

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LUIZ HENRIQUE CARDOSO**

Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao estresse celular em  
*Saccharomyces cerevisiae*

**Botucatu**

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUIZ HENRIQUE CARDOSO

**Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao  
estresse celular em *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, no programa de pós-graduação em Biotecnologia para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Guilherme Targino Valente

**Botucatu**

**2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cardoso, Luiz Henrique.

Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao estresse celular em *Saccharomyces cerevisiae* / Luiz Henrique Cardoso. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Guilherme Targino Valente

Capes: 20202008

1. Leveduras. 2. Termotolerância. 3. Biocombustíveis.  
4. Etanol. 5. Inativação gênica.

Palavras-chave: Bioetanol; Levedura; Termotolerância;  
Tolerância ao etanol.

## AGRADECIMENTO

Dou início aos meus agradecimentos pelas pessoas que tornaram esse trabalho possível, que são os membros mais importantes em toda minha jornada, pessoas que dedicaram seu tempo a mim, me aconselharam e me guiaram na minha busca pelo aperfeiçoamento. Agradeço por todo o ensinamento, por todo amor, por todo afeto, pela amizade, agradeço por permanecerem ao meu lado e tornarem meus sonhos possíveis. Agradeço de todo coração ao meu Pai e minha Mãe!

Ao meu orientador Guilherme, que desde o início da minha graduação me acompanhou e deu vários conselhos, críticas e me ajudou nesse caminho. Por me fazer sempre ir além, por me ensinar muitas vezes a sentar e rever o que eu estava fazendo nos meus trabalhos, pelas conversas e por me mostrar o caminho do que espero no meu futuro dentro da ciência. Agradeço por me apoiar e reclamar quando eu precisava melhorar, sei que discordamos de vários pontos nesse caminho, mas de qualquer forma foi a nossa convivência que me ajudou a me tornar não só um pesquisador melhor, como uma pessoa melhor.

A minha amiga Amanda que me ensinou diversas coisas e me ajudou incontáveis vezes a planejar experimentos, padronizar e realiza-los. Agradeço além disso pelas discussões, risadas, piadas e jogos, por sempre falar de tomar um café nas horas mais necessárias, pelas palavras. Obrigado.

Aos outros colegas de trabalho que acompanharam esse período, Ivan, Camila, Farinazzo, Lazari, entre outros que não são menos importantes. Agradeço pela ajuda, pelas palavras, as correções e sugestões. Os encontros onde começávamos a falar de coisas do laboratório em meio a conversas descontraídas, a companhia e tudo mais, muito obrigado por ajudarem a fazer esse momento mais fácil.

Aos professores Ary, Rafael, Paulo e todos os outros que me ajudaram direta ou indiretamente com esse trabalho. Por mais que alguns tenham dito que não era nada, fizeram uma grande diferença em momentos que precisava dessa ajuda.

Por fim agradeço aos amigos e familiares, sejam os que estavam longe e perguntavam vez ou outra sobre meu trabalho, ou aqueles que perdi durante essa jornada. Agradeço de coração todo o apoio, torcida e paciência em momentos que estava totalmente perdido.

Gostaria de agradecer a UNESP, universidade esta que possibilitou dentro de todos os contratemplos de pandemia e demais problemas um ambiente seguro e um

local de trabalho que atendia as necessidades dos meus estudos. Também gostaria de agradecer ao programa de pós graduação em Biotecnologia, o qual me auxiliou no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos órgãos de fomento CAPES, processo 88882.433359/2019-01 e a FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 2015/12093-9 por todo o financiamento e suporte!

## RESUMO

A demanda mundial por energia tem se tornado um dos maiores desafios da atualidade. Junto a isso, temos a crescente demanda por sustentabilidade que tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias para substituição do uso de combustíveis fósseis. Desta forma, os biocombustíveis, sendo o bioetanol um dos mais evidentes, têm tomado espaço no mercado econômico e, com isso, alavancado pesquisas nessa área. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido exaustivamente estudada, tornando-se assim um organismo modelo. Dentre as muitas propriedades desta, algumas a tornam ideal para estudos referentes à tolerância ao etanol e à termotolerância, problemas encontrados durante a fermentação em escala industrial. Muitas pesquisas buscam aumentar a tolerância desses organismos a estressores, portanto, diversos métodos são estudados e utilizadas para isso. Nesse contexto, utilizou-se a técnica de edição gênica, do tipo CRISPR-Cas9, para realizar a inativação de genes candidatos à tolerância ao etanol e à temperatura e gerar novas linhagens potencialmente mais tolerantes a esse composto, a fim de melhorar o atendimento às necessidades industriais. Estes estudos permitiram visualizar que a inativação de certos genes leva ao decréscimo da capacidade de suportar o estresse ao etanol, além de alterar a capacidade de tolerância térmica nesses mutantes. Com isso pode-se visualizar a relevância da inativação de determinados genes na busca pela melhoria dos processos fermentativos, podendo-se melhorar o teor alcoólico do processo, minimizar os custos da etapa de recuperação do etanol, auxiliar no aumento de produção através de concentrações maiores de açúcar no início do processo, reduzir o custo com trocadores de calor que são utilizados durante o processo e reduzir a contaminação por leveduras selvagens e bactérias durante o processo.

Palavras-chave: Bioetanol; Levedura; Termotolerância; Tolerância ao etanol.

## ABSTRACT

The increase of global energy demands is one of the greatest challenges in the world. Along with this, we have the growing demand for sustainability that has stimulated the development of technologies to replace the use of fossil fuels. Therefore, biofuels, bioethanol being one of the most evident, have taken up space in the economic market and, with that, leveraged research in this field. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a model organism extensively studied. Among its many properties, some make it ideal for studies related to ethanol tolerance and thermotolerance, relevant hurdles to the industrial-scale fermentation. Researchers often seek methods to optimize yeast tolerance, such as using gene editing. In this context, the CRISPR-Cas9 gene editing technique was used to inactivate candidate genes for ethanol tolerance and generate new strains potentially more tolerant to this compound. Possible thermotolerant effects on these mutants were also tested in order to improve the fulfillment of industrial needs. These studies showed that the inactivation of genes such as ALD4, CTA1 and IXR1 reduce the ethanol tolerance and changes the thermal tolerance capacity of these mutants. Therefore, these data show the relevance of these genes for the fermentation processes, which modifications on them could improve the dormancy time also optimizing the production.

Keywords: Bioethanol; Ethanol tolerance; Thermotolerance; Yeast.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
1.1 Bioetanol	10
1.2 Biologia Celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.3 Tolerância ao etanol	15
1.4 Tolerância Térmica	16
1.5 O modelo de tamponamento <i>diauxic shift</i>	18
1.6 Genes relacionados à tolerância ao etanol e temperatura	20
1.6.1 CTA1 (YDR256C)	20
1.6.2 IXR1 (YKL032C)	21
1.6.3 ALD4 (YOR374W)	21
<b>2 HIPÓTESE</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
<b>4 MÉTODOS</b>	<b>28</b>
4.1 Seleção de genes candidatos	28
4.2 Microrganismos e meios de cultura	28
4.3 Montagem dos <i>primers</i>	29
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) de modificação do plasmídeo e eletroforese de confirmação da modificação	34

<b>4.5</b>	<b>Digestão da reação de modificação, purificação do plasmídeo e ligação por ligase T4</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Competência em <i>Escherichia coli</i> TOP 10</b>	<b>35</b>
4.6.1	Tornando a bactéria TOP 10 competente	35
4.6.2	Transformação do plasmídeo em bactérias TOP 10	36
<b>4.7</b>	<b>Extração do plasmídeo pMEL16 e checagem da inserção do target</b>	<b>36</b>
<b>4.8</b>	<b>Geração de leveduras competentes</b>	<b>37</b>
<b>4.9</b>	<b>Preparo do DNA de reparo e transformação</b>	<b>38</b>
<b>4.10</b>	<b>Confirmação de transformação da levedura</b>	<b>38</b>
<b>4.11</b>	<b>Teste de tolerância ao etanol</b>	<b>39</b>
<b>4.12</b>	<b>Spot Test</b>	<b>40</b>
<b>4.13</b>	<b>Análise de crescimento celular e testes de sobrevivência</b>	<b>41</b>
<b>4.14</b>	<b>Análise estatística das curvas de crescimento</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção e validação das linhagens mutantes</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Testes de tolerância ao etanol</b>	<b>46</b>
<b>5.3</b>	<b>Teste de estresse prolongado ao etanol</b>	<b>48</b>
<b>5.4</b>	<b>Teste de crescimento e estresse</b>	<b>49</b>
5.4.1	SEY6210 e mutante	49
5.4.2	BY4742 e mutantes	51
5.4.3	BMA641-A e mutantes	52
<b>5.5</b>	<b>Análise estatística das curvas de crescimento celular</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>6.1</b>	<b>BMA64-1A CTA1<math>\Delta</math></b>	<b>56</b>
<b>6.2</b>	<b>BMA64-1A IXR1<math>\Delta</math></b>	<b>57</b>
<b>6.3</b>	<b>SEY6210 ALD4-1, BY4742 ALD4-2 e ALD4-3</b>	<b>58</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>60</b>

<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE B</b>	<b>67</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nutrientes e concentrações para concepção do meio <i>drop out</i> a 10X.....	29
Tabela 2 - Oligos utilizados para inserção do target no pMEL16 .....	30
Tabela 3 - Oligos utilizados no reparo e genotipagem das mutantes de ALD4.....	31
Tabela 4 – Valores de meio e etanol ou solução fisiológica para os testes de tolerância ao etanol.....	40
Tabela 5 – Estudo estatístico de linhagens mutantes e selvagens de <i>S. cerevisiae</i> .....	54
Tabela 6 - Estudo estatístico da tolerância térmica em linhagens mutantes e selvagens de <i>S. cerevisiae</i> .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reprodução da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> adaptado .....	13
Figura 2 – Ciclo celular da <i>S. cerevisiae</i> adaptado.....	14
Figura 3 – Modelo de tamponamento do etanol.....	19
Figura 4 – Esquema do funcionamento in vivo do sistema CRISPR.....	24
Figura 5 - Design do gDNA para implementação em plasmídeo pMEL16.....	30
Figura 6 – Modelo dos oligos de reparo, em vermelho as sequencias complementares. Em verde reporta-se o gRNA (porção contida no OliA). Em azul a sequência PAM (NGG).....	32
Figura 7 – Exemplo da montagem dos primers de genotipagem das mutações (pequenas setas verdes). A: Primers para verificação da inserção de <i>stop codon</i> prematuro (sequencia entre as barras verde e azul claro). B: <i>Primers</i> para verificação da deleção (pequenas barras verdes flanqueando o reparo, reportado em vermelho) .....	33
Figura 8 – Modelo de aplicação de <i>spot test</i> adaptado.....	41
Figura 9 - Representação gráfica do crescimento populacional de acordo com a equação de Verhulst (equação logística) .....	43
Figura 10 – Placas de levedura em meio seletivo com G418 (200mg/L), nestas foram cultivadas colônias e testadas as mutações.....	44
Figura 11 – Gel de eletroforese de genotipagem das linhagens mutantes. A: <i>ladder</i> . B-C: linhagens mutantes. D-E, G: linhagens com falha na mutação. F: Falha na reação de PCR. H: linhagem BY4742 selvagem.....	45
Figura 12 – Resultados de sequenciamento dos genes das linhagens mutantes ALD4.....	46

Figura 13 – Comparação de tolerância ao etanol em levedura selvagem e sua contraparte com inativação do gene ALD4.....	47
Figura 14 – Comparação entre linhagens com inativação da ALD4 e sua contraparte selvagem (BY4742). A: BY4742 ALD4-2 mutante com redução da tolerância. B: BY4742 ALD4-3 mutante sem influência na tolerância máxima, mas com indícios de melhor resistência ao estresse por esse metabólito.....	47
Figura 15 – Determinação da tolerância máxima ao etanol das linhagens BMA64-1A IXR1 $\Delta$ e BMA64-1A CTA1 $\Delta$ .....	48
Figura 16 – Teste de tolerância ao etanol por tempo prolongado realizado com as tolerâncias máximas de cada linhagem (SEY6210 = 24%, SEY6210 ALD4-1 = 28%) .....	48
Figura 17 – Teste de estresse ao etanol prolongado à cepa BMA64-1A CTA1 $\Delta$ .....	49
Figura 18 – Análise comparativa de crescimento com e sem fatores estressores.....	50
Figura 19 - Ensaio comparativo de crescimento com e sem fatores estressores.....	52
Figura 20 - Experimento comparativo de crescimento com e sem fatores estressores.....	53
Figura 21 – Efeito da deleção de CTA1 adaptado.....	57

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Bioetanol

O início do século XXI tem sido marcado pelo grande incentivo ao uso de biocombustíveis em substituição àqueles provindos de fontes fósseis (ex. gás natural, o carvão mineral e o petróleo) devido à queda na disponibilidade desse tipo de combustível, o crescimento populacional, o aquecimento global e ao avanço industrial, o qual tem elevado as necessidades energéticas mundiais (MUSSATTO et al., 2010).

Os biocombustíveis compreendem todos os produtos úteis para a geração de energia obtidos de uma biomassa (matéria prima de origem vegetal ou animal, passível de ser utilizada para a produção de bioenergia) (TOLMASQUIM, 2016). A substituição dos combustíveis derivados de petróleo por combustíveis advindos de biomassas, tais como o bioetanol, o biodiesel, o bio-hidrogênio, os derivados de bagaço e palha de cana-de-açúcar e milho, deve-se ao fato dos recursos fósseis serem finitos e carecem de substitutos capazes de atender às necessidades energéticas atualmente cobertas por estes (SARKAR et al., 2012).

O bioetanol é o biocombustível mais utilizado comercialmente no Brasil, sendo obtido a partir da fermentação alcoólica dos açúcares simples e fermentescíveis. Estes açúcares podem ser extraídos diretamente da cana-de-açúcar, beterraba, sorgo e soro (CHAKRABORTY et al., 2012), a qual a glicólise e a fermentação são as vias complementares para a produção desse composto (DELLOMONACO; FAVA; GONZALEZ, 2010).

O surgimento do bioetanol remonta ao século XX, tendo inicialmente um uso industrial e residencial. Apenas em 1922, passou a ser vislumbrado como uma alternativa à gasolina, iniciando a utilização do mesmo como combustível no Brasil (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000). Um grande marco dos biocombustíveis se deu com a crise do petróleo de 1973, quando se iniciaram as pesquisas para obtenção de energias renováveis, esses trabalhos acabaram por originar o Proálcool e Proóleo, com o objetivo de substituir a gasolina e o diesel, respectivamente. (MELO, 2018)

Sua produção tem o potencial de apoiar, e até mesmo superar, o esgotamento atual de fontes de combustíveis fósseis. Além disso, no quesito sustentabilidade e no que tange às questões ambientais, tais como o aquecimento global e as mudanças climáticas, o bioetanol supera os combustíveis fósseis (DODO; MAMPHWELI; OKOH, 2017).

Devido às políticas públicas brasileiras que intensificam a busca por combustíveis de fontes renováveis, o Brasil é um país de referência na pesquisa de biocombustíveis e uso destes como substituição ao uso integral dos combustíveis derivados do petróleo. Pode-se citar o Proálcool como uma dessas políticas, sendo que este programa vai desde a busca por espécies com maior rendimento de produção, até o desenvolvimento de motores capazes de aceitar misturas de biocombustíveis e combustíveis derivados do petróleo (MELO, 2018)

Outro importante programa provindo das políticas públicas brasileiras foi o Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel (PNPB), este visou não só um impacto ambiental, como um incentivo aos pequenos produtores, já que a matéria prima para este biocombustível deveria vir destes. Inicialmente foi implementado 2% deste biodiesel em meio ao diesel comum, aumentando gradativamente este valor para 5% e por fim para 20%, o que contribuiria tanto para economia, quanto para o fator sustentabilidade e independência dos combustíveis de origem fóssil (MELO, 2018). Entendendo os impactos sociais, econômicos e ambientais, é possível visualizar o por que os biocombustíveis, em especial o bioetanol, têm atraído amplo interesse regional, nacional e internacional, tornando-os objetos de grande interesse científico e industrial (SARKAR et al., 2012).

Existem alguns tipos de produção de bioetanol no cenário brasileiro, sendo aquele a partir da cana-de-açúcar (1ª geração) o mais utilizado, há também o processo a partir do milho (1ª geração) e os de segunda geração, que usam os resíduos dos de primeira em sua produção. Além das tradicionais usinas de cana, destilarias foram construídas para fermentar o amido de milho, reduzindo o gargalo de 4 meses do entressafra, com isto abriu-se uma nova perspectiva para o aumento da produção de etanol de primeira geração (LOPES et al., 2016).

Além dessas destilarias de milho, o Brasil também conta com duas plantas industriais em operação para a produção de etanol de segunda geração, com

uma outra que utiliza um processo semi-industrial, todas provindas do investimento do governo em etanol de segunda geração desde 2011. Todavia, os custos da produção de segunda geração ainda são elevados em vários aspectos, assim, iniciativas têm se concentrado na seleção de linhagens microbianas e na otimização das condições para produção, sendo ainda uma alternativa em desenvolvimento (LOPES et al., 2016).

Como citado, o processo de produção de bioetanol no Brasil foi bastante modificado, sendo que das opções de mercado brasileiro, atualmente a maior parcela se caracteriza principalmente pelo uso do esmagamento da cana-de-açúcar e fermentação em dornas de alta capacidade (até 3 milhões de litros), com alta concentração de leveduras no meio fermentativo (10-15%) (MUSSATTO et al., 2010). Assim sendo, este biocombustível é produzido por meio da fermentação alcoólica realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma excelente produtora de etanol.

