
**PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, USP E UNICAMP) DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOENERGIA**

**Abordagens de engenharia metabólica e evolutiva para produção de
d-ácido láctico em *saccharomyces cerevisiae***

Dandara Porto Pedreira

Tese apresentada ao Instituto de
Pesquisa em Bioenergia de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador(a): Dr. Jeferson Gross
Co-orientador: Prof. Nelson Ramos
Stradiotto

Mai - 2026

**PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, USP E UNICAMP) DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOENERGIA**

**Abordagens de engenharia metabólica e evolutiva para produção de d-ácido
lático em *saccharomyces cerevisiae***

Dandara Porto Pedreira

Tese de Doutorado apresentado ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Bioenergia.

Orientador(a): Dr. Jeferson Gross
Co-orientador: Prof. Nelson Ramos Stradiotto

Maio - 2026

P371a	Pedreira, Dandara Porto Abordagens de engenharia metabólica e evolutiva para produção de d-ácido láctico em <i>saccharomyces cerevisiae</i> / Dandara Porto Pedreira. -- Rio Claro, 2026 86 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Rio Claro Orientador: Jeferson Gross Coorientador: Nelson Ramos Stradiotto 1. Biologia sintética. I. Título.
-------	--

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ABORDAGENS DE ENGENHARIA METABÓLICA E EVOLUTIVA PARA PRODUÇÃO DE D-ÁCIDO LÁCTICO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

AUTORA: DANDARA PORTO PEDREIRA

ORIENTADOR: JEFERSON GROSS

COORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área: Bioenergia pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 JEFERSON GROSS
Data: 28/02/2025 11:46:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Pesquisador JEFERSON GROSS (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN - Unesp Rio Claro

Documento assinado digitalmente
 JONAS CONTIERO
Data: 28/02/2025 14:20:11-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Documento assinado digitalmente
 LUCIANA FONTES COELHO
Data: 01/03/2025 14:27:29-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. LUCIANA FONTES COELHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Documento assinado digitalmente
 THALITA PEIXOTO BASSO
Data: 02/03/2025 14:22:15-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. THALITA PEIXOTO BASSO (Participação Virtual)
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos / Universidade de São Paulo - USP - ESALQ

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Genômica e Evolução Experimental de Leveduras, pelo aprendizado e todas as oportunidades. Ao meu orientador, Jeferson Gross, pela paciência e orientação. À Ana Paula Jacobus, Nelson Stradiotto e Jonas Contiero, pelas valiosas contribuições ao longo desta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2017/22401-8. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Sou grata a todos que me apoiaram, especialmente quando o caminho parecia difícil. Aos meus amigos, em especial Aline, Adriana, André, Amilton, Igor, Rudá, Huanne, Tawann e Ralyvan, que estiveram ao meu lado nos momentos de dúvida e me mostraram que "casa" é onde nos sentimos bem. Aos meus amigos do forró, por me fazerem sentir que a vida é mais leve quando estamos cercados de alegria e música. Aos meus irmãos Cassio e Fernanda, sempre presentes, e à minha mãe, que me fortaleceu com seu amor incondicional.

Agradeço também à minha prima Carol, Camila e Tia Fau, que sempre estiveram ao meu lado, com carinho e compreensão, oferecendo seu apoio nos momentos que mais precisei.

Neste caminho, aprendi sobre a importância de cuidar da saúde mental e emocional. Agradeço de coração à minha psicóloga, Elizabeth, por me apoiar durante todo esse processo. Ela foi fundamental para que eu me conhecesse melhor e aprendesse a lidar com os desafios de forma mais equilibrada.

Cada um que estive ao meu lado tem um lugar especial na minha história. A todos vocês, meu muito obrigado.

RECONHECIMENTO

Agradeço à FAPESP pelo apoio e financiamento à minha pesquisa por meio do projeto temático FAPESP 2017/22401-8 – “Fruto-refinaria: processos de obtenção, métodos de caracterização e geração de produtos oriundos de resíduos da fruticultura”. Sem o suporte da FAPESP, este trabalho não teria sido possível, e sou imensamente grata por essa contribuição fundamental no desenvolvimento da minha pesquisa.

RESUMO

O ácido láctico é um composto de alto valor agregado com ampla aplicação em indústrias alimentícia e cosmética, além de ser uma alternativa promissora para a produção de polímeros biodegradáveis, capazes de substituir materiais plásticos derivados do petróleo. Sua obtenção pode ocorrer por síntese química ou fermentação microbiana. A rota química gera uma mistura racêmica de isômeros, enquanto a produção microbiana permite a obtenção de um produto opticamente puro, formado por apenas um isômero (L ou D). A maioria dos microrganismos naturais produz o isômero L, mas a produção do isômero D é vantajosa para a síntese de polímeros heterogêneos (poli-ácido láctico) combinando D-lactato e L-lactato. Este projeto utiliza estratégias de engenharia metabólica e evolução adaptativa para a produção de D-ácido láctico pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura foi geneticamente modificada com a inserção de duas cópias do gene da lactato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* no genoma, utilizando CRISPR/Cas9, como parte do projeto temático FAPESP 2017/22401-8 – “Fruto-refinaria: processos de obtenção, métodos de caracterização e geração de produtos oriundos de resíduos da fruticultura”. Ensaio fermentativos demonstraram que a cepa modificada produziu 6 g/L de D-ácido láctico. Por meio de evolução adaptativa, quatro diferentes populações de *S. cerevisiae* adquiriram alta tolerância a ácidos orgânicos após seleção em concentrações crescentes de ácido láctico. Quatro populações evoluídas toleraram choques de até 15% de ácido láctico por duas horas. O sequenciamento genômico dessas populações revelou mais de 230 mutações, incluindo alterações no gene *PCK1*, comum a todas as populações submetidas a diferentes estratégias de evolução adaptativa. Ensaio fenotípicos indicaram que uma das populações apresentou ganho de fitness sete vezes superior ao progenitor.

Palavras-chave: Ácido láctico. Evolução adaptativa. *S. cerevisiae*.

ABSTRACT

Lactic acid is a high-value compound with broad applications in the food and cosmetic industries. It also represents a promising alternative for the production of biodegradable polymers capable of replacing petroleum-derived plastics. Its production can occur via chemical synthesis or microbial fermentation. Chemical synthesis generates a racemic mixture of isomers, whereas microbial production allows for the generation of an optically pure product consisting of only one isomer (L or D). Most natural microorganisms produce the L isomer, but the production of the D isomer is advantageous for synthesizing heterogeneous polymers (polylactic acid) combining D-lactate and L-lactate. This project employs metabolic engineering and adaptive evolution strategies to produce D-lactic acid using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The yeast was genetically modified by inserting two copies of the lactate dehydrogenase gene from *Leuconostoc mesenteroides* into its genome using CRISPR/Cas9 as part of the FAPESP thematic project 2017/22401-8 – "Fruit biorefinery: processes for obtaining, characterization methods, and generation of products derived from fruit industry residues." Fermentative assays showed that the engineered strain produced 6 g/L of D-lactic acid. Through adaptive evolution, four distinct populations of *S. cerevisiae* acquired high tolerance to organic acids after selection in increasing concentrations of lactic acid. These populations tolerated shocks of up to 15% lactic acid for two hours. Genomic sequencing of these populations revealed over 230 mutations, including alterations in the *PCK1* gene, common to all populations subjected to different adaptive evolution strategies. Phenotypic assays indicated that one population exhibited a fitness gain seven times higher than the progenitor.

Keywords: Adaptive evolution. Lactic acid. *S. cerevisiae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura dos isômeros de ácido lático.....	18
Figura 2 - Reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH)	20
Figura 3 - Caminhos metabólicos para a produção de AL em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e via competidora do etanol	27
Figura 4 - Engenharia metabólica de <i>S. cerevisiae</i> para a produção de D-AL	34
Figura 5 - Protocolos de evolução adaptativa de <i>S. cerevisiae</i> ao ácido lático.....	36
Figura 6 - Comprovação por PCR das inserções cromossomais do cassete <i>pTEF-Lm.LdhA-Tsynth25t</i> nos genes <i>JEN1</i> e <i>DLD1</i>	41
Figura 7 - Teste piloto para a determinação da concentração inicial de AL para início dos experimentos de adaptação evolutiva por choques.....	43
Figura 8 - Experimento evolução por choques de AL com as populações CEN.PK113-7D e PE-2	44
Figura 9 - Gráfico de resultados parciais de viabilidade da população de CEN.PK113- 7D.	45
Figura 10 - Gráficos de comparação do <i>fitness</i> das populações evoluídas de PE-2_H4 versus progenitores.....	46
Figura 11 - Gráficos de comparação do <i>fitness</i> das populações evoluídas de CEN.PK113-7D.....	47
Figura 12 - <i>Heatmap</i> do <i>fitness</i> (Coeficiente S por duplicação celular) das populações evoluídas de CEN.PK113-7D e PE-2_H4 em crescimento celular em YPS 2% de sacarose e 0%, 1% e 1,5% de AL.....	47
Figura 13 - Gráfico Tmid (hs).....	48
Figura 14 - Diagrama de Venn.....	50
Figura 15 - Estruturação de regiões da proteína Pck1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	54
Figura 16 - Interações proteína-proteína da Pck1. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	54
Figura 17 - Estruturação de regiões da proteína Coq4p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	55
Figura 18 - Interações proteína-proteína. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.....	55

Figura 19 - Estruturação de regiões da proteína do Pex29p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	57
Figura 20 - Interações proteína-proteína da Pex29p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	58
Figura 21 - Estruturação de regiões da proteína Rev1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	59
Figura 22 - Interações proteína-proteína de Rev1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	60
Figura 23 - Estruturação de regiões da proteína Pms6p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	61
Figura 24 - Interações proteína-proteína da Pms6p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	61
Figura 25 - Estruturação de regiões da proteína Cry1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	62
Figura 26 - Interações proteína-proteína Cry1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	63
Figura 27 - Estruturação de regiões da proteína Hsp30p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	63
Figura 28 - Interações proteína-proteína Hsp30p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	64
Figura 29 - Estruturação de regiões da proteína Trs31p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	65
Figura 30 - Interações proteína-proteína Trs31p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	66
Figura 31 - Estruturação de regiões da proteína Stv1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.....	67

Figura 32 - Interações proteína-proteína Stv1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	67
Figura 33 - Estruturação de regiões da proteína Pdr3p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.	69
Figura 34 - Interações proteína-proteína Pdr3p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	69
Figura 35 - Estruturação de regiões da proteína Ssa3p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.	71
Figura 36 - Interações proteína-proteína Ssa3p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	71
Figura 37 - Estruturação de regiões da proteína Pma1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.	73
Figura 38 - Interações proteína-proteína Pma1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	74
Figura 39 - Estruturação de regiões da proteína Cdc25p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.	75
Figura 40 - Interações proteína-proteína Cdc25p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	75
Figura 41 - Estruturação de regiões da proteína Whi2p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.	76
Figura 42 - Interações proteína-proteína Whi2p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	77
Figura 43 - Estruturação de regiões da proteína Hap4p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.	78
Figura 44 - Interações proteína-proteína. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Ácido Láctico.....	18
3.2. L-AL.....	19
3.3. D-AL.....	20
3.4. Produção industrial do AL.....	21
3.5. Efeitos em bactérias e leveduras do acúmulo de ácidos fracos	22
3.6. Resposta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ao acúmulo de AL	23
3.7. D-lactato desidrogenase (D-LDH)	25
3.8. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	25
3.9. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.10. Engenharia Metabólica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para produção de AL.....	27
3.11. Evolução adaptativa e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para maior tolerância a AL	19
4. METODOLOGIA	31
4.1. Linhagens utilizadas	31
4.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	31
4.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2_H4.....	31
4.2. Engenharia metabólica	31
4.2.1. Desenvolvimento do constructo para produção de D-Lático ácido por <i>S. cerevisiae</i>	33
4.3. Ensaio fermentativo	34
4.4. Evolução adaptativa.....	34
4.4.1. Protocolos de choques com AL	35
4.4.2. <i>Genome Shuffling</i>	36
4.4.3. Controle de Contaminação.....	36
4.4.4. Avaliações fenotípicas	37
4.4.4.1. Ensaio de crescimento em microplaca - TECAN.....	37
4.4.4.2. Ensaio de competição assistida por citometria de fluxo.....	37
4.4.4.3. Viabilidade.....	39
4.4.5. Sequenciamento das populações.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
7. REFERÊNCIAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico (AL) é um produto de alto valor agregado com um mercado avaliado em 1,25 milhões de dólares em 2019 e uma previsão de expansão no mercado mundial de 11,5% até 2026 (Ahuja; Bayas, 2020). Seu potencial se dá pelas suas utilizações em inúmeras indústrias, como a química, alimentícia, têxtil e, principalmente, pela sua utilização na produção de ácido polilático (APL), um importante bioplástico (Rasal; Janorkar; Hirt, 2010; Gupta; Revagade; Hilborn, 2007).

Produto direto da conversão do piruvato pela lactato desidrogenase (LDH), atualmente o AL tem sua produção industrial em grande parte biotecnológica. O processo fermentativo em questão, permite a produção de estereoisômeros específicos do AL, em vez de uma mistura racêmica como ocorre pela via da síntese química, além de possuir uma produção mais barata (Maican; Ferdes, 2015; Pal et al., 2009).

A fermentação para a produção de AL, a princípio, ocorre por bactérias lácticas como *Sporolactobacillus inulinus* CASD, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Corynebacterium glutamicum*, e *Escherichia coli* que naturalmente possuem a maquinaria genética necessária para isso (Zhong et al., 2019). Porém, alguns fatores dificultam e encarecem a sua produção em escala industrial. A sensibilidade a baixos pHs desses organismos, faz com que seja necessária a neutralização do pH por adição de carbonato de cálcio (CaCO_3) ou hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) durante a etapa fermentação industrial, acarretando a formação de lactato de cálcio, que é então separado por filtração. Porém, esse processo de precipitação gera gesso (CaSO_4) como subproduto indesejável. No todo, o processo *downstream* contabiliza cerca de 50% do custo de produção do AL (Abdel-Rahman; Tashiro; Sonomoto, 2013; Schügerl, 1983; Zhong et al., 2019). Neste sentido, a produção de AL por organismo recombinante se mostra uma possibilidade economicamente promissora ao se desenvolver organismos geneticamente modificados capazes de crescer e sobreviver a concentrações relevantes de ácidos fracos, diminuindo os custos associados à neutralização do pH.

Quando se discute a relação entre ácido láctico e a célula é importante se discutir o papel dos ácidos orgânicos (AO). Tais compostos, são constituídos por um ou mais grupamentos carboxílicos, podendo ser ligados covalentemente a aminoácidos, peptídicos e ésteres (Hirshfield; Terzulli; O'Byrne, 2003; Kim et al., 2019). Como o próprio nome deixa claro, tais compostos são ácidos fracos, de maneira geral, não se dissociando completamente na água, diferente de ácidos minerais fortes (Peetermans; Foulquié-Moreno; Thevelein, 2021).

Um ponto interessante é que geralmente quanto menor a massa molar do ácido orgânico, mais solúvel em água ele é, como o ácido láctico e o ácido fórmico, e quanto maior sua massa molar mais insolúvel é na sua forma molecular (neutra) (Peetermans; Foulquié-Moreno; Thevelein, 2021; Berterame et al., 2016; Kim et al., 2019).

O grupo mais comum dentro dos AO são os ácidos carboxílicos, que possuem em sua estrutura um -COOH, de onde vem sua acidez (Narvhus; Axelsson, 2003). Como é o caso do AL, que possui como fórmula $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, apresentando um grupo hidroxila adjacente ao grupo carboxila. Por ter essa estrutura, o AL possui uma grande capacidade de gerar ligações intramoleculares de hidrogênio, chegando a ser cerca de 10 vezes mais ácido que o ácido acético.

Esses compostos quando em contato com microrganismos são capazes de gerar graves problemas de crescimento (Hirshfield; Terzulli; O'Byrne, 2003). A escala desse prejuízo celular vai variar de acordo com o tipo de AO em questão, sendo o pKa (constante de dissociação), a sua lipofilicidade, a sua volatilidade as principais propriedades químicas determinantes, além do pH do ambiente celular e a concentração do ácido (Salminen; von Wright, 2004). Quando o pH externo é menor que o pKa do ácido fraco, ele estará na sua forma não dissociada, lhe conferindo lipofilicidade e a capacidade de atravessar a membrana plasmática. Porém, ao entrar na célula o AO tende a se dissociar pelo pH neutro do citosol, o que acarreta uma cascata de reações dentro da célula para corrigir esse desequilíbrio (Berterame et al., 2016; Kim et al., 2019; Hirshfield; Terzulli; O'Byrne, 2003).

A *S. cerevisiae* se mostra como uma alternativa atrativa de organismo produtor de AL a nível de produção recombinante, por ser capaz de tolerar ambientes com pH mais baixos do que as bactérias lácticas e também por ser um organismo considerado modelo e com a genética e fisiologia bem estabelecidas (Schügerl, 1983; Porro et al., 1995). Diversos trabalhos têm relatado sucesso na modificação genética de *S. cerevisiae* para a produção de AL. Por exemplo, Baek e colaboradores (2016a) relataram uma produção de aproximadamente 48,9 g/L de AL a partir de glicose e sem neutralização, a partir da inserção do gene *ldhA* de *Leuconostoc mesenteroides*, aliada a eliminação dos genes *PDC1* e *ADHI* para reduzir a produção de etanol, e dos genes *GPD1* e *GPD2* para o diminuir a formação de glicerol. Já Zhong e colaboradores (2019) demonstraram a eficiência cinética da *LdhA* de *Leuconostoc mesenteroides* em comparação a genes homólogos de *E. coli*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* e *S. inulinus*.

A evolução adaptativa laboratorial (do inglês *Adaptive Laboratory Evolution*, ou ALE) é uma importante ferramenta no estabelecimento de mecanismos de tolerância a ambientes

estressantes para microrganismos (Baek et al., 2016a). A ALE se baseia em cultivar um organismo em condições seletivas (por exemplo, altas concentrações de AL) por longos períodos de tempo (tipicamente algumas centenas a milhares de gerações) para que os clones com mutações adaptativas se espalhem na população. As novas metodologias genéticas e maior acesso ao sequenciamento genômico de alto rendimento torna a análise dessa evolução mais fácil, assim como o estudo da base genética e mecanismos moleculares que podem conferir tolerância ao estresse (Baek et al., 2017) aumentaram a tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* gerada pela expressão do gene D-lactato desidrogenase (*Lm. LdhA*) de *Leuconostoc mesenteroides* e por evolução adaptativa ao AL aumentando sua concentração gradualmente até 3,95% e conseguindo uma produção eficaz de D-AL de até 82,6 g/L.

Alguns estudos têm aplicado estratégias de ALE com *S. cerevisiae* abordando inúmeros tipos de tolerância, como à ácidos orgânicos (Kildegaard et al., 2014; Baek et al., 2017) e baixo pH (Fletcher et al., 2017). No presente projeto de doutorado, buscamos alinhar as estratégias de engenharia metabólica e ALE para a obtenção de uma cepa de *S. cerevisiae* com produção de D-AL e tolerância a geração deste produto. Essa linhagem será utilizada na fermentação de resíduos da cadeia de fruticultura como substrato, visando a produção de D-AL, como parte do projeto temático FAPESP 2017/ 22401-8.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho de doutoramento foram divididos em três etapas:

- a) Objetivo 1: Engenharia metabólica da produção de ácido láctico. Integração via CRISPR/Cas9 no genoma de *S. cerevisiae* de duas cópias do gene codificador da D-lactato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides*.
- b) Objetivo 2: Estabelecimento de protocolos de evolução experimental. Diferentes populações experimentais de *S. cerevisiae* PE-2_H4 e CEN.PK113-D7 foram desafiadas evolutivamente quanto à tolerância a níveis crescentes de AL. Isso envolveu diferentes protocolos de (i) choques com AL, (ii) ciclos sexuais (genome shuffling), (iii) e experimentos com diferentes backgrounds genéticos (PE_H4 e CEN.PK113-7D);
- c) Objetivo 3: Sequenciamento genômico de linhagens evoluídas. As populações experimentais foram submetidas ao sequenciamento genômico de alto rendimento e avaliações de bioinformática quanto ao seu potencial de resistência ao ácido láctico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Ácido Láctico

O AL (Figura 1) foi descoberto a partir da observação do leite azedo em 1780 por C. W. Scheele, porém só em 1881 que se conseguiu obter esse ácido por meio de fermentação, marco inicial para sua produção industrial (Coelho et al., 2018). Sua importância se dá por seu alto valor agregado, além de ser um GRAS (*Generally Recognized As Safe*), ser inofensivo, possuir um mercado com grande potencial de crescimento, e ser extremamente versátil no que tange a sua produção (fermentação ou síntese química), além de possuir uma grande variedade de substratos possíveis, como resíduos agroindustriais (Jiménez; Peltzer; Ruseckaite, 2015). A biofuncionalidade do AL ocorre pelos seus grupos de álcool e ácido carboxílico, que o tornam suscetível a diferentes reações, tais como condensação, redução, esterificação e substituição no grupo do álcool, e expande consideravelmente suas aplicações (Jiménez; Peltzer; Ruseckaite, 2015).

O AL possui um importante uso como precursor de compostos pequenos (propilenoglicol) ou grandes (polímeros acrílicos) (Bozoglu; Ray, 2013). Seus polímeros são biodegradáveis, utilizados como materiais para embalagem e rotulagem e biocompatíveis, sendo úteis para a fabricação de dispositivos protéticos, suturas e dosagem interna de drogas (Wui; Li, 2018). Entre eles, o ácido polilático tem diversas aplicações nas indústrias têxtil, médica e farmacêutica (Albuquerque et al., 2021).

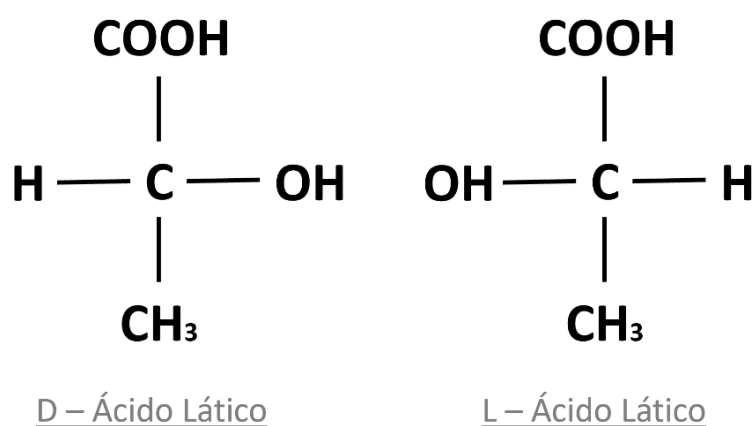


Figura 1: Estrutura dos isômeros de ácido láctico. Fonte: elaborado pela autora.

Suas características partem dos seus dois estereoisômeros, sendo a aplicação de sua mistura racêmica ou isomericamente pura um ponto essencial em diferentes campos de produção (Wui; Li, 2018). Nota-se uma maior frequência de uso do isômero L(+) nas indústrias de alimentos e farmacêutica, já que esse é o único que o corpo humano é capaz de metabolizar. No entanto, na indústria de bioplásticos como o PAL, faz-se uso tanto de misturas racêmicas, puras ou de misturas com diferentes proporções desses isômeros para obtenção de produtos com diferentes características (Albuquerque et al., 2021).

A síntese química do AL é realizada pela aplicação de recursos petroquímicos como o acetaldeído e o ácido cianídrico na obtenção de uma mistura racêmica desse composto (Albuquerque et al., 2021; van der Zee, 2021). Por esta razão, cerca de 90% do AL comercializado é feito através da fermentação microbiana de açúcares de biomassa de primeira geração, como amido de milho e cana de açúcar, para a obtenção de produtos isomericamente puros. Essas matrizes agrícolas são transformadas em AL por bactérias lácticas que geram esse composto isomericamente puro (Albuquerque et al., 2021).

A fermentação microbiana, por sua vez, é realizada em reatores em batelada. No processo é gerado lactato de cálcio e outras impurezas, necessitando processos de filtração, tratamento de carbono, evaporação e acidificação com ácido sulfúrico para purificação e obtenção AL e sulfato de cálcio (Albuquerque et al., 2021; Pohanka, 2020; Jiménez; Peltzer; Ruseckaite, 2015).

Nesse sentido, um processo de fermentação estável e altamente produtivo de D-AL é extremamente desejável e buscado por grupos de pesquisa. Liu e colaboradores (2014), por exemplo, conseguiram uma fermentação em escala piloto (6 toneladas) de D-AL utilizando uma cepa de *Escherichia coli*, obtendo uma pureza do enantiômero de 99% (Liu et al., 2014).

3.2. L-AL

As duas formas de AL existem na forma de lactato de base conjugada em pH fisiológico 7,4, não havendo efeito sobre a quiralidade que é mantida no ânion básico (Pohanka, 2020). O L-AL é o enantiômero natural em humanos e outras formas mais elevadas de vida. No sangue humano, o nível normal de L-lactato está na faixa de 0,5 a 1 mmol/l (Pohanka, 2020).

