hanisch, F. G., Schroten, H., & Kunz, C. (2018). Human Milk Oligosaccharides as Promising Antivirals. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(6), 1–46.
7. Bode, L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum. Dev.* 2015, 91, 619–622.
8. Castanys-Muñoz E, Martin MJ, Prieto PA. 2'-fucosyllactose: An abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. *Nutr Rev.* 2013 Dec;71(12):773–89.
9. Kobata A. 2003. Possible application of milk oligosaccharides for drug development. *Chang Gung Med J.* 26:621–636
10. Reverri EJ, Devitt AA, Kajzer JA, Baggs GE, Borschel MW. Review of the clinical experiences of feeding infants formula containing the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose. *Nutrients.* 2018 Oct 1;10(1346).
11. Infant Formula Ingredients Market Size 2019-2025 | Industry Share and Forecast [Internet]. [citado 1 Feb 2020]. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/infant-formula-ingredients-market-198132825.html>
12. Turck D, Castenmiller J, De Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Kearney J, Maciuk A, et al. Safety of 2'-fucosyllactose/difucosyllactose mixture as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J.* 2019 Jun 1;17(6).
13. LSRO. COMPREHENSIVE GRAS ASSESSMENT Of the Proposed Uses of 2'-O-FUCOSYLLACTOSE In Term Infant Formulas, Toddler Formulas, and Foods Targeted to Toddlers. 2017.
14. Spohner SC, Schaum V, Quitmann H, Czermak P. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol.* 2016 Mar 20;222:104–16.
15. Coenen TMM, Bertens AMC, De Hoog SCM, Verspeek-Rip CM. Safety evaluation of a lactase enzyme preparation derived from *Kluyveromyces lactis*. *Food Chem Toxicol.* 2000 Aug;38(8):671–7

16. Flores, C., Rodriguez, C., Petit, T., Gancedo, C., 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (4), 507–529.
17. Hagman A, Säll T, Piškur J. Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. *FEBS J.* 2014;281(21):4805–14.
18. Merico A, Galafassi S, Piškur J, Compagno C. The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 2009 Aug;9(5):749–56.
19. Kiers J, Zeeman AM, Luttik M, Thiele C, Castrillo JI, Steensma HY, et al. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast.* 1998 Mar 30;14(5):459–69.
20. Bharadwaj, P., Martins, R., Macreadie, I., 2010. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res.* 10 (8), 961–969.
21. González Siso, M., Cerdán, M., 2012. *Kluyveromyces lactis*: a suitable yeast model to study cellular defense mechanisms against hypoxia-induced oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2012, 634–674
22. Rodicio R, Heinisch JJ. Yeast on the milky way: genetics , physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis* †. 2013;165–77.
23. Campos, A. S, et al. Produção de 2'- Fucosillactose em *Kluyveromyces lactis* utilizando manose como substrato. Dissertação (Dissertação em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, p. 15-16, 2019
24. Monteiro AF, Miguez IS, Silva JPRB, Silva ASA da. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9 (10939).
25. AÇAÍ | SEDAP [Internet]. [citado 1 Fev 2020]. Disponível em: <http://www.sedap.pa.gov.br/content/açai>
26. Pessoa JDC, Arduin M, Martins MA, de Carvalho JEU. Characterization of Açai (*E. oleracea*) fruits and its processing residues. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2010 Nov;53(6):1451–60.
27. Freitas DM de. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*). Universidade Federal de São Carlos (UFSCar); 2010.
28. Hara KY, Kobayashi J, Yamada R, Sasaki D, Kuriya Y, Hirono-Hara Y, et al. Transporter engineering in biomass utilization by yeast. *FEMS Yeast Res.* 2017 Nov 1;17(7).
29. Fisher, A. K., Freedman, B. G., Bevan, D. R., & Senger, R. S. (2014). A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing

performance of microbial cell factories. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 11(18), 91–99.