Ao longo de sua evolução, os microrganismos enfrentaram mudanças ambientais que os levaram ao desenvolvimento de mecanismos capazes de sentir e responder a diversos tipos de estressores. Alguns exemplos são a depleção de nutrientes, as mudanças na osmolaridade externa, temperaturas elevadas, concentração de etanol, entre outros fatores (MENSONIDES et al., 2005).

Durante o processo produtivo do etanol, as células da levedura encontram-se sujeitas a numerosos estresses físico-químicos, tendo como destaque a toxicidade pela concentração etanólica do meio e as altas temperaturas (WALLACE-SALINAS; GORWA-GRAUSLUND, 2013; YU et al., 2012).

O problema das elevadas concentrações de etanol (DIVATE et al., 2016) e das altas temperaturas (WALLACE-SALINAS; GORWA-GRAUSLUND, 2013) levam a efeitos de inibição do crescimento e viabilidade celular da levedura, além de limitar a hidrólise enzimática. Isso torna esses estressores, fatores limitantes da produção.

As respostas a esses estressores têm sido estudadas para o entendimento desses mecanismos, aumento da sobrevivência do microrganismo, aumento do seu desempenho sob condições estressantes, além

da eliminação de concorrentes indesejados durante seu uso industrial (MENSONIDES et al., 2005).

A compreensão dos eventos moleculares que ocorrem na levedura durante a resposta ao estresse por etanol e temperatura é algo muito importante. Uma melhor compreensão desses mecanismos pode culminar a uma melhor adaptação aos ataques ocorridos por esses estressores, conseqüentemente, pode levar a uma maior tolerância a estes (STANLEY et al., 2010a).

## 1.2 Biologia Celular da *Saccharomyces cerevisiae*

Segundo a classificação taxonômica, a *S. cerevisiae* se enquadra no Reino Fungi, Sub-reino Dikarya, Divisão Ascomycota, Subdivisão Saccharomycotina, Classe Saccharomycetes, Subclasse Saccharomycetidae, Ordem Sacaromicetal, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Saccharomyces* Meyen e Espécie *Saccharomyces cerevisiae* ([https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=194157#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=194157#null). Acessado 13/08/2021). Estas leveduras são unicelulares, haplóides ou diplóides e com reprodução mitótica ou meiótica (Figura 1) (TAYLOR; BOWMAN; BERBEE, 1993).

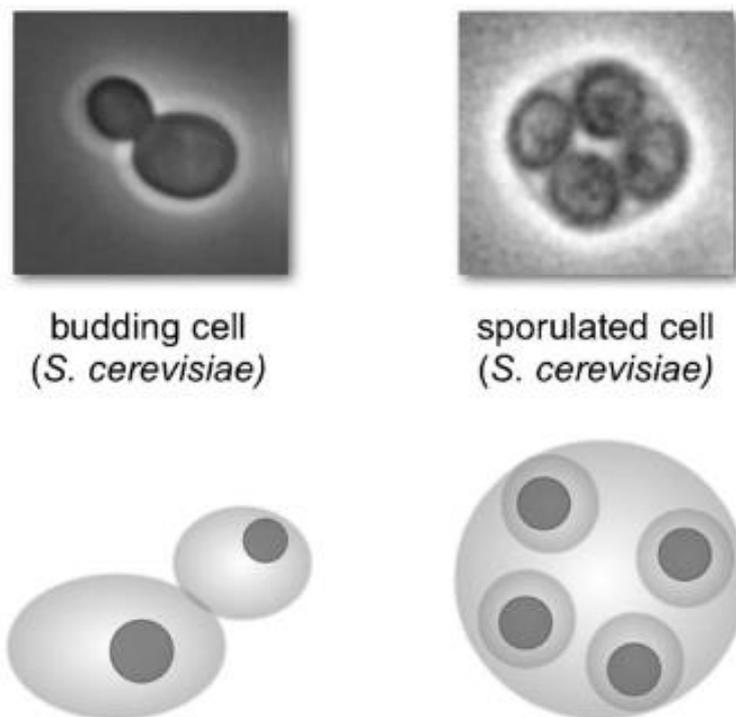


Figura 1 – Reprodução da *Saccharomyces cerevisiae* adaptado (KNOP, 2011)

As células de *S. cerevisiae* possuem aproximadamente entre 5 e 10µm de diâmetro (NGUYEN et al., 2017), sendo capazes de dividir-se a cada 90 minutos em condições nutricionais adequadas (SILVA, 2009). Esta levedura em um estado haplóide se divide pela formação de um broto, o qual surge durante a fase G1, crescendo até a mitose e separando-se, dando origem a um novo indivíduo (Figura 2).

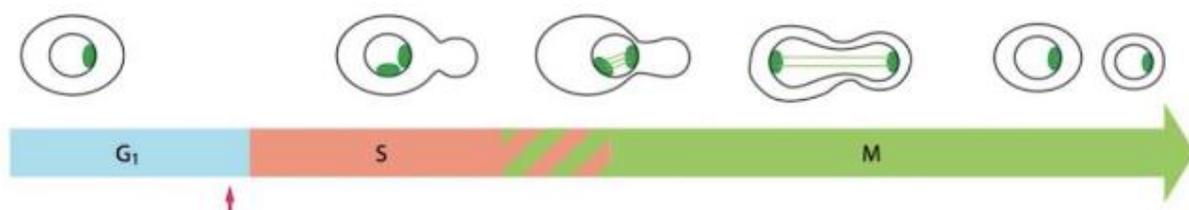


Figura 2 – Ciclo celular da *S. cerevisiae* adaptado de (ALMEIDA, 2017)

Este fungo é um organismo modelo (espécie não humana amplamente estudada para compreender uma gama de fenômenos biológicos, onde dados, modelos e teorias são aplicados à outros organismos (LEONELLI; ANKENY, 2013) e está entre os principais microrganismos escolhidos para o processo de produção de etanol (MUSSATTO et al., 2010). Ela tem sido amplamente utilizada para estudos de variabilidade genética, expressão gênica, interações entre proteínas, função de proteínas, identificação de novas estruturas proteicas etc. Seu uso para a produção de bioetanol advém da sua grande capacidade fermentativa e taxa de crescimento em condições anaeróbias, além da relativa alta tolerância ao etanol, temperatura e outros inibidores (BROWN et al., 2013; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; MUSSATTO et al., 2010).

A *S. cerevisiae* é uma ótima escolha para testes laboratoriais devido a algumas características, tais como: ausência de patogenicidade para o operador (GRAS – Geralmente Seguro (*generally regarded as safe*)), grande facilidade de teste de biologia molecular (PCR, Enzimas de restrição etc), é um organismo de fácil cultivo, fácil capacidade de isolamento de OGMs (Organismos geneticamente modificados), ser passível de técnicas de transformação (tornar a célula apta a receber um plasmídeo exógeno), ter alta tolerância contra inibidores tóxicos e produtos finais, entre outras características (GOFFEAU et al., 1996; LIAN; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018).

### 1.3 Tolerância ao etanol

Durante o processo fermentativo, a levedura sofre diversos tipos de estresses, sendo o estresse por etanol um dos limitadores do seu uso. A tolerância a altos níveis desse metabólito secundário é uma característica chave para a levedura *S. cerevisiae*, sendo que essa tolerância está relacionada ao potencial de sobrevivência das células durante uma exposição crônica a essa substância (STANLEY et al., 2010b).

A concentração de etanol influencia as células de diversas formas, como por exemplo, causando modificações nas membranas celulares, nas proteínas de membrana e na parede celular (MA; LIU, 2010; STANLEY et al., 2010 a). Nesse último caso, modifica a absorção dos compostos moleculares, afetando a absorção de glicose, maltose, amônia, aminoácidos, potássio e, por fim, reduz a produção do etanol em si, desestabilizando alguns processos metabólicos (DING et al., 2009; HALL et al., 2009; INGRAM, 1989; MA; LIU, 2010).

O etanol é também um inibidor do crescimento em concentrações relativamente baixas, podendo inibir a divisão celular, diminuir o volume das células e a taxa de crescimento (KUBOTA et al., 2004), enquanto as altas concentrações inibem a viabilidade e aumentam a morte celular, limitando a produtividade da fermentação (BIRCH; WALKER, 2000).

A resposta ao estresse da levedura é uma reprogramação transitória de atividades celulares com o intuito de garantir a sobrevivência em condições adversas (MAGER; FERREIRA, 2015). Os principais locais da levedura que sofrem efeitos do etanol são as membranas celulares, ocorrendo mudanças na composição da membrana ou da parede celular (CHENG et al., 2016). Assim, a exposição da levedura ao etanol resulta em aumento da fluidez da membrana e consequente redução na integridade da mesma (STANLEY et al., 2010b).

De forma mais global, todas as características influenciadas pelo estresse, ou que geram uma maior tolerância a ele, se enquadram em mais de 200 descrições ontológicas diferentes que perfazem boa parte das ontologias conhecidas (MA; LIU, 2010; STANLEY et al., 2010a, 2010b). A tolerância ao etanol é controlada por vários genes, sendo que muitos desses ainda não estão bem caracterizados, logo, uma boa associação entre eles e suas funções celulares é complexa (YU et al., 2012).

Alguns trabalhos apontam bons genes candidatos, demonstrando, por exemplo, que a produção do etanol pode ser melhorada quando realizada a deleção do gene GPD1, o qual codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase. Há também a superexpressão do GLT1, responsável pela síntese de glutamato (KONG et al., 2007), além de outros genes que já são conhecidos por causar mudanças na tolerância ao etanol ao serem super expressos ou inativados.

Alguns genes elencados como importantes para a tolerância ao etanol, em um teste a 11% (v/v) desse estressor, foram associados à biossíntese (43 genes), ciclo celular (17 genes), citoesqueleto (18 genes), mitocôndria (22 genes), morfogênese (14 genes), ligação de ácidos nucléicos (12 genes), atividade protease (4 genes), transporte proteico / vacúolo (45 genes), transdução de sinal (4 genes), transcrição (25 genes), transporte (11 genes) e função desconhecida (41 genes) (STANLEY et al., 2010a).

Trabalhos de engenharia genética têm propiciado a caracterização e criação de linhagens de *S. cerevisiae* mais tolerantes ao etanol, sendo que, em alguns casos, aumentou-se a resistência em até 4% (v/v) (JIA; ZHANG; LI, 2010).

#### **1.4 Tolerância Térmica**

Ainda não são totalmente compreendidos os mecanismos celulares que definem a temperatura máxima que a *S. cerevisiae* é capaz de crescer (tolerância térmica). O ponto de transição entre uma população de células viáveis e a morte celular pelo calor ocorre dentro de uma faixa de temperatura entre 20°C e 42°C (MENSONIDES et al., 2005). Leveduras típicas requerem uma temperatura entre 30-35°C para maximizar a produção de etanol, dessa forma percebe-se a importância do controle da temperatura nos processos industriais, este controle requer sistemas de refrigeração caros em países tropicais, onde as temperaturas médias são geralmente altas durante todo o ano (ZHANG; SHI; JIANG, 2015).

O fenótipo de termotolerância é identificado como uma característica quantitativa regulada e controlada por vários genes, sendo que dentre esses, essa regulação advém principalmente daqueles relacionados à síntese de uma

macromolécula específica que protege a integridade celular durante o estresse por altas temperaturas. Em particular, os genes envolvidos no metabolismo do glicerol e do ergosterol (necessários para a célula de levedura proteger e reparar estruturas celulares) têm sido considerados envolvidos nesta termoestabilidade. (ZHANG; SHI; JIANG, 2015).

O estresse térmico desfavorece os microrganismos, causando muitas mudanças na célula, produção de ROS (*reactive oxygen species*), inativação e desnaturação de proteínas, perda de integridade da membrana, desequilíbrios metabólicos e celulares (ZHANG; SHI; JIANG, 2015), acúmulo de macromoléculas desnaturadas e agregadas, inibição do crescimento e aumento da morte celular (ALFRED L. GOLDBERG, 2003). O estresse térmico também interrompe a integridade das membranas celulares (SINGER; LINDQUIST, 1998), aumentando sua permeabilidade e afetando a fluidez da membrana plasmática. De fato, a composição específica das membranas é uma das principais razões para a termoestabilidade das leveduras. Algumas das proteínas presentes nessa membrana são degradadas durante este estresse, principalmente pela via do proteassoma, como uma estratégia de defesa para garantir a sobrevivência da célula (ZHANG; SHI; JIANG, 2015).

O início da resposta a esse estresse geralmente ocorre em temperaturas próximas ao valor máximo para o crescimento. Essas altas temperaturas induzem um aumento na termotolerância, limitando-se à medida que a temperatura de incubação se aproxima de valores letais. Estudos apontam que o início da aquisição da termotolerância em *S. cerevisiae* está entre 34 °C e 37 °C (COOTE; COLE; JONES, 1991). O estresse térmico mantém-se em uma linha tênue entre crescimento, interrupção do crescimento e perda de viabilidade. Ao usar glicose como fonte de carbono, observa-se que a taxa de crescimento celular cresce significativamente com o aumento da temperatura de 28° C a 37° C. Interessantemente, a uma temperatura de 39° C o crescimento não é afetado, a 41° C o crescimento é seriamente comprometido, enquanto que a 43 ° C há uma rápida e completa perda de viabilidade (MENSONIDES et al., 2005). Isto tem correspondência com outros estudos, onde a exposição prolongada a 48°C resultou em um aumento constante da taxa de mortalidade (TROLLMO et al., 1989).

Dentro das faixas de temperatura que aumentam a resistência ao calor, as mais altas produzem um aumento de células sobrevivendo a temperaturas letais e também uma resposta mais rápida do que temperaturas menores de pré-incubação. O fato da existência da relação cinética entre a temperatura de incubação e o grau de termotolerância indica que esses fatores não são apenas "ligados" em um determinado limite de temperatura, mas que o mecanismo molecular é uma resposta relativa ao tempo, bem como a temperatura de estresse (COOTE; COLE; JONES, 1991).

Embora temperaturas entre 38°C e 42°C permitam reduções de custos de produção devido a melhoria dos processos com trocadores de calor e microrganismos competidores (contaminantes). Uma fermentação a alta temperatura é um processo que inibe o crescimento celular da própria *Saccharomyces* e dificulta sua viabilidade. Portanto o desenvolvimento de cepas capazes de suportar temperaturas acima de 50°C é relevante para a indústria, principalmente na de produção de etanol (CASPETA; NIELSEN, 2015). De fato, uma cepa de levedura termotolerante é necessária para fermentação do bioetanol sob condições de estresse e possibilitaria a redução de custos operacionais (WALLACE-SALINAS; GORWA-GRAUSLUND, 2013), assim como a economia no investimento de capital e nos custos de operação do sistema de refrigeração (ZHANG; SHI; JIANG, 2015).

### **1.5 O modelo de tamponamento *diauxic shift***

A levedura *S. cerevisiae* durante a depleção de glicose alterna para um crescimento fermentativo substituindo sua fonte de carbono para o etanol ou glicerol (KLEIN et al., 2017). Previamente, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa sugerem que o estresse severo por etanol induziu o *diauxic shift* pelo consumo de glicerol e etanol (WOLF et al., 2021).

As análises de redes, metabólitos, genes etc, presentes em muitas vias afetadas pelo estresse de etanol, bem como as vias KEGG relacionadas à energia e desintoxicação, permitiram traçar um modelo de tamponamento de etanol mediado pela via de *diauxic shift* (Figura 3). Este modelo sugere que esta via é responsável pela desintoxicação celular sob intensa exposição ao etanol, amenizando seus efeitos colaterais. O modelo considera que nesta via, induz-se

um grande aumento de energia por acetil-CoA, ácidos graxos, peroxissomo e mitocôndrias (WOLF et al., 2021).