Em geral, o metabolismo do L-AL é mediado pela L-lactato desidrogenase (L-LDH) na presença de NAD^+/NADH como cofator (Pohanka, 2020). Em essência, a Figura 2 mostra a reação reversível de oxidoredução da D-lactato desidrogenase (Figura 2).

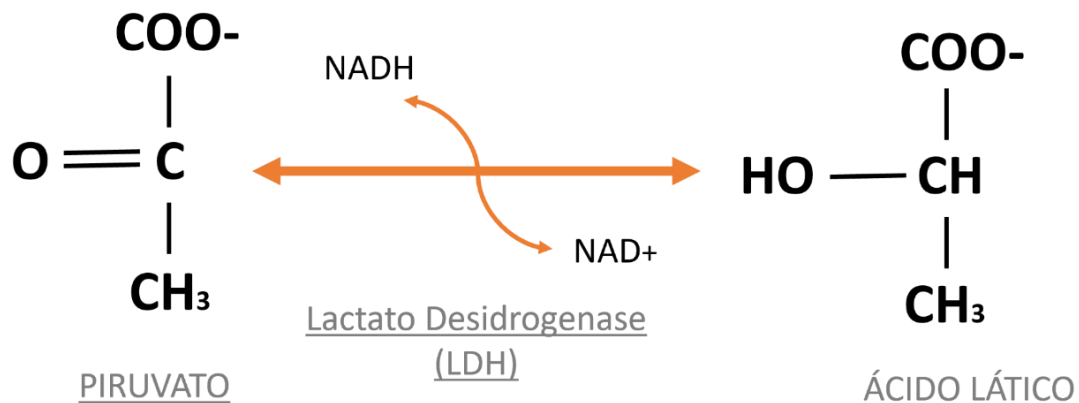


Figura 2: Reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH). Essa enzima é responsável pela conversão reversível do piruvato em lactato. Fonte: elaborado pela autora.

A lactato desidrogenase é uma enzima evolutivamente conservada encontrada em eucariotos, bactérias e em arqueias (Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021). A L-LDH se envolve com diversas vias metabólicas celulares, como a glicólise e gliconeogênese. Em humanos tem função importante no ciclo de Cori, além de participar de processos fermentativos (Pohanka, 2020). No metabolismo do de AL, as enzimas são normalmente específicas para um dos seus isômeros, como o caso da L-lactato desidrogenase (Pohanka, 2020). Porém, algumas desidrogenases em bactérias se envolvem tanto na conversão da D-AL, como no metabolismo do L-AL.

3.3. D-AL

A produção da D-AL se dá por diversos mecanismos metabólicos. A principal deles é por meio da D-lactato desidrogenase (D-LDH). Essa enzima realiza a conversão redutiva do piruvato em D-AL usando NADH (Pohanka, 2020; Afiati et al., 2020). Uma gama de organismos são capazes de expressar tal enzima, como a *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Escherichia coli* e os fungos *Phytophthora undulata*, *Pythium debaryanum* e *Sapromyces elongatus* (Pohanka, 2020).

Para obtenção de um produto competitivo, porém, é necessário o desenvolvimento de cepas robustas com rápido crescimento, tolerância a altas concentrações de AL e alto rendimento com baixo custo de nutrientes (Klotz et al., 2016). Quando produzida por *Lactobacillus sp.*, a expressão é anaeróbica e exige um mínimo uso de energia (Klotz et al.,

2016). Já pelo fungo *Rizopus oryzae* a produção é aeróbica, necessitando-se agitação com alto custo de energia e tempo de fermentação longo devido a seu crescimento lento e taxas de produção (Klotz et al., 2016).

A D-Lactato desidrogenase (citocromo) é outra enzima que é capaz de produzir e consumir D-LA (Pohanka, 2020; Afiati et al., 2020). Sua reação necessita de duas moléculas de ferricitocromo c (Pohanka, 2020). Sua presença é descrita em *Arabidopsis thaliana* e nas leveduras *Hansenula polymorpha* e *Saccharomyces cerevisiae* (Pohanka, 2020; Klotz et al., 2016).

3.4. Produção industrial do AL

A produção industrial é etapa chave quando se discute o potencial econômico do D- AL. Nesse processo, durante a fermentação, compostos alcalinos como a cal (hidróxido de cálcio) devem ser adicionados para neutralizar o meio, controlando o pH do caldo de fermentação a um nível ideal para a produção de AL (Jiménez; Peltzer; Ruseckaite, 2015).

Porém, esse processo gera o sal lactato de cálcio que deve ser retirado em etapas posteriores pela adição de ácidos fortes como o ácido sulfúrico para liberar o D-AL para posterior recuperação (Jiménez; Peltzer; Ruseckaite, 2015). Outro composto indesejado gerado no processo é o gesso (sulfato de cálcio) que deve ser descartado como um resíduo sólido com uso limitado (Eregowda, 2019). De maneira geral, as etapas envolvidas no processo *downstream* são: 1) remoção dos microrganismos de produção (biomassa), 2) tratamento com ácido sulfúrico, 3) remoção de D-AL bruto de cobertura de gesso e 4) purificação do ácido láctico por resinas cromatográficas de troca iônica para produzir ácido láctico de grau alimentício contendo algumas impurezas, e/ou por destilação para produzir ácido láctico de grau polimérico (ou termoestável) livre de qualquer proteína, açúcar e a maioria das outras impurezas (Klotz et al., 2016).

3.5. Efeitos em bactérias e leveduras do acúmulo de ácidos fracos

O acúmulo de AL gerado pelas células produtoras exerce uma série de efeitos negativos que prejudicam a produtividade microbiológica deste composto (Peetermans; Foulquié-Moreno; Thevelein, 2021; Darvishi; Blenner; Ledesma-Amaro, 2021). Dentre os efeitos mais prejudiciais para as células destacam-se a acidificação intracelular, acúmulo de ânions, perturbação da membrana plasmática, perturbação do trânsito de aminoácidos, esgotamento do ATP, acumulação de ROS, desregulação metabólica e quelação de metais (Mira; Teixeira, 2014).

O pKa, a lipofilicidade, a volatilidade, a concentração do ácido e pH são os principais determinantes da escala de inibição que será causada nas células microbianas (Hirshfield; Terzulli; O'Byrne, 2003; Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021). O AL quando está fora da célula em um pH abaixo do seu valor de pKa, encontra-se em sua forma não dissociada, lipofílica. Essa característica acarreta na capacidade de atravessar a membrana plasmática (Peetermans; Foulquié-Moreno; Thevelein, 2021; Kim et al., 2019).

Porém, quando dentro do espaço celular o próton do AL tende a se dissociar, pela mudança do pH para neutro, o que acarreta uma série de acontecimentos celulares (Hirshfield; Terzulli; O'Byrne, 2003; Kim et al., 2019). O ponto crítico é que essa forma não dissociada do AL perde a sua lipofilicidade, levando ao acúmulo do seu ânion no interior celular (Peetermans; Foulquié-Moreno; Thevelein, 2021; Mira; Teixeira, 2014). Tal composto será capaz de perturbar a atividade das proteínas presentes na membrana e da estrutura de fosfolípidos na bicamada, gerando a permeabilização da membrana. Esse fato leva ao influxo de íons e outros metabólitos, à importação de prótons e a consequente quebra no potencial eletroquímico celular (Foulquié-Moreno; Thevelein, 2021; Mira; Teixeira, 2014). Algumas outras consequências são a geração de alto turgor e problemas no transporte e absorção de alguns compostos essenciais, como aminoácidos (Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o esgotamento de ATP são produtos da ruptura da cadeia transportadora de elétrons na membrana interna mitocondrial, outra consequência do acúmulo dos ânions de AL na levedura (Bauer et al., 2003; Piper, 1999; Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021). O comprometimento das funções celulares pela acidificação intracelular também afeta a síntese de DNA e RNA e a glicólise (Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021).

O esgotamento de energia celular é uma importante consequência da presença de AL, influenciando aspectos fisiológicos como a atividade das bombas H^+ -ATPase e ABC que são dependentes de ATP para exportação de prótons e ânions (Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021).

3.6. Resposta de *S. cerevisiae* ao acúmulo de AL

O estresse causado por ácidos fracos leva à indução de uma série de genes em *S. cerevisiae*, sendo de maneira geral relacionados com o dobramento de proteínas, metabolismo lipídico, função da parede celular e resistência multidrogas (Mira; Teixeira, 2014). Um dos poucos genes relacionados com essa resposta é o *TPO3* que codifica um transportador de H^+ (Mira; Teixeira, 2014).

O fator de transcrição Haa1p tem sido amplamente descrito como regulador ao estresse causado por AL e acidez em geral (Kim et al., 2019). Nesse sentido, ele se ativa em pH mais baixo, ou seja, com o AL em sua forma não-dissociada (Abbott et al., 2008). A super expressão de *HAA1* em células produtoras de AL, resulta em uma maior produtividade desse composto (Baek et al., 2016a). Ao mesmo tempo, alterações nos alvos normais de Haa1p como *TPO2*, *TPO3*, *YGP3* e *YRO2* não afetam negativamente sua produção (Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021; Baek et al., 2016a; Abbott et al., 2008). Existe uma complexa rede de regulação no que tange ao estresse causado pelo AL, ainda não elucidada por completo.

A homeostase intracelular de pH é essencial para a célula e intimamente perturbada na presença de AL. A bomba de H^+ -ATPase Pma1p e ATPases vacuolares possuem papel central na manutenção do equilíbrio interno de pH e uma maior atividade quando em momentos de estresse (Martínez-Muñoz; Kane, 2017). O papel da Pma1p ocorre pelo bombeamento de prótons para fora do citosol em uma tentativa de restabelecer o pH celular, enquanto que as bombas ATPases vacuolares atuam no sequestro de prótons para o lúmen do vacúolo (Martínez-Muñoz; Kane, 2017; Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o AL possui um grande potencial para acidificação interna da célula apresentando uma redução na atividade da Pma1p (Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021). De alguma maneira, isso se relaciona com a redução nos níveis de ácidos graxos insaturados, afetando a fluidez da membrana e o consequente posicionamento da Pma1p (Gregori et al., 2008; Baek et al., 2016b).

Para equilibrar o acúmulo de íon-lactato no interior celular é necessário que a célula trabalhe na sua exportação. Nesse sentido, dois transportadores de ânion-lactato são utilizados, o Jen1p e o Ady2p (Sauer et al., 2010; Kok et al., 2012). O Jen1p é bem estudado em *S. cerevisiae* e atua no transporte de próton/lactato, estando envolvido também no transporte de outros ácidos monocarboxílicos, o piruvato, acetato e propionato (Pacheco et al., 2012; Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021). Já o Ady2p é um transportador de próton/ânion que também atua no bombeamento de acetato, propionato, amoníaco, formato e piruvato (Pacheco et al., 2012; Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021).

O estresse resultante do excesso de AL também acarreta na redução considerável dos aminoácidos intracelulares (Suzuki et al., 2012). Sua consequência é uma redução geral da síntese proteica, que perturba a homeostase intracelular do pH devido a uma diminuição do glutamato e da descarboxilação da arginina e o aumento no número de radicais oxigenados, resultando em estresse adicional (Peetermans; Foulquié-Moreno; Thevelein, 2021; Mira; Teixeira, 2014; Baek et al., 2016a; Abbott et al., 2008).

Na tentativa de balancear esse desequilíbrio, a célula tende a superexpressar genes relacionados com a homeostase dos aminoácidos (Suzuki et al., 2012). Quando se avalia compostos semelhantes ao AL, como o ácido acético, essa expressão é mediada via TOR (Suzuki et al., 2012; Mira; Becker; Sá-Correia, 2010). Nota-se, a acidificação vacuolar como outra resposta na busca de restabelecer o gradiente de prótons e a consequente melhor absorção de aminoácidos.

Porém, alguns aminoácidos têm um aumento, no que tange estresse com AL, como prolina, cisteína, asparagina e glutamina. Isso provavelmente se deve ao aumento da síntese de glutathione, que atua no combate de espécies reativas de oxigênio (Nugroho; Yoshikawa; Shimizu, 2015).

O estresse causado por AL gera importante perturbação na cadeia transportadora de elétrons, via que atua na produção de ATP, além de se relacionar com a glicólise e a exportação de prótons e ânions (Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021). De maneira geral, se observa uma redução dos níveis energéticos na presença de AL, porém, quando em níveis elevados do agente estressor, observa-se um aumento dos níveis de ATP como o observado por Ullah (2013). Isso provavelmente se dá pela redução na atividade das H⁺-ATPase.

É perceptível a capacidade da célula em desenvolver mecanismos contra o esgotamento de energia pela expressão de diversos genes envolvidos na regulação do ATP para prevenir o ciclo celular fútil e manter reservas de energia para a retomada do crescimento

em condições mais favoráveis (Ullah et al., 2013; Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021).

3.7. D-lactato desidrogenase (D-LDH)

Os organismos produtores de D-AL possuem uma grande variedade de genes de isoenzimas de D-LDH, além de diversos substratos a depender do organismo (Chen et al., 2017). Tais enzimas, geram as formas estereoisômeras do AL, que são o D e o L, sendo que suas sequências genéticas ou proteicas variam dependendo de sua especificidade (Cheng et al., 2022).

Nesse sentido, essa diversidade pode ser percebida no gene *lrl dh* de *Lactobacillus rossiae* é responsável pela produção de D-AL, enquanto o gene *l-l dh* de *Lactobacillus plantarum* é responsável pela produção de L-AL (Cheng et al., 2022; Luo et al., 2020; Zhu et al., 2017). A grandes concentrações de lactato, a LDH exibe inibição por *feedback* e a taxa de conversão do piruvato a lactato é reduzida (Cheng et al., 2022).

As isoenzimas de LDH são mais diversificadas em bactérias lácticas do que em outros grupos de organismos. De maneira geral, uma mesma LDH não é capaz de catalisar os dois isômeros de AL, para isso possuem uma enzima para o isômero L de lactato e a outra o isômero D, como é o caso do *Lactobacillus plantarum* (Cheng et al., 2022).

Dentro das diversas possibilidades de isoenzimas, surge o questionamento sobre qual teria maior atividade enzimática. Nesse sentido, avaliou-se a eficiência dos genes das seguintes espécies produtoras de D-AL *Leuconostoc mesenteroides*, *E. coli*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* e *L. plantarum* e observou-se uma boa atividade cinética oriunda da *Leuconostoc mesenteroides* (Zhong et al., 2019).

3.8. *Leuconostoc mesenteroides*

A *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria que produz D-AL opticamente puro, o que é interessante economicamente. Porém, ela possui uma produção complexa, devido a sua capacidade limitada de biossíntese de vitaminas e aminoácidos (Coelho et al., 2011). As matérias-primas devem possuir baixo custo, baixos níveis de contaminantes e fermentação rápida (Chandel; Segato, 2021; Coelho et al., 2011).

Essa bactéria é anaeróbica facultativa, gram-positivo, utilizada como membro de culturas iniciais ou como inóculo natural em muitos alimentos fermentados, como chucrute,

kimchi, vinho, kefir e queijo e associado a fermentação em condições de baixas temperaturas e salinidade (Özcan et al., 2019). Ela se apresenta na forma de células lenticulares de cocóide em pares e cadeias, no entanto, pode ocasionalmente formar hastes curtas com extremidades arredondadas em cadeias longas. Cresce em temperaturas próximas aos 30°C e possui pH ideal por volta de 4,5-7 (Özcan et al., 2019; Campedelli et al., 2015).

3.9. *Saccharomyces cerevisiae*

Organismo com boa tolerância a ambientes ácidos, metabolismo bem elucidado, bem como a fácil manipulação, cultivo simples e taxas de crescimento rápido (tempo de geração curto), a *S. cerevisiae* tem grande potencial como plataforma metabólica (Xu et al., 2019). Fungo unicelular, a levedura foi descoberta a cerca de 100 anos atrás e já possui atualmente mais de 1500 espécies conhecidas (Diego-Nava et al., 2023).

A *S. cerevisiae* é o organismo mais utilizado comercialmente, sendo peça-chave para obtenção de alguns produtos como cerveja, pão, vinhos, bioetanol, entre outros produtos mais complexos, além de ser o primeiro eucarionte com um amplo banco de dados de toda a sequência do genoma (Goffeau et al., 1996; Diego-Nava et al., 2023). O mercado de leveduras tem uma previsão de crescimento anual de aproximadamente 9,6% e estima-se que até 2025 valerá cerca de 6,1 bilhões de dólares (Markets and Markets, 2020).

A *S. cerevisiae* possui curto período de replicação, facilidade de domesticação, alta eficiência de esporulação, baixa patogênese e tamanho pequeno do genoma (Gallone et al., 2016; Diego-Nava et al., 2023). Esse microrganismo tende a dominar as fermentações devido a sua tolerância a várias pressões seletivas, como pH baixo, estresse osmótico, altos níveis de etanol e estresse nutricional (Diego-Nava et al., 2023).

S. cerevisiae tem sido usada como biofábrica para produção de diversos compostos de alto valor agregado como ácidos graxos, ácido succínico, ácido 3-hidroxipropiônico (3-HP), ácido mucônico, sorbitol, xilitol, glicerol, isopreno, etc. Nesse sentido, metodologias de engenharia metabólica e evolutiva são algumas ferramentas essenciais para a obtenção desses produtos químicos.

Um exemplo é Baek et al. (2016b) que engenheirou uma *S. cerevisiae* com uma maior concentração de ATP, a partir da eliminação do *GSF2*, que está envolvida no direcionamento dos transportadores de glicose para a membrana plasmática. Essa modificação genética causou a desrepressão de genes envolvidos com a via respiratória, a partir da utilização de glicose como substrato (Baek et al., 2016b).

3.10. Engenharia Metabólica de *S. cerevisiae* para produção de AL

A tolerância ao AL é uma característica complexa, que envolve diversos fatores. Por isso, existem diversas abordagens que podem ser utilizadas para tentar melhorá-la. É possível identificar vários alvos que poderiam ser modificados a fim de otimizar a produção deste composto (Figura 3).

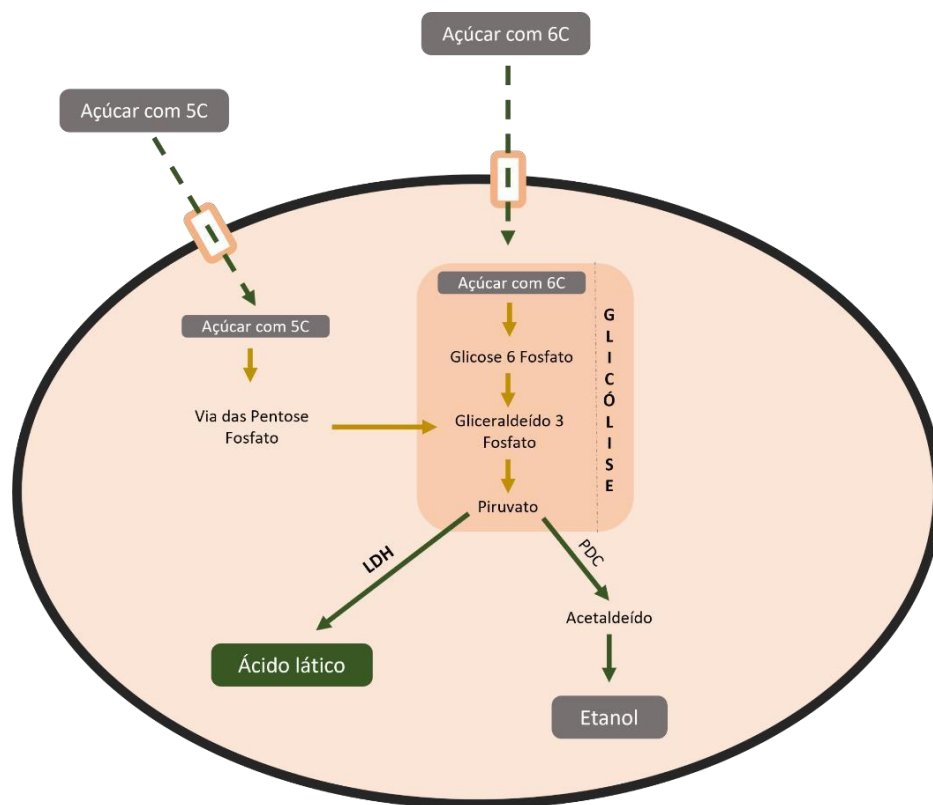


Figura 3: Caminhos metabólicos para a produção de AL em *S. cerevisiae* e via competitiva do etanol. Fonte: adaptado de Baptista et al. (2021). Nota: LDH representa a enzima lactato desidrogenase, enquanto a abreviação PDC representa a piruvato descarboxilase.

Diversas possibilidades de tecnologias podem ser utilizadas nessa abordagem como a utilização de CRISPR, análise funcional usando uma coleção de cepas de deleção para todos os genes não essenciais, monitoramento de mudanças de expressão sobre estresse por ácido láctico usando microarrays de DNA, mapeamento QTL, entre outros (Baptista et al., 2021). Nesse sentido, diversos trabalhos têm demonstrado o potencial da engenharia metabólica de leveduras para construção de cepas de *S. cerevisiae* capaz de produzir D-AL e com alta

tolerância a esse composto (Baptista et al., 2021; Peetermans; Folquié-Moreno; Thevelein, 2021).

De maneira geral, as principais abordagens utilizadas em estudos são a expressão de uma *LDH* heteróloga, que catalisa o piruvato em AL, e a redução da produção de etanol, alcançada através da atenuação ou eliminação da atividade da piruvato descarboxilase (PDC) (Novy et al., 2017). O trabalho de Baek e colaboradores (2016a) foi capaz de alcançar uma quantidade de 48,9 g/L de AL sem neutralização e 112 g/L de AL sob condições de neutralização, usando a glicose como substrato. Nesse trabalho foi utilizado o gene *ldhA* de *Leuconostoc mesenteroides* junto com a deleção de alguns genes como o *PDC1*, *ADH1*, *GPD1*, *GPD2*, *DPD1*, *JEN1* e superexpressão do *HAA1* (Baek et al., 2016a).

A partir da deleção dos genes *PDC1* e *PDC5* em *S. cerevisiae* diploide via CRISPR/Cas9, Stovicek, Borodina e Forster (2015) conseguiram fazer as edições em um único evento de transformação, onde a inserção de um gene heterólogo e a interrupção de dois genes endógenos ocorreram simultaneamente. No estudo de Lian e colaboradores (2018), foi possível eliminar quatro genes (*ALD6*, *PHO13*, *LEU2* e *URA3*) em uma única etapa em cepas diploides e triploides via CRISPR/Cas9, a fim de aumentar a produção de AL em cepas que consumiam xilose.

Já o trabalho de Baek et al. (2017) foi capaz de chegar em 82,6 g/L de AL, com um rendimento de 0,83 g/g de glicose em pH 3,5. Foi utilizado *ldhA* de *Leuconostoc mesenteroides* em *S. cerevisiae* e eliminamos genes envolvidos na produção de etanol (*ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, e *ADH5*), produção de glicerol (*GPD1* e *GPD2*) e degradação de D-AL (*DLD1*) (Baek et al., 2017).

Lee e colaboradores (2015) observaram uma produção de cerca de 50 g/L de AL a partir do *knock-out* do gene *SSB1*, que codifica uma chaperona associada ao ribossomo. Esse trabalho foi feito com a abordagem de screenings RNAi em todo o genoma, com o objetivo de identificar rapidamente possíveis alvos genéticos que poderiam aumentar a tolerância da *S. cerevisiae* à ambientes ácidos (Baptista et al., 2021). Já Sugiyama e colaboradores (2016) obtiveram uma elevação de 20% na produção de AL, comparado com a cepa parental, pela superexpressão do gene *ESBP6* (que codifica uma proteína com similaridade com as permeases de monocarboxilatos), juntamente com a expressão heteróloga da LDH (Sugiyama et al., 2016).

Zhu et al. (2022), por sua vez, fez uso da engenharia metabólica em *S. cerevisiae* através da expressão heteróloga da L-lactato desidrogenase, reduzindo o acúmulo de etanol, e introduzindo uma via de síntese bacteriana da acetil coenzima A (acetil-CoA). Além disso, foi

realizado o screening com a expressão de transportadores de monocarboxilatos, o que levou a produção de até 51,4 g/L de AL (Zhu et al., 2022).

Lee e colaboradores (2015) demonstraram o potencial de lidar com pH baixos e a importância de estratégias para associação do processo redox na engenharia metabólica de *S. cerevisiae*. Foi expresso a L-LDH alinhado ao o *knockout* de *PDC1*, *CYB2* e *GPD1*, e a deleção de *NDE1* e *NDE2* (genes envolvidos nas reações de consumo de NADH) acarretando na produção de 117 g/L de AL (Lee et al., 2015; Baptista et al., 2021).

De maneira geral, existe um favorecimento metabólico para a produção de etanol frente a produção de AL por expressão heteróloga. Um exemplo disso é a existência dos genes *PDC1*, *PDC5* e *PDC6* que estão envolvidos na conversão de piruvato em acetaldeído e a estratégia comumente tomada é a deleção desses genes (Hohmann, 1991; Baptista et al., 2021). Porém, existe um grande risco de se gerar um déficit de compostos C2 necessários para o crescimento da levedura (Smolke, 2009; Baptista et al., 2021). Alguns trabalhos têm conseguido superar esse desafio, como Turner (2015), que conseguiu um favorecimento metabólico para a produção de AL frente a produção de etanol. Isso foi feito por meio da expressão heteróloga de lactato desidrogenase, *ldhA*, em uma cepa de *S. cerevisiae* desenhada para o consumo de xilose alcançando a produção de 49,1 g/L de AL com um rendimento de 0,60 g/g, com xilose como única fonte de carbono e sem a deleção de nenhum gene *PDC* (Baptista et al., 2021; Sornlek et al., 2022). O efeito observado aqui foi a formação de produto dependente do substrato.