30. Choi, K. R., Jang, W. D., Yang, D., Cho, J. S., Park, D., & Lee, S. Y. (2019). Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering. *Trends in Biotechnology*, 37(8), 817–837.
31. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51–59.
32. Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., & Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(10), 6354–6358.
33. Maassen N, Freese S, Schruff B, Passoth V, Klinner U. Nonhomologous end joining and homologous recombination DNA repair pathways in integration mutagenesis in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *FEMS yeast research*. 2008; 8(5):735–43.
34. Kooistra R, Hooykaas PJ, Steensma HY. Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 2004; 21(9):781–92.
35. Krijger JJ, Baumann J, Wagner M, Schulze K, Reinsch C, Klose T, et al. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*. *Microb Cell Fact*. 2012 Aug 20;11(112).
36. Fattah FJ, Lichter NF, Fattah KR, Oh S, Hendrickson EA. Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (25):8703–8.
37. Tsakraklides, V., Brevnova, E., Stephanopoulos, G., & Shaw, A. J. (2015). Improved gene targeting through cell cycle synchronization. *PLoS ONE*, 10(7), 1–11.
38. Apraiz, A., Mitxelena, J., & Zubiaga, A. (2017). Studying cell cycle-regulated gene expression by two complementary cell synchronization protocols. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(124), 1–12.
39. Kim, C. S., Ji, E. S., & Oh, D. K. (2003). Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 25(20), 1769–1774.
40. Jung, S. M., Chin, Y. W., Lee, Y. G., & Seo, J. H. (2019). Enhanced production of 2'-fucosyllactose from fucose by elimination of rhamnose isomerase and arabinose isomerase in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and*

Bioengineering, 116(9), 2412–2417.

41. Uccelletti, D., Staneva, D., Rufini, S., Venkov, P., & Palleschi, C. (2005). Enhanced secretion of heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis* by overexpression of the GDP-mannose pyrophosphorylase, KIPsa1p. *FEMS Yeast Research*, 5(8), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.01.004>
42. Bleck, G. T., Wheeler, M. B., Hansen, L. B., Chester-Jones, H., & Miller, D. J. (2009). Lactose synthase components in milk: Concentrations of α -lactalbumin and β 1,4-galactosyltransferase in milk of cows from several breeds at various stages of lactation. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 241–247.
43. Saburi, W., Sato, S., Hashiguchi, S., Muto, H., Iizuka, T., & Mori, H. (2019). Enzymatic characteristics of d-mannose 2-epimerase, a new member of the acylglucosamine 2-epimerase superfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6559–6570.
44. Feed, F., & Materials, B. C. (2007). IEA Bioenergy 29th update. *Biomass and Bioenergy*, 31(8), I–VII.
45. Ishii J, Okazaki F, Djohan AC, Hara KY, Asai-Nakashima N, Teramura H, et al. From mannan to bioethanol: cell surface co-display of β -mannanase and β -mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 2016 Dec 2;9(1):188.
46. Yang X, Jin G, Gong Z, Shen H, Song Y, Bai F, et al. Simultaneous utilization of glucose and mannose from spent yeast cell mass for lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresour Technol*. 2014;158:383–7.
47. Rambo MKD, Schmidt FL, Ferreira MMC. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta*. 2015 Jul 17;144:696–703.
48. Nonklang S, Abdel-Banat BMA, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, et al. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Dec;74(24):7514–21.
49. Lu, M., Mosleh, I., & Abbaspourrad, A. (2021). Engineered Microbial Routes for Human Milk Oligosaccharides Synthesis. *ACS Synthetic Biology*. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00063>
50. Yu S, Liu J-J, Yun EJ, Kwak S, Kim KH, Jin Y-S. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2018 Dec 27;17(101).
51. Liu JJ, Kwak S, Pathanibul P, Lee JW, Yu S, Yun EJ, et al. Biosynthesis of a Functional Human Milk Oligosaccharide, 2'-Fucosyllactose, and I -Fucose

Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth Biol. 2018 Nov 16;7(11):2529–36.