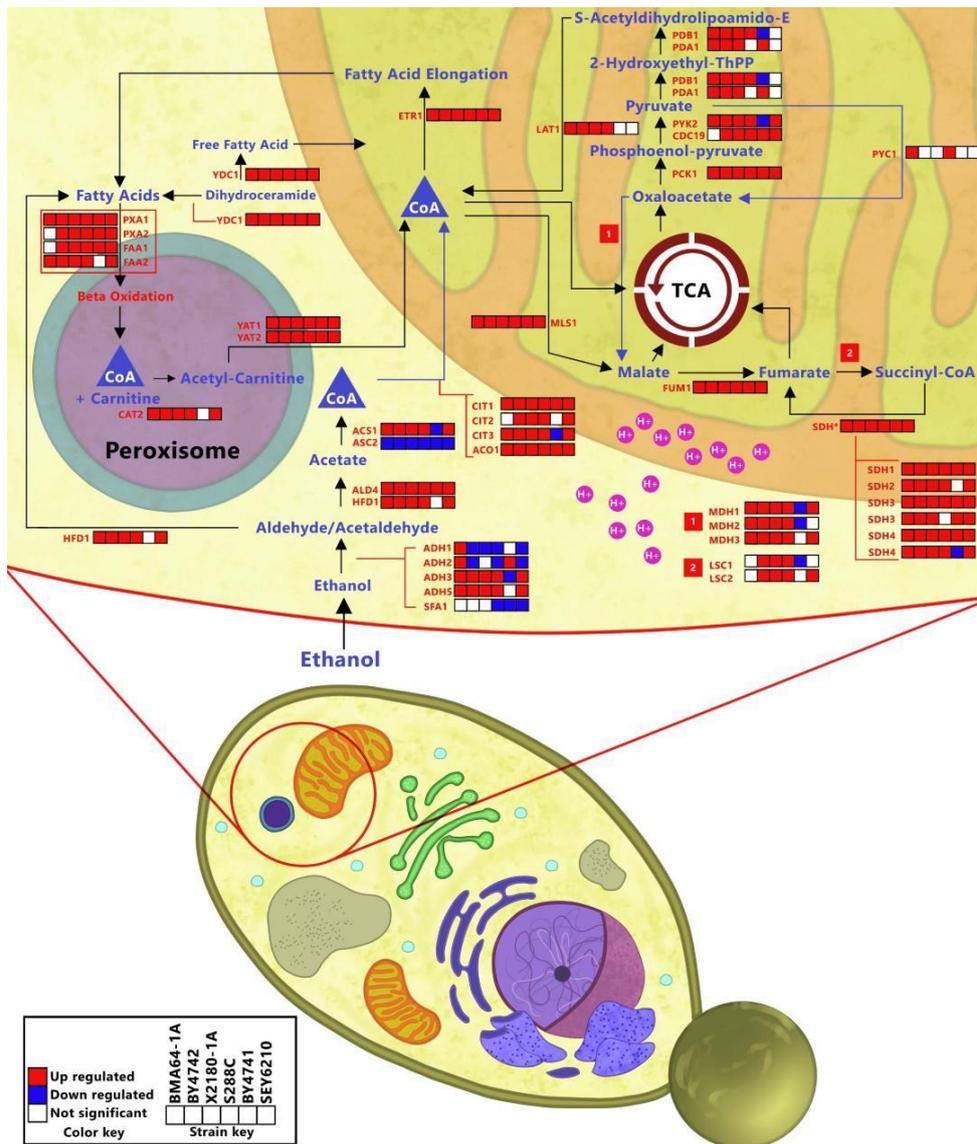


Figura 3 – Modelo de tamponamento do etanol (WOLF et al., 2021).

No modelo de bufferização do etanol via *diauxic shift* elaborado pelo nosso grupo, após a conversão do etanol em acetaldeído ou aldeído, conforme mencionado, esses metabólitos seriam convertidos em precursores de acetil-CoA. Nesse caso, a enzima Ald4p (YOR374W) converte acetaldeído em acetato, a Hfd1p (YMR110C) sintetizaria ácidos graxos a partir de aldeídos, o catabolismo de acetaldeído para acetil-CoA é realizado pelo Acs1p (YAL054C), o qual pode ocorrer no citosol. Com relação aos ácidos graxos, Pxa1p (YPL147W) e YKL188C (YKL188C) estariam importando-os para o peroxissomo e, uma vez lá, esta organela indiretamente produz acetil-CoA em uma via complexa envolvendo

Pox1p (YGL205W), Fox2p (YKR009C) e Pot1p (YIL160C). Após a glicólise, o acetil-CoA é transferido para a mitocôndria ingressando no ciclo do ácido cítrico (TCA) para gerar energia. Sugeriu-se então que as carnitina acetiltransferases Yat1p (YAR035W), Yat2p (YER024W), Cat2p (YML042W) e Cit2p (YCR005C) atuam neste processo. Sugeriu-se também que a Cat2p tem um papel essencial para transferir acetil-CoA do peroxissomo para a mitocôndria, convertendo-o em acetil-carnitina (WOLF et al., 2021).

Uma vez na mitocôndria, o acetil-CoA do citosol ou dos peroxissomos parecem desencadear indiretamente um ciclo de *feedback* positivo para sua síntese no peroxissomo. A via de alongamento do ácido graxo começa com a decomposição de acetil-CoA e, neste caso, a enzima Etr1p (YBR026C) é uma das responsáveis por este alongamento. Em seguida, esse ácido graxo volta ao peroxissomo, sendo posteriormente convertido em acetil-CoA pela via mencionada anteriormente. Juntos, esses caminhos podem ser uma forma de tamponar o etanol por meio de transformações de acetil-CoA que auxiliam a produção de energia desencadeada pelo *diauxic shift*. Nesse caso, associa-se essa via ao fenótipo de maior tolerância, uma vez que os dados indicam que eles parecem tirar melhor proveito desse processo (WOLF et al., 2021).

## 1.6 Genes relacionados à tolerância ao etanol e temperatura

### 1.6.1 CTA1 (YDR256C)

O CTA1 atua em diferentes vias metabólicas da *S. cerevisiae*, tais como o metabolismo do triptofano, do glioxilato e dicarboxilato, a biossíntese de metabólitos secundários, o metabolismo do carbono, a via de sinalização MAPK, peroxissomo e via reguladora da longevidade (KANEHISA; GOTO, 2000).

O gene CTA1 (YDR256C) codifica uma catalase A da matriz mitocondrial e matriz peroxissomal, sendo responsável pela desintoxicação do peróxido de hidrogênio. Em peroxissomos, a fonte primária de peróxido de hidrogênio é aquela produzida durante a beta-oxidação de ácidos graxos. Já na mitocôndria, o peróxido de hidrogênio é produzido pelas superóxidos dismutases Sod1p e Sod2p na defesa contra espécies reativas de oxigênio (CHERRY et al., 2012).

As catalases decompõe o peróxido de hidrogênio na matriz peroxissômica formada pela acil-CoA oxidase (Pox1p) durante a beta-oxidação do ácido graxo em dióxigênio (O<sub>2</sub>) e moléculas de água. Dessa forma, a atividade da Cta1p é importante durante a resposta ao estresse oxidativo e na proteção de proteínas contra a inativação oxidativa. A atividade da Cta1p também é aumentada durante a restrição calórica e durante o estresse oxidativo causado pelos processos de envelhecimento, adaptação ao estresse ácido e termotolerância. A catalase A é um homotetrâmero com um grupo heme e um local de ligação do cofator NADP (H) por subunidade. Sua transcrição é regulada em resposta ao ácido oleico, glicose, heme e oxigênio. Esta resposta transcricional é mediada pelos ativadores transcricionais Adr1p, Oaf1p, Rtg1p e Rtg2p, via ligação aos elementos ORE e UAS1 sobrepostos no promotor CTA1 (CHERRY et al., 2012).

### **1.6.2 IXR1 (YKL032C)**

O gene IXR1 (YKL032C) codifica um repressor transcricional que regula os genes hipóxicos durante a normóxia, estando envolvido na repressão aeróbia de genes como COX5b, TIR1 e HEM13. Este gene também auxilia nas ligações cruzadas *intrastrand* de DNA formadas pela cisplatina HMG (caixa de grupo de alta mobilidade) contendo proteínas que se ligam e dobram o DNA modificado com cisplatina, bloqueando o reparo por excisão (CHERRY et al., 2012).

Este gene também codifica uma proteína de ligação ao DNA específica da sequência. Esta proteína colocaliza-se na cromatina nuclear e está envolvida na regulação negativa da transcrição de promotores de RNA polimerase II, na resposta celular à hipóxia, no reparo do DNA, na regulação do reparo por excisão de nucleotídeos, na resposta à cisplatina e na regulação da biogênese do ribossomo (CHERRY et al., 2012).

### **1.6.3 ALD4 (YOR374W)**

No genoma da levedura, existem alguns genes conhecidos por codificar aldeído desidrogenases. Entre esses genes o Ald4p (YOR374W) e Ald5p são proteínas mitocondriais, usam NAD e NADP como cofatores e são dependentes

de K<sup>+</sup> (CHERRY et al., 2012). Ald4p atua na glicólise e gliconeogênese, na degradação de ácidos graxos, valina, leucina, isoleucina, e lisina; no metabolismo da prolina, arginina, histidina, triptofano, beta alanina, glicerolipídeos, piruvato e etanol; na biossíntese de metabólitos secundários, ascorbato, aldarato, pantotenato, CoA, cofatores, acetato e na regeneração do NADPH (CHERRY et al., 2012; KANEHISA; GOTO, 2000).

As aldeído desidrogenases desempenham um papel crítico na conversão de acetaldeído em acetil-CoA durante o crescimento em fontes de carbono não fermentáveis. Desempenham a quebra de aldeídos tóxicos acumulados em condições de estresse. Em uma via alternativa de desvio da piruvato desidrogenase mitocondrial: o piruvato é primeiro descarboxilado em acetaldeído no citosol pela piruvato descarboxilase e é então convertido em acetato pelas aldeído desidrogenases mitocondriais (ALD4 e ALD5). (CHERRY et al., 2012).

Apesar da expressão da ALD4 ser reprimida pela glicose, esse gene é necessário para garantir o crescimento da levedura em meio com etanol, uma vez que, além de auxiliar na conversão de acetaldeído em acetato, pode substituir a aldeído desidrogenase dependente de NADP citosólica quando dirigida ao citosol. De fato, os mutantes ALD4 não crescem em etanol. A expressão de ALD4 é regulada por várias proteínas diferentes: o fator de transcrição Stb5p induz a transcrição de ALD4, enquanto os repressores de transcrição Nrg1p e Nrg2p a diminuem (CHERRY et al., 2012).

## **1.7 CRISPR-Cas9**

Devido ao crescente interesse na produção de substitutos aos combustíveis fósseis e ao uso de fábricas celulares para produção de fármacos e químicos, acentua-se a necessidade de métodos mais eficazes de produção de mutantes. Como naturalmente muitos microrganismos não evoluíram para uma função comercial desejada, a fim de atender tais interesses, é necessária a utilização de abordagens de engenharia genética focando na engenharia metabólica, melhorando, assim, seu potencial comercial (LIAN; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018).

As vantagens apresentadas pela *S. cerevisiae* em termos de biologia molecular (CHERRY et al., 2012), compatibilidade com mais de um tipo de fermentação e alta tolerância a estresses (BALAKUMAR; ARASARATNAM, 2012; LIAN; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018), permite que ela seja muito utilizada na engenharia genética. De fato, as alterações gênicas em leveduras vêm sendo feitas desde a década de 80 (FRACZEK; NASEEB; DELNERI, 2018) para atender as necessidades de produção sustentável de produtos químicos, farmacêuticos e de bioetanol (LIAN; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018).

A engenharia metabólica geralmente envolve um dos quatro tipos de modificações genéticas possíveis: o aumento do nível de expressão de um ou mais genes de interesse, redução do nível de expressão de alguns genes essenciais, a deleção de genes e/ou vias e a introdução de novas vias biossintéticas dentro de um genoma previamente estudado. Embora a recombinação homóloga tenha sido usada na engenharia genética de leveduras por décadas, essa técnica é lenta, ineficiente, trabalhosa e de baixo rendimento (LIAN; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018).

Em bactérias, os loci das repetições palindrômicas são regularmente aglomerados em intervalos regulares (CRISPR) (STOVICEK; HOLKENBRINK; BORODINA, 2017) (Figura 4). Esse sistema também está presente em arqueobactérias. Dessa forma, em quase 40% dos genomas de bactérias e quase 90% dos genomas de arqueobactérias sequenciados (ZHANG; WEN; GUO, 2014) observa-se que as CRISPR atuam no sistema imunológico adaptativo contra fagos invasores e DNAs plasmidiais (MOJICA; RODRIGUEZ-VALERA, 2016).

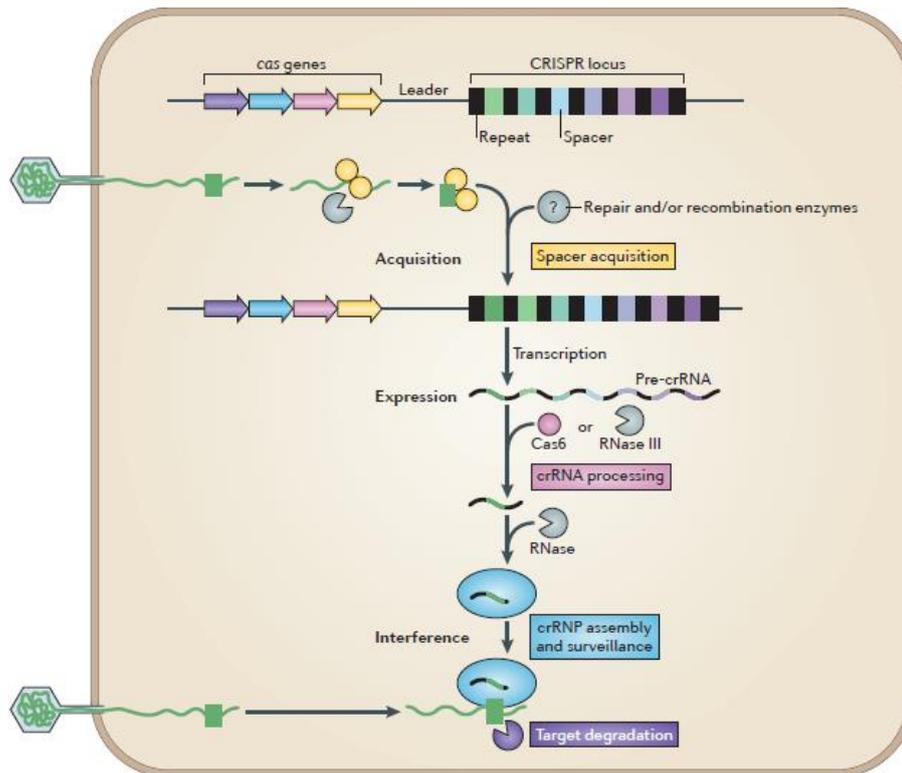


Figura 4 – Esquema do funcionamento in vivo do sistema CRISPR (Lian et al., 2018).

A partir deste sistema adaptativo CRISPR, foi desenvolvida uma tecnologia poderosa e de múltiplos propósitos para engenharia de genoma (Liu et al., 2015). No início de 2013, aplicações de CRISPR-Cas9 para edição de genoma *in vivo* em células de mamíferos foi publicada. Posteriormente, aplicou-se essa técnica na levedura *S. cerevisiae* (STOVICEK; HOLKENBRINK; BORODINA, 2017).

O sistema de CRISPR-Cas9 é composto por endonucleases programáveis de sequências específicas, que facilitam a edição precisa de loci genômicos endógenos, permitindo múltiplos tipos de edição gênica (RAN et al., 2013). Este sistema possui algumas divisões, dentre as quais a do tipo II, provinda do microrganismo *Streptococcus pyogenes*, é a mais estudada. A partir deste sistema adaptativo, foi desenvolvida uma tecnologia poderosa e de múltiplos propósitos para engenharia de genoma (Liu et al., 2015).

O complexo de edição consiste em dois componentes: a enzima Cas9 nuclease e um RNA guia (gRNA), o qual irá direcionar precisamente a Cas9 para o sítio de clivagem desejado (Goyal et al., 2017). Neste sistema, o gRNA recruta uma nuclease Cas9 que guia o sistema para um alvo genômico de ~20 pb por

meio do emparelhamento de bases com a fita de DNA. O alvo genômico particular deve ser seguido pelo protoespaçador adjacente motif (PAM) de sequência NGG, o qual 'N' pode ser 'A', 'G', 'C' ou 'T' (Goyal et al., 2017; Lian et al., 2018; Peng et al., 2018; Stovicek et al., 2017). O domínio Cas9 da nuclease HNH, cliva a fita de DNA complementar à sequência do guia, enquanto o domínio semelhante a RuvC cliva a outra fita de DNA, resultando assim, em um DSB em ponto específico no genoma: a clivagem do DNA é realizada três nucleotídeos a montante do PAM (Goyal et al., 2017; Lian et al., 2018; Stovicek et al., 2017).

A modificação do genoma pode ser alcançada, então, de duas maneiras, sendo elas: as mutações de *frameshift* por meio da via de reparo não homóloga de fim de adesão (NHEJ), ou por meio do reparo direcionado por homologia (HDR). Ao fornecer um modelo de reparo para o DNA, o sistema é compelido ao uso do reparo no sistema HDR, o qual várias modificações de DNA podem ser obtidas. Esta técnica é usada normalmente para correção de genes, inserção de elementos no DNA, superexpressão gênica ou para deleção de alguma sequência (Goyal et al., 2017; Lian et al., 2018).

Em virtude da capacidade do Cas9 de ligação e clivagem em sítios-específicos do genoma, essa técnica tornou-se uma ferramenta poderosa para a engenharia genética e tem sido amplamente utilizada em estudos desta área nos últimos anos (Goyal et al., 2017).

Em suma, o sistema CRISPR é capaz de conduzir deleção de genes, integração gênica, ativação transcricional (CRISPRa) e interferência transcricional (CRISPRi), representando a maioria das manipulações genéticas necessárias para a engenharia de metabólica (Stovicek et al., 2017; Lian et al., 2018).

## 2 HIPÓTESE

A hipótese geral do trabalho é a de que a inativação de genes presentes nos mecanismos ativados durante períodos de estresse, como o de tamponamento por etanol via *diauxic shift*, permite a alteração da tolerância a estressores em cepas de *S. cerevisiae*. Além disso, mutações em um dado gene em linhagens distintas seriam capazes de modificar a resposta a estressores de forma diferente para cada linhagem devido a mecanismos compensatórios presentes na maquinaria celular da levedura.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação é verificar os efeitos da inativação de genes ligados ao mecanismo de *diauxic shift*

### 3.2 Objetivos Específicos

- 1 – Seleção de genes relacionados ao *diauxic shift* para edição gênica;
- 2 – Criação de cepas mutantes de *S. cerevisiae*;
- 3 – Avaliação do efeito da deleção dos genes selecionados nas novas linhagens frente à tolerância ao etanol e temperatura;
- 4 – Obtenção de uma linhagem mutante mais tolerante a etanol e/ou temperatura que sua versão selvagem;
- 5 – Analisar a sobrevivência da levedura ante aos estresses etanólico e térmico.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Seleção de genes candidatos

Para seleção dos genes candidatos foram utilizados os dados de RNA-Seq obtidos em experimentos anteriores do grupo. A partir desses dados foi realizada uma filtragem por ferramentas de bioinformática a qual os valores de *fold-change* para expressão diferencial das culturas sob estresse por etanol foram selecionados. Esses dados foram comparados ao modelo de *diauxic shift* de Wolf (2021) permitindo selecionar o gene ALD4 (YOR374W). Os genes CTA1 (YDR256C) e IXR1 (YKL032C), diferencialmente expressos durante um estresse etanólico também foram selecionados baseando-se nas suas funções descritas no *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (CHERRY et al., 2012).