3.11. Evolução adaptativa com *S. cerevisiae* para maior tolerância a AL

A abordagem conhecida como Evolução Adaptativa em Laboratório (ALE) é uma técnica inovadora para produzir linhagens microbianas evoluídas com características desejáveis, aplicando as regras de seleção natural descritas pela Teoria Darwiniana no ambiente controlado do laboratório (Menegon et al. 2022, Zhu et al. 2022). Embora relativamente nova, essa abordagem já foi adotada por diversos pesquisadores para aprimorar uma variedade de características em microrganismos amplamente utilizados na área da biotecnologia (Menegon et al. 2022).

O ALE é frequentemente utilizada como uma ferramenta para aprofundar a compreensão das vias genéticas e metabólicas envolvidas na evolução. Além disso, é um campo promissor para a produção de produtos de alto valor agregado, como etanol, butanol, ácido láctico e lipídios (Zhu et al. 2022).

Durante a fermentação a produção de AL por *S. cerevisiae*, ocorre um efeito negativo que o desse composto sobre a célula que tem problemas de se manter em ambientes com maior acidez por AL. Nesse contexto, o ALE tem sido utilizado por diversos trabalhos como uma alternativa para o desenvolvimento de maior tolerância a ambientes com grandes concentrações do produto (Menegon et al. 2022).

Zhu et al. (2022) fez a associação entre engenharia metabólica e evolutiva, onde para aumentar ainda mais sua eficiência intrínseca de tolerância a ácido, a ALE foi adotada cultivando *S. cerevisiae* com um aumento gradual nos níveis de AL durante 12 subculturas em série, resultando uma produção de 60,4 g/L. Já Baek et al. (2016a) realizou uma ALE através do crescimento de células em meio de extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) com um aumento gradual nas concentrações de AL de 1,3 para 3,95 % durante 11 subculturas. Ao final do experimento, após o sequenciamento do genoma, observou que mutações nos genes *SUR1* e *ERF2*, resultavam em uma tolerância e produção AL melhorada.

Baek et al. (2017) ao inserir as mutações de *SUR1* e *ERF2* na *S. cerevisiae*, alinhado com a deleção do gene *PDC1* observou na cepa resultante uma produção de até 82,6 g/L de D-LA.

Já Zhu et al. (2022) observou um aumento da tolerância ao ácido láctico, cultivando células de levedura com um aumento gradual dos níveis de LA ao longo de 12 subcultivos seriados, o que levou a um aumento de 17,5% na produção de LA, atingindo 60,4 g/L. Por fim, a linhagem modificada foi capaz de produzir 121,5 g/L de LA.

4. METODOLOGIA

4.1. Linhagens utilizadas

4.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D

Para o experimento de evolução foram utilizadas três populações da linhagem CEN.PK113-7D preparadas por integração no locus *FLO8* dos cassetes kanMX, natMX, e hphMX, respectivamente. O locus *FLO8* foi escolhido para integração dos marcadores por especificar um fator de transcrição envolvido em floculação (Liu; Styles; Fink, 1996), traço fenotípico que visamos evitar em nossas populações experimentais, tendo em vista o objetivo de escrutínio destas populações por citometria de fluxo, o que requer a análise de células isoladas.

4.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* PE-2_H4

Para o experimento de choques de AL com a linhagem PE-2_H4 (ALE1, Figura 3), construímos 1 população distintamente marcada por integração cromossomal dos cassetes de resistência ao antibiótico zeoMX (zeocina) (Goldstein; McCusker, 1999). O local de inserção foi o locus *HO*, descrito como neutro para integrações de marcadores (Goldstein; McCusker, 1999) e que já é defectivo por uma deleção na linhagem PE-2 (Jacobus et al., 2021). A levedura *HO::hphMX* teve seu *mating-type* trocado para “*MATalpha*” por expressão induzida via plasmídeo do gene *HO*. A linhagem *HO::hphMX* foi então conjugada com a linhagem *HO::zeoMX*, gerando a linhagem PE-2_H4 diploide zeoMX/hphMX (Figura 3).

4.2. Engenharia metabólica

Inicialmente foi proposto o uso da *S. cerevisiae* PE-2 (Basso et al., 2008) no projeto bolsa de doutorado direto FAPESP 20/02434-1, porém, optamos por fazer uso da linhagem CEN.PK113-7D nas etapas de engenharia metabólica (Kok et al., 2012). Isso se deve pela linhagem CEN.PK113-7D oferecer algumas vantagens em relação a PE-2_H4. Essa cepa não flocula no estado haploide (como observamos com a PE-2_H4), o que facilita detecção de células individuais em todas as análises propostas por citometria de fluxo. A CEN.PK113-7D

tem maior sensibilidade ao AL, sendo, portanto, um objeto de estudo mais “maleável”, em que supostamente mais mecanismos de adaptação serão identificados para tolerância ao AL. Por último, no nosso sistema CRISPR/Cas9, a CEN.PK113-7D permite transformação simultânea multiplexada (várias modificações genéticas ao mesmo tempo), enquanto apenas uma modificação genética é conseguida por vez na PE-2. Os oligonucleotídeos utilizados em todo o processo podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação de oligonucleotídeos utilizados no projeto

Primer	Sequência
CheckDLD1_f1	AAGGAAGATTTGATAGAGAAGCTGG
CheckJEN1_r	GTGGATGTGCAGTAAGGACGTAAATCTCG
dld_f1	CAACAGGCACAGGCAGCACCGACAGC
dld_L1	CCCAACTGGTGCAGTAATAACCGCTTAGCG
DonDLD1_f	GGTCAAAAAGATCGACCCAGTAAATTCTACGTTAAAGCTGGTTGAGGACCTGA AGCAGGTGCTGG
DonDLD1_r	GGAAACTTCTTCGGTAGTATGAGG
DonJEN1_f	TGGTGAACAGCAACAACCTGCTGG
DonJEN1_r	ATACTCTACACCTTGATCCTGGCTATAAACTCTTTCCAGCGTATAGCTTTTCGT GATCCGGGTTG
JACa_CYB2	ATACGCCACGGAAGTAGTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAA GG
JACa_DLD1	ATAGTCTGGTGAGTCCAATGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAG G
JACa_JEN1	ACTGCCTGCACAATCAATTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAG G
JACb_CYB2	CTACTAGTTCCGTGGCGTATGATCATTATCTTTCACTGCGGAGAAGTTTCGAA CGCC
JACb_DLD1	CATTGGACTCACCAGACTATGATCATTATCTTTCACTGCGGAGAAGTTTCGA ACGCC
JACb_JEN1	GAATTGATTGTGCAGGCAGTGATCATTATCTTTCACTGCGGAGAAGTTTCGA ACGCC
JEN1_L1	ATACATTGCACATCATTGTTGAGA
JEN1_R1	AATGTACTTACATTCTAATCCCTTC
ldhJEN1_f	AAGTTTTTCCTCAAAGAGATTAAATACTGCTACTGAAAATATAGCTTCAAAT GTTTCTACTCCT
ldhJEN1_r	ATAGAGAAGCGAACACGCCCTAGAGAGCAATGAAAAGTGATTTGAAAGATGA TACTCTTTATTTC
lmLDH_f1	AAGGGAGAGAAGCCTGCCATAGCCGTGGAG
lmLDH_f2	AACTATCACGTCTGCTTAGGAGG
lmLDH_f3	GCTGCGAGGGGTAACCTTAATGGA
lmLDH_r1	TTCATCGTCTCTGATCCCATAGGC
lmLDH_r2	GAGCCCATCTTAGGTCGTGCTTGG
lmLDH_r3	TTAAGTCCGTCTATGATAGCATC
TEF1pro_f1	GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAG
TEF1pro_r2	GAGGGGAAATTTAGTATGCTGTGCTTGG
Check_CYB2_f	GGCCAAATAGACAACGAGCCGAAAC
Check_CYB2_R	CGATGACATTAGGAGCATGTAGTGG

CYB_L1	CCAAGTCTGAACCTTAGATCTCCAATACTTTC
CYB_R1	GAATGATATTAAGTTATACGAATGTTTCG
CYB_L2	TTAGATCTCCAATACTTTCAGTTGGAGTATGTG
CYB_R2	AATGTATAAAACATATAACTTTGCAAATGATTC
lmLDH_f5	CCAATCATTGATGCCGCCGTAGCCTTTGCC

Fonte: elaborado pela autora.

4.2.1. Desenvolvimento do constructo para produção de D-Lático ácido por *S. cerevisiae*

A *S. cerevisiae* não possui a maquinaria para produção de ácido láctico, logo é necessário conferir essa característica ao organismo. Nesse sentido, selecionamos a enzima D- lactato desidrogenase (D-Ldh) de *Leuconostoc mesenteroides* para expressão heteróloga em *S. cerevisiae* por inserção cromossomal via recombinação homóloga (Figura 4A). A enzima D-Ldh de *L. mesenteroides* foi caracterizada como tendo parâmetros de cinética enzimática superiores a proteínas homólogas de outros microrganismos e já foi transformada com sucesso em *S. cerevisiae* em outros trabalhos que empregaram estratégias de evolução adaptativa em laboratório (Baek et al., 2017; Zhong et al., 2019). O cassete de DNA desenhado (Figura 4A) foi sintetizado pela empresa Biomatik (Cambridge, Canadá). Neste cassete o gene codificador da D-lactato desidrogenase de *L. mesenteroides* (*lm.ldhA*) foi códon otimizada para *S. cerevisiae*, sendo expresso por meio de um promotor endógeno forte (promotor *TEF1*) e controlado por um terminador artificial (sintético) Tsynth25t (Sun et al., 2012; Curran et al., 2015). A integração do cassete pTEF-*Lm.ldhA*-Tsynth25t foi planejada para ser realizada, via CRISPR/Cas9, em três genes distintos, resultando na deleção destes genes concomitante com a inserção cromossomal do cassete (Figura 4A).

O cassete desenhado foi amplificado por PCR (Phusion DNA polimerase, NEB) e por meio do sistema CRISPR/Cas9 foi facilitada a sua inserção direcionada no genoma. A primeira inserção realizada foi no gene *JEN1* (Figura 4) que especifica um transportador de membrana atuante na recaptção do AL a partir do meio de cultura, levando a um ciclo fútil de exportação para fora da célula e recaptção para dentro da célula (Goffeau et al., 1996; Pacheco et al., 2012). A segunda inserção foi feita na região do gene *DLD1* que codifica uma lactato desidrogenase mitocondrial (Lodi; Ferrero, 1993) (Figura 4).

A inserção do cassete pTEF-*Lm.ldhA*-Tsynth25t é promovida por meio da recombinação homóloga mediada pelo sistema CRISPR/Cas9 a partir de plasmídeos desenvolvidos em nosso laboratório, capazes de expressar RNAs guia (gRNAs) específicos para a deleção dos genes (Menegon; Gross; Jacobus, 2022) (Figura 4A). No Tabela 1, pode-se

encontrar os primers desenhados para a amplificação do cassette *pTEF-Lm.ldhA-Tsynth25t* (com regiões 5' homólogas para inserção disruptiva nos *loci* distintos), construção de gRNAs e comprovação de inserção do cassette na região prevista. Primers utilizados nos experimentos foram encomendados junto a empresa Exxtend Solução em Oligos (Campinas, SP).

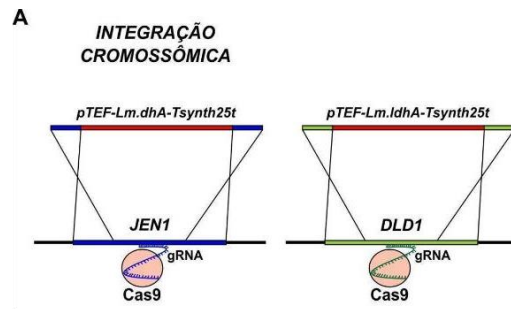


Figura 4: Engenharia metabólica de *S. cerevisiae* para a produção de D-AL. Fonte: elaborado pela autora. (A) O cassette *pTEF-Lm.LdhA-Tsynth25t* para expressão da D-lactato desidrogenase de *L. mesenteroides* é integrado nos genes *JEN1* e *LDL1* causando a disrupção dos mesmos. A integração é facilitada pela ação do sistema CRISPR/Cas9 com gRNA específicos para os genes alvos.

4.3. Ensaio fermentativo

Foram realizadas fermentações prospectivas para uma quantificação por HPLC da produção de D-AL nas populações de CEN.PK113-7D progenitora, com uma cópia do cassette (*JEN1Δ::LmLDH*) e com duas cópias (*JEN1Δ::LmLDH; DLD1Δ::LmLDH*). A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer 250 mL com 20 mL de meio YPS 2% (yeast-peptona e 2% sacarose) por propagação *overnight*. Ao final do crescimento, a quantificação do meio de cultura evidenciou uma produção de AL de 0,7 g/L para o progenitor, enquanto que as inserções de uma e duas cópias aumentaram a síntese para 3,96 g/L e 6 g/L, respectivamente. O experimento foi feito em duplicata com HPLC da marca Shimadzu, com detector ultravioleta a 210 nm e coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) da Phenomenex, eluída com 0,005 M de H₂SO₄ como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 65 °C.

4.4. Evolução adaptativa

Um dos principais objetivos desse projeto é a realização de estudos de evolução adaptativa da *S. cerevisiae* ao AL. A formação e acúmulo do AL tem por inconveniente a diminuição do pH no meio de cultura, sendo, portanto, prejudicial para a levedura (Kim et al.,

2019). Nesse sentido, estabelecemos dois tipos diferentes de protocolos de ALE, conforme descrito abaixo e na Figura 5. Nestes protocolos a evolução das populações de *S. cerevisiae* PE-2_H4, ou CEN.PK113-D7, foi estimulada por tratamentos drásticos de 2hr com concentrações de AL que causam alta letalidade celular (Figura 5).

4.4.1. Protocolos de choques com AL

Inicialmente se realizou um teste piloto para determinação da concentração inicial de AL e tempo de tratamento que apresentasse alta letalidade em diferentes populações haploides CEN.PK113-7D e uma diploide de PE-2_H4. As linhagens passaram por tratamentos (“choques”) de 2 horas com concentrações crescentes de AL (0%, 2,5%, 5% e 10%). Uma diluição das populações tratadas foi semeada em placas de Petri em meio sólido para avaliação de CFU (*Colony-Forming Unit* ou Unidade de Formação de Colônias) e estimativa de letalidade do tratamento após 48 horas de crescimento. Após a definição inicial de adaptação, foram essas populações passaram por choques crescentes em ácido láctico por duas horas, sendo seguido de um período de recuperação celular em YPS 2%.

O protocolo ALE (Figura 5) foi executado da seguinte maneira: No início do protocolo as células foram deixadas crescer *overnight* até a fase estacionária, quando 1 mL ($\sim 10^8$ células) são coletadas e submetidas ao primeiro tratamento de duas horas com AL, no volume de 1 mL PBS 1% e temperatura de 28 °C. Após o choque de AL, é seguida uma recuperação por inoculação destes 1 mL em 20 mL de YPS 2%, e crescimento a 28 °C, 110 rpm, com propagação até a fase estacionária (usualmente ocorrendo após 2-4 dias de recuperação, conforme a tolerância da população). 1 mL de células na fase estacionária são então coletadas para o ciclo seguinte de choque com AL (2hr) e recuperação subsequente. Desta maneira ciclos repetidos de choques e recuperações foram sendo aplicados às populações experimentais. Aumentos periódicos das concentrações de AL foram realizados ao longo da adaptação evolutiva, quando uma melhora da tolerância foi exibida pelas populações experimentais por apresentarem pelo menos três ciclos seguidos de recuperação rápida (i.e., em até 2 dias chegando a fase estacionária). Este protocolo foi executado com as populações PE-2_H4 diploide e CEN.PK113-7D haploides desde janeiro 2021 até dezembro de 2021.

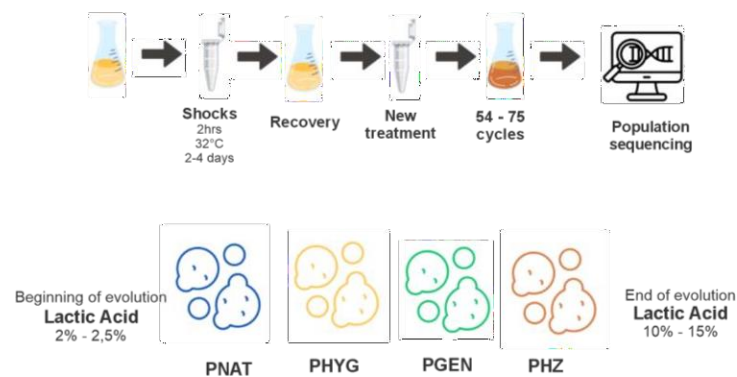


Figura 5: Protocolos de evolução adaptativa de *S. cerevisiae* ao ácido láctico. Fonte: adaptado de Menegon, Gross e Jacobus (2022). Nota: Uma população diploide da PE-2_H4 e três haploides da CEN.PK113-7D, respectivamente, foram submetidas a ciclos de tratamentos drásticos de AL por duas horas, seguidas de recuperações em meio YPS 2%.

4.4.2. *Genome Shuffling*

Para os experimentos com a população PHZ foi realizado o *Genome Shuffling*. Nesse protocolo, a reprodução sexuada durante os ALEs (embaralhamento do genoma, “*genome shuffling*”) são conhecidos por aumentar a diversidade genética ao recombinar (via meiose) alelos adaptativos de diferentes cepas parentais nas células filhas resultantes (Snoek et al., 2015). Para tirar proveito dessas estratégias evolutivas, após cada 10 transferências, 1 mL das células diploides ($>10^8$ células) são esporuladas com quantidade insuficiente de nitrogênio. Ao final de quatro dias, os esporos são germinados em meio YPS 2% overnight para formar novos diploides recombinados.

Em seguida, uma nova rodada de crescimento em YPS 2% contendo os antibióticos da população (PHZ: higromicina e zeocina) selecionaram para a sobrevivência apenas das células diploides. O protocolo repetido a cada 10 transferências de AL.

4.4.3. Controle de Contaminação

O uso periódico de geneticina (PGEN), nourseotricina (PNAT), higromicina (PHYG) e zeocina (PHZ) nas populações que passaram por evolução adaptativa serviram para avaliar possíveis contaminações externas e cruzadas. Dessa forma, o uso da zeocina e higromicina na população PHZ garantiu que apenas os eventos de mating e diploidização bem-sucedidos fossem propagados após episódios de *Genome Shuffling*. Além disso, a cada período de 30

dias as células foram testadas contra todos os antibióticos, para eliminar a possibilidade de alguma contaminação cruzada entre as cepas e populações.

4.4.4. Avaliações fenotípicas

Ao final da estratégia de evolução adaptativa, foram realizados diferentes ensaios fenotípicos para se analisar se o processo adaptativo aumentou o desempenho das populações evoluídas frente aos seus progenitores.

4.4.4.1. Ensaios de crescimento em microplaca - TECAN: populações evoluídas CEN.PK113-7D Haploides

Para os ensaios de tolerância ao AL em microplacas, as leveduras foram incubadas até a fase estacionária e então diluídas em YPS 2% até OD_{600nm} = 1. Em cada poço foi adicionado o meio YPS 2% de sacarose complementado com AL nas concentrações de 0%, 3% e 3,7%. Assim, foi inoculado aproximadamente 2×10^5 células em cada poço de forma que os crescimentos fossem feitos em réplicas. As condições da placa foram 28 °C de temperatura e agitação leve a cada 3 minutos. As leituras foram feitas a cada 15 min na OD de 600nm no TECAN SUNRISE® (Suíça). Para caracterização das populações progenitoras e das populações evoluídas utilizou-se o parâmetro Tmid. Tal valor refere-se a metade do tempo necessário para a curva alcançar a OD máxima. Desse modo, o Tmid é um parâmetro que relaciona o tempo de adaptação ao meio (fase lag), a velocidade de crescimento durante a fase log e a densidade máxima de células ao final do crescimento. Esse valor é calculado no R, com pacote ggplot2 e growthcurver (Sprouffske; Wagner, 2016).

4.4.4.2. Ensaios de competição assistida por citometria de fluxo

Com o objetivo de avaliar as populações evoluídas pelos protocolos de ALE, foram realizados experimentos relacionados com os aspectos fenotípicos dessas populações versus seus progenitores. Nesse sentido, foram feitos ensaios de competição intermediados por citometria de fluxo (DeLuna et al., 2008; Menegon; Gross; Jacobs, 2022). Para que fosse possível a avaliação do *fitness*, as respectivas populações progenitoras do trabalho foram transformadas via CRISPR/Cas9 por integração no locus *HO* com um marcador de fluorescência, o gene repórter GFP (*S. cerevisiae* PE-2_H4 e *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D).

Essas cepas que expressam GFP (H4, *HO::GFP* e CEN.PK113-7D, *HO::GFP*) serviram como referências marcadas com fluorescência contra a qual todas as cepas evoluídas (ou populações evoluídas) competiram.

Todas as 4 populações (1 diploide PE-2_H4 e 3 haploides CEN.PK113-7D) que finalizaram seus respectivos processos de evolução adaptativa passaram por dois tipos de competições: a) avaliação da recuperação celular após choques de duas horas a 6% de AL (Figuras 4 e 5) e b) avaliação do crescimento dessas populações em meio de cultura YPS 2% nas concentrações de 0%, 1% e 1,5% de AL.

Para realização dos ensaios competitivos as células foram aclimatadas durante 2 rodadas de crescimento overnight em YPS 2%. Cada linhagem evoluída competiu com o seu respectivo progenitor marcado com GFP. Para isso foi feita uma mistura inicial dessas células na proporção 1:1 (medido em citômetro de fluxo *Attune NxT*®, Thermo Fisher Scientific) e então a mistura foi submetida a condições de estresse com AL anteriormente descritas. Encerrada a competição, quantificou-se por meio do citômetro de fluxo o número de células totais e a proporção de células sensíveis expressando GFP e não expressando GFP. O número de células que não expressam GFP corresponde a quantidade de células da linhagem evoluída. Cada competição foi realizada em triplicata. Os resultados foram lidos no citômetro entre 48 e 72 horas de crescimento celular. As proporções entre competidores encontradas serviram como base para cálculo de um coeficiente de seleção (S) que é realizado segundo a fórmula abaixo (DeLuna et al., 2008):

$$S = \ln \left(\frac{E_f}{P_f} \right) - \ln \left(\frac{E_i}{P_i} \right) \quad (1)$$

Onde “E” é a porcentagem de células da população evoluída e “P” é a da linhagem parental marcada com GFP. A letra “f” é a porcentagem final e “i” a inicial.

Quanto maior o S, mais a linhagem evoluída está mais representada proporcionalmente ao final da propagação e, portanto, maior o fitness ganho durante a evolução. Um S igual a zero representa uma condição de “empate”, enquanto que um S negativo exprime uma situação em que o progenitor está mais adaptado ao meio de cultura usado para a competição. Também rodamos competições dos progenitores não marcados com o “*tester*” com GFP. Isso permite o desconto da perda de fitness na expressão da GFP e também possibilita exprimir todos os resultados em relação ao progenitor do experimento de evolução sem a marca GFP.

4.4.4.3. Viabilidade

Com relação ao protocolo haploide com a CEN.PK113-7D, foi iniciado o processo de fenotipagem das linhagens que estão passando pela evolução por choques de AL. Um ensaio de viabilidade celular foi estabelecido baseado no monitoramento por citômetro de fluxo da permeabilidade celular ao fluoróforo iodeto de propídio (*propidium iodide*, PI). As duas linhagens avaliadas passaram por dois ciclos de choques leves de AL a 1% seguido por um processo de recuperação. Em seguida, o choque aplicado foi de 2% AL por 2 h. Ao final do tratamento o PI foi aplicado (17,5 µL de PI para 300 µL de amostra). Esse fluoróforo somente permeia células mortas, ou com dano de membrana, e quando intercalado ao DNA fluoresce na faixa de 617 nm (coloração vermelha alaranjada), permitindo a detecção pelo citômetro de fluxo. Por outro lado, células vivas intactas não absorvem o PI e não são fluorescentes. Essas propriedades possibilitam a contagem diferenciada de células vivas (não fluorescentes) ou mortas (fluorescentes) (Davey; Hexley, 2011).

4.4.5. Sequenciamento das populações

4.4.5.1. Preparação da amostra

O DNA das populações foi extraído pelo método fenol-clorofórmio, adaptado segundo Mahuku (2004). O material foi enviado para a GenOne: Soluções em Biotecnologia, para sequenciamento 2x 150 PE na plataforma Illumina NovaSeq6000, com bibliotecas preparadas com o kit NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina.