52. Mattila, P., Rabinä, J., Hortling, S., Helin, J., and Renkonen, R. (2000) Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* 10 (10), 1041–1047.
53. Lasken RS, Schuster DM, Rashtchian A (July 1996). "[Archaeobacterial DNA polymerases tightly bind uracil-containing DNA](#)". *The Journal of Biological Chemistry*. **271** (30): 17692–6. doi:[10.1074/jbc.271.30.17692](#). PMID [8663453](#).
54. Ishii TM, Zerr P, Xia XM, Bond CT, Maylie J, Adelman JP. Site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol* 1998;293:53–71. [PubMed: 9711602]
55. Adereth Y, Champion KJ, Hsu T and Dammai V (2005). Site-directed mutagenesis using Pfu DNA polymerase and T4 DNA ligase. *Biotechniques* 38: 864-868.
56. Edelheit, O., Hanukoglu, A., & Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61>
57. Bilcock, D. T., Daniels, L. E., Bath, A. J., & Halford, S. E. (1999). Reactions of type II restriction endonucleases with 8-base pair recognition sites. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36379–36386. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36379>
58. Gowers, D.M., Bellamy, S.R.W. and Halford, S.E. (2004) One recognition sequence, seven restriction enzymes, five reaction mechanisms. *Nucleic Acids Res.*, 32, 3469-3479.
59. Xu, Q.S., Roberts, R.J. and Guo, H.C. (2005) Two crystal forms of the restriction enzyme MspI-DNA complex show the same novel structure. *Protein Sci.*, 14, 2590-2600.
60. Wei, H., Therrien, C., Blanchard, A., Guan, S. and Zhu, Z. (2008) The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.*, 36, e50.
61. Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases - A historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7489–7527. <https://doi.org/10.1093/nar/gku447>
62. Birla, B. S., & Chou, H. H. (2015). Rational design of high-number dsDNA fragments based on thermodynamics for the construction of full-length genes in a single reaction. *PLoS ONE*, 10(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/>

63. Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
64. Dormitzer PR, Suphaphiphat P, Gibson DG, Wentworth DE, Stockwell TB, Algire MA, et al. Synthetic Generation of Influenza Vaccine Viruses for Rapid Response to Pandemics. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 185ra68–185ra68. doi: 10.1126/scitranslmed.3006368 PMID: 23677594
65. Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bustin'Grab. *BMC Biotechnol*. 2004;4(1):8.
66. Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Yvonne. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, 1(June), 22–25.
67. Chin YW, Kim JY, Kim JH, Jung SM, Seo JH. Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative α -1,2-fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis*. *J Biotechnol*. 2017 Sep 10;257:192–8.
68. Baumgärtner F, Seitz L, Sprenger GA, Albermann C. Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microb Cell Fact*. 2013 May 1;12(1).
69. Chin YW, Kim JY, Lee WH, Seo JH. Enhanced production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* BL21star(DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase. *J Biotechnol*. 2015 Aug 1;210:107–15.
70. Chin YW, Seo N, Kim JH, Seo JH. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce 2'-fucosyllactose via salvage pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP)-l-fucose. *Biotechnol Bioeng*. 2016 Nov 1;113(11):2443–52.
71. Inada T, Kimata K, Aiba H. Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes to Cells*. 1996 Mar;1(3):293–301.
72. Schaffrath R, Breunig KD. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol*. 2000;30(3):173–90.
73. Wolf, Klaus; Breunig, Karin; Barth G. *Non-Conventional Yeasts in Genetics, Biochemistry and Biotechnology*. Non-Conventional Yeasts in Genetics, Biochemistry and Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg; 2003.
74. Read JD, Colussi PA, Ganatra MB, Taron CH. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-

frequency formation of multicopy strains. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Aug;73(16):5088–96.

75. YODA, K., KAWADA, T., KAIBARA, C., FUJIE, A., ABE, M., HASHIMOTO, H., ... YAMASAKI, M. (2000). Defect in Cell Wall Integrity of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Caused by a Mutation of the GDP-mannose Pyrophosphorylase Gene *VIG9*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(9), 1937–1941. doi:10.1271/bbb.64.1937
76. Rosa, J. C. C., Colombo, L. T., Alvim, M. C. T., Avonce, N., Van Dijck, P., & Passos, F. M. L. (2013). Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-59>
77. Pereira-Rodriguez, A. et al. Structural characterization of the β -galactosidase from "*Kluyveromyces lactis*" and expression and directed evolution of β -galactosidases with high biotechnological interest. (Tese de Doutorado) Universidade da Coruña. Departamento de Biología Celular e Molecular, 2012.
78. Pitkänen JP, Törmä A, Alff S, Huopaniemi L, Mattila P, Renkonen R. Excess mannose limits the growth of phosphomannose isomerase *PMI40* deletion strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2004 Dec 31;279(53):55737-43.
79. Vieira Gomes AM. Produção Heteróloga de Ácido Hialurônico em *Kluyveromyces lactis*. Universidade de Brasília; 2016.
80. Holtzapfle, MT (2003). HEMICELULOSAS. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 3060–3071.
81. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* 2016; 387:475-90.