Dessa forma, foram selecionados tanto genes relacionados diretamente com a tolerância ao etanol, quanto aqueles onde este estressor tinha algum papel na reestruturação dos mecanismos metabólicos referentes ao estresse.

### 4.2 Microrganismos e meios de cultura

Foram selecionados para esse estudo os microrganismos BY4742, SEY6210 e BMA64-1A (<http://www.euroscarf.de>, <http://yeast.lab.nig.ac>), leveduras de laboratório já presentes no grupo de pesquisa e que já haviam sido utilizadas em outros trabalhos que geraram resultados que foram aproveitados neste estudo, maiores detalhes sobre estes microrganismos podem ser vistos no Apêndice A.

Os experimentos foram realizados em meio de cultura YNB. Primeiramente, 190 mg de base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos (YNB), 2g de bacto agar (quanto necessário para produzir o meio sólido) foram diluídos em 95 mL de Água Milli-Q. O meio foi autoclavado à 121°C, 30-40 psi, 15 minutos e, no caso do meio líquido, o mesmo foi filtrado em filtro de 0,2 µm. Posteriormente, adiciona-se 2% de glicose esterilizada e 1X de *drop out* (mínimo completo). O meio sólido foi vertido imediatamente sobre placas de Petri. Ressalta-se que parte do meio sólido recebeu 200 mg/L de antibiótico G418

antes das montagens das placas. O meio *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements sem histidina (Sigma-Aldrich)* foi produzido seguindo restrições de cada linhagem (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Nutrientes e concentrações para concepção do meio *drop out* a 10X.

Nutriente	Concentração (mg/L) (10X)
Sal hemissulfato de L-adenina	200
L-Arginina HCl	200
L-Histidina HCl mono-hidratada	200
L-isoleucina	300
L-Leucina	1000
L-lisina HCl	300
L-metionina	200
L-fenilalanina	500
L-Treonina	2000
L-triptofano	200
L-tirosina	300
L-Uracila	200
L-Valina	1500

Outro meio necessário foi o YPD (Extrato de levedura – Peptona – Glicose), o qual foi preparado conforme a seguinte relação: 20g de peptona, 10g de extrato de levedura e 950 mL de água Milli-Q; 20g de bacto ágar foram adicionados para o meio sólido. O meio foi autoclavado seguindo os procedimentos de autoclavagem descritos anteriormente e adição de glicose acima mencionados.

#### 4.3 Montagem dos *primers*

Para realização do processo de mutação, foi necessária a construção de oligos para a modificação do plasmídeo. O primer *forward* (oliA) possui 20 bp relativos à sequência genômica alvo enquanto que o primer *reverse* é referente

à sequência 5' GATCATTTATCTTTCACTGC 3' do vetor (pMEL16\_crispr\_oliB) (Figura 5). Ambos oligos possuem a extremidade 5' fosforilada. Para a construção do primer oliA, foi utilizada a ferramenta computacional CRISPRdirect (NAITO et al., 2015). Inicialmente, introduziu-se a sequência do gene alvo no software e selecionou-se *S. cerevisiae* na região “*Specificity check*” para o design do oligo.

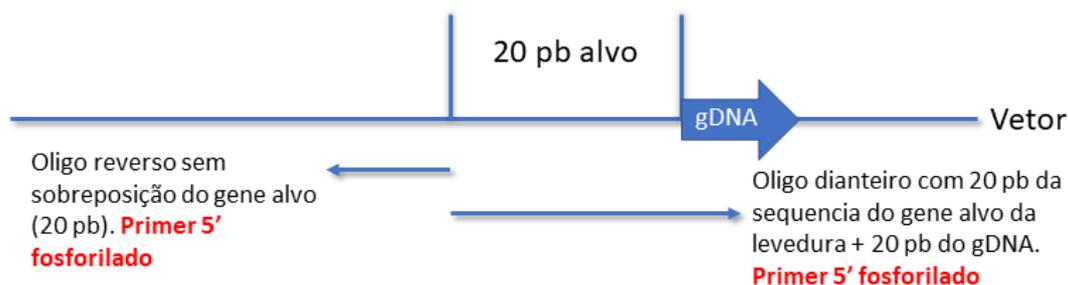


Figura 5 - Design do gDNA para implementação em plasmídeo pMEL16.

Os oligos oliA e oliB foram então utilizados para inserir a sequência target no pMEL16 (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Oligos utilizados para inserção do target no pMEL16.

Nome	Sequência	X °C	Y °C	Z °C
ALD4	P-5' GATGGTAGAATGATTGATACGTTTTAGA	71,7	65,2	64,7
	GCTAGAAATAGC 3'			
CTA1	P-5' TTGAAAAATTTAGATGCATAGTTTTAGAG	70,6	66,6	63,65
	CTAGAAATAGC 3'			
IXR1	P-5' GTA CTTGTCTCAGCTCCCACGTTTTAGA	74,2	70,2	67,25
	GCTAGAAATAGC 3'			
Olib	P-5' GATCATTTATCTTTCACTGC 3'			

Para o cálculo de X, Y e Z, foram seguidas as seguintes fórmulas:

$$X = \left( \frac{\text{Temperatura de anelamento } forward + \text{Temperatura de anelamento } reverse}{2} \right) + 9 \quad (1)$$

$$Y = \left( \frac{\text{Temperatura de anelamento } forward + \text{Temperatura de anelamento } reverse}{2} \right) + 5 \quad (2)$$

$$Z = \left( \frac{\text{Temperatura de anelamento } forward + \text{Temperatura de anelamento } reverse}{2} \right) + 2 \quad (3)$$

Os oligos utilizados para a construção do DNA de reparo estão descritos na (**Tabela 3**). Estes oligos foram construídos no *software* Geneious (versão

7.1.3). Utilizou-se os genes de interesse como base focando a região genômica-alvo no primer oliA, seguindo-se uma extensão flanqueando o alvo totalizando 60 pb (Figura 6). Sintetizou-se uma sequência *forward* e uma *reverse* para cada gene alvo.

Tabela 3 - Oligos utilizados no reparo e genotipagem das mutantes de ALD4.

Nome	Sequência	Descrição	TM (°C)
ALD4	TCTGCTGGCTTTGCTGATAAAATTGATGGTAGAATGATTGA TAC	Homologia Forward	95
ALD4	TAGAACCCATTTTTCTTACACTAAGAGACAGCCTTTGGGTG	Homologia Reverse	95
ALD4	GACCGTGCCTTCTCTAATGG	Genotipagem Forward	59,7
ALD4	ATTGTGGGTGAGGCCATTAC	Genotipagem Reverse	59,7
CTA1	TTTAAAAGGTAAGTTAAATAAATATAATAGTACTTACAAA TAAATTTGGAACCCTAGAAGAACGCTCAAGTAACAAATGA GTGGCGTTGTTTCCACGACAATTATTTATGATAGTGTGTA	Homologia Forward	95
CTA1	TTTAAAAGGTAAGTTAAATAAATATAATAGTACTTACAAA TAAATTTGGAACCCTAGAAGAACGCTCAAGTAACAAATGA GTGGCGTTGTTTCCACGACAATTATTTATGATAGTGTGTA	Homologia Reverse	95
CTA1	GCTCTGTCAAACGTCCTTGC	Genotipagem Forward	59,8
CTA1	GGTTCCTACTCAGTGCTGC	Genotipagem Reverse	60,4
CTA1	ATCCCCTTCTTCTATCCATTCTGTGATATACGTACGACGC TAACAGTACCCACAACCTGCACAAATAAACAACCTTTAGTTT TCCACTGTAACATTATCCCACGCAAACAACGAGAATAAGG	Homologia Forward	95
IXR1	ATCCCCTTCTTCTATCCATTCTGTGATATACGTACGACGC TAACAGTACCCACAACCTGCACAAATAAACAACCTTTAGTTT TCCACTGTAACATTATCCCACGCAAACAACGAGAATAAGG	Homologia Reverse	95
IXR1	CTCCCCTTGGTGAGAGAACG	Genotipagem Forward	59,8
IXR1	TTTTGGCTTCATCACGCTCG	Genotipagem Reverse	59,5

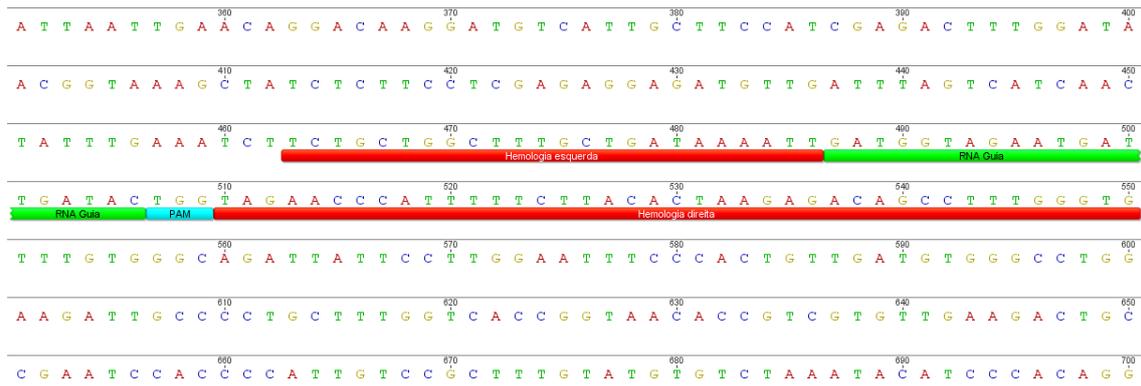


Figura 6 – Modelo dos oligos de reparo, em vermelho as sequencias complementares. Em verde reporta-se o gRNA (porção contida no OliA). Em azul a sequência PAM (NGG).

A verificação da edição desejada nos mutantes foi realizada via PCR e sequenciamento automático em plataforma ABI3730XL. Para isso, foi necessário a síntese de oligos flanqueando as regiões-alvo das mutações (tanto para verificar a deleção quanto para verificar a inserção de *stop codon* prematuros) (Figura 7).

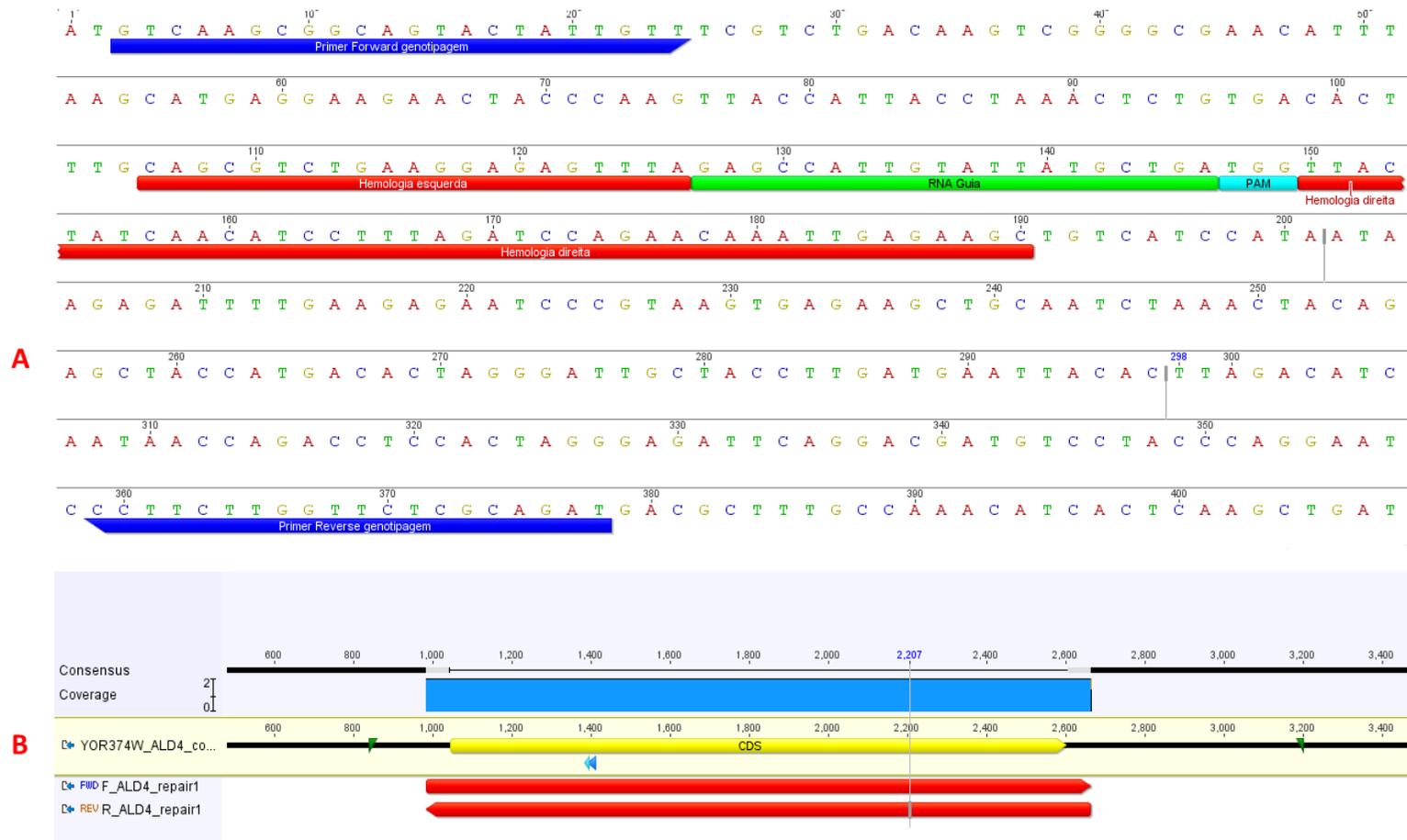


Figura 7 – Exemplo da montagem dos primers de genotipagem das mutações (pequenas setas verdes). A: Primers para verificação da inserção de *stop codon* prematuro (sequencia entre as barras verde e azul claro). B: *Primers* para verificação da deleção (pequenas barras verdes flanqueando o reparo, reportado em vermelho).

#### **4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) de modificação do plasmídeo e eletroforese de confirmação da modificação**

Para modificação do plasmídeo pMEL16 (Addgene) foi realizada uma PCR seguindo a reação: 20 ng do plasmídeo pMEL16, 5 µL de tampão HF 5x, 1µL de dNTP a 10 mM (Invitrogen), 1 µL de *primer forward* a 10 µM, 1 µL do *primer reverse* a 10 µM, 1 µL de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher) em um volume final de 25 µL. A ciclagem foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes temperaturas: 98 °C por 1 min, seguido de 5 ciclos a 98 °C por 30s, X °C por 30 s e 72 °C por 6 min, seguido de 10 ciclos a 98 °C por 30 s, Y °C por 30 s e 72 °C por 6 min, seguido de 20 ciclos a 98 °C por 30 s, Z °C por 30 s e 72 °C por 6 min, com extensão final de 72 °C por 10 min. As temperaturas X, Y e Z são específicas para cada conjunto de primers e estão descritas na (**Tabela 2**), juntamente com a sequência dos primers.

Os primers de checagem da modificação do plasmídeo do pMEL16 devem gerar uma banda em torno de 6 Kb. O surgimento de bandas mais altas ou menores indica uma provável amplificação inespecífica.

#### **4.5 Digestão da reação de modificação, purificação do plasmídeo e ligação por ligase T4**

Realizada a confirmação de modificação do plasmídeo pMEL16 por eletroforese, seguiu-se uma digestão da reação utilizando a enzima DPNI, através da reação de 22 µL da reação de amplificação, 1 µL da enzima DPNI (New England BioLabs) e 2 µL do tampão *cut smart* (New England BioLabs). Esta reação foi incubada a 37°C por 30 minutos.

Para a purificação do plasmídeo, adicionou-se 25 µL da solução de ligação da membrana aos 25 µL da reação digerida. Em seguida, esta mistura foi transferida para um novo tubo com uma coluna de purificação e feita incubação de 1 minuto à temperatura ambiente. O conteúdo é centrifugado a 14.000 RPM por 1 minuto seguido do descarte do sobrenadante.

Em seguida, foram adicionados 700  $\mu$ L de solução de lavagem de membrana e etanol (580  $\mu$ L de solução e 120  $\mu$ L de etanol), sendo realizada na sequência uma nova centrifugação à 14.000 RPM por 1 minuto com descarte do sobrenadante ao fim da etapa. Então, repetiu-se a etapa anterior, porém, com 500  $\mu$ L de solução de lavagem de membrana e etanol (400  $\mu$ L de solução e 100 $\mu$ L de etanol) e com centrifugação à 14.000 RPM por 5 minutos.

Posteriormente, foi realizado o descarte do sobrenadante e feita uma nova centrifugação a 14.000 RPM por 1 minuto para auxiliar na remoção de resíduos de etanol.