4.4.5.2. Bioinformática

Para identificar mutações (SNPs e InDels), leituras das populações evoluídas foram filtradas por seleção de tamanho (> 50 bases) e pontuações de qualidade geral. O mapeamento para os genomas de referência *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D (Salazar et al., 2017) foi realizado pelas ferramentas de mapeamento de referência incorporadas no CLC Genomics Workbench 8.0. A identificação de SNPs/InDels foi realizada diretamente a partir de mapeamentos de leitura gerados pelo CLC Genomics Workbench usando algoritmos de detecção de variantes dentro do pacote CLC. Uma configuração de frequência de variantes de

pelo menos 20% das leituras foi observada para a chamada de variantes a partir do sequenciamento das populações.

4.4.5.3. *Seleção de mutações*

A abordagem utilizada para a seleção de mutações de interesse segue Menegon, Gross e Jacobus (2022) e favorece: 1) alelos relacionados a genes que são atingidos por mutações em duas ou mais populações; 2) mutações que afetam genes que estão funcionalmente relacionados a outros genes mutados (convergência funcional); e 3) alelos mutantes relacionados a genes cuja função descrita (por exemplo, genes relacionados ao estresse) pode explicar o fenótipo adaptativo (uma abordagem dedutiva). Além disso, mutações que resultam em códons de parada ou *frameshifts* também podem ter consequências funcionais e devem ser consideradas, de acordo com o contexto. Como foram sequenciadas as populações, outro aspecto importante para a seleção das mutações foi a frequência mutacional (pelo menos 20%).

4.4.5.4. *Avaliação das mutações*

A análise bioinformática foi conduzida utilizando o InterProScan para identificar e caracterizar as mutações no gene de interesse. Já a rede de interações da proteína foi explorada utilizando a ferramenta String DB, que fornece uma visão detalhada das interações proteicas e permite entender o papel da proteína em redes metabólicas e celulares.

5. Resultados e discussão

5.1. Engenharia metabólica da síntese de ácido láctico

A integração do cassete codificando a D-lactato desidrogenase de *L. mesenteroides* foi feita em dois loci concomitante com a deleção dos genes *JEN1* Δ , e *DLD1* Δ . A integração foi comprovada por meio de PCRs com primers ligantes nas regiões de flanco do cassete e do locus alvo (Figura 6). Os genes que foram submetidos a *knockout*, concomitante com a inserção do nosso cassete, codificam proteínas implicadas no consumo ou recaptção celular do AL.

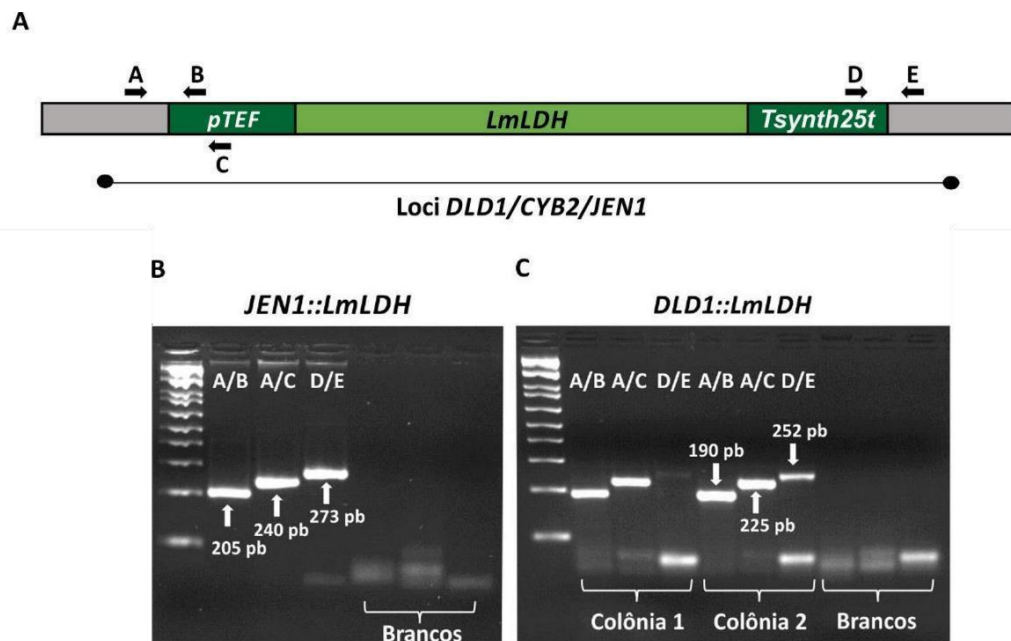


Figura 6: Comprovação por PCR das inserções cromossomais do cassete *pTEF- Lm.LdhA-Tsynth25t* nos genes *JEN1* e *DLD1*. **A:** Esquema geral dos loci *JEN1/DLD1* com relação ao posicionamento dos primers para checagem via PCR da inserção do cassete. **B:** Eletroforese em gel de agarose 2% comprovando a amplificação dos fragmentos de PCR específicos para inserção do cassete no locus do *JEN1* A/B = *JEN1_L1/TEF1pro_r1* A/C = *JEN1_L1/TEF1pro_r2* D/E = *JEN1_R1/LmLDH_fl*; **C:** Amplificação de fragmentos de PCR referentes a inserção no locus *DLD1* A/B = *DLD1_L1/TEFpro_r1* A/C = *DLD_L1/TEFpro_r2* D/E = *DLD_R1/LmLDH_fl*; A primeira canaleta em todos os géis de agarose corresponde ao marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Brancos correspondem a reações de PCR sem DNA para observação de possíveis contaminações da água e dos reagentes de PCR. A combinação de primers dos PCRs Brancos segue respectivamente a ordem dos PCRs positivos nas primeiras canaletas.

A inserção dessas 2 cópias do cassete concomitante a deleção de 2 genes indesejados, utilizando o sistema *CRISPR/Cas9*, nos permitiu o alcance de uma cepa de levedura com potencial extremamente interessante. Tal resultado, também foi comprovado após ensaios fermentativos e quantificação de AL por HPLC, apresentando 0,7 g/L para o progenitor, enquanto que as inserções de uma e duas cópias aumentaram a síntese para 3,96 g/L e 6 g/L.

Quando se aborda a tolerância à célula em um ambiente estressor com AL, o gene *JEN1*, possui um papel interessante contrapondo a geração de ânions a partir do lactato dentro da célula, já que esse gene expressa um importante transportador de ânion-lactato (Pacheco et al. 2012). Porém, com a sua deleção, um outro gene consegue suprir seu papel que é o *ADY2* que codifica um outro transportador de lactato. É interessante observar também que a composição do meio influencia diretamente a expressão e aspectos transcricionais desse gene (Pacheco et al. 2012).

O *DLD1*, por sua vez, codifica a proteína D-lactato desidrogenase localizada na membrana interna da mitocôndria. Ela catalisa a oxidação de D-lactato em piruvato, sendo reprimida por glicose e estimulada na presença de etanol e lactato (Baek et al., 2016). Neste sentido, ao se buscar uma alta produção de AL para fins industriais, esse gene leva a redução na concentração de AL, sendo estrategicamente mais interessante a sua deleção via *CRISPR/Cas9* (Mourier et. al., 2008).

5.2. Evolução adaptativa

Ao realizar a avaliação preliminar de tolerância ao AL nas leveduras para início dos experimentos ALE (Figura 7), nós selecionamos uma concentração de 2,5% de AL para início do protocolo de choques com a população diploides PE-2_H4 (PHZ). Já nos ensaios para a população haploide CEN.PK113-7D a concentração de 2,0% foi mais apropriada para início das atividades, permitindo recuperação das células entre 2-4 dias.

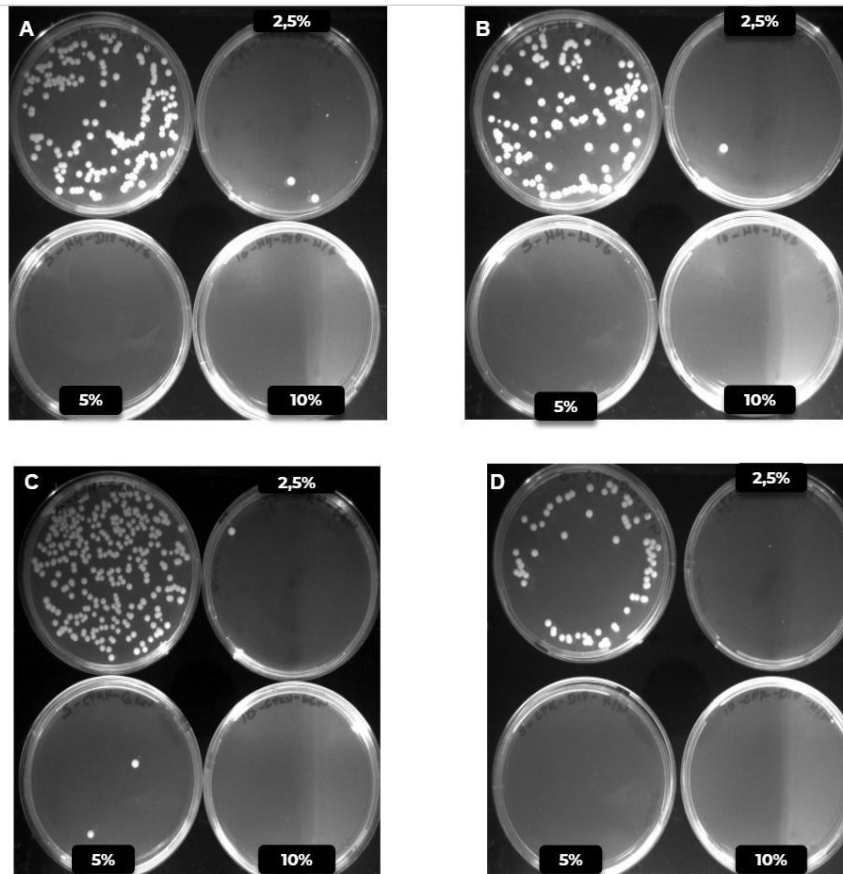


Figura 7: Teste piloto para a determinação da concentração inicial de AL para início dos experimentos de adaptação evolutiva por choques. As diferentes linhagens progenitoras de *S. cerevisiae* sofreram choques de duas horas de AL nas concentrações de 0%, 2,5%, 5% e 10%, sendo colocadas uma diluição $1:10^5$ para recuperação em meio sólido YPS 2%. **A:** resultados referentes aos choques do progenitor PE-2 H4 diploide; **B:** resultados referentes a linhagem haploide PE-2_H4; **C:** Resultados referentes aos choques em diploides da CEN.PK113-7D; **D:** resultados referentes aos choques em parentais haploides CEN.PK113-7D.

A partir dessas concentrações foram realizados os experimentos de evolução adaptativa. A população diploide da linhagem *S. cerevisiae* PE-2_H4 (PHZ) ao final do experimento passou por até 54 choques de AL, alcançando uma tolerância de choques de até 10% ácido láctico (Figura 8). As outras três populações haploides CEN.PK113-7D (PGEN, PNAT e PHYG) passaram por até 75 choques, chegando a tolerar choques de até 15% de AL (Figura 8). Nesse sentido, foram realizadas análises dos resultados dos sequenciamentos genômicos de todas essas 4 populações evoluídas.

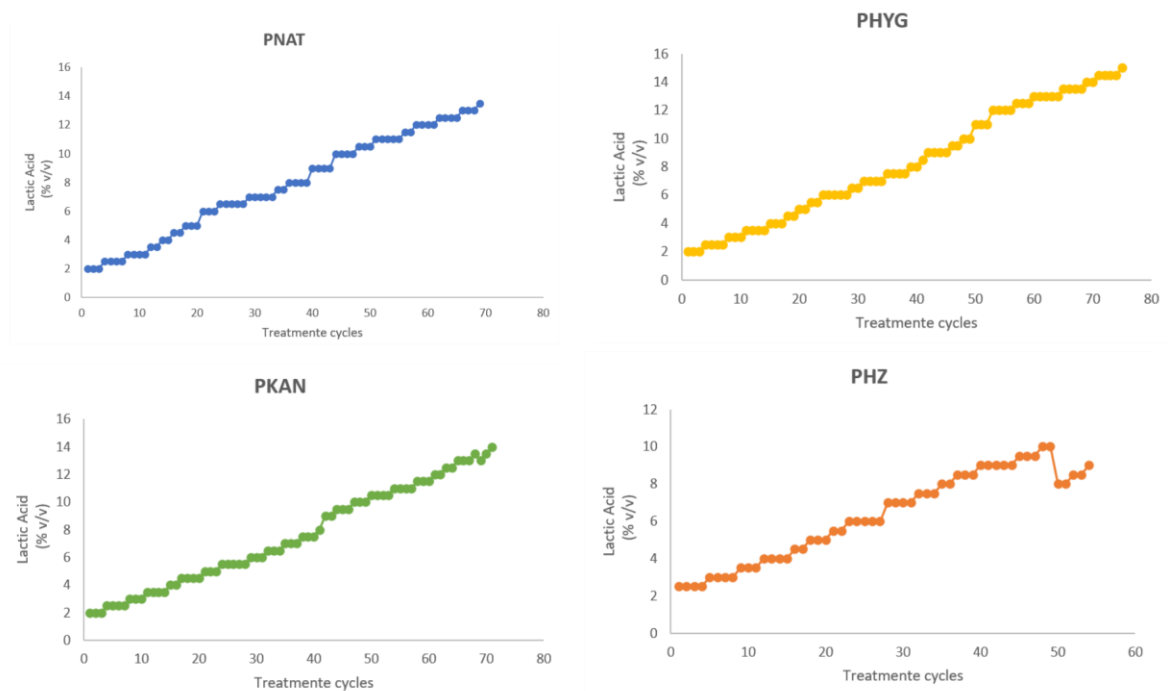


Figura 8: Experimento evolução por choques de AL com as populações CEN.PK113-7D e PE-2. O gráfico exibe o aumento gradual da concentração de AL em função do número de ciclos de tratamentos/recuperações. Na cor azul é representada a linhagem da população de CEN.PK113-7D com marcador de natMX, em vermelho o hygMX, em verde o kanMX e em roxo a linhagem PE-2 hygMX/zeoMX. As populações finais foram submetidas a sequenciamento genômico.

5.3. Ensaios Fenotípicos

Com relação ao protocolo haploide com a CEN.PK113-7D, foi iniciado o processo de fenotipagem das linhagens que estão passando pela evolução por choques de AL. Um ensaio de viabilidade celular foi realizado no nosso laboratório baseado no monitoramento por citômetro de fluxo da permeabilidade celular ao fluoróforo iodeto de propídio (propidium iodide, PI). A Figura 9 mostra os resultados da população CEN.PK113-7D haploide com marca de hphMX evoluída até a concentração de 6% de AL após 23 choques. Esta foi comparada ao progenitor. Esse fluoróforo somente permeia células mortas, ou com dano de membrana, e quando intercalado ao DNA fluoresce na faixa de 617 nm (coloração vermelha alaranjada), permitindo a detecção pelo citômetro de fluxo. Por outro lado, células vivas intactas não absorvem o PI e não são fluorescentes. Essas propriedades possibilitam a contagem diferenciada de células vivas (não fluorescentes) ou mortas (fluorescentes) (Davey e Hexley 2011). Porém, optamos por não continuar com os estudos de viabilidade celular

pelo fluoróforo se ligar não só a células mortas, mas também as células danificadas o que impossibilita a quantificação exata de células mortas.

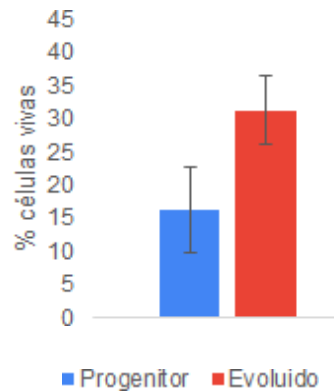


Figura 9: Gráfico de resultados parciais de viabilidade da população de CEN.PK113-7D (PHYG). Esta população avaliada quanto a viabilidade quando tolerava a concentração de 6% de AL e é comparada com a linhagem progenitora. Foram contabilizadas em triplicata, via citometria de fluxo, a percentagem de células PI-negativas, denotando sobrevivência celular.

Com os resultados das competições por citometria de fluxo, foi possível a aferição de diversas informações interessantes. A partir dos resultados apresentados, pode-se observar que as linhagens haploides de CEN.PK113-7D (evoluídas em choques de AL) quando colocadas para competir nas mesmas condições de choques de AL e recuperações apresentaram resultados de grande adaptação ao AL (S elevado) com relação ao respectivo progenitor (Figura 10). Já quando colocados em condições de competição de crescimento em meio líquido (sem choques) eles apresentam um *fitness* menor ou igual aos seus respectivos progenitores (Figura 11), sugerindo uma condição comum em experimentos de evolução que é chamada de *trade-off*, em que uma linhagem evoluída em um ambiente ou condição de estresse, perde a desenvoltura de propagação em meio rico e sem estresse (Menegon, et al. 2022).

Ao se avaliar a linhagem evoluída diploide de PE-2_H4 que também foi submetida a tratamentos de AL, quando posta para competir em condições de choque ela apresentou S 10 vezes superior ao seu respectivo progenitor. Nota-se, também, um desempenho relevante quanto esta linhagem é posta para competir na presença constante de AL (Figura 12).

Possivelmente as células diploides foram capazes de conduzir a uma seleção melhor de mutações relacionadas com tolerância ao AL.

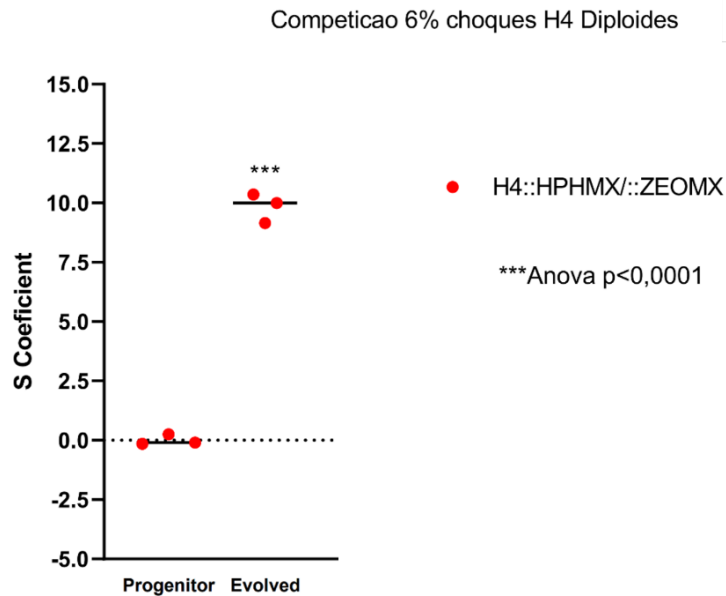


Figura 10: Gráficos de comparação do *fitness* da população evoluída PHZ de PE-2_H4 versus o progenitor. Após mistura 1:1 progenitor/evoluído, choques de 6% de AL foram aplicados por 2h. Subsequentemente, foi feita a recuperação em meio YPS 2% por 2-3 dias até a fase estacionária. Ao final, a quantificação (citômetro de fluxo) de células expressando GFP (parental) e não expressando a fluorescência (linhagem evoluída) permitiu a quantificação (expressa no eixo Y como um coeficiente de seleção, S) de quanto a população evoluída tinha mais células como resultado de uma maior tolerância ao choque de 6% AL. A medida para o progenitor é normalizada como S=0, enquanto para o evoluído é positiva, indicando *fitness* maior para tolerância aos choques de 6% AL. Os círculos vermelhos representam a população PHZ. Os resultados tem robustez estatística autenticada por testes ANOVA de uma via $p<0,0001$ e pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas sendo a diferença entre populações evoluídas e parentais com $p<0,0001$.

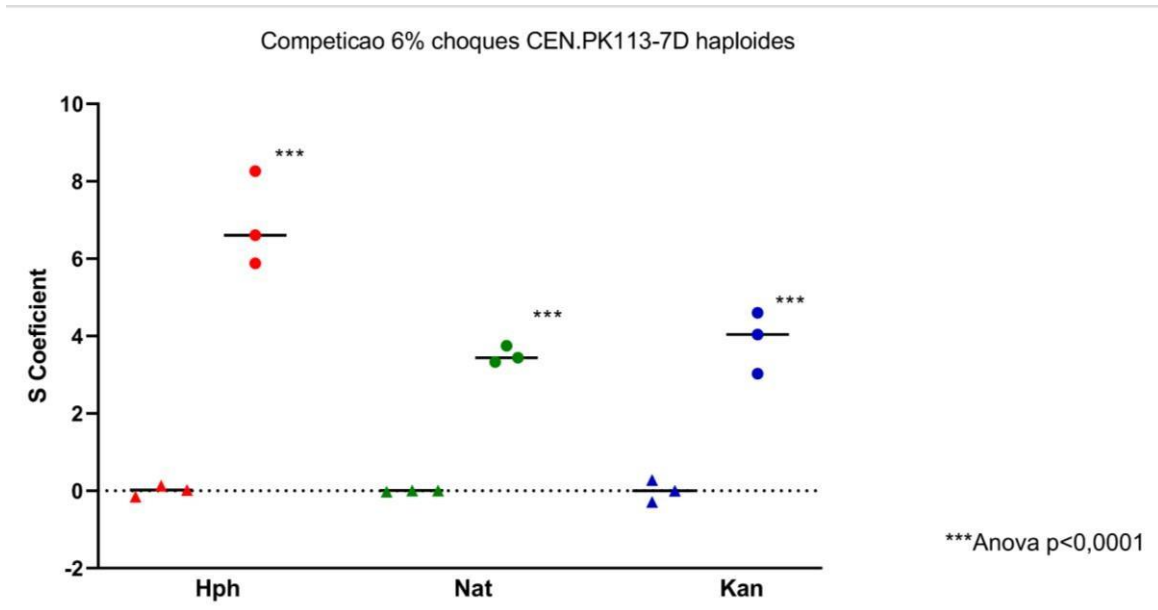


Figura 11: Gráficos de comparação do fitness das populações evoluídas de CEN.PK113-7D. Testes de competição como descrito na legenda da Figura 4. Os círculos vermelhos representam a população PHYG (Hph), as verdes representam a população PNAT (Nat), e as azuis PGEN (Kan). O S=0 de cada respectivo progenitor aparece na coluna da esquerda, seguida da medida (sempre positiva) a direita para a população evoluída.

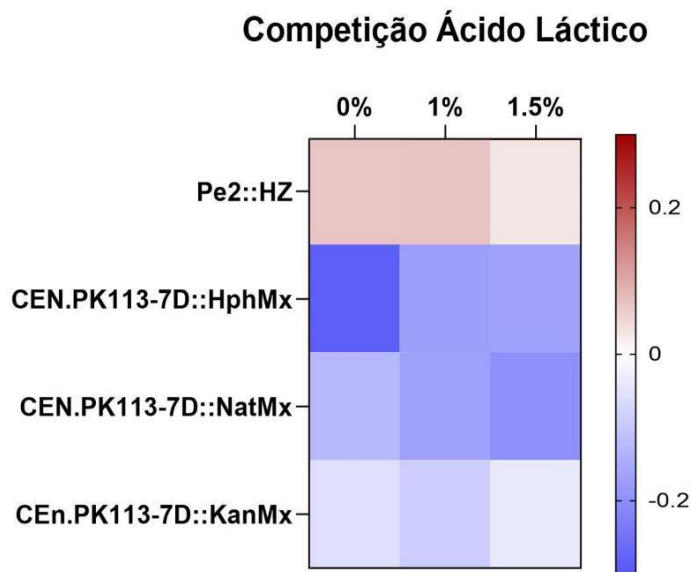


Figura 12: Heatmap do fitness (Coeficiente S por duplicação celular) das populações evoluídas de CEN.PK113-7D e PE-2_H4 em crescimento celular em YPS 2% e adição de 0%, 1% e 1,5% de AL. Neste experimento as competições com os parentais versus evoluídos foram feitas em um ciclo de crescimento em meio líquido com inoculação de 10^8 células de uma mistura 1:1 (progenitor/evoluído). O crescimento se estende até a fase estacionária, quando a proporção do número de células dos competidores é medida no citômetro de fluxo. Isso permite o cálculo de S por geração para as populações evoluídas. Em

vermelho o S é positivo, indicando que as populações evoluídas ganharam a competição. Em azul o S é negativo, indicando que o parental GFP cresce mais rápido. Note que as populações evoluídas CEN.PK113-7D todas elas têm um *fitness* pior (S com valor negativo) que o parental, enquanto que a populações derivada de PE-2_H4 tem *fitness* positivo e tolera o crescimento em AL bem melhor do que o respectivo parental.

5.4. Ensaios de crescimento em microplaca - TECAN: população evoluída CEN.PK113-7D Haploide

Foi realizado um ensaio de crescimento das células em AL das populações evoluídas de CEN.PK113-7D Haploide derivadas dos experimentos com choques de AL. É possível observar com esses resultados que as populações haploides de CEN.PK113-7D possuem um T_{mid} maior que suas populações progenitoras. Resultado que corrobora com as observações feitas nas competições dessas populações em crescimento contínuo (Figura 13). O interessante aqui reside no fato de que esses dados corroboram com as competições feitas dessas populações em meio com quantidades crescentes de AL. O que evidencia a especificidade da evolução dessas populações para o reparo a grandes concentrações de AL e não ao seu crescimento em presença constante desse composto.