Por fim, a coluna foi transferida a um novo tubo (1,5 mL) e foram adicionados 50  $\mu$ L de água *nuclease free*, com incubação de 1 minuto à temperatura ambiente para, em seguida, realizar-se nova centrifugação à 14.000 RPM por 1 minuto.

100-200 ng de pMEL16 purificado, 1  $\mu$ L da enzima T4 ligase e tampão com concentração final de 1X (sendo acertado devido a vir inicialmente a 10x) em um volume final de 10  $\mu$ L foram incubadas por 24h em temperatura ambiente para realizar a ligação do plasmídeo.

## **4.6 Competência em *Escherichia coli* TOP 10**

### **4.6.1 Tornando a bactéria TOP 10 competente**

As bactérias foram replicadas em uma placa LB ágar por uma incubação de 16 horas à 37°C. 5 colônias foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 5mL de meio LB líquido e incubadas por 16 horas a 37°C com agitação de 130 RPM.

1 mL da suspensão bacteriana foi inoculada em 50 mL de meio LB e incubadas por 3 horas a 37°C com agitação de 130 RPM até a cultura atingir uma OD<sub>600</sub> de 0,4. A cultura foi centrifugada por 5 minutos à 4°C e 6.000 RPM, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 15 mL de CaCl<sub>2</sub> a 0,1 M mantido em gelo. Seguiu-se uma centrifugação por 5 minutos à 6.000 RPM a 4°C.

Após a etapa anterior o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado, seguido da adição de 1 mL de

glicerol a 50%. Várias alíquotas contendo 100 µL do cultivo foram estocadas à -80°C.

#### **4.6.2 Transformação do plasmídeo em bactérias TOP 10**

Para a transformação, 3 tubos, cada um com 100 µL da bactéria competente, foram levados ao gelo por 10 minutos. 20 ng de cada plasmídeo pMEL16 modificado e purificado foram adicionados e cuidadosamente homogeneizados. O material foi, então, incubado em gelo por 30 minutos. As células foram, então, incubadas à 42°C por 90 segundos, sem agitação, seguida de um choque térmico em gelo por 2 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 800 µL de meio LB seguido de uma homogeneização cuidadosa e incubação à 37°C por um período entre 45 minutos e 1 hora.

O material foi centrifugado à 14.000 RPM por 30 segundos e 800 µL de meio foram removidos. As células foram ressuspensas com o restante da solução e plaqueadas juntamente com os 100 µL restantes em placa com meio LB e ampicilina (1µL de ampicilina para cada 1mL de meio). Estas placas foram incubadas à 37°C por 16 horas.

#### **4.7 Extração do plasmídeo pMEL16 e checagem da inserção do target**

As colônias bacterianas transformadas contendo o plasmídeo foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas a 37° C por 16 h a 200 Rpm. Essa cultura, então, foi utilizada para extração do plasmídeo utilizando o kit QuickLyse® Miniprep Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

Reações de PCR utilizando primers M13 foram utilizados para o screening das mutantes. Para isso, 5 colônias foram inoculadas em 15 mL de meio LB a 37°C por 16 h a 200RPM. Coletou-se 10 µL do cultivo seguido de centrifugação a 2.000 RPM por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 4 µL de NaOH 0,4 M, seguido de uma incubação a 95°C por 10 minutos.

Após essa etapa, foi realizada a PCR da amostra conforme a reação: 0,15µL de MgSO<sub>4</sub> (Addgene), 0,25 µL de primer M13 Forward (10 µM), 0,25 µL de primer M13 Reverse (10 µM), 0,1 µL de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0,5 µL de buffer (10x), 0,02 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase (ThermoFisher), 1,73 µL de água e 2 µL de Amostra. A ciclagem foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes temperaturas: 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 15s, 50 °C por 30 s e 68 °C por 1 min, com extensão final de 68 °C por 5 min.

Além disso, tratamentos com a enzima de restrição BSU XV foram usados para validar os mutantes. Para isso, os amplicons foram digeridos com esta enzima de restrição da seguinte forma: 2,4 µL de água, 0,5 µL de tampão, 2 µL de Amostra e 0,1 µL de Enzima BSU XV. A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos seguida por uma eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação da modificação do plasmídeo, o qual espera-se uma banda de 778 pb.

Por fim, a sequência amplificada foi enviada para sequenciamento para confirmar a devida modificação do plasmídeo pMEL16.

#### **4.8 Geração de leveduras competentes**

Foram cultivadas as cepas BY4742, SEY6210 e BMA64-1A em Erlenmeyer com 5 mL de YPD a 30°C por 16 horas e com agitação de 140 RPM.

As culturas foram diluídas em YPD para um OD<sub>600</sub> de 0,3. O material foi incubado por 5 horas com agitação de 140 RPM até um OD<sub>600</sub> ~1.

As células foram, então, centrifugadas por 5 minutos a 4.000 RPM, o sobrenadante foi descartado e o material ressuspense em 50 mL de água MiliQ autoclavada. Esse procedimento foi repetido novamente com uma centrifugação final tal como mencionado. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 10 mL de solução LATE e centrifugadas por 5 minutos a 4.000 RPM. O sobrenadante foi novamente descartado seguida de uma diluição em 1 mL de solução LATE. Várias alíquotas de 100 µL de células competentes e 43 µL de glicerol 50% foram estocadas a -80°C.

#### 4.9 Preparo do DNA de reparo e transformação

40 µL de cada um dos oligos de reparo *forward* e *reverse* (100 µM cada) foram conjuntamente incubados à 95°C por 10 minutos. Os tubos foram resfriados na bancada por 3 horas.

Para a transformação, foram utilizados 10 µL de Salmon Sperm Deoxyribonucleic acid – SSDNA (Sigma-Aldrich), 1 µg de plasmídeo p414 (Addgene), 1 µg de plasmídeo pMEL16 modificado e purificado, 5 µL de DNA de reparo para cepa SEY6210 e 20 µL de DNA de reparo para cepa BY4742, 100µL de células de levedura competentes, 600 uL de solução PLATE (Ryan, 2016).

Foram realizadas 5 transformações, sendo a primeira com 5 µL de DNA de reparo para cepa SEY6210, outras 2 com 20 µL de DNA de reparo para cepa BY4742 e por fim 2 com 5 µL de DNA de reparo para cepa BMA641-A. Em ambas as transformações, após a adição de todos os componentes, foi realizada a mistura aspirando e descartando a reação no tubo de forma lenta e cuidadosa. Em seguida as reações foram incubadas a 30°C por 30 minutos com agitação de 140 RPM. Foi então adicionado 10% DMSO na amostra, seguido de uma incubação por 15 minutos a 42°C e transferência imediata para gelo por 2 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 250 µL de meio SD/CM *drop out* específico de cada linhagem. Seguiu-se uma incubação por 2 horas a 30°C e agitação de 140 RPM, 10 µL das amostras foram plaqueadas em YPD ágar para controle de crescimento e o restante foi plaqueada em placas SD/CM *drop out* com 20 mg/L do antibiótico G418. As placas foram então incubadas a 30°C por um período de 3 dias para o crescimento das colônias.

#### 4.10 Confirmação de transformação da levedura

O *screening* de colônias foi realizado via PCR utilizando os primers de confirmação de transformação. Para esse teste, 10 colônias de cada placa foram inoculadas em 25 mL de meio YPD por 16 horas. Após, foram coletados 10 µL de cultivo e centrifugado a 2.000 RPM por 2 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 4 µL de NaOH e

incubadas à 95°C por 10 minutos. Para checagem da inserção do target, foi realizada uma PCR utilizando a reação: 0,5 µL de tampão (10X), 0,1 µL de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0,15 µL de MgSO<sub>4</sub>, 0,25 µL de primer M13 Forward (10 µM), 0,25 µL de primer M13 Reverse (10 µM), 0,02 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase (ThermoFisher), 1,73 µL de água e 2 µL de amostra. A ciclagem utilizada foi 94 ° C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 94 ° C por 15 s, 60 ° C por 30 s e 68 ° C por 1 min, com extensão final a 68 ° C por 5 min, em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Posteriormente, 0,5 µL de tampão, 2,4 µL de água, 2 µL do amplicom e 0,1 µL de Enzima de restrição (Anza 11) foram incubados a 37°C por 15 minutos, em seguida foi realizada uma eletroforese em 2% de gel de agarose, nesta foi possível avaliar se havia a presença de 2 bandas ou 1 apenas, sendo que o primeiro caso era um indicativo da inativação do gene de estudo.

A segunda forma de confirmação da presença de um mutante se deu pelo uso da técnica de sequenciamento e avaliação da sequência. A reação pré-sequenciamento consistiu de 1,5 µL de tampão, 4,5 µL de água, 0,5 µL do Primer Reverse de genotipagem do gene testado, 3 µL (10 ng/ µL) de amostra e 0,5 µL de BigDye. A ciclagem utilizada foi 95 ° C durante 4 min, seguido de 24 ciclos de 95 ° C por 20 s, 50 ° C por 15 s e 60 ° C por 4 min, em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

#### **4.11 Teste de tolerância ao etanol**

Para testar a tolerância ao etanol das leveduras selvagens e mutantes, células foram incubadas por 16h (obtenção das células na fase log) em 25 mL de YPD a 30°C. Após essa incubação, os cultivos foram medidos e alíquotas foram retiradas para uma OD<sub>600</sub> final de 0,2, essas foram centrifugadas a 2.000 RPM por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante e o *pellet* obtido foi ressuscitado com uma solução preparada em uma placa de 6 poços, 3 dos quais continham meio de cultura e solução fisiológica (controle) e 3 continham meio de cultura e etanol (tratamento) conforme concentrações apresentadas na **(Tabela 4)**. Na sequência foi realizado o cultivo destas amostras a 30°C a 120 RPM por 1 hora seguido de um *spot* teste.

Tabela 4 – Valores de meio e etanol ou solução fisiológica para os testes de tolerância ao etanol.

Porcentagem de etanol no meio (%)	Meio YPD (mL)	Etanol ou solução fisiológica (mL)
18	1,64	0,36
20	1,60	0,40
22	1,56	0,44
24	1,52	0,48
26	1,48	0,52
28	1,44	0,56
30	1,40	0,60
32	1,36	0,64
34	1,32	0,68

#### 4.12 Spot Test

Foram utilizadas placas com YPD as quais receberam uma preparação de 5 diluições seriadas 1:10 (90  $\mu$ L de água estéril e 10  $\mu$ L da cultura). Antes de cada etapa de diluição, o material foi homogeneizado (Figura 8). As placas foram então incubadas à 30°C até o surgimento de colônias.

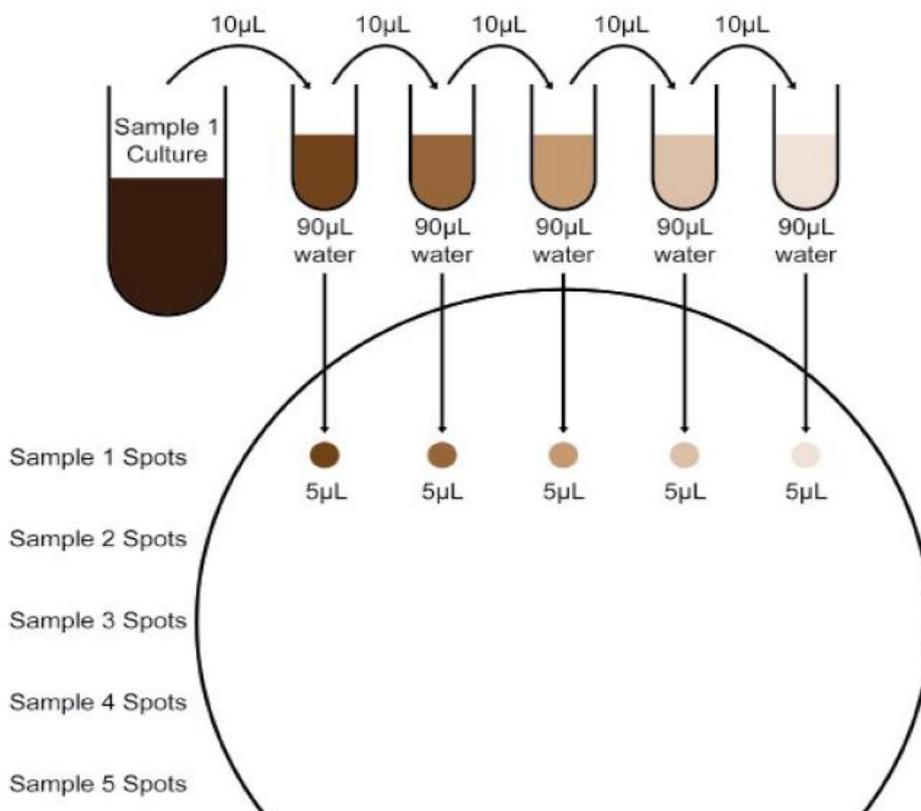


Figura 8 – Modelo de aplicação de *spot test* adaptado (FRED, 2002).

#### 4.13 Análise de crescimento celular e testes de sobrevivida

O crescimento das células foi definido pela análise de OD<sub>600</sub> utilizando o equipamento Epoch TM 2 em uma placa de 48 poços. As placas foram inoculadas com colônias de interesse em YPD e a incubação foi realizada por 14 horas. Alíquotas de 200 µL foram retiradas desse crescimento e mensuradas, determinando assim o volume necessário para a obtenção de alíquotas correspondendo a uma OD<sub>600</sub> de 0,2.

Tais alíquotas foram centrifugadas a 2.000 RPM por 2 minutos e ressuspensas em meio YPD. Após a preparação, os inóculos foram incubados por 1h para crescimento e, em seguida, foi realizada nova medição para acertar o volume para a OD<sub>600</sub> de 0,2 novamente. Essas células foram ressuspensas em 1 mL de YPD, com posterior medição ao longo de 24h no mesmo leitor de placas supracitado.

O teste de sobrevivência foi realizado da mesma forma que o de crescimento citado até a etapa de centrifugação de 2.000 RPM por 2 minutos, sendo que, no instante em que as células foram ressuspensas, esta etapa foi realizada em meio contendo YPD e etanol na tolerância máxima de cada uma das linhagens, conforme Apêndice B (ALMEIDA, 2017), ao longo de 24 horas.

#### 4.14 Análise estatística das curvas de crescimento

Para a avaliação estatística dos experimentos, foram utilizados os softwares R com a biblioteca Rcmdr (FOX, 2005), além do software Matlab e a função cftool. Nessas avaliações, foram comparados o tempo e a densidade óptica celular das linhagens ao longo do tratamento, obtendo-se os valores de desvio padrão e média nos quais foi avaliado o p-Value de 0,05 para considerar diferenças estatisticamente significantes.

A avaliação do Matlab das curvas de crescimento populacional da levedura em função do tempo foi modelada por uma equação diferencial de 1ª ordem proposta por Pierre François Verhulst e conhecida como equação logística (BACAËR, 2008), a qual é definida como:

$$\frac{dP}{dt} = kP \left(1 - \frac{P}{M}\right), \quad (4)$$

onde  $P$  é a população no domínio do tempo  $t$ , ou seja  $P(t)$ ;  $k$  é a taxa de crescimento e  $M$  é uma variável conhecida como suporte de carga, a qual está associada ao número máximo de indivíduos que o ambiente suporta.

A equação de crescimento populacional tem solução analítica, conforme segue:

$$P(t) = \frac{M}{1 + \left(\frac{1}{P(0)} - \frac{1}{M}\right) M e^{-kt}}. \quad (5)$$

A Figura 9 mostra graficamente o comportamento da equação 2, na qual pode ser observado uma fase de crescimento populacional exponencial e uma faixa de estabilização, associada ao limite de substrato.

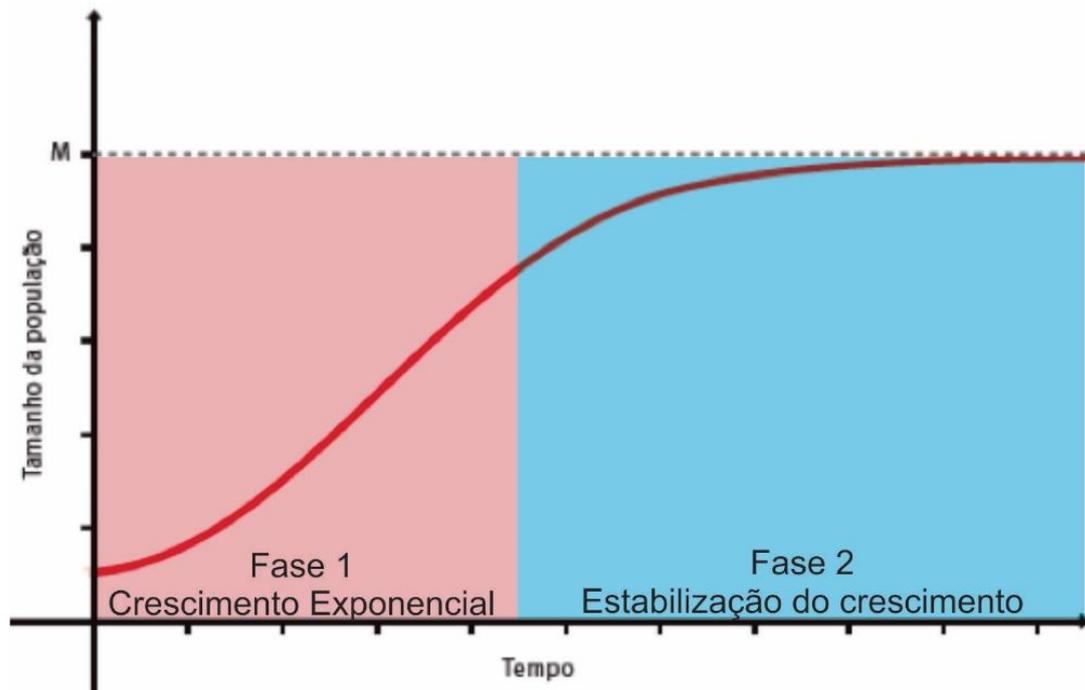


Figura 9 - Representação gráfica do crescimento populacional de acordo com a equação de Verhulst (equação logística).