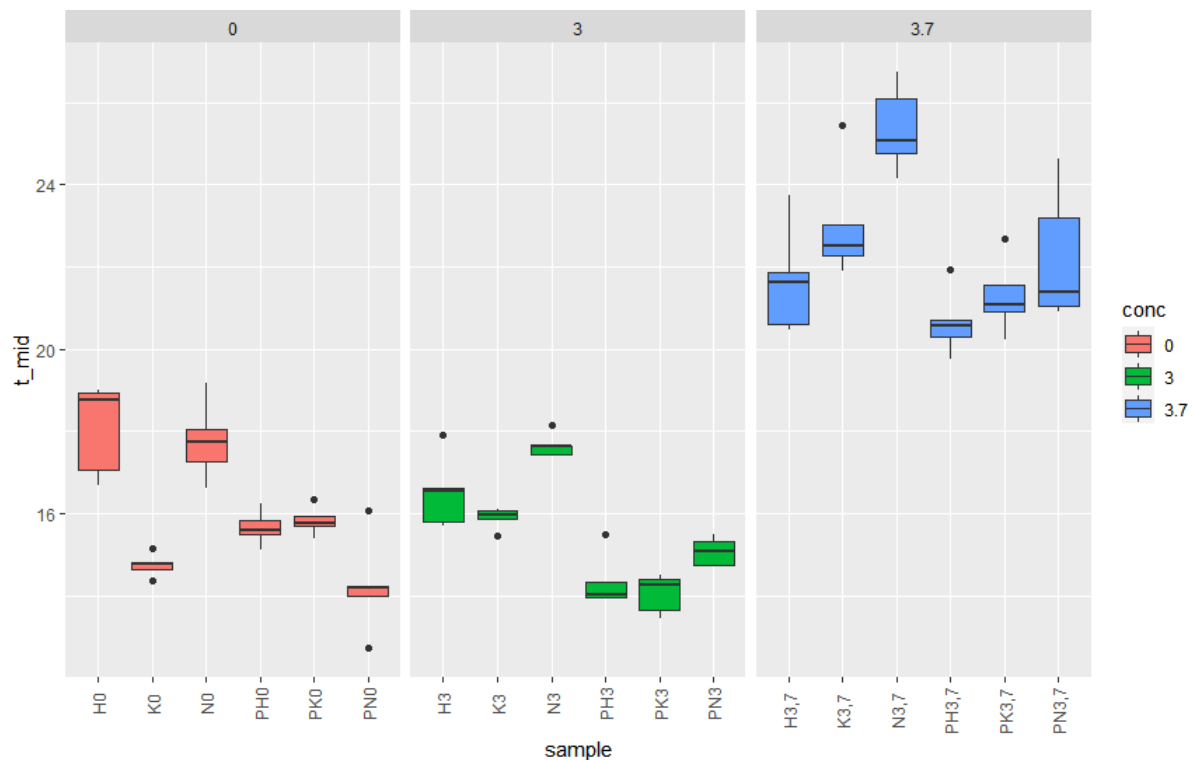


Figura 13: Gráfico T_{mid} (hs). Gráfico apresenta valores de T_{mid} para crescimento em 0% (vermelho), 3% (verde) e 3,75% (azul) de AL para populações evoluídas PHYG (H), PGEN (K) e PNAT (N) e as respectivas populações progenitoras (PH, PK E PN), representando as

marcas de antibióticos G, geneticina; H, higromicina e N, nourseotricina introduzidos na linhagem CEN.PK113-7D evoluídas com choques de AL versus populações progenitoras. Teste estatístico ANOVA de uma via $p < 0,0001$ e pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas sendo a diferença entre populações evoluídas e parentais com $p < 0,0001$.

É possível observar com esses resultados que as populações haploides de CEN.PK113-7D possuem um Tmid maior que suas populações progenitoras. Resultado que corrobora com as observações feitas nas competições dessas populações em crescimento contínuo (Figura 13).

5.4. Bioinformática

Foram sequenciadas 4 populações evoluídas, sendo 3 populações de CEN.PK113-7D haploides (PHYG, PGEN e PNAT) derivadas dos experimentos com choques de AL e uma população H4-PE-2 diploide (PHZ) proveniente do mesmo experimento.

Como resultado, identificamos mais de 261 SNPs (nas três populações), incluindo mutações sinônimas, mutações de sentido trocado, mutações sem sentido e em alguns casos, ocasionando *frameshift*. É importante frisar que a população evoluída PNAT apresentou 224 mutações. Esse número elevado é compatível com a ideia de que essa população PNAT é um *hypermutator* (Galeota-Sprung, et al. 2020). Esta população apresenta alterações em 5 genes relacionados com reparação de DNA, sendo que o gene *PMS1* (responsável por Proteína de ligação ATP necessária para reparo de DNA) presente em 100% da população. A perda da capacidade de reparo de DNA gera muitas mutações aleatórias (Galeota-Sprung, et al. 2020), portanto, muitos alelos observados nesta linhagem não têm relação direta com tolerância ao AL.

Para ilustrarmos e melhorar o entendimento das mutações nas quatro populações, utilizamos o diagrama de Venn, onde espaços internos comuns a dois ou mais conjuntos representam a sua interseção, ao passo que a totalidade dos espaços pertencentes a um ou outro conjunto indistintamente representa sua união (Figura 14).

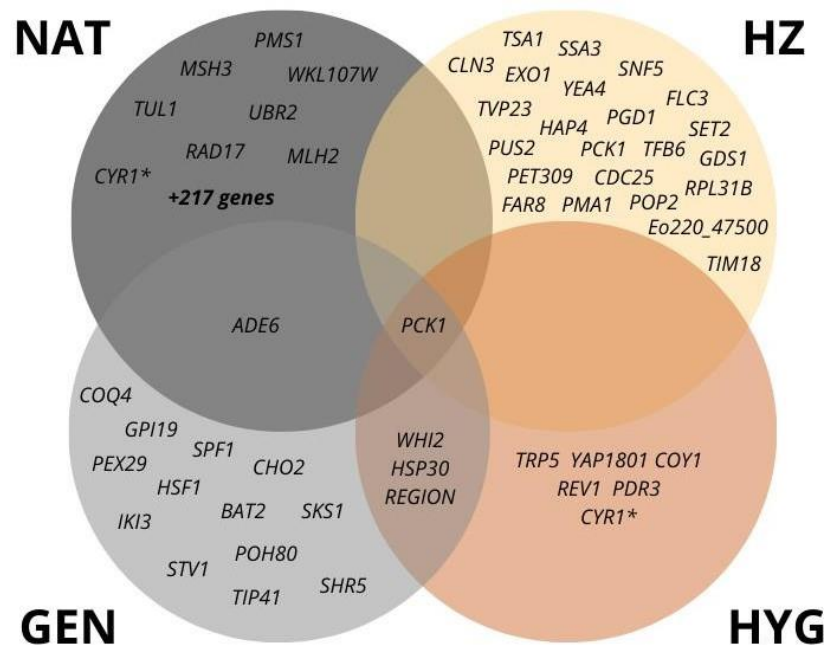


Figura 14: Diagrama de Venn. São mostrados os genes com mutações das quatro populações que passaram pelos protocolos de evolução adaptativa e consequente sequenciamento.

Frequência	Genes com mutações
41,89	<i>CLN3</i>
100	<i>SSA3</i>
42,5	<i>SNF5</i>
100	<i>Pode ser promotor do TVP23</i>
42,42	<i>YEA4</i>
47,31	<i>FLC3</i>
49,03	<i>PUS2</i>
50,94	<i>PGD1</i>
100	<i>PMA1</i>
46,78	<i>SET2</i>
55,4	<i>HAP4</i>
100	<i>PCK1</i>
52,45	<i>PET309</i>
100	<i>CDC25</i>
100	<i>Pode ser promotor RPL31B</i>
51,83	<i>TSA1</i>
46,95	<i>FAR8</i>
43,18	<i>POP2</i>
47,4	<i>Promotor EO220_47500</i>
51,16	<i>EXO1</i>
100	<i>Pode ser promotor TIM18</i>
77,33	<i>TFB6</i>
76,54	<i>GDS1</i>

Tabela 2: Frequência dos alelos mutados na população evoluída e genes afetados pelas mutações encontradas na população de PE-2_H4 (PHZ).

As mutações observadas podem ser agrupadas em 3 diferentes grupos. Aquelas relacionadas com vias de biossíntese, genes relacionados com produção de energia e transporte celular e por fim as mutações que atuam na reparação de DNA. A Tabela 3 mostra os genes, as mutações e alterações nas proteínas resultantes.

Gene	População	Grupo	Aminoácido original	Novo aminoácido	Classificação do Aminoácido
<u><i>CKI</i></u>	PGEN	Via de biossíntese	Asparagina	Ácido Aspártico	Cadeia lateral polar para Aminoácido ácido
<u><i>CKI</i></u>	PHYG	Via de biossíntese	Triptofano	Cisteína	Cadeia lateral apolar para polar não carregada

<u>CK1</u>	PNAT	Via de biossíntese	Treonina	Deleção	Deleção de aminoácido de cadeia lateral polar
<u>CK1</u>	PHZ	Via de biossíntese	Glicina	Deleção	Deleção de aminoácido de cadeia lateral apolar
<u>OO4</u>	PGEN	Via de biossíntese	Glicina	Ácido Aspártico	Cadeia lateral polar não carregada para um aminoácido cadeia lateral com grupo ácido
<u>EX29</u>	PGEN	Via de biossíntese	Serina	Treonina	Mesma função
<u>EV1</u>	PHYG	Reparo de DNA	Valina	Isoleucina	Cadeia lateral apolar para hidrofóbico
<u>MS1</u>	PNAT	Reparo de DNA	Serina	Prolina	Cadeia lateral polar para cadeia lateral apolar
<u>RY1</u>	PHYG	Reparo de DNA	Leucina	Histidina	Cadeia lateral apolar em básica
<u>SP30</u>	PHYG e PGEN	Energia	-----	-----	-----
<u>RS31</u>	PGEN	Energia	Treonina	Prolina	Cadeia lateral Polar para cadeia apolar
<u>TV1</u>	PGEN	Energia	Treonina	Serina	Mesma função
<u>DR3</u>	PHYG e PGEN	Energia	-----	-----	-----
<u>SA3</u>	PHZ	Energia	Asparagina	Isoleucina	Cadeia lateral polar em apolar
<u>MA1</u>	PHZ	Energia	Ácido aspártico	Asparagina	Cadeia lateral ácida em apolar
<u>DC25</u>	PHZ	Energia	Tirosina	Asparagina	Cadeia lateral ácida em apolar
<u>WHI2</u>	PHYG	Ciclo celular	Cisteína	Tirosina	Mesma função
<u>HI2</u>	PGEN	Ciclo celular	Arginina	Cisteína	Cadeia lateral básica para polar
<u>AP4</u>	PHZ	Energia	Prolina	Serina	Cadeia lateral apolar em polar

Tabela 3: Lista das principais mutações e suas respectivas alterações à nível de aminoácido.

Abaixo discutimos caso a caso sobre as possíveis funções dos genes afetados no experimento de evolução adaptativa ao AL.

PCK1:

Esse gene é responsável pela codificação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, uma enzima chave na gliconeogênese (Yuan, et al. 2020). Ela catalisa a reação precoce na biossíntese de carboidratos, reprime a transcrição e acelera a degradação do mRNA, sendo regulado por Mcm1p e Cat8p, localizado no citosol. Foram observadas mutações nesse gene em todas as 4 populações evoluídas, na Tabela 3 é possível observar as mudanças oriundas das mutações à nível da mudança de aminoácido em cada uma das populações.

É importante frisar que em análise feita pelo InterProScan (Figura 15), se observa que as 4 mutações aconteceram na região do aminoácido 93 até o 257, ou seja, todas à nível do domínio 1 do gene, região da fosfoenolpiruvato carboxiquinase e no domínio N- carboxiquinase N-terminal. Na Figura 16 é possível observar a rede de interações dessa proteína pelo String DB.

A proteína Pck1p possui alta homologia com as proteínas Pck1 dependentes de ATP em outras espécies, especialmente com a Pck1 de *Candida albicans* (70% de homologia), mas não com as proteínas Pck1 dependentes de GTP (LEUKER et. al, 2001, VALDÉS-HEVIA, 1989). É importante frisar que todas as etapas da gliconeogênese envolvem enzimas que são compartilhadas pela via glicolítica, exceto aquelas catalisadas pela frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase) e pela fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK).

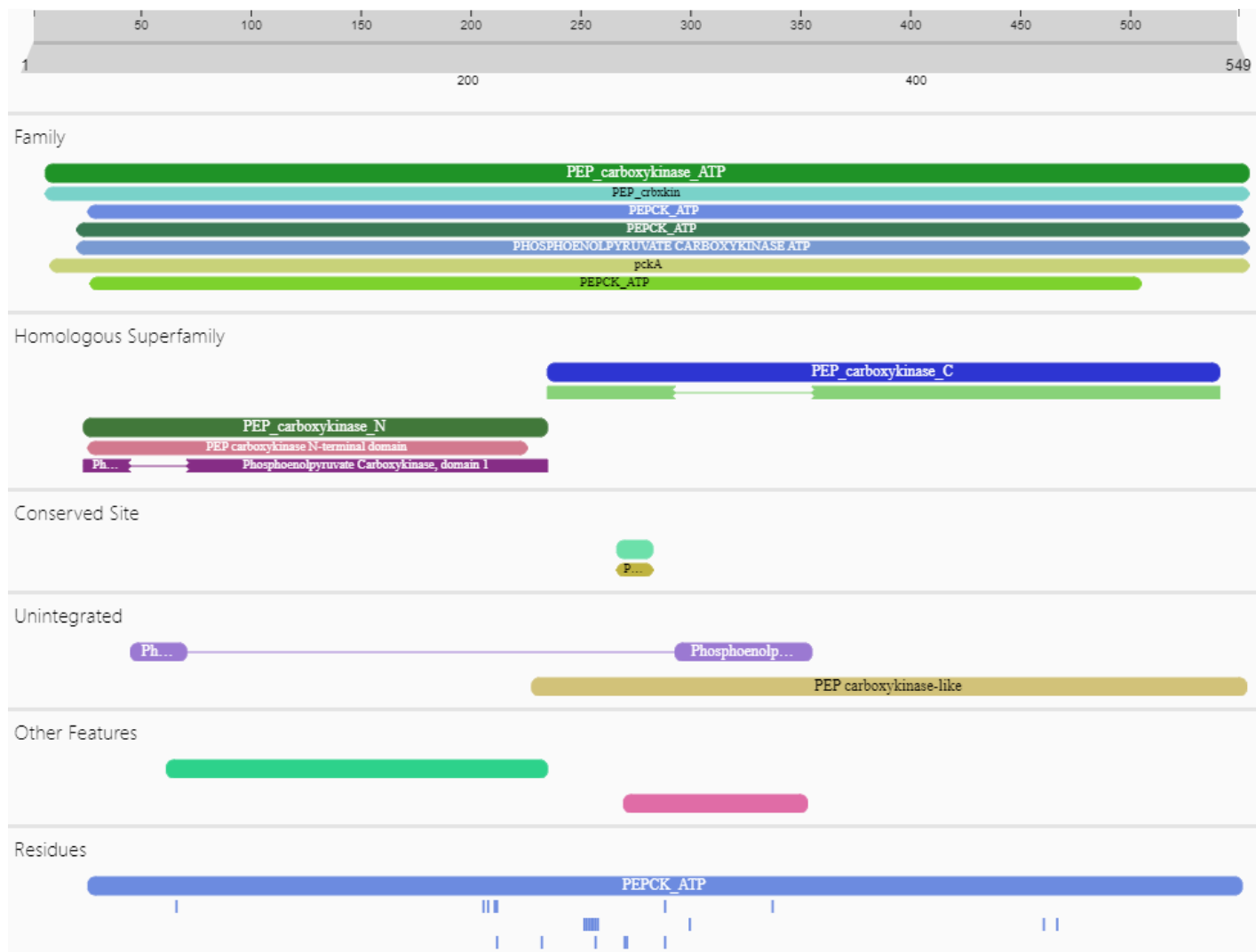


Figura 15: Estruturação de regiões da proteína do PCK1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

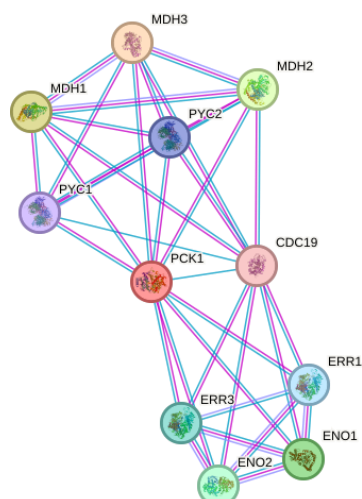


Figura 16: Interações proteína-proteína da Pck1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

COQ4:

O gene *COQ4* codifica um componente da via biossintética da ubiquinona (coenzima Q). Possivelmente seu produto atua na estabilização da Coq7p, localizada na face da matriz da membrana interna mitocondrial, sendo componente de um complexo mitocondrial de síntese de ubiquinona (BELOGRUDOV et al, 2001).

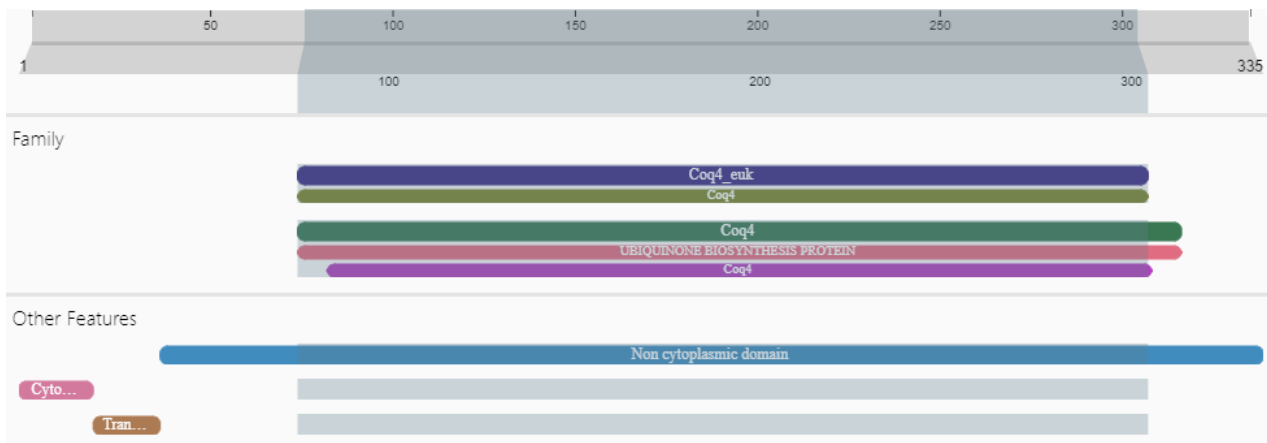


Figura 17: Estruturação de regiões da proteína Coq4p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

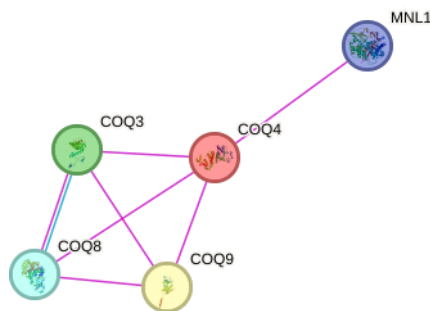


Figura 18: Interações proteína-proteína da Coq4p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

A coenzima Q10 (simbolizada como Q) é uma benzoquinona prenilada que atua na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias em eucariotos e das membranas plasmáticas

em procariotos (Belogradov, Grigory I., et al., 2001). Esse componente realiza essa função por meio de ciclos de redução (para formar QH₂) e oxidação (para formar Q). Essa mesma química redox permite que Q funcione como um potente antioxidante, no qual tem a capacidade de eliminar diretamente os radicais peróxil lipídicos de maneira análoga à vitamina E ou de agir em conjunto com o α -tocoferol reduzindo os radicais α -tocoferoxil (Belogradov, Grigory I., et al., 2001). Recentemente, Q foi identificado como um componente lipídico essencial envolvido na atividade de bombeamento de prótons das proteínas desacopladoras UCP-1, -2 e -3. As mutações na proteína de Coq4p aconteceram na região do aminoácido 246, dentro do domínio não citoplasmático da proteína, o que pode sugerir uma mutação importante na ação enzimática. Já no que tange interação com outras proteínas, a Cop4p possui interações confiáveis com a Coq3p, Coq8p e Coq9p, além do Mnl1p.

PEX29:

A proteína residente no retículo endoplasmático (RE) desempenha um papel crucial na biogênese dos peroxissomos, sendo responsável pela associação entre o RE e os peroxissomos. Esta proteína interage com várias proteínas, incluindo Pex30p, Pex31p, Pex32p, e reticulons como Rtn1p e Yop1p, com a função de regular a biogênese peroxissomal a partir do RE (Kaufmann et al., 2007; Schrader & Bornemann, 2007). A proteína atua no fluxo vesicular direcionado aos peroxissomos, influenciando o transporte de proteínas e lipídios necessários para a formação e manutenção dessa organela (Thompson et al., 2016). Adicionalmente, ela regula parâmetros essenciais como o tamanho, número e distribuição dos peroxissomos dentro da célula (Mano et al., 2006).

A Pex28p e a Pex29p, que também estão localizadas no RE, podem atuar em etapas anteriores àquelas mediadas pelas proteínas Pex30p, Pex31p e Pex32p, desempenhando um papel inicial no processo de biogênese peroxissomal (Matsumoto et al., 2007). Após estresse de replicação do DNA, essa proteína forma focos no RE, sugerindo uma possível resposta a danos no DNA ou alterações no fluxo de proteínas entre o RE e os peroxissomos (Chang et al., 2010).

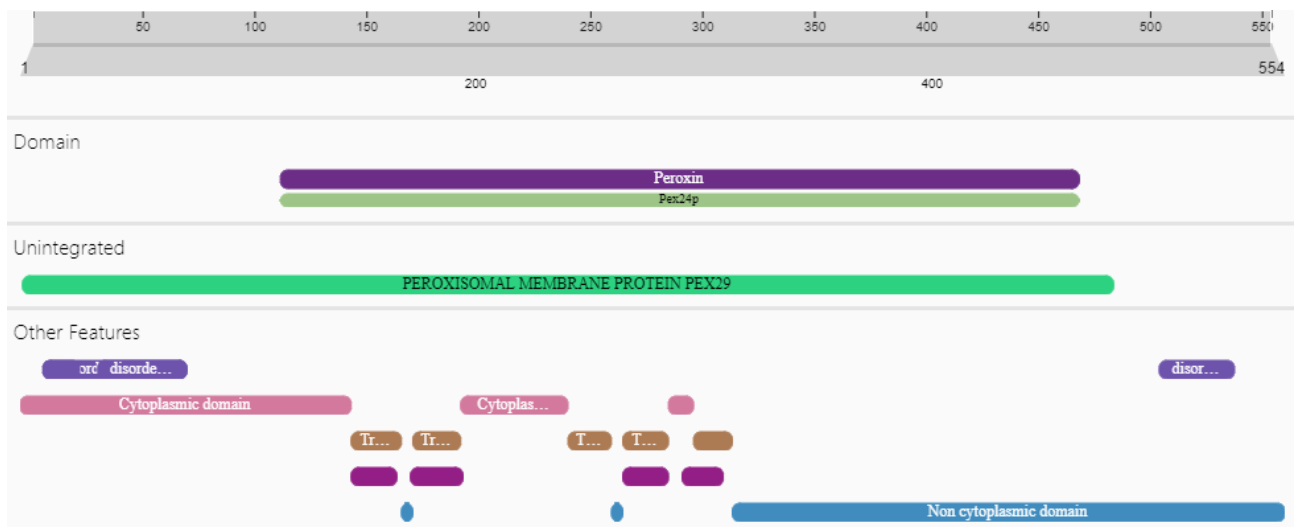


Figura 19: Estruturação de regiões da proteína do Pex29p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

Os peroxissomos são organelas altamente responsivas, com variações significativas em seu tamanho, número, composição proteica e funções bioquímicas, dependendo do organismo, do tipo celular e do ambiente (Vizeacoumar et al., 2004). A montagem, divisão e herança dos peroxissomos são controladas por pelo menos 29 proteínas denominadas peroxinas, codificadas pelos genes *PEX*. Mutações em 12 desses genes estão associadas a distúrbios na biogênese dos peroxissomos (Vizeacoumar et al., 2004).