Esse modelo foi aplicado para caracterizar e ajustar as curvas de crescimento populacional no presente trabalho com o objetivo de determinar os parâmetros  $k$  e  $M$ , assim como seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Esses parâmetros foram utilizados para comparar o crescimento celular para cada linhagem utilizada neste estudo.

## 5 RESULTADOS

Todos os procedimentos listados anteriormente formam um conjunto de ferramentas que permitiram que as cepas BMA641-A, SEY6210 e BY4742 pudessem ter genes específicos inativados. Dessa forma foram obtidas alterações nas tolerâncias ao etanol e a temperatura nessas linhagens.

### 5.1 Obtenção e validação das linhagens mutantes

Após todos os processos de construção de primers, PCRs, competência e transformação, as linhagens cultivadas em placas de meio seletivo com antibiótico G418 obtiveram colônias com possíveis mutantes (Figura 10).



Figura 10 – Placas de levedura em meio seletivo com G418 (200mg/L), nestas foram cultivadas colônias e testadas as mutações.

Ao utilizar-se o método de PCR-RFLP (Alu1), comparando-se a sequência do gene da cepa selvagem com as das possíveis mutantes encontradas nas placas da Figura anterior, foi possível confirmar as edições gênicas (Figura 11).

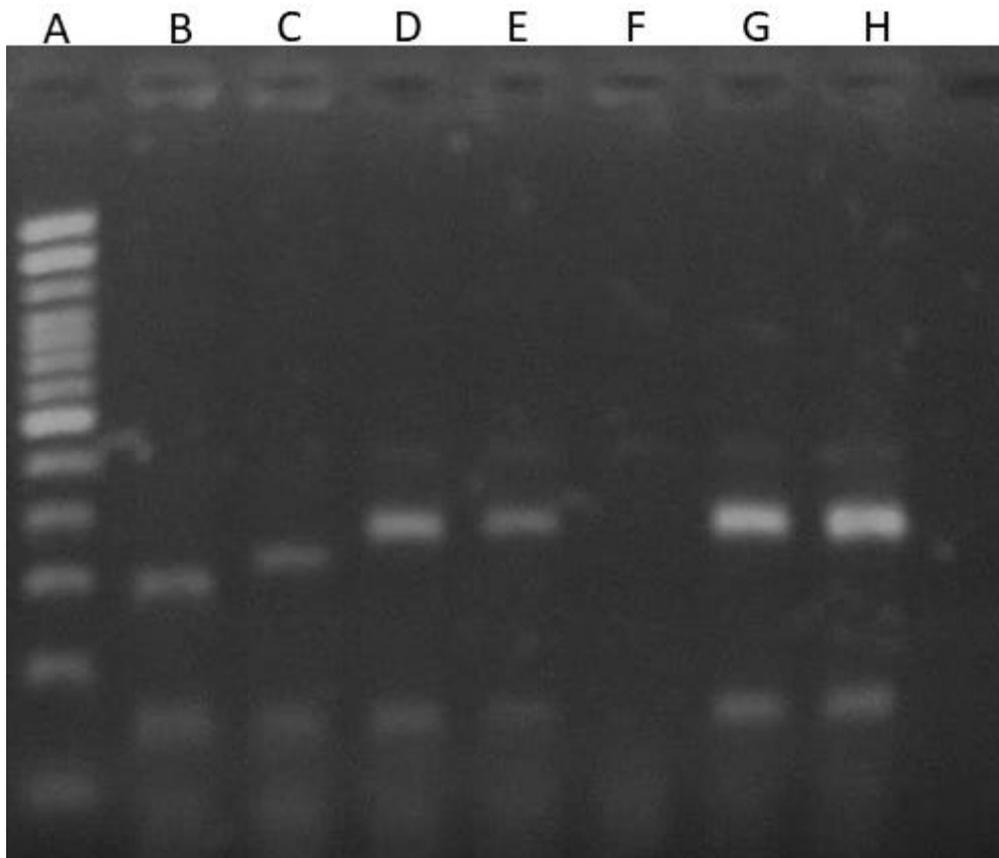


Figura 11 – Gel de eletroforese de genotipagem das linhagens mutantes. A: *ladder*. B-C: linhagens mutantes. D-E, G: linhagens com falha na mutação. F: Falha na reação de PCR. H: linhagem BY4742 selvagem.

Assim como na Figura 11, mutantes das linhagens SEY6210 foram identificadas através de PCR-RFLP, além de PCR de confirmação para a BMA641-A, as quais as mutantes apresentaram um padrão de bandas relativos a uma deleção total do gene. A segunda confirmação da edição dos genes alvo das linhagens estudadas foi obtida a partir do sequenciamento dos mutantes (Figura 12) utilizando primers específicos para a região do gene alvo (primers de genotipagem).

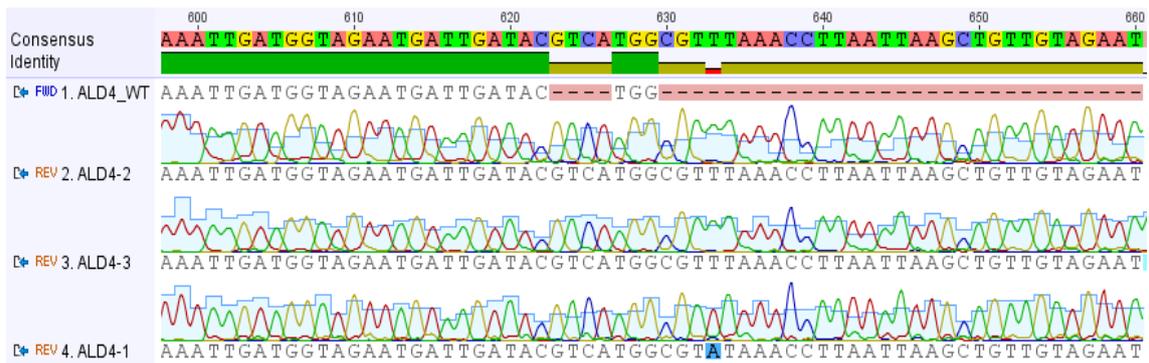


Figura 12 – Resultados de sequenciamento dos genes das linhagens mutantes ALD4.

Pode ser visto na figura que na primeira linha está a linhagem selvagem, nas seguintes as mutantes, como pode ser visto de 623 a 600 pode ser vista a inserção do stop códon prematuro, com suas peculiaridades para cada linhagem mutante.

## 5.2 Testes de tolerância ao etanol

Os testes demonstram que há diferentes fenótipos de tolerância ao etanol quando comparado as linhagens SEY6210 e BY4742 portadores da versão ALD4 inativa, ou comparando-se diferentes colônias mutantes da BY4742, ALD4-1 é uma SEY6210 mutante e ALD4-2 e ALD4-3 são BY4742 mutantes. A linhagem SEY6210 selvagem tolera até 24% de etanol, enquanto que a mutante ALD4-1 apresentou um aumento da tolerância para 28% (Figura 13). Já a linhagem BY4742 selvagem tolera até 26% de etanol, enquanto que as mutantes ALD4-2 e ALD4-3 apresentaram 24% e 26% de tolerância, respectivamente (Figura 14). Portanto a modificação da ALD4 é capaz de alterar a tolerância ao etanol nessas linhagens.

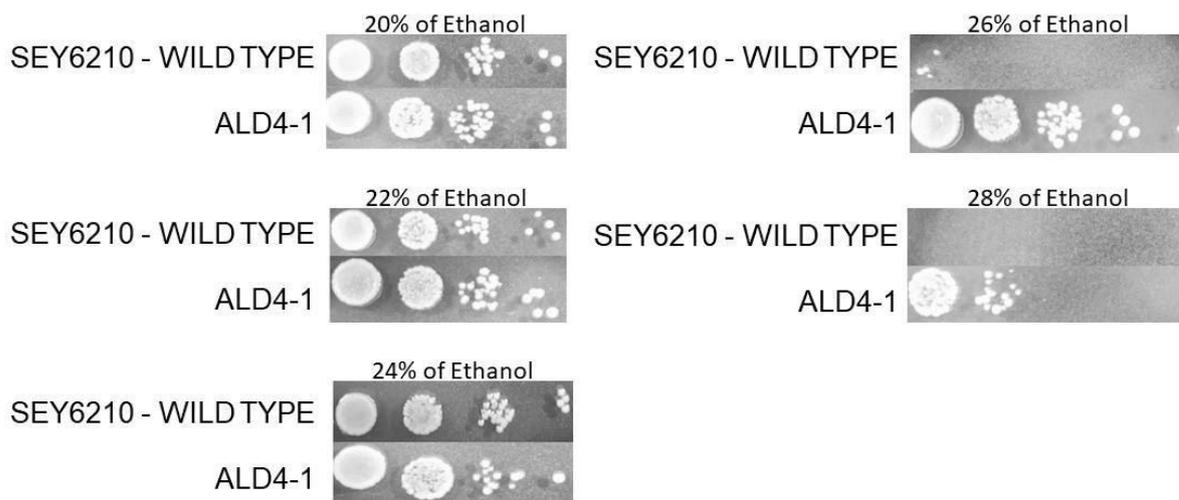


Figura 13 – Comparação de tolerância ao etanol em levedura selvagem e sua contraparte com inativação do gene ALD4.

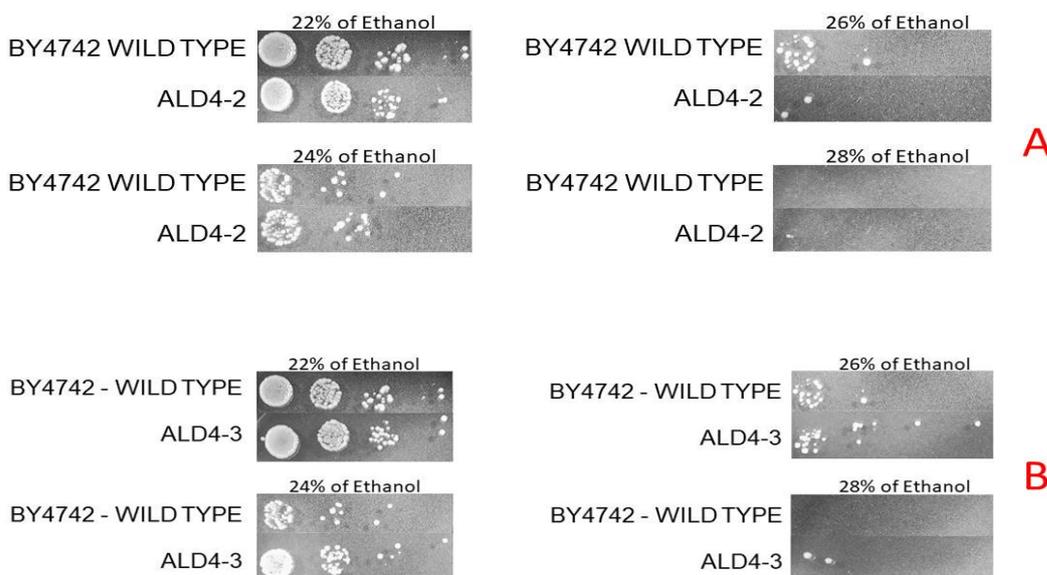


Figura 14 – Comparação entre linhagens com inativação da ALD4 e sua contraparte selvagem (BY4742). A: BY4742 ALD4-2 mutante com redução da tolerância. B: BY4742 ALD4-3 mutante sem influência na tolerância máxima, mas com indícios de melhor resistência ao estresse por esse metabólito.

A linhagem BMA64-1A IXR1 $\Delta$  tolerou no máximo 22% de etanol enquanto a BMA64-1A CTA1 $\Delta$  suportou até 18% (Figura 15). A tolerância máxima previamente obtida com a cepa BMA64-1A selvagem foi de 30% (ALMEIDA, 2017), indicando uma queda da tolerância nos mutantes.

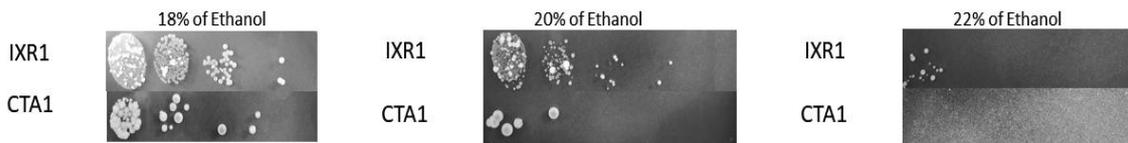


Figura 15 – Determinação da tolerância máxima ao etanol das linhagens BMA64-1A IXR1 $\Delta$  e BMA64-1A CTA1 $\Delta$ .

### 5.3 Teste de estresse prolongado ao etanol

Esses experimentos avaliaram a capacidade da levedura em suportar longos períodos de estresse etanólico, com posterior crescimento em meio rico (YPD) sem o estressor.

No caso do mutante SEY6210 ALD4-1 e sua contraparte selvagem, os experimentos demonstraram que esse estresse é mais danoso na linhagem selvagem do que na mutante, sendo que a última começa a apresentar grandes sinais de mudança no crescimento após 4h de exposição. Dessa forma, evidenciamos que a estirpe selvagem apresenta maior dificuldade de recuperação pós estresse do que a mutante, o que indica que o gene ALD4 possui um papel fundamental para SEY6210 durante o crescimento em períodos de estresse (Figura 16).

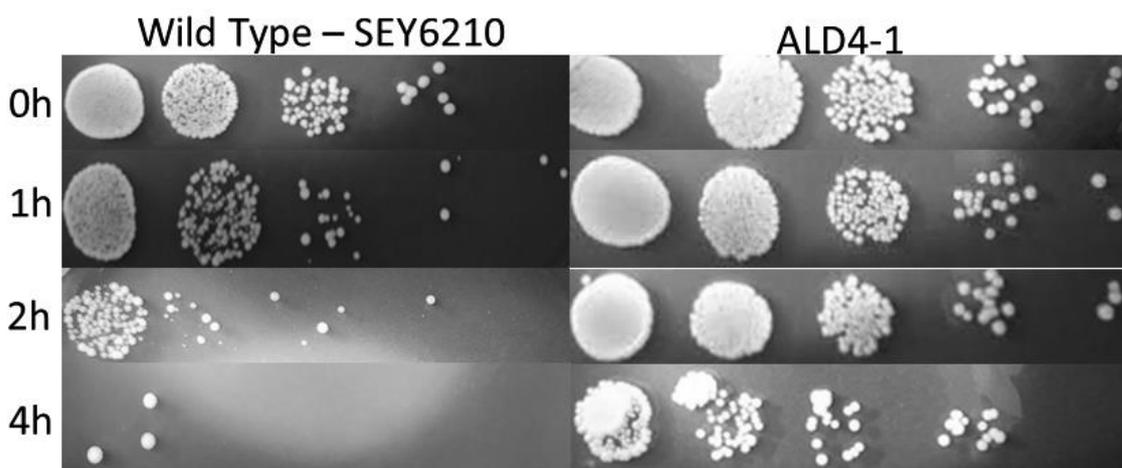


Figura 16 – Teste de tolerância ao etanol por tempo prolongado realizado com as tolerâncias máximas de cada linhagem (SEY6210 = 24%, SEY6210 ALD4-1 = 28%).

As mutantes BY4742 ALD4-2 e BY4742 ALD4-3 não demonstraram mudanças aparentes no crescimento, o que conduziu a suposição de que, para a BY4742, ALD4 não exerce um papel essencial ao fenótipo de tolerância.

No caso da linhagem BMA64-1A CTA1 $\Delta$ , foi possível verificar que o tempo de exposição a porcentagem máxima suportada de etanol (18%) causou um efeito de redução da viabilidade de colônias visíveis em cultivo (Figura 17).

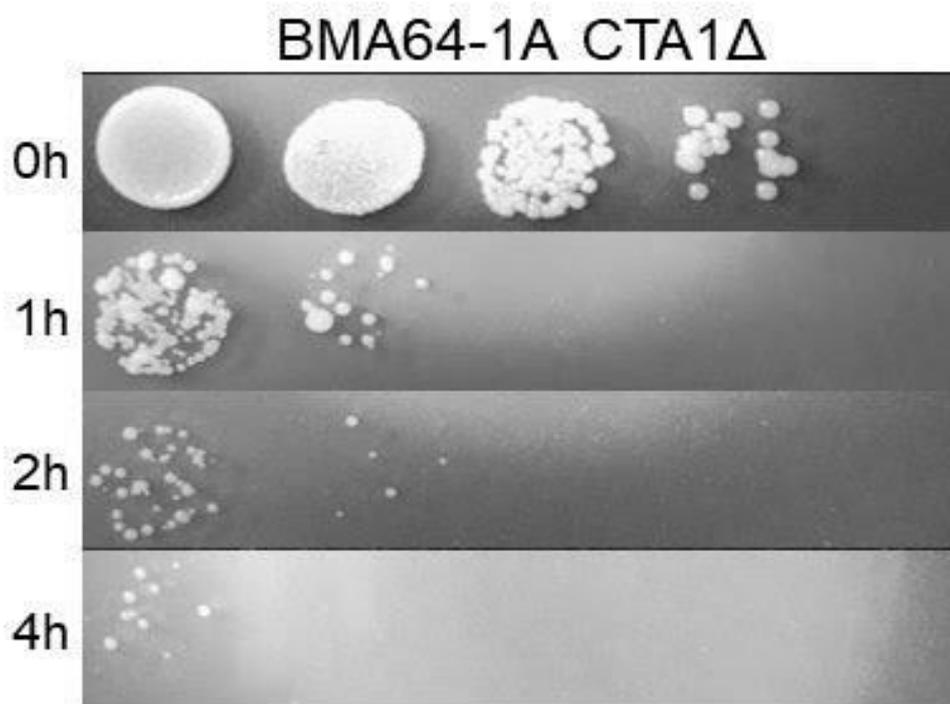


Figura 17 – Teste de estresse ao etanol prolongado à cepa BMA64-1A CTA1 $\Delta$ .