As proteínas peroxissomais são exclusivamente codificadas por genes nucleares, sintetizadas em polissomos citosólicos e direcionadas pós-traducionalmente para os peroxissomos. Esse processo ocorre por meio de sinais específicos de direcionamento de peroxissomo (PTSs), que são reconhecidos por seus receptores cognatos no citosol, responsáveis pelo direcionamento e acoplamento das proteínas à membrana peroxissomal. A maioria das proteínas da matriz peroxissomal é direcionada pelo PTS1, um tripeptídeo carboxil-terminal, com seu receptor de transporte, a peroxina Pex5p. De maneira surpreendente, a Pex5p entra na matriz do peroxissomo junto com sua carga e recircula de volta ao citosol após a dissociação da carga (Mast et al., 2016). Algumas proteínas da matriz são identificadas pelo PTS2, um nonapeptídeo amino-terminal, e seu receptor de transporte citosólico, Pex7p. Um número limitado de proteínas da matriz é direcionado por PTSs internos, cuja maioria ainda não foi caracterizada. A classificação das proteínas da membrana peroxissomal é menos compreendida, parecendo ser independente da importação das

proteínas da matriz (Vizeacoumar et al., 2004). A forma citosólica da peroxina Pex19p pode atuar como um receptor de transporte para as proteínas da membrana peroxissomal, enquanto sua forma associada ao peroxissomo pode funcionar como uma chaperona, auxiliando na montagem de complexos multiméricos após sua ligação à membrana do peroxissomo (Mast et al., 2016).

A mutação observada em nossos experimentos ocorre na região do domínio não citoplasmático da proteína, especificamente no aminoácido 507 (Figura 19). Vale ressaltar que a proteína Pex29p interage com diversas outras proteínas Pex e vias adjacentes (Figura 20).

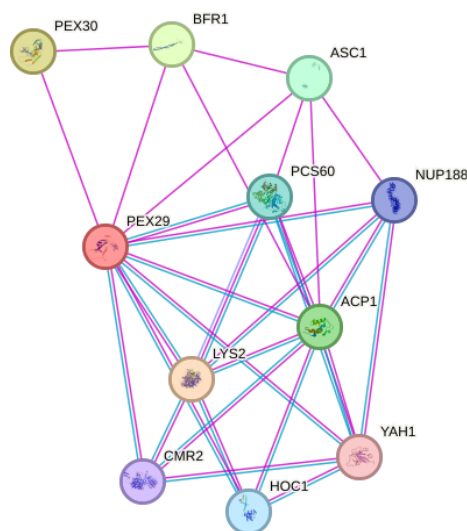


Figura 20: Interações proteína-proteína da Pex29p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

REV1:

A proteína de reparo do DNA Rev1p é uma desoxicitidil transferase envolvida no reparo de locais abásicos e guaninas aduzidas em DNA danificado, mediado pela síntese de translesão (TLS). Rev1p é capaz de formar um complexo com as subunidades da DNA polimerase zeta, Rev3p e Rev7p, e realocaliza-se do núcleo para o citoplasma após estresse de replicação do DNA. Além disso, a proteína pode desempenhar um papel importante durante a meiose (Makarova et al., 2006; Zhang et al., 2000).

A proteína Rev1p é altamente conservada entre organismos e é reconhecida principalmente por sua função na replicação do DNA e em atividades mutagênicas (Collins et

al., 2007). O gene Rev1p em *S. cerevisiae* é essencial para a indução normal de mutações por agentes físicos e químicos (Larimer et al., 1989). A alteração de aminoácido observada nesta proteína ocorreu especificamente na região do aminoácido 89, e as interações proteína- proteína do Rev1p estão ilustradas na Figura 22. Vale ressaltar que os experimentos de evolução adaptativa ao ácido láctico não apenas induziram mutações em genes relacionados ao estresse por esse ácido fraco, mas também envolveram genes associados ao reparo de DNA, evidenciando uma conexão entre o estresse ambiental e a manutenção da integridade genômica (Makarova et al., 2006).

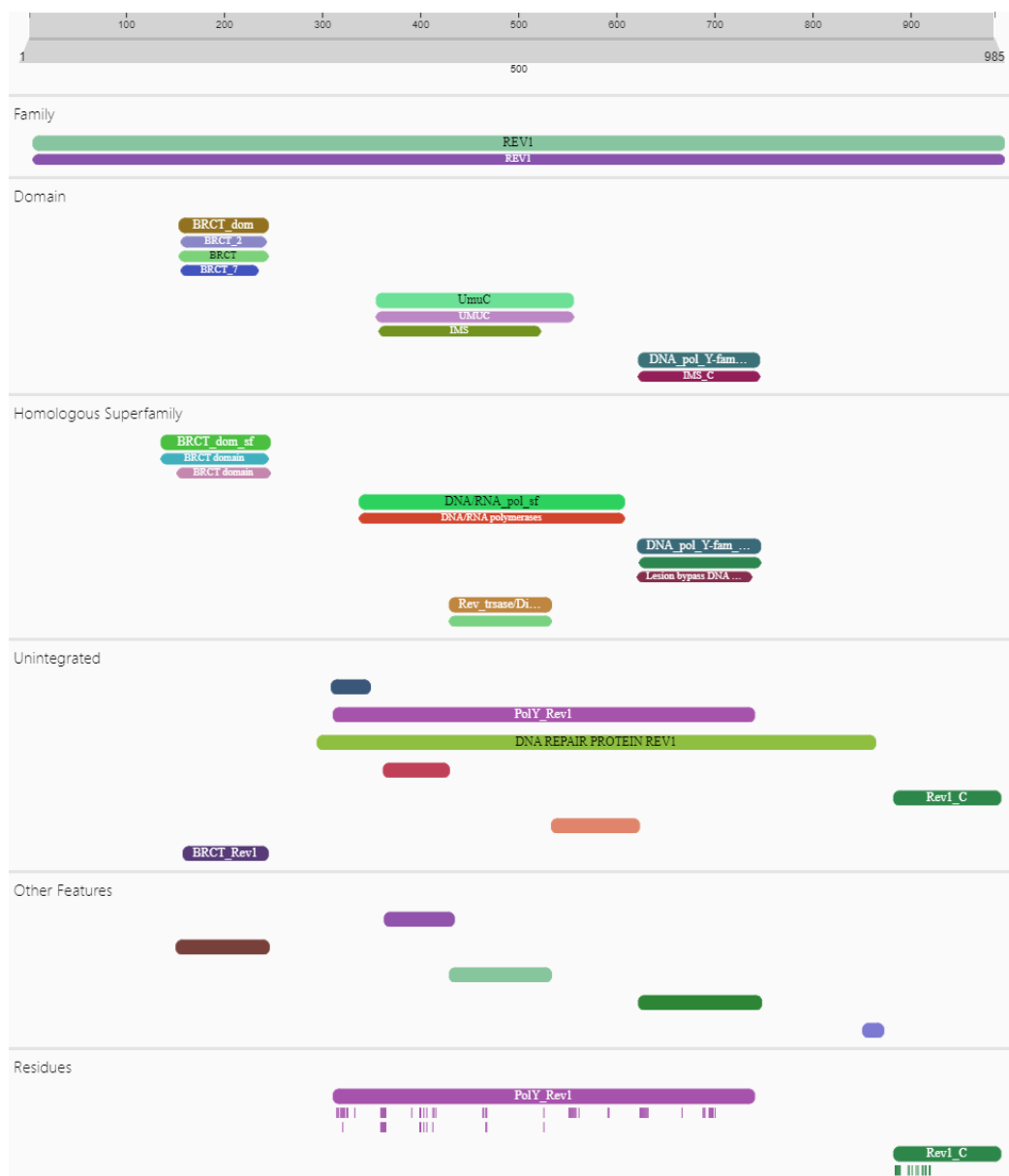


Figura 21: Estruturação de regiões da proteína do Rev1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

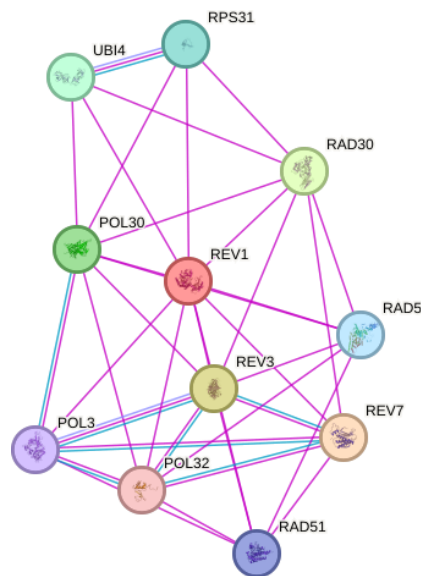


Figura 22: Interações proteína-proteína de Rev1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

PMS1:

A proteína Pms1p é uma proteína de ligação a ATP necessária para o reparo de incompatibilidade de DNA e desempenha um papel crucial tanto na mitose quanto na meiose. Ela atua como um heterodímero com a proteína Mlh1p, formando um complexo essencial para a manutenção da integridade genômica durante a replicação e divisão celular (Tishkoff et al., 1997). A Pms1p liga-se ao DNA de fita dupla e simples por meio de seu domínio N- terminal, facilitando o reparo de erros nas fitas de DNA e assegurando a fidelidade da replicação e recombinação (Iyer et al., 2013).

Além de sua função no reparo de incompatibilidade de DNA, a Pms1p é necessária para o silenciamento nos loci do tipo *mating type* e telômeros em *S. cerevisiae* (Zhang et al., 2001). O gene *PMS1* em *S. cerevisiae* é implicado especificamente no reparo de incompatibilidade de DNA em células de levedura, destacando sua importância na prevenção de mutações e na manutenção da estabilidade cromossômica, especialmente em contextos genômicos complexos como os telômeros e loci de *mating type* silenciados (Tishkoff et al., 1997).

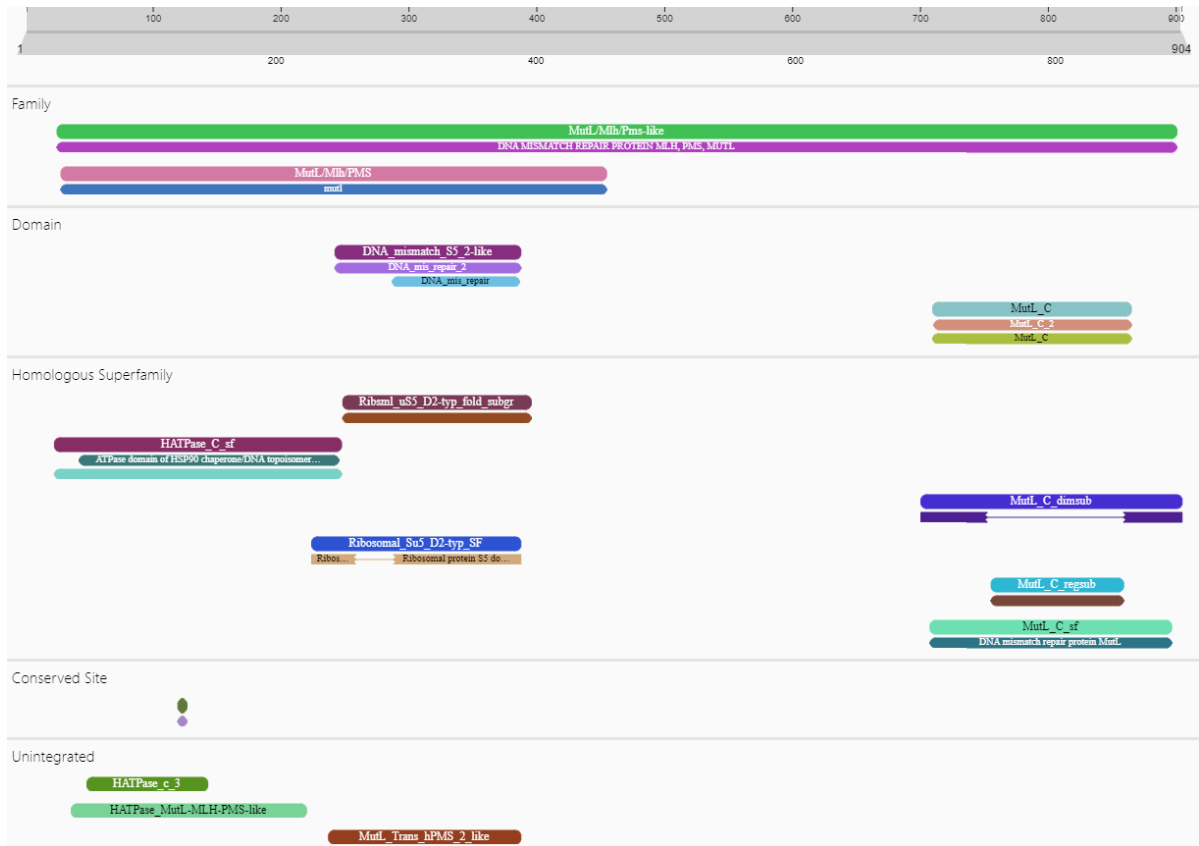


Figura 23: Estruturação de regiões da proteína do Pms1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

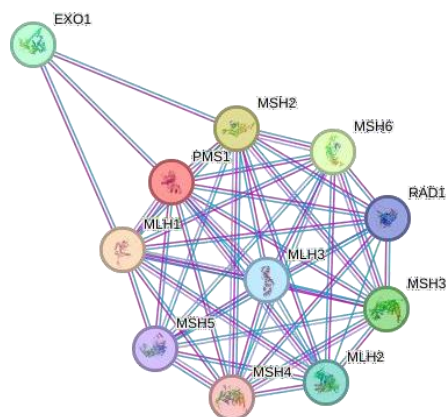


Figura 24: Interações proteína-proteína de Pms1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

CYR1:

Mutações no gene relacionado à adenilato ciclase foram identificadas em duas das populações haploides evoluídas. Esse gene é essencial para a produção de AMP cíclico (cAMP), um mensageiro intracelular fundamental para a sinalização da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), que regula uma ampla gama de processos celulares. Além disso, o gene atua como uma proteína *scaffold*, facilitando a interação com o complexo Ras2-Ira (Colombo et al., 2014).

A via de sinalização mediada por cAMP desempenha um papel central na regulação de diversos processos celulares, incluindo metabolismo celular, progressão do ciclo celular, resposta ao estresse, entrada e manutenção da fase estacionária, e esporulação. Esses processos são cruciais para a adaptação e sobrevivência celular em ambientes dinâmicos, destacando a importância desse gene na fisiologia celular. As mutações observadas podem refletir adaptações específicas ao ambiente seletivo no qual as populações evoluíram, sugerindo que a evolução dessas populações pode estar vinculada à modulação dessas vias de sinalização para otimizar a resposta a condições ambientais adversas (Colombo et al., 2014).

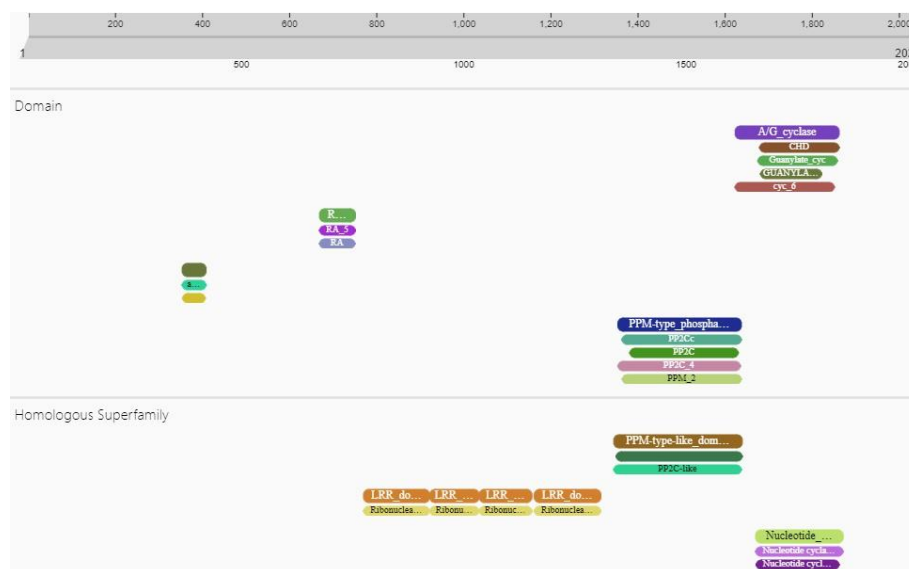


Figura 25: Estruturação de regiões da proteína do Cyr1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

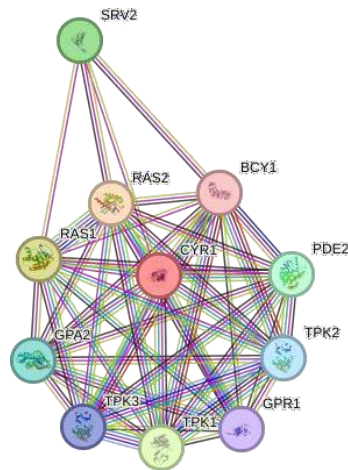


Figura 26: Interações proteína-proteína de Cyr1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

HSP30:

Em 100% das populações submetidas aos marcadores de geneticina e higromicina, foi identificada a duplicação da região do gene *HSP30*. Esse gene desempenha um papel fundamental nas respostas celulares ao estresse térmico, promovendo termotolerância através da desregulação da atividade da Pma1p. Essa desregulação resulta na economia de ATP durante situações de estresse, permitindo que a célula se adapte melhor a condições adversas,

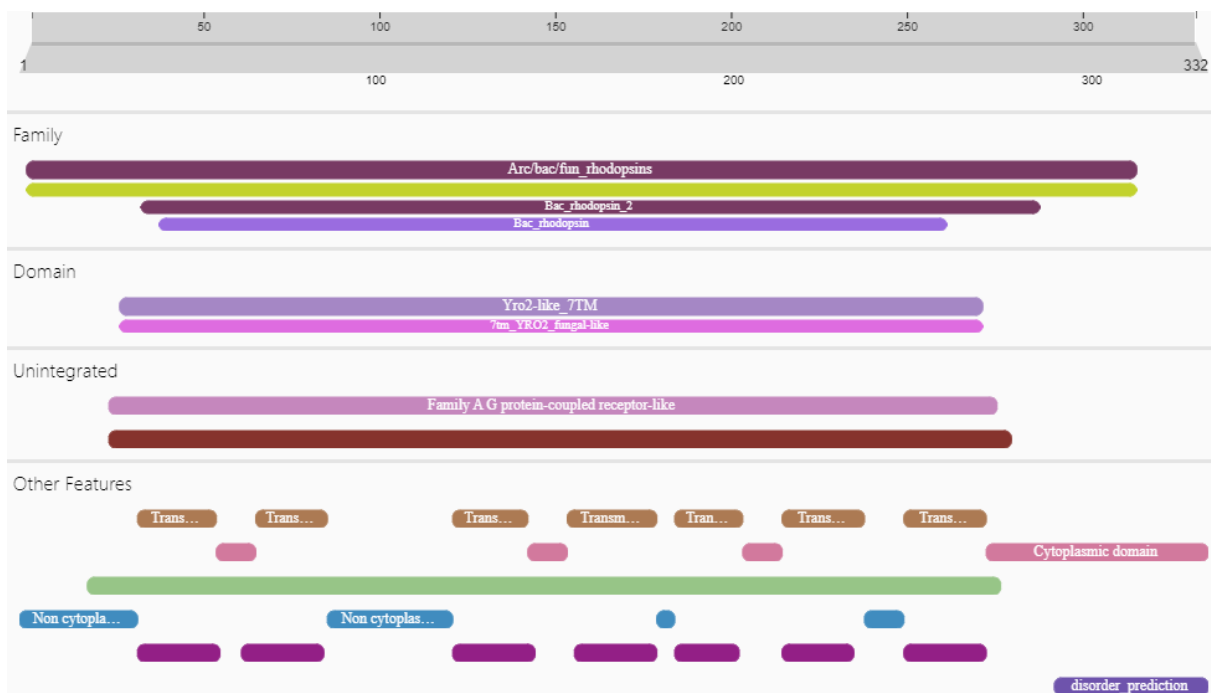


Figura 27: Estruturação de regiões da proteína Hsp30p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

como o aumento da temperatura (Meena et al., 2011). A duplicação do gene *HSP30* pode, portanto, ser um mecanismo adaptativo que facilita a sobrevivência celular em ambientes com estresse térmico intenso.

Além disso, a duplicação do gene *HSP30* também tem sido relatada em algumas populações utilizadas na indústria do bioetanol, sugerindo sua relevância em contextos industriais para a adaptação ao estresse ambiental (Jacobus et al., 2021). Esse fenômeno destaca o potencial do *HSP30* como um mecanismo adaptativo essencial para a sobrevivência celular em condições extremas, como as encontradas em processos industriais de produção de bioetanol.

Na Figura 28, é apresentada a rede de interações do Hsp30p, evidenciando suas conexões com as proteínas Tor1p e Tor2p. Esses fazem parte de um complexo proteico fundamental para o controle do crescimento celular em resposta à disponibilidade de nutrientes. A regulação envolvendo Tor1p e Tor2p afeta processos celulares críticos, como tradução, transcrição, biogênese ribossomal, transporte de nutrientes e autofagia. Essas conexões indicam que o Hsp30p não atua apenas na adaptação ao estresse térmico, mas também desempenha um papel significativo em mecanismos de regulação metabólica, essenciais para a resposta a condições de cultivo específicas, como aquelas encontradas em ambientes industriais (Jacobus et al., 2021).

Essas observações destacam o *HSP30* como um alvo promissor para aplicações biotecnológicas, especialmente em processos que exigem a adaptação celular a estresses ambientais extremos, como na produção de bioetanol e em outras indústrias que envolvem estresse térmico e metabólico.

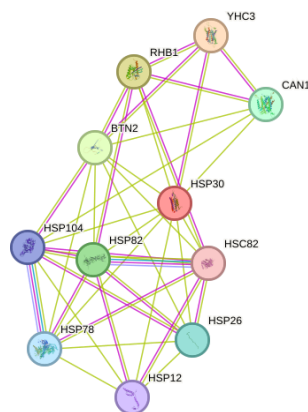


Figura 28: Interações proteína-proteína da Hsp30p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

TRS31:

O gene *TRS31* codifica um componente central dos complexos de partículas de proteína de transporte (TRAPP) I, II e III. Esses complexos são fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) multiméricos que regulam o tráfego intracelular por meio da ativação da GTPase Ypt1p.

TRAPP I está envolvido no tráfego entre o retículo endoplasmático (ER) e o complexo de Golgi, facilitando a fusão de vesículas provenientes do ER com o Golgi (Zhao et al., 2015). TRAPP II participa do tráfego intra-Golgi e do transporte endossomo-Golgi, desempenhando um papel essencial na organização e dinâmica do complexo de Golgi (Zhao et al., 2015). TRAPP III está implicado no tráfego endossomo-Golgi e é crucial para a autofagia, uma via de degradação celular que é fundamental para a manutenção da homeostase celular e a resposta ao estresse (Stenmark, 2009).

A localização e função versátil dos complexos TRAPP evidenciam o TRS31p como um gene essencial na coordenação de diversas etapas do transporte vesicular, que são vitais para a organização e dinâmica dos compartimentos intracelulares, garantindo processos fundamentais como a reciclagem de proteínas, a manutenção da estrutura do Golgi e a regulação de vias de degradação celular (Zhao et al., 2015; Stenmark, 2009).

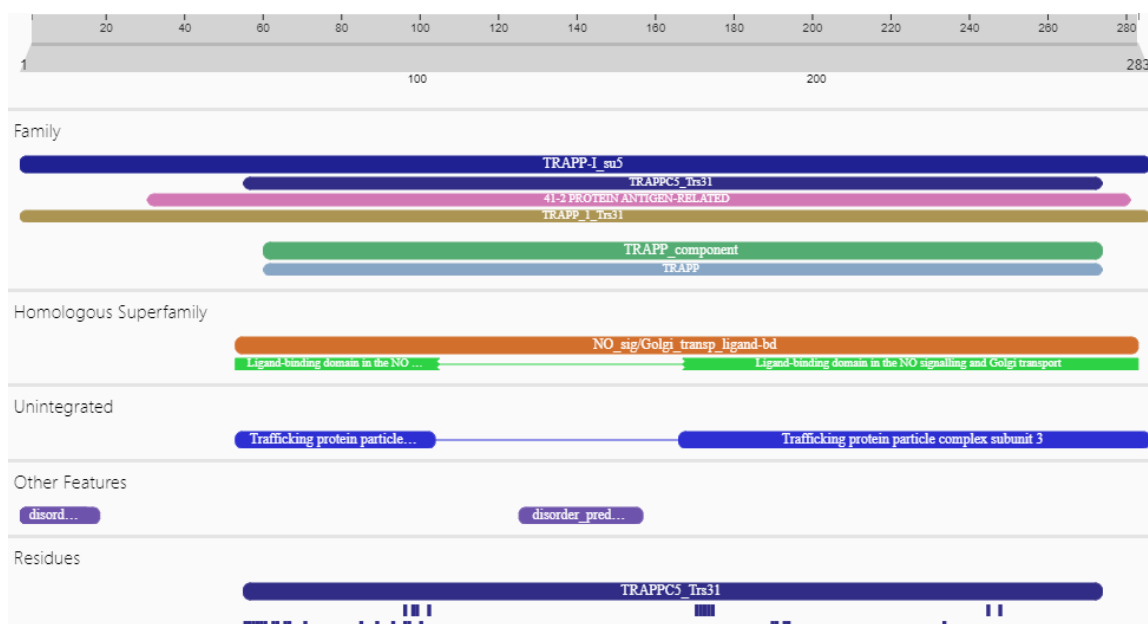


Figura 29: Estruturação de regiões da proteína do Trs31p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

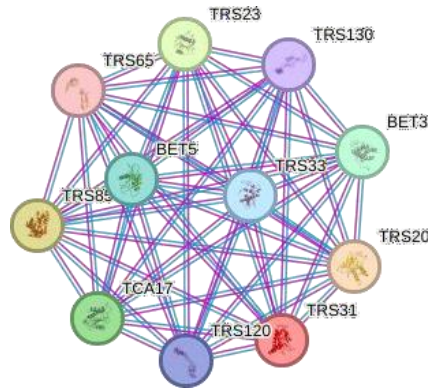


Figura 30: Interações proteína-proteína da Trs31p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

STV1:

O gene *STV1* codifica a subunidade α do domínio V0 da ATPase vacuolar do tipo V (V-ATPase), sendo uma das duas isoformas presentes nos complexos de V-ATPase. O produto desse gene, a Stv1p, está predominantemente localizado nos complexos de V-ATPase do Golgi e dos endossomos, enquanto a isoforma Vph1p, codificada pelo gene *VPH1*, é encontrada nos complexos de V-ATPase do vacúolo (Hafner et al., 2004).

A interação da Stv1p com PI(4)P (fosfatidilinositol 4-fosfato) é essencial para a localização adequada e o funcionamento eficiente das V-ATPases em seus compartimentos específicos. Essa interação é crucial para garantir o transporte de íons, o que permite à V-ATPase manter o gradiente de prótons e o pH ácido necessário para diversas funções intracelulares, incluindo o transporte de metabólitos, degradação proteica e regulação do tráfego vesicular (Kane, 2007).

A Stv1p pertence à família de subunidades de ATPases V de 116 kDa, o que destaca sua importância tanto na composição estrutural quanto funcional das V-ATPases. Esse papel é essencial para a compartimentalização de processos celulares críticos em eucariotos,

garantindo o funcionamento adequado de compartimentos como o Golgi, endossomos e vacúolos, com implicações diretas na homeostase celular e na adaptação ao ambiente intracelular (Kane, 2007; Hafner et al., 2004).

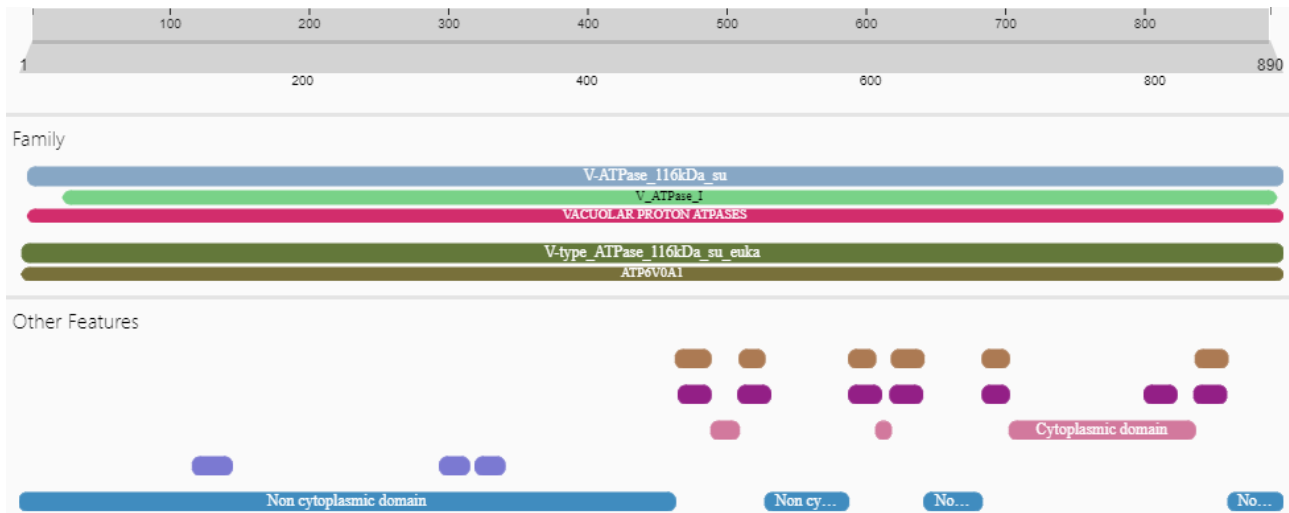


Figura 31: Estruturação de regiões da proteína do Stv1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

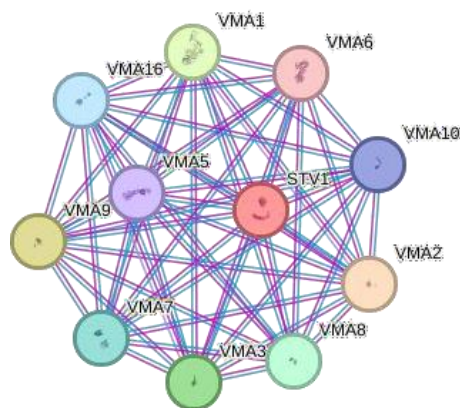


Figura 32: Interações proteína-proteína da Stv1p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

PDR3:

Foi observada a duplicação da região genômica do gene *PDR3* em toda a população haploide evoluída com o marcador de higromicina. Estudos indicam que a alta expressão de *PDR3* contribui significativamente para a melhoria da tolerância ao ácido láctico. Linhagens com *PDR3* superexpresso apresentam um crescimento celular superior ao de linhagens controle na presença de ácido láctico (Yamada et al., 2021).

O *PDR3* codifica um fator de transcrição que atua como ativador transcricional da rede de resistência a drogas pleiotrópicas. Ele regula a expressão de transportadores da família ABC (cassete de ligação a ATP) por meio de sua ligação a elementos cis PDRE (elementos responsivos a *PDR*). A Pdr3p tem funções importantes na resposta a drogas e solventes orgânicos, sendo regulado positivamente pós-translacionalmente em células desprovidas de genoma mitocondrial funcional (Alberts et al., 2002).

Além disso, o gene *PDR3* está envolvido no fase diuxica e sua distribuição relativa ao núcleo aumenta em resposta ao estresse de replicação do DNA. O *PDR3* também é regulado como substrato do complexo APC/C(Cdh1), demonstrando sua relevância em processos de regulação celular em condições de estresse metabólico e replicativo (Levin et al., 2016).

Essas características destacam o Pdr3p como um fator central na adaptação celular a ambientes desafiadores, especialmente no contexto da tolerância ao ácido láctico e da resistência a compostos tóxicos.

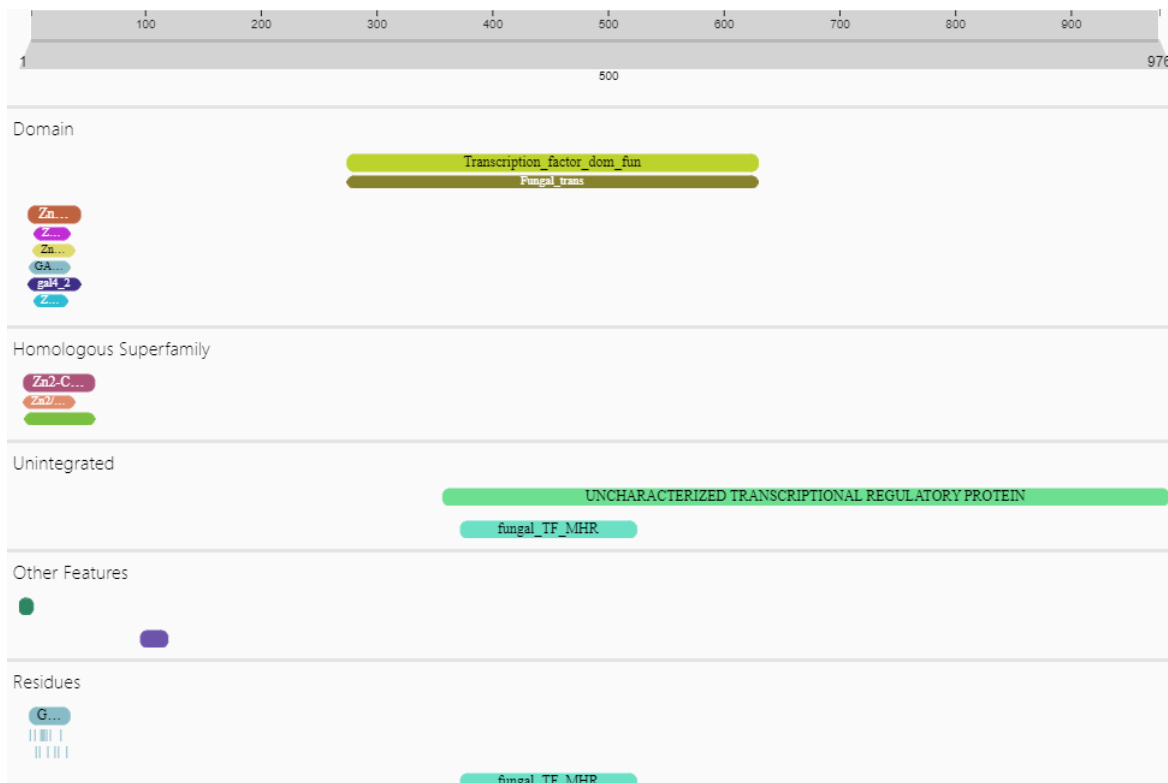


Figura 33: Estruturação de regiões da proteína do Pdr3p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

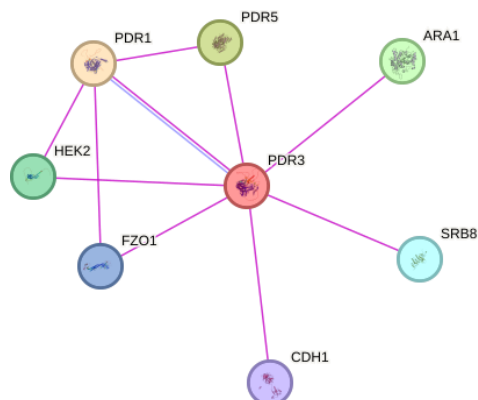


Figura 34: Interações proteína-proteína da Pdr3p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

SSA3:

O gene SSA3 codifica uma ATPase citoplasmática que desempenha funções essenciais no dobramento de proteínas e na resposta ao estresse celular. Essa proteína pertence à família Hsp70 (proteína de choque térmico 70) e está diretamente envolvida no direcionamento e

translocação cotranslacional de proteínas para a membrana, processo mediado pelo complexo SRP (Signal Recognition Particle) (Bukau & Horwich, 1998).

Além de sua função principal no dobramento e estabilização de proteínas, o gene *SSA3* também desempenha um papel crítico na adaptação celular a condições de estresse, garantindo a integridade e funcionalidade do proteoma em situações adversas. Em resposta a estresses como calor, a *SSA3* auxilia na proteção e no reparo de proteínas danificadas, facilitando sua renovação para retomar a função celular (Craig, 2018).

O gene possui um parálogo, o *SSA4*, originado de um evento de duplicação completa do genoma, o que ressalta a importância funcional dessa família de proteínas no metabolismo e homeostase celular. A duplicação de *SSA3* e *SSA4* reflete a necessidade de redundância em processos celulares críticos para a sobrevivência, principalmente sob condições adversas (Young et al., 2004).

Assim, o *SSA3* é um componente chave no sistema de manutenção proteica, destacando-se pela sua relevância tanto em processos de tradução quanto na proteção celular contra danos relacionados ao estresse.

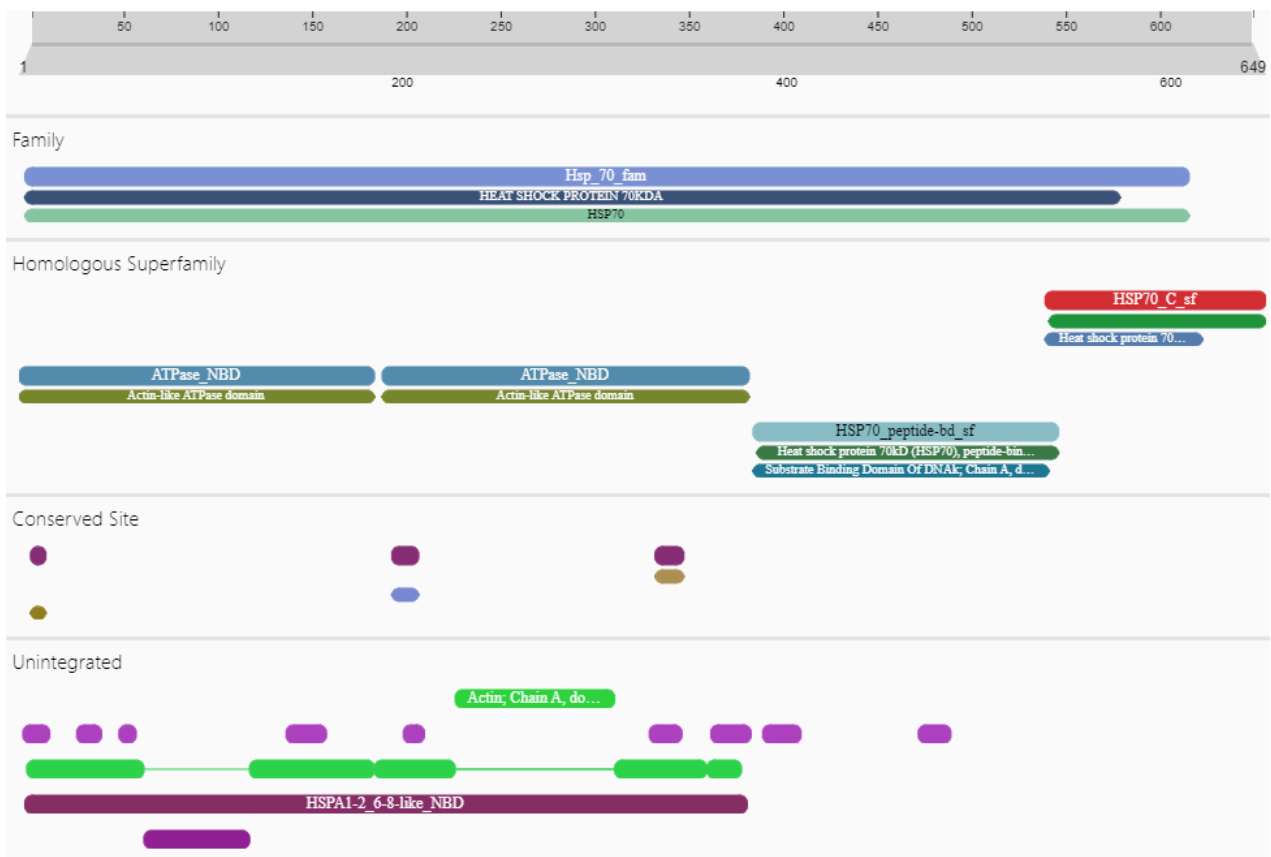


Figura 35: Estruturação de regiões da proteína do Ssa3p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

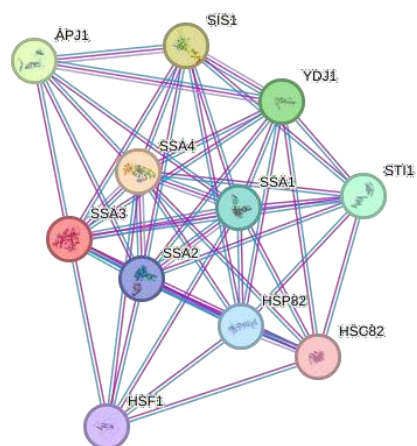


Figura 36: Interações proteína-proteína da Ssa3p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.900 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

PMAl:

O gene *PMAl* codifica uma H⁺-ATPase do tipo P2 localizada na membrana plasmática, cuja principal função é bombear prótons (H⁺) para fora da célula. Esse processo é essencial para a manutenção do pH citoplasmático e do potencial da membrana plasmática, desempenhando um papel central no equilíbrio iônico e no transporte ativo de nutrientes via H⁺-simporte. O gradiente de prótons gerado pela Pma1p também está associado a respostas de crescimento, como a acidificação externa e/ou alcalinização interna (Brown & Lindquist, 2009).

A proteína Pma1p, produto do gene *PMAl*, é uma proteína de longa vida que se distribui assimetricamente entre células-mãe e brotos durante a divisão celular. Durante o envelhecimento, ela se acumula em altos níveis nas células-mãe, enquanto os brotos emergem com níveis muito baixos de Pma1p, o que resulta em níveis baixos dessa ATPase em células recém-nascidas (Ohya et al., 2002).

Além disso, a regulação da Pma1p é mediada por proteínas como Hsp30p, que influencia sua atividade, e Std1p, que parece estar envolvida na propagação do estado [GAR⁺]. Essa ATPase pertence à subfamília tipo IIIA das ATPases de transporte de cátions (tipo P) (TC 3.A.3) (Wu et al., 2013).

O Pma1p é, portanto, um gene crucial para a homeostase celular e para a regulação de mecanismos essenciais ao crescimento e à sobrevivência celular.

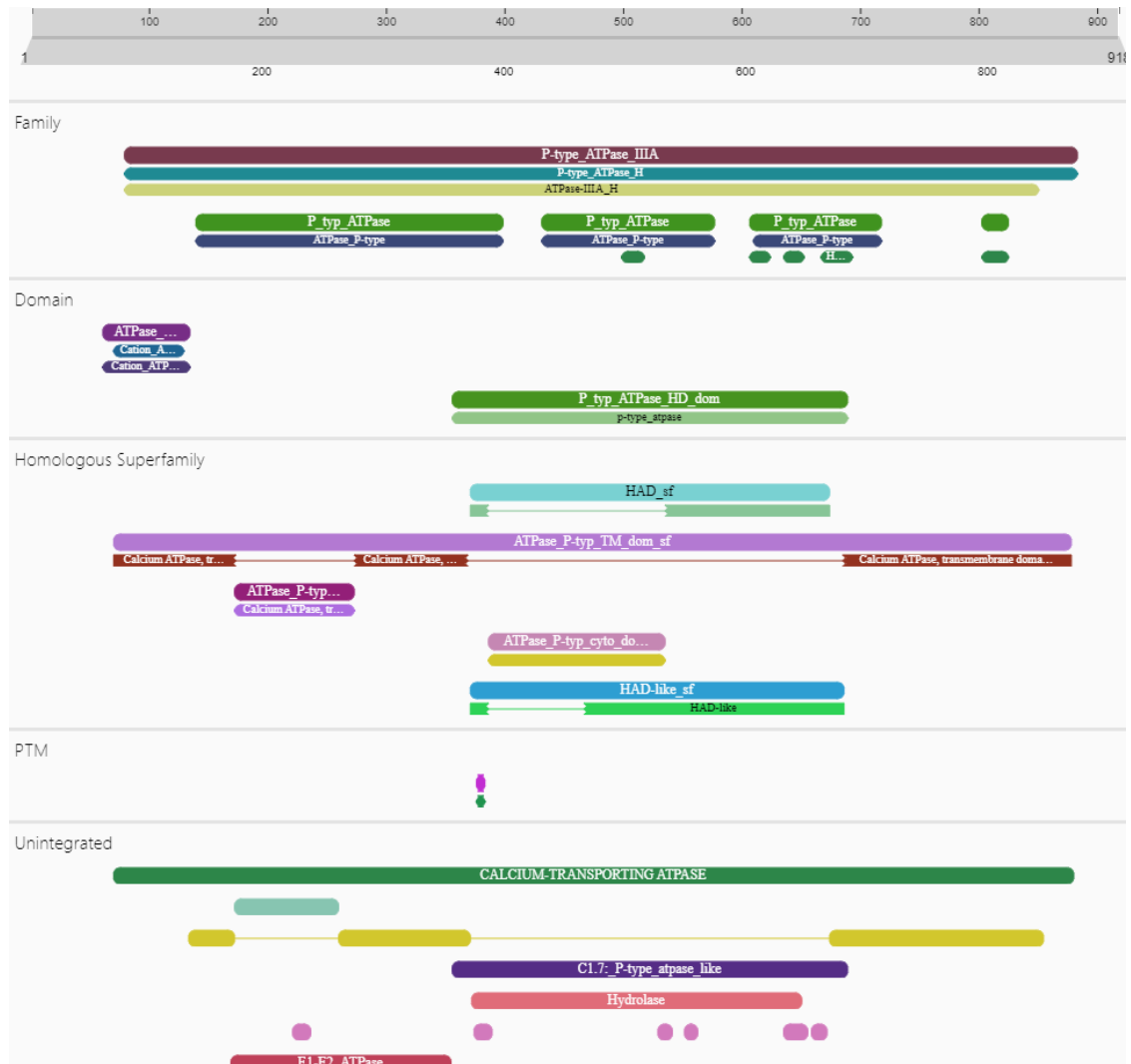


Figura 37: Estruturação de regiões da proteína do Pma1p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

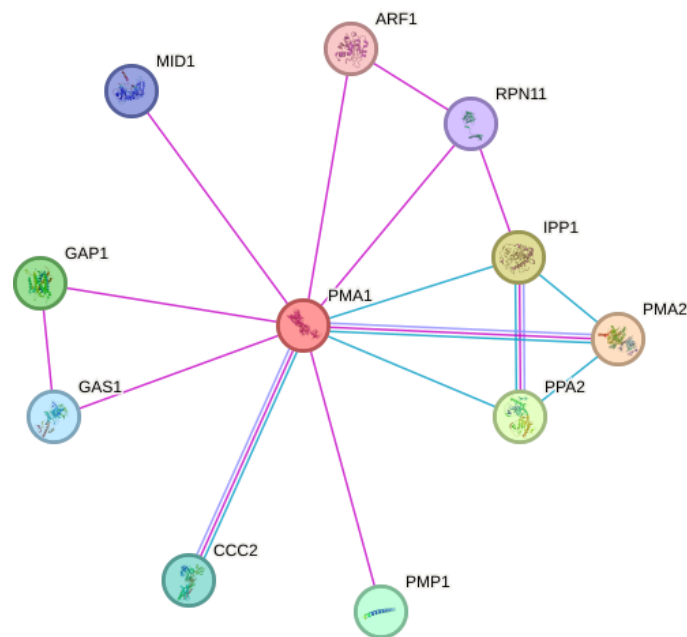


Figura 38: Interações proteína-proteína da Pma1. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.700 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

CDC25:

O gene *CDC25* desempenha uma função essencial no controle da divisão celular. Ele codifica uma proteína ligada à membrana que atua como um fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF), também conhecido como fator de liberação de GDP. Sua principal função é regular indiretamente a atividade da adenilato ciclase por meio da ativação de Ras1p e Ras2p, estimulando a troca de GDP por GTP. Essa ativação é crucial para a progressão do ciclo celular na fase G1.

Além disso, a proteína Cdc25p possui homologia funcional com proteínas humanas. A termosensibilidade do mutante *cdc25-5* pode ser complementada pelo RASGRF1 humano ou por um fragmento do SOS1 humano que contém o domínio catalítico relacionado ao Cdc25p, evidenciando sua conservação evolutiva e importância nos processos de regulação do ciclo celular (Gulli et al., 1995).

Por suas funções, o Cdc25p é uma proteína chave na integração de sinais que controlam a divisão celular e no funcionamento da via Ras, posicionando-se como um regulador fundamental do ciclo celular em eucariotos.