#### 5.4 Teste de crescimento e estresse

Outros testes foram avaliados para as mutantes e selvagens, sendo um deles o teste de crescimento celular. Também se testou as capacidades de crescimento sob estresse térmico (38°C) e de sobrevivência ao longo de 24h depois do tratamento em etanol por 1h.

##### 5.4.1 SEY6210 e mutante

A inativação do gene ALD4 em SEY6210 levou a um decréscimo da capacidade de multiplicação celular. Além disso, a deleção desse gene

aumentou a capacidade da levedura em lidar com o estresse etanólico e térmico. Nesse caso, a levedura mutante tem um melhor desempenho de crescimento tanto no teste de sobrevivência (etanol) quanto na avaliação do estresse térmico (incubação a 38°C). Observa-se também que a inativação do ALD4 influenciou mais efetivamente os mecanismos relacionados à capacidade da levedura em tolerar o etanol do que a tolerar elevadas temperaturas (Figura 18). Em suma, evidencia-se que tanto temperatura quanto o etanol são agentes capazes de influir de forma negativa o crescimento celular, todavia, numa análise estatística, apenas a diferença da capacidade de lidar com o etanol é relevante estatisticamente, visto que o crescimento padrão, a temperatura e a sobrevivência apresentam P-value de 0.9668, 0.9360 e 0.0473, respectivamente.

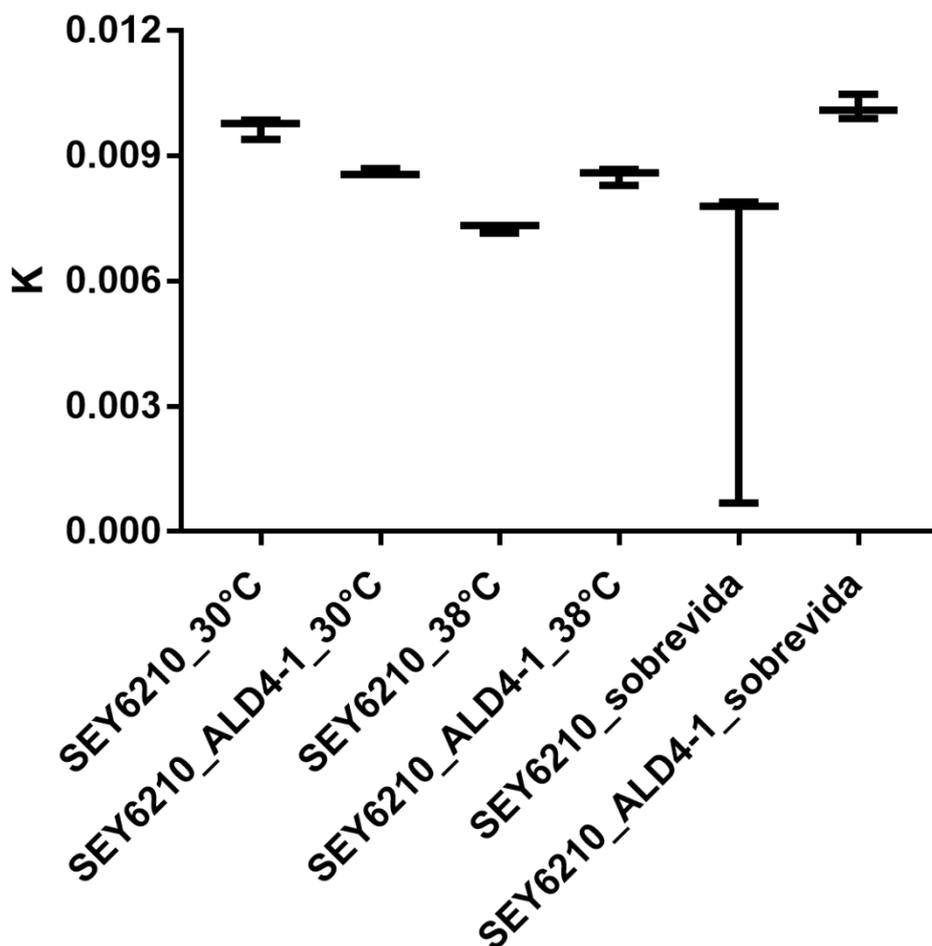


Figura 18 – Análise comparativa de crescimento com e sem fatores estressores.

#### 5.4.2 BY4742 e mutantes

Diferentemente do que foi visto com as SEY6210 ALD4 mutantes, as BY4742 ALD4 mutantes não apresentaram nenhuma diferença de crescimento nas condições controle comparadas ao tratamento térmico. Contudo, algumas diferenças podem ser observadas em comparação com a mutante portadora de um *stop codon* prematuro e nos resíduos catalíticos encontrados após a inativação. Apesar de não haver uma relevância estatística na diferença dos dados da estirpe BY4742, visto que o P-value do crescimento foi  $> 0.9999$  e  $0.9616$ , respectivamente para BY4742 ALD4-2 e BY4742 ALD4-3. Já para a diferença quanto a temperatura o P-value foi  $> 0.9991$  e  $0.9653$  respectivamente para BY4742 ALD4-2 e BY4742 ALD4-3 e por fim ao se comparar uma mutante com a outra o P-value também não indicou diferença estatística entre elas, tanto para o crescimento padrão,  $0.9204$ , quanto para o crescimento sob estresse térmico,  $0.8600$ .

Observa-se uma tendência na qual a BY4742 ALD4-3 aparenta ter um desempenho melhor do que o da selvagem e o da BY4742 ALD4-2 em ambas as condições estudadas, enquanto que BY4742 ALD4-2 aparenta estar em uma leve desvantagem ante a sua contraparte selvagem (Figura 19).

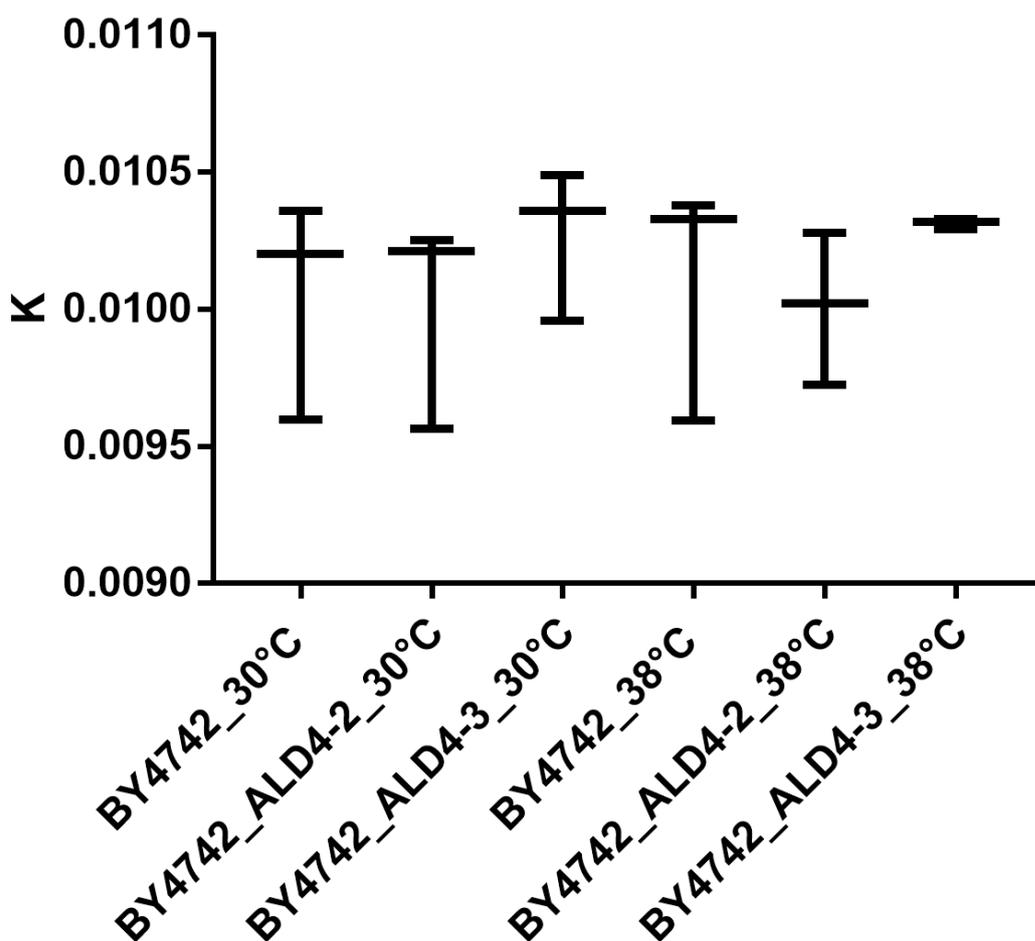


Figura 19 – Ensaio comparativo de crescimento com e sem fatores estressores.

#### 5.4.3 BMA641-A e mutantes

Verificou-se que, independentemente da condição analisada, a cepa BMA64-1A selvagem é superior em crescimento do que as IXR1 e CTA1 mutantes, apresentando inclusive significância estatística, visto que o P-value foi  $< 0.0001$  para ambas as mutantes de BMA64-1<sup>a</sup>, tanto para o crescimento padrão, quanto para o crescimento sob estresse térmico. (Figura 20).

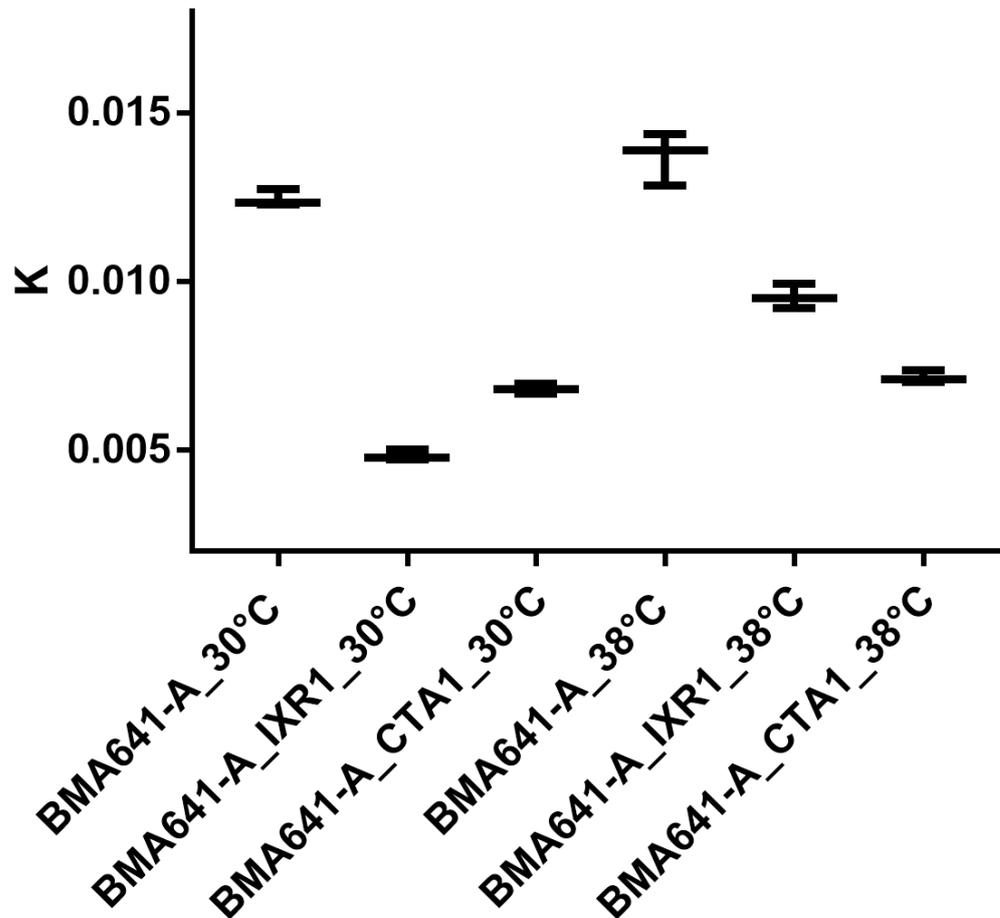


Figura 20 – Experimento comparativo de crescimento com e sem fatores estressores.

### 5.5 Análise estatística das curvas de crescimento celular

A partir da taxa de crescimento das leveduras nos testes de crescimento e estresse térmico, assim como o número máximo de indivíduos suportados em ambos os casos, verificou-se que a mutante de SEY6210 possui uma maior taxa de crescimento quando comparada à selvagem. Porém, o número de indivíduos suportado é bem maior no caso da selvagem quando comparadas às 2 outras cepas (**Tabela 5**).

Ainda, foi possível concluir que a inativação dos genes na BMA64-1A levou a uma redução da taxa de crescimento dos mutantes. Já no caso da mutante com deleção do gene CTA1, ocorreu um aumento no número de indivíduos presentes nesse meio quando comparada esta mutante com a

selvagem e com IXR1. Por fim, analisando-se IXR1, foi possível verificar tanto para  $K$ , quanto para  $M$ , que esta cepa teve uma redução da sua capacidade de crescimento, corroborando o que fora observado na figura 20 (**Tabela 5**), o que pode estar relacionado ao fato desse gene ser um regulador de crescimento.

Ao avaliar as estirpes referentes à BY4742, não é possível observar grande diferença em suas taxas de crescimento. Contudo, ao observamos o número máximo de indivíduos de BY4742 ALD4-2 suportados, observa-se uma redução dessa capacidade em relação às outras 2 linhagens (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Estudo estatístico de linhagens mutantes e selvagens de *S. cerevisiae*.

Crescimento a 30°C					
Cepa	K	Intervalo de confiança	M	Intervalo de confiança	R-square
ALD4-1	0.008602	(0.008529, 0.008674)	1.426	(1.424, 1.427)	0.9990
SEY6210	0.007246	(0.007155, 0.007337)	1.585	(1.583, 1.588)	0.9978
CTA1	0.006813	(0.006774, 0.006852)	1.567	(1.565, 1.568)	0.9996
IXR1	0.004832	(0.004658, 0.005006)	1.176	(1.168, 1.185)	0.9834
BMA64-1A	0.01244	(0.01235, 0.01253)	1.459	(1.458, 1.46)	0.9994
ALD4-2	0.01001	(0.009865, 0.01016)	1.455	(1.452, 1.458)	0.9972
ALD4-3	0.01028	(0.01013, 0.01043)	1.473	(1.471, 1.476)	0.9973
BY4742	0.01006	(0.009908, 0.01022)	1.478	(1.475, 1.48)	0.997

\*  $k$  é a taxa de crescimento e  $M$  é o suporte de carga

É possível visualizar um mesmo padrão nas variáveis ao avaliar as linhagens SEY6210 e BMA64-1A quanto ao estresse térmico, indicando que esse estresse não afetou a taxa de crescimento dessas cepas. Já em uma observação das estirpes de BY4742, reporta-se que a inativação da ALD4 não afetou o padrão da taxa de crescimento. Porém a deleção de ALD4 faz com que as cepas mutantes tenham uma menor capacidade do número máximo de indivíduos suportados (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Estudo estatístico da tolerância térmica em linhagens mutantes e selvagens de *S. cerevisiae*.

Crescimento a 38°C					
Cepa	K	Intervalo de confiança	M	Intervalo de confiança	R- square
ALD4-1	0.008472	(0.008398, 0.008546)	1.446	(1.445, 1.448)	0.999
SEY6210	0.007246	(0.007155, 0.007337)	1.585	(1.583, 1.588)	0.9978
CTA1	0.00715	(0.00706, 0.00724)	1.585	(1.582, 1.589)	0.9978
IXR1	0.0095	(0.009422, 0.009578)	1.404	(1.403, 1.405)	0.9991
BMA	0.01368	(0.01338, 0.01399)	1.454	(1.451, 1.457)	0.9934
ALD4-2	0.01001	(0.00991, 0.01010)	1.441	(1.44, 1.443)	0.9987
ALD4-3	0.01031	(0.01026, 0.01035)	1.446	(1.446, 1.447)	0.9998
BY4742	0.0101	(0.009954, 0.01026)	1.471	(1.469, 1.474)	0.997

\*  $k$  é a taxa de crescimento e  $M$  é o suporte de carga

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 BMA64-1A CTA1Δ

Aqui, objetivou-se avaliar se o gene CTA1 agia como um regulador da tolerância térmica e etanólica em BMA64-1A. Nossos dados avaliando a BMA64-1A CTA1Δ corroboram resultados prévios que demonstram a relevância desse gene no estresse etanólico. Ainda, o aumento do tempo de exposição desse mutante ao etanol, resultou em um decréscimo no número de colônias viáveis. De fato, já foi sugerido que esse gene pode ser um regulador do estresse térmico e etanólico, mostrando que os mutantes com deleção desse gene eram mais sensíveis aos estressores (DU; TAKAGI, 2007). Interessantemente, a linhagem BMA64-1A CTA1Δ teve uma melhor recuperação da população após o alívio do estresse em comparação com a linhagem selvagem na maioria das porcentagens de etanol testadas (de 35% a 40%), o que está de acordo com a correlação negativa observada no reestabelecimento de populações pós-estresse (WOLF et al., 2021).

Estudos prévios demonstraram que a exposição deste microrganismo a estressores como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou temperatura, eram capazes de levar a um estresse oxidativo, que induziria a sobre-expressão de uma variedade de genes de enzimas antioxidantes, incluindo a catalase (CTA1) para reduzir os danos causados na célula (DU; TAKAGI, 2007). Assim, é esperado que a deleção do CTA1 causasse impactos negativos no crescimento celular (JAMIESON, 1998). De fato, os resultados suportam que o gene CTA1 age como um indutor de crescimento da linhagem BMA64-1A, uma vez que a inativação desse gene reduziu o crescimento tanto a 30°C como a 38°C em comparação com a linhagem selvagem.

Longevidade, peroxissomo e CTA1 são o primeiro conjunto responsivo a exibir expressão gênica específica do fenótipo de estresse ao etanol, sendo a longevidade o gatilho dessa via (WOLF et al., 2021). Dos mutantes aqui testados para a linhagem BMA64-1A, CTA1Δ foi a que apresentou a menor capacidade de lidar com o estresse ao etanol. Entretanto ficou em faixas intermediárias de crescimento e teve baixo rendimento de tolerância ao estresse térmico. Apesar

de artigos anteriores já mostrarem o papel do CTA1 na tolerância ao etanol (DU; TAKAGI, 2007) e na vida cronológica (WEINBERGER et al., 2010), a partir dos dados aqui obtidos e do trabalho de Wolf et al. (2021), tornou-se possível confirmar o papel desse gene na superação dos recursos vinculados ao etanol e seu papel como provável regulador do estresse térmico, como já era apontado por Du; Takagi (2007) e Jamieson (1998). Assim, como visto por Du; Takagi. (2007), CTA1 é um gene diretamente envolvido com a tolerância ao etanol e a tolerância térmica (Figura 21). Em suma, os resultados demonstram que CTA1 não somente é importante para o crescimento celular como também para a resistência a temperatura e a tolerância ao etanol.

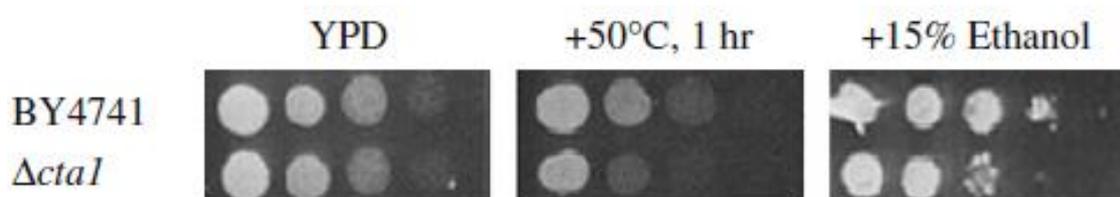


Figura 21 – Efeito da deleção de CTA1 adaptado de Du; Takagi. (2007).

## 6.2 BMA64-1A IXR1Δ

Ixr1p é um fator de transcrição que regula várias funções celulares importantes, entre elas os níveis de dNTPs na célula necessários para a síntese (MOTA; MARTINS; SÁ-CORREIA, 2021) e o reparo do DNA (BARREIRO-ALONSO et al., 2018). Estudos com este gene indicaram que ele é importante também na tolerância ao metanol (MOTA; MARTINS; SÁ-CORREIA, 2021). A queda na tolerância ao etanol observado na linhagem BMA64-1A IXR1Δ sugere uma importância do IXR1 nos mecanismos reguladores do fenótipo de resistência ao etanol, uma vez que células sob estresse etanólico necessitam utilizar diversos mecanismos para suportar os danos causados ao DNA (WOLF et al., 2021).

O estresse por etanol induz a um maior acúmulo de células com espécies reativas de oxigênio (ROS) na cepa BMA64-1A (WOLF et al. 2021), e os ROS podem ser uma fonte de danos ao DNA (MANI; CHINNAIYAN, 2010). Desta forma, a ausência de IXR1 pode estar colaborando para que durante o estresse

por etanol, o reparo do DNA não esteja ocorrendo de forma correta, o que pode reduzir a viabilidade celular, como visto nos resultados deste trabalho.

Observou-se previamente que a recuperação da população BMA64-1A IXR1Δ após estresse máximo de etanol (32,5%, 35%, 37,5%, 40% e 42,5%) é em geral mais rápido do que a linhagem selvagem (WOLF et al., 2021), diferentemente do que fora previamente reportado para outra linhagem, na qual não observou-se diferenças entre a linhagem IXR1 mutante e a selvagem (BARREIRO-ALONSO et al., 2018). Este aspecto demonstra que o efeito regulatório em diferentes linhagens pode levar a mudanças fenotípicas com relação ao crescimento.

### **6.3 SEY6210 ALD4-1, BY4742 ALD4-2 e ALD4-3**

ALD4 é um gene diretamente relacionado a resposta pelo estresse por etanol (NAVARRO-TAPIA et al., 2016), o qual sua proteína degrada tal composto. Ainda, a superexpressão de ALD4 pode levar a reprogramação metabólica celular para um crescimento aeróbio (CHA et al., 2021). De fato, mutantes com a deleção de ALD4 possuem reduzida capacidade de crescer em meio contendo etanol (SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004). Interessantemente, observamos que ALD4 mutantes possuem características fenotípicas variáveis. Nossos resultados corroboram prévios achados que evidenciam que a produção de acetato em ALD4 mutantes varia de acordo com a linhagem e condições de cultivo (SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004). Dessa forma, as variações observadas entre SEY6210 ALD4-1, SEY6210 ALD4-2 e SEY6210 ALD4-3 podem estar relacionadas a diferenças na regulação das isoformas correspondentes ou a outras variações genéticas.

Observou-se previamente que a compensação parcial da ACDH citosólica pela falta de ALD4 ocorre apenas quando a atividade da enzima citosólica é suficiente (SAINT-PRIX; BÖNQUIST; DEQUIN, 2004). Isso pode estar relacionado com o aumento da tolerância de uma linhagem ALD4 mutante e a queda (ou ausência de variação) em outra aqui observada.

Foi reportado que a queda na viabilidade celular em linhagens ALD4 mutantes poderia estar relacionada com as *heat shock proteins*, as quais auxiliam no dobramento, proteção e movimento de proteínas recém-sintetizadas

(LEON, 2021). Porém, reportamos aqui que a mutante SEY6210 ALD4-1 apresentou maior crescimento sob estresse térmico. Portanto, ao comparar diferentes trabalhos sobre ALD4 (e.g. Prado et al., 2020 e Leon, 2021) com os resultados aqui obtidos sugerimos que o gene ALD4 não possui uma característica fenotípica conservada para o estresse térmico.

De fato, observamos aqui que ALD4 mutantes levaram a uma redução na capacidade de crescimento ante a selvagem quando cultivadas a 30°C. Interessantemente, a inativação de ALD4 na linhagem Gcr1SLZ1 foi elencada como uma das principais razões para problemas durante o crescimento aeróbio (CHA et al., 2021).

Por fim, sugerimos que a mudança na tolerância e no crescimento das células com ALD4 mutantes pode ser resultado de como a maquinaria celular responde a ausência desse gene durante o período estressor.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma visão geral, o trabalho trata sob a hipótese de que alguns genes têm um importante papel na tolerância da levedura a certos estressores presentes no processo fermentativo. Para melhor compreensão dos mecanismos de tolerância, foi analisada a inativação de certos genes e observado que a ausência destes afetavam a levedura durante os estresses etanólico e térmico.

Apesar dos estressores estudados ocorrerem de forma simultânea durante o processo fermentativo, o entendimento individual destes processos é essencial na busca pela melhoria do processo industrial. Diante disso, foi investigado como os genes selecionados afetavam na maquinaria celular durante o estresse etanólico e visualizou-se a importância destes como reguladores chave na capacidade de crescimento, mesmo em condições desfavoráveis a qual, com exceção de SEY6210 ALD4-1, os demais mutantes apresentaram quedas na capacidade de sobrevivência.

Outro importante ponto é a tolerância térmica, que é um fator limitante não só da produção do etanol de primeira geração, mas também no de segunda geração. Os resultados deste trabalho colaboram para um estudo de genes ligados a este estressor a fim de obter cepas com maior interesse comercial.

Os resultados obtidos salientam que esses estressores não trabalham de forma isolada, sendo assim, estudos de dupla deleção ou o aprofundamento no âmbito de testes duplos de estresse, são opções para um melhor entendimento do papel destes genes nessas tolerâncias.

Conclui-se que os genes CTA1, IXR1 e ALD4 estão diretamente relacionados à tolerância ao etanol, sendo possíveis reguladores-chave dentro das cepas estudadas. Foi constatado que estes possuem algum papel na regulação da tolerância térmica, porém com menor relevância do que os do estresse etanólico.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. FOGAÇA DE. **Análise das linhagens de Saccharomyces cerevisiae expostas ao estresse por etanol.** [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2017.
- BACAËR, N. Verhulst e a equação logística na dinâmica populacional. **European Communications in Mathematical and Theoretical Biology**, v. 10, p. 24 – 26, 2008.
- BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Osmo-, thermo- and ethanol- tolerances of. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 157–166, 2012.
- BARREIRO-ALONSO, A. et al. The HMGB protein Ixr1 interacts with Ssn8 and Tdh3 involved in transcriptional regulation. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 2, p. 1–10, 2018.
- BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9–10, p. 678–687, 2000.
- BRAY, M.; FERREIRA, I.; RUAS, P. **A Evolução da Produção de Etanol no Brasil** Documentos técnicos científicos., , 2000.
- BROWN, N. A. et al. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 3, p. 277–290, 2013.
- CHA, S. et al. Differential activation mechanisms of two isoforms of Gcr1 transcription factor generated from spliced and un-spliced transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 2, p. 745–759, 2021.
- CHAKRABORTY, S. et al. Biomass to biofuel: a review on production technology. **ASIA-PACIFIC JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING**, v. 7, n. 17, p. 743–753, 2012.
- CHENG, Y. et al. Protective Effects of Arginine on *Saccharomyces cerevisiae* Against Ethanol Stress. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.
- CHERRY, J. M. et al. *Saccharomyces* Genome Database: The genomics resource of budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 700–705, 2012.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

DELLOMONACO, C.; FAVA, F.; GONZALEZ, R. The path to next generation biofuels: Successes and challenges in the era of synthetic biology. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 1–15, 2010.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 253–263, 2009.

DIVATE, N. R. et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in ethanol tolerance by accumulation of trehalose. **Bioengineered**, v. 7, n. 6, p. 445–458, 2016.

DODO, C. M.; MAMPHWELI, S.; OKOH, O. Bioethanol production from lignocellulosic sugarcane leaves and tops. **Journal of Energy in Southern Africa**, v. 28, n. 3, p. 1, 2017.

DU, X.; TAKAGI, H. N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1343–1351, 2007.

FOX, J. The R Commander. **Journal of Statistical Software**, v. 14, n. 9, p. 1–42, 2005.

FRACZEK, M. G.; NASEEB, S.; DELNERI, D. History of genome editing in yeast. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 361–368, 2018.

FRED, S. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 3–41, 2002.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 25 out. 1996.

HALL, M. A. et al. The WEKA data mining software: an update. **SIGKDD Explorations**, v. 11, n. 1, p. 10–18, 2009.

INGRAM, L. O. Ethanol tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 305–319, 1989.

JIA, K.; ZHANG, Y.; LI, Y. Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 5, p. 422–429, 2010.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.

KLEIN, M. et al. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.

KNOP, M. Yeast cell morphology and sexual reproduction - A short overview and some considerations. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 8–9, p. 599–606, 2011.

KONG, Q. X. et al. Overexpressing GLT1 in *gpd1Δ* mutant to improve the production of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1382–1386, 2007.

LEON, X. **Increasing stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* using lipocalin genes**. [s.l.] University of Tennessee at Chattanooga, 2021.

LEONELLI, S.; ANKENY, R. A. What makes a model organism? **Endeavour**, v. 37, n. 4, p. 209–212, 2013.

LIAN, J.; HAMEDIRAD, M.; ZHAO, H. Advancing Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* Using the CRISPR/Cas System. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1–11, 2018.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 829–845, 2010.

MAGER, W. H.; FERREIRA, P. M. Stress response of yeast. **Biochemical Journal**, v. 290, n. 1, p. 1–13, 2015.

MANI, R. S.; CHINNAIYAN, A. M. Triggers for genomic rearrangements: Insights into genomic, cellular and environmental influences. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 12, p. 819–829, 2010.

MELO, M. C. DE R. E. **Políticas Públicas Brasileiras de Biocombústíveis: Estudo comparativo entre os programas de incentivos à produção, com ênfase em etanol e biodiesel**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

MENSONIDES, F. I. C. et al. Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4531–4538, 2005.

MOJICA, F. J. M.; RODRIGUEZ-VALERA, F. The discovery of CRISPR in

archaea and bacteria. **FEBS Journal**, n. July, p. 3162–3169, 2016.

MOTA, M. N.; MARTINS, L. C.; SÁ-CORREIA, I. The identification of genetic determinants of methanol tolerance in yeast suggests differences in methanol and ethanol toxicity mechanisms and candidates for improved methanol tolerance engineering. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–28, 2021.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010.

NAITO, Y. et al. CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. **Bioinformatics**, v. 31, n. 7, p. 1120–1123, 2015.

NAVARRO-TAPIA, E. et al. Ethanol cellular defense induce unfolded protein response in yeast. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–12, 2016.

NGUYEN, K. et al. Morphology, cell division, and viability of *Saccharomyces cerevisiae* at high hydrostatic pressure. p. 1–19, 2017.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013.

SAINT-PRIX, F.; BÖNQUIST, L.; DEQUIN, S. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: The NADP<sup>+</sup>-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2209–2220, 2004.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SILVA, A. F. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS DE CACHAÇAS DE ALAMBIQUE DA BAHIA. Dissertação de mestrado. p. 115, 2009.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. v. 16, n. November, p. 460–468, 1998.

STANLEY, D. et al. Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 231–239, 2010a.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p.

13–24, 2010b.

STOVICEK, V.; HOLKENBRINK, C.; BORODINA, I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 5, p. 1–16, 2017.

TAYLOR, J. W.; BOWMAN, B. H.; BERBEE, M. L. Fungal model organisms: Phylogenetics of *saccharomyces*, *aspergillus*, and *neurospora*. **Systematic Biology**, v. 42, n. 4, p. 440–457, 1993.

TOLMASQUIM, M. T. **Energia Renovável: Hidráulica, Biomassa, Eólica, Solar, Oceânica**. Rio de Janeiro: EPE, 2016.

WALLACE-SALINAS, V.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2013.

WEINBERGER, M. et al. Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence. **Aging**, v. 2, n. 10, p. 709–726, 27 out. 2010.

WOLF, I. R. et al. The ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* under a phenomics perspective. p. 1–41, 2021.

YU, K. O. et al. Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 4, p. 237–243, 2012.

ZHANG, F.; WEN, Y.; GUO, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. R1, p. 40–46, 2014.

ZHANG, M.; SHI, J.; JIANG, L. Modulation of mitochondrial membrane integrity and ROS formation by high temperature in *Saccharomyces cerevisiae*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 202–209, 2015.

## APÊNDICE A

Apêndice A: Descrição e tolerância máxima ao etanol das linhagens selvagens

<b>Linhagem</b>	<b>Etanol tol. (%)</b>	<b>Aces. num.</b>	<b>MAT locus</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fenótipo</b>
BMA64-1A	30	Euroscarf/20000A	a	MATa; his3-11_15; leu2-3_112; ura3-1; trp1D2; ade2-1; can1-100	HT
BY4742	26	Euroscarf/Y10000 SGD/BY4742	alpha	S288C isogenic yeast strain: MATalpha; his3D1; leu2D0; lys2D0; ura3D0	HT
X2180-1A	24	NBRP/BY21559 SGD/X2180-1A	a	MATa SUC2 mel gal2 CUP1	HT
SEY6210	24	NBRP/BY3553 SGD/SEY6210	alpha	MAT $\alpha$ suc2- $\Delta$ 9 ura3-52 leu2-3,112 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 901 lys2-801	LT
BY4741	22	Euroscarf/Y00000 SGD/BY4741	a	S288C isogenic yeast strain: MATa; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0	LT
S288C	20	NBRP/BY20118 SGD/S288c	alpha	MAT $\alpha$ SUC2 mal mel gal2CUP1	LT

## APÊNDICE B

Apêndice B: Tolerância máxima ao etanol de todas as linhagens estudadas

<b>Linhagem</b>	<b>Etanol tol. (%)</b>	<b>Fenótipo</b>
BMA64-1A	30	HT
SEY6210 ALD4-1	28	HT*
BY4742	26	HT
BY4742 ALD4-3	26	HT
BY4742 ALD4-2	24	HT
SEY6210	24	LT
BMA64-1A IXR1 $\Delta$	20	LT*
BMA64-1A CTA1 $\Delta$	18	LT*

\*Mudança no fenótipo da mutante em relação a selvagem