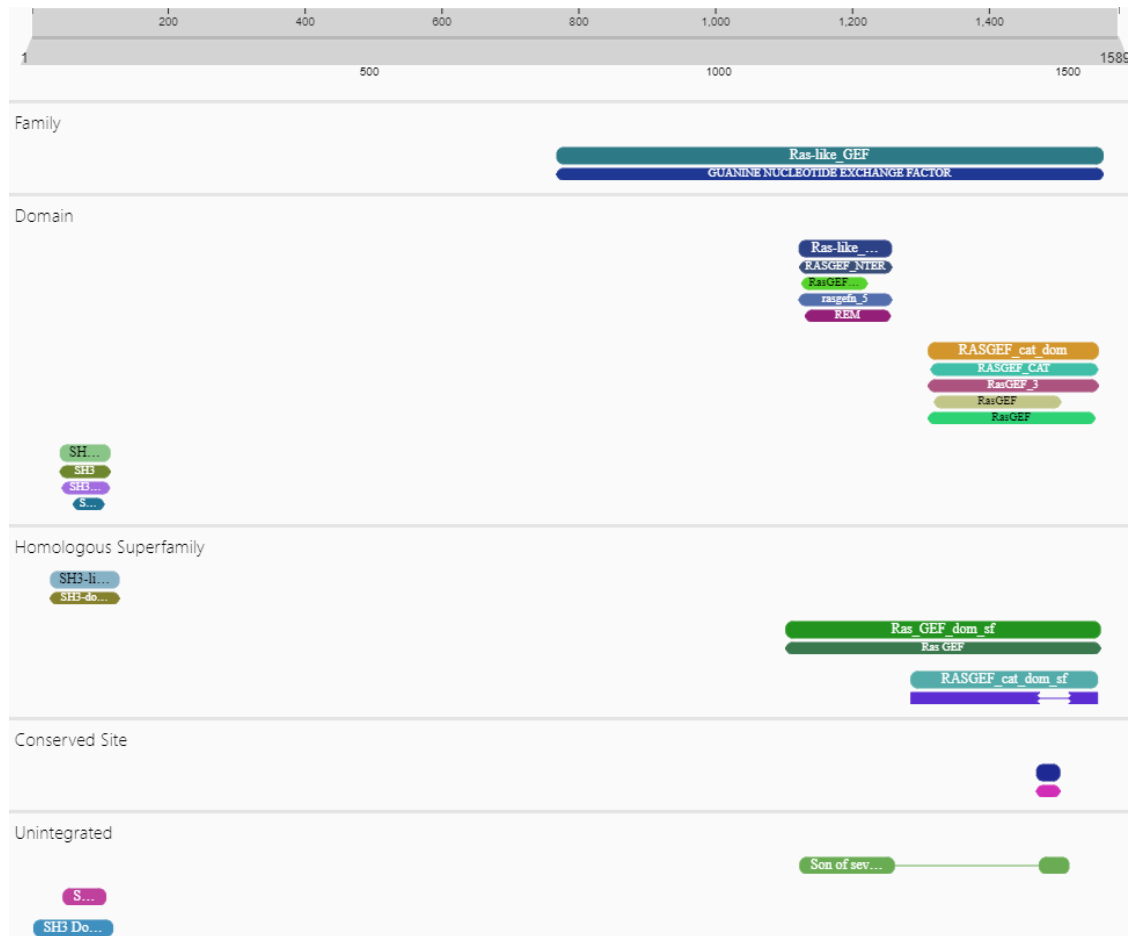


Figura 39: Estruturação de regiões da proteína do Cdc25p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

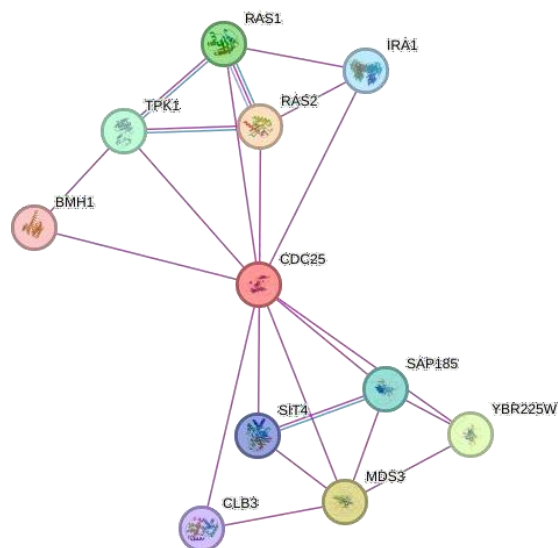


Figura 40: Interações proteína-proteína da cdc25p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.700 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

WHI2:

O gene *WHI2* apresenta alelos mutados que dominaram as populações que expressam marcadores de resistência à geneticina (PGEN) e higromicina (PHYG). Este gene atua como um regulador negativo da Torc1p, desempenhando um papel crucial na resposta à limitação de leucina. Em conjunto com seus parceiros de ligação, Psr1p e Psr2p, o Whi2p reprime a atividade da Torc1p, operando de forma paralela ao complexo SEACIT (Leadsham et al., 2009).

Além disso, o Whi2p está associado à regulação da parada do ciclo celular na fase estacionária, bem como à inibição da via Ras-cAMP-PKA, contribuindo para a apoptose em condições de esgotamento de nutrientes. Sua função está diretamente ligada à ativação da resposta geral ao estresse, mediada por sua interação com Psr1p, possivelmente através da desfosforilação de Msn2p.

O Whi2p desempenha um papel essencial na regulação do crescimento celular, sendo necessário para a ativação completa da resposta geral ao estresse e para a regulação da expressão de ciclina G1. Durante a fase diauxica, ele também atua como regulador negativo do crescimento. Estudos de localização subcelular utilizando proteínas de fusão como SWAT-GFP, seamless-GFP e mCherry demonstraram que o Whi2p está predominantemente localizado na periferia celular.

Essas funções destacam o Whi2p como um componente fundamental nos mecanismos de regulação do crescimento, ciclo celular e adaptação ao estresse celular, ressaltando sua importância para a manutenção da homeostase celular e para a sobrevivência em condições adversas.

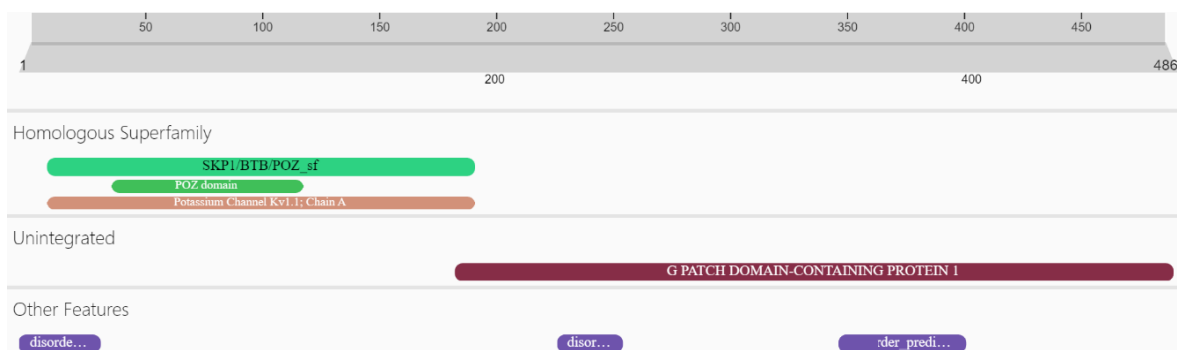


Figura 41: Estruturação de regiões da proteína do Whi2p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

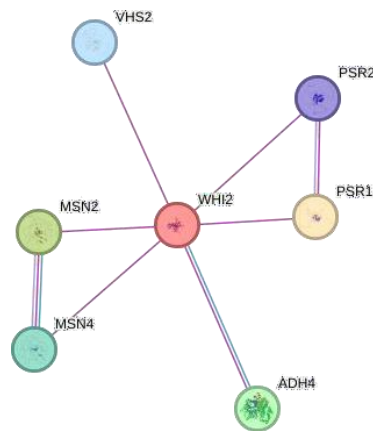


Figura 42: Interações proteína-proteína de Whi2p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.700 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

HAP4:

O fator de transcrição e subunidade do complexo Hap2p/3p/4p/5p, também conhecido como Hap ou CCAAT-glucosereprimido heme ativado, é um regulador global da expressão gênica respiratória. Ele atua como ativador transcricional, desempenhando um papel essencial na regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo respiratório. Este complexo está diretamente envolvido no processo de mudança para a fase diaxica, um fenômeno observado em microrganismos, incluindo *S. cerevisiae* e *Escherichia coli*, quando cultivados em meios contendo duas fontes de carbono diferentes, como glicose e lactose (Gancedo, 1998; Teixeira & Sá-Correia, 2010).

O microrganismo consome preferencialmente a glicose como fonte de carbono, já que ela é mais facilmente metabolizável. Quando a glicose se esgota, o microrganismo entra na fase diauxica e altera seu metabolismo para utilizar a lactose ou outra fonte de carbono presente, em um processo de adaptação que envolve mudanças na expressão gênica. Nesse contexto, o Hap2p/3p/4p/5p regula a ativação de genes que permitem ao microrganismo realizar essa transição metabólica, facilitando a adaptação à disponibilidade de recursos no ambiente (Kurat & Schüller, 2003; Stout & Heideman, 2001).

Além disso, o fator Hap está implicado na regulação da resposta a estresse energético e respiratório, coordenando a ativação de genes relacionados ao metabolismo aeróbico,

essencial para a sobrevivência do organismo em condições de baixa disponibilidade de glicose ou em ambientes com fontes de carbono alternadas (Lai & Tung, 2009).

Essas características tornam o complexo Hap2p/3p/4p/5p um regulador chave na adaptação metabólica dos microrganismos, especialmente em ambientes com variação na disponibilidade de fontes de carbono.

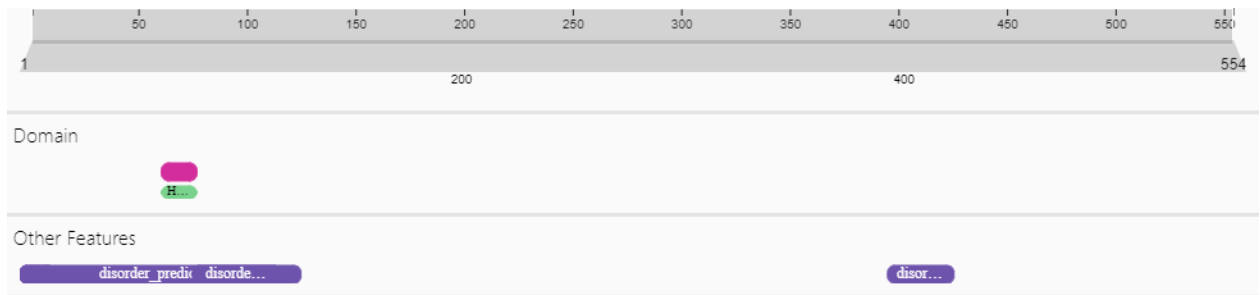


Figura 43: Estruturação de regiões da proteína do Hap4p e seus respectivos domínios e famílias. Imagem obtida por análise no InterProScan.

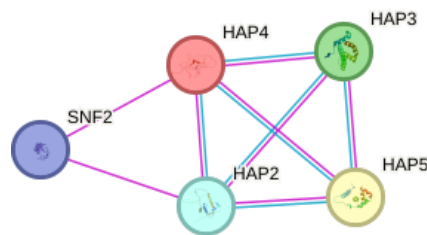


Figura 44: Interações proteína-proteína da Hap4p. Avaliação realizada pelo StringDB com confiança de 0.700 e apenas dados de fontes de experimentos e databases.

6. Considerações finais

Foram identificadas diversas mutações associadas à tolerância de células de *S. cerevisiae* aos ácidos fracos, como o ácido láctico. O *PCK1* foi um gene que sofreu mutações em todas as populações avaliadas. Tal gene, se relaciona com a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, uma enzima chave na gliconeogênese, evidenciando alguma possível alteração no fluxo de energia da célula. O presente trabalho mostra um grande potencial para auxílio na construção de uma levedura robusta, tanto em produção quanto em tolerância ao ácido láctico (AL). É importante frisar também o grande potencial percebido da *S. cerevisiae* no desenvolvimento de resistência ao estresse associado à produção de AL.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Derek A.; ZAKHARTSEV, Maxim; SAUER, Uwe; PRONK, Jack T.; VAN MARIS, Antonius J. A. Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 18, p. 5759-5768, 2008.
- ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali; TASHIRO, Yukihiro; SONOMOTO, Kenji. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 6, p. 877-902, 2013.
- AFIATI, Fifi; PURNOMO, Hadi; GUNAWAN, Edi; FARDIAZ, Dewi; DJAJANEGARA, Asmoro A. Quantification of Lactic Acid as Secondary Metabolite of Lactic Acid Bacteria Isolated from Milk and Its Derivatived Products. In: *Food Ingredient Asia Conference (6th FIAC 2020)*, 6., 2020, Bogor, Indonesia. Proceedings [...]. [S. l.]: SCITEPRESS – Science and Technology Publications, 2020. p. 132-136.
- AHUJA, Kunal; BAYAS, Sarita. Lactic Acid Market Size By Application (Industrial, Food & Beverage, Pharmaceuticals, Personal Care), Polylactic Acid (PLA) Market Size By Application (Packaging, Agriculture, Transport, Electronics, Textiles), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2020 – 2026. Delaware: Global Market Insights, 2020. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/lactic-acid-and-polylactic-acid-market>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALBUQUERQUE, Tiago Lima; CURVELO, Adriano Antônio da Silva; KLOCKE, Michael; PRADILLA, David; SILVA, Sérgio Salles de Oliveira. Polylactic acid production from biotechnological routes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 186, p. 933-951, 2021.
- BAEK, Seung-Ho; LAHTEENMAKI, Marta; XU, Hualiang; PARK, Jong-Hwa. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 2737-2748, 2016a.
- BAEK, Seung-Ho; KWON, Eunjin; LAHTEENMAKI, Marta; XU, Hualiang; JOO, Young-Min; YOO, Jong-Hyun; JEONG, Dong-Woo; LIU, Jinlong; WANG, Guochang; XU, Zhiwei; KIM, Sung Ho; PARK, Jong-Hwa. *GSF2* deletion increases lactic acid production by alleviating glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, e34812, 2016b.
- BAEK, Seung-Ho; KWON, Eunjin; LAHTEENMAKI, Marta; PARK, Jong-Hwa. Improvement of D-lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* under acidic conditions by evolutionary and rational metabolic engineering. *Biotechnology Journal*, v. 12, n. 10, e1700015, 2017.
- BAPTISTA, Sara L.; ANTUNES, Liliana C.; GOMES, Ana C.; ROCHA, Inês; ALVES, Ricardo; FERREIRA, Eugénio C.; MADEIRA, Luís M. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top-value chemicals from biorefinery carbohydrates. *Biotechnology Advances*, v. 47, e107697, 2021.
- BASSO, Luiz Carlos; DE AMORIM, Hélia V.; DE OLIVEIRA, Antonio José; ALVES, Douglas M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BAUER, Bettina E.; WOLFGER, Hermann; KUESTER, Christina; LETTMANN, Uta; STAMBERG, Johannes; LECHNER, Reinhold; KREMSER, Jürgen; ANDO, Shin; MAYER, Beatrice; BREITENBACH, Michael. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *European Journal of*

Biochemistry, v. 270, n. 15, p. 3189-3195, 2003.

BELOGRUDOV, Grigory I.; LEE, Pooi Fung; LEE, Meiling T.; WATANABE, Tatsuki; NEUFFER, J.; CLARKE, Catherine F. Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 392, n. 1, p. 48-58, 2001.

BERTERAME, Nadia Maria; MANDRILE, Laura; AVEZZA, Fabiola; SOTGIU, Eleonora; DI CANIO, Caterina; TURCO, Eugenia; MARTINOTTI, Simona; ZUCCA, Patrizia; DE FILIPPIS, Vincenzo; COTTI, Massimo. Protein aggregation and membrane lipid modifications under lactic acid stress in wild type and OPI1 deleted *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microbial Cell Factories*, v. 15, n. 39, 2016.

BOZOGLU, T. Faruk; RAY, Bibek (Eds.). *Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications*. Springer, 2013.

BROWN, Patrick O.; LINDQUIST, Susan. Hsp30: A role in regulating membrane potential in yeast cells. *Cell*, 2009.

BUKAU, Bernd; HORWICH, Arthur L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998.

CAMPEDELLI, Ilenia; FIORI, Chiara; TACCARI, Mara; DERIU, Daniela; GALLETTTO, Sara; CAVALLI, Riccardo; TORRIANI, Sandra. Draft genome sequence of three antibiotic-resistant *Leuconostoc mesenteroides* strains of dairy origin. *Genome Announcements*, v. 3, n. 5, 2015.

CHANDEL, Anuj Kumar; SEGATO, Fernando. *Production of Top 12 Biochemicals Selected by USDOE from Renewable Resources: Status and Innovation*. Elsevier, 2021.

CHANG, Chia-Hui; WANG, Jui-Yu; TSAI, Wei-Chih; CHEN, Hsiu-Chuan; CHEN, Hsin-I. Stress-induced focus formation of peroxisomal proteins in response to DNA replication stress. *Journal of Cell Biology*, 2010.

CHEN, Lixia; LIU, Xiaoyan; GUO, Xinyu; LI, Zhimin; MA, Rong; ZHANG, Ying; LI, Hao. Characterization of ad-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus fermentum* JN248 with high phenylpyruvate reductive activity. *Journal of Food Science*, v. 82, n. 10, p. 2269-2275, 2017.

CHENG, Ya-Yun; LIU, Jian-Fei; LI, Yu-Wei; YANG, Hai-Tao; LUO, Guo-Min; WANG, Qing; LI, Yi-Fan; WU, Bin; YANG, Mao-Yuan. Biological characterization of D-lactate dehydrogenase responsible for high-yield production of D-phenyllactic acid in *Sporolactobacillus inulinus*. *Microbial Biotechnology*, v. 15, n. 11, p. 2717-2729, 2022.

COELHO, Emanuela Monteiro; NASCIMENTO, Ana Maria de; NOGUEIRA, Rafael J. M. C.; OLIVEIRA, Marcus Antonio L. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 66, p. 160-167, 2018.

COELHO, Luciana Fontes; DE LIMA, Cláudia J. B.; GARCIA-CARMONA, José; CONVERTI, Attilio; GIORGI, Roberto. D(-)-lactic acid production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 164, p. 1160-1171, 2011.

COLLINS, Sarah L.; BROWN, Peter J.; HARRISON, Mark J.; WANG, Huili; LIU, Jian; GREENE, Timothy M. REV1: A key player in DNA replication and mutagenesis. *DNA Repair*, 2007.

COLOMBO, Silvia F.; MAZZONI, Cristina; ORTIZ, Juan Carlos; MARCET, Sergio; RUGGIERO, Valeria. Adenylate cyclase and cAMP signaling in the regulation of cellular processes. *FEMS Yeast Research*, 2014.

CRAIG, Elizabeth A. Heat shock proteins in the stress response. *Current Opinion in Cell Biology*, 2018.

CURRAN, Kathleen A.; REID, Samuel J.; WOLFE, Christopher L.; KARLOVSKY, Patrick; LINDQUIST, Karen R. Short synthetic terminators for improved heterologous gene expression in yeast. *ACS Synthetic Biology*, v. 4, n. 7, p. 824-832, 2015.

DARVISHI, Farshad; BLENNER, Mark; LEDESMA-AMARO, Rodrigo. *Synthetic Biology of Yeasts for the Production of Non-Native Chemicals*, 2. ed. Frontiers, 2021.

DAVEY, Hazel M.; HEXLEY, Paul. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 163-171, 2011.

DELUNA, Alexander; SPRINGER, Michael; KIRKPATRICK, David K.; PECK, Stephanie C.; KERSCHNER, Jennifer L.; PIRRUNG, Mark; STEARNS, Tim. Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nature Genetics*, v. 40, n. 5, p. 676-681, 2008.

DIEGO-NAVA, Fidel; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Marco A.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, José; ORNELAS-PÉREA, Leticia; SALGADO-CERVANTES, Miguel A.; RUIZ-GARCÍA, Miguel; MARTÍNEZ-TOLEDO, Manuel V. Functional and quality assessment of a spore harvester for entomopathogenic fungi for biopesticide production. *AgriEngineering*, v. 5, n. 2, p. 801-813, 2023.

EREGOWDA, Tejaswini. *Anaerobic Treatment and Resource Recovery from Methanol Rich Waste Gases and Wastewaters*. Leiden: CRC Press, 2019.

FLETCHER, Eugene; BUNN, Jonathan; JONES, Richard; WILKINSON, Alex; CAMPBELL, Greg. Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments. *Metabolic Engineering*, v. 39, p. 19-28, 2017.

GALLONE, Brigida; STEENSELS, Jan; MATHÉ, Louise; DUBOIS, Emmanuelle; FRANCISCO, Carvajal; HUBERT, Pascal; BORNEMAN, Anthony R.; VERSTREPEN, Kevin J. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, v. 166, n. 6, p. 1397-1410.e16, 2016.

GANCEDO, Juan M. Diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in gene expression and metabolism. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, n. 3, p. 305-320, 1998.

GOFFEAU, André; BARRE, André; CASREG, Bernard; GAUDIN, Daniel; HEIJNE, Gunnar; JOHANSSON, Kristina; LEPESANT, Jean-Marc; MARCK, Christian; MICHIELS, Francis; WINCKER, Patrick. Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

GOLDSTEIN, Alan L.; MCCUSKER, John H. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 15, n. 14, p. 1541-1553, 1999.

GREGORI, Christa; SCHULLER, Christoph; REUSS, Matthias; AMBRONN, Monika; PAUER, Philipp; MEYER, Thomas. Weak organic acids trigger conformational changes of the yeast transcription factor War1 in vivo to elicit stress adaptation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 37, p. 25752-25764, 2008.

GUIARD, Bernard. Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L (+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2). *The EMBO Journal*, v. 4, n. 12, p. 3265-3272, 1985.

- GULLI, K. A., et al. Functional homology between the yeast CDC25 protein and human Ras activators. *Journal of Cell Biology*, 1995.
- GUPTA, Bhuvanesh; REVAGADE, Nilesh; HILBORN, Jöns. Poly (lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 4, p. 455-482, 2007.
- HAFNER, A., et al. Role of V-ATPase in intracellular pH regulation and vesicular trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004.
- HIRSHFIELD, Irvin N.; TERZULLI, Stephanie; O'BYRNE, Conor. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Science Progress*, v. 86, n. 4, p. 245-270, 2003.
- HOHMANN, Stefan. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 24, p. 7963-7969, 1991.
- IYER, R. R., et al. PMS1: A key player in DNA mismatch repair. *DNA Repair*, 2013.
- JACOBUS, Ana Paula, et al. Comparative genomics supports that Brazilian bioethanol *Saccharomyces cerevisiae* comprise a unified group of domesticated strains related to cachaça spirit yeasts. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021.
- JACOBUS, K., et al. HSP30 duplication in bioethanol production: Implications for environmental stress adaptation. *Applied Environmental Microbiology*, 2021.
- JEM, K. Jim; VAN DER POL, Johan F.; DE VOS, Sicco. Microbial lactic acid, its polymer poly (lactic acid), and their industrial applications. In: CHEN, George Guo-Qiang (Ed.). *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. v. 14. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. p. 323-346.
- JIMÉNEZ, Alfonso; PELTZER, Mercedes; RUSECKAITE, Roxana (Eds.). *Poly (lactic acid) science and technology: processing, properties, additives and applications*. n. 12. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015.
- KANE, P. M. V-ATPase function in eukaryotic cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2007.
- Kaufmann, A., et al. The role of Pex30p and Pex31p in peroxisome biogenesis. *Journal of Cell Science*, 2007.
- KILDEGAARD, Kanchana R., et al. Evolution reveals a glutathione-dependent mechanism of 3-hydroxypropionic acid tolerance. *Metabolic Engineering*, v. 26, p. 57-66, 2014.
- KIM, Myung Sup, et al. Activation of Haa1 and War1 transcription factors by differential binding of weak acid anions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. 3, p. 1211-1224, 2019.
- KLOTZ, Silvia, et al. Biotechnological production of enantiomerically pure d-lactic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 22, p. 9423-9437, 2016.
- KOK, Stefan, et al. Laboratory evolution of new lactate transporter genes in a *jen1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* and their identification as ADY2 alleles by whole-genome resequencing and transcriptome analysis. *FEMS Yeast Research*, v. 12, n. 3, p. 359-374, 2012.
- KURAT, C. F.; SCHÜLLER, H. J. Hap2p/3p/4p/5p transcription factor complex of *Saccharomyces cerevisiae*: An activator of respiration genes. *FEMS Yeast Research*, v. 3, n. 4, p. 443-448, 2003.
- LAI, L. C.; TUNG, K. C. The regulation of glucose metabolism and the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 10, p. 12-18, 2009.

- LARIMER, F. W., et al. The REV1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for normal mutagenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 1989.
- LEADSHAM, J. E., et al. Whi2p regulates the general stress response through its interaction with Psr1p and Psr2p. *Journal of Cell Biology*, 2009.
- LEE, Ju Young, et al. Engineering cellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of L-lactic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 4, p. 751-758, 2015.
- LEVIN, D. E., et al. Regulation of PDR3 by APC/C(Cdh1) in response to DNA replication stress. *Molecular Cell Biology*, 2016.
- LIAN, Jiazhong, et al. Engineered CRISPR/Cas9 system for multiplex genome engineering of polyploid industrial yeast strains. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 115, n. 6, p. 1630-1635, 2018.
- LIU, Haoping; STYLES, Cora Ann; FINK, Gerald R. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FL08, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, v. 144, n. 3, p. 967-978, 1996.
- LIU, Xingxun, et al. Effects of inorganic fillers on the thermal and mechanical properties of poly (lactic acid). *International Journal of Polymer Science*, v. 2014, art. ID 827028, 2014.
- LODI, Tiziana; FERRERO, I. Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferriocytochrome c oxidoreductase. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 238, p. 315-324, 1993.
- LUO, Xi, et al. Enzymological characterization of a novel d-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus rossiae* and its application in d-phenyllactic acid synthesis. *3 Biotech*, v. 10, art. 10, 2020.
- MAHUKU, George S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22, p. 71-81, 2004.
- MAICAN, Edmond; FERDES, Mariana. Advances and perspectives in second generation biofuels production. *Journal of Biotechnology*, n. 208, p. S12, 2015.
- MAKAROVA, A. V., et al. Mechanisms of DNA damage tolerance and translesion synthesis in eukaryotes. *DNA Repair*, 2006.
- MANO, S., et al. The role of reticulons in peroxisome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006.
- MARKETS AND MARKETS. Yeast Market worth \$6.1 billion by 2025. Northbrook, Markets and Markets, 26 maio 2020. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/yeastindustry.asp>. Acesso em 8 ago. 2023.
- MARTINEZ-MUNOZ, Gloria A.; KANE, Patricia. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 29, p. 20309-20319, 2008.
- MAST, F. D., et al. Pex5p and the import of peroxisomal matrix proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016.
- MATSUMOTO, M., et al. Pex28p and Pex29p in the early steps of peroxisome biogenesis. *FEBS Letters*, 2007.
- MEENA, R., et al. The role of HSP30 in heat stress tolerance and ATP regulation in yeast. *FEMS Yeast*

Research, 2011.

MENEGON, Yasmine Alves; GROSS, Jeferson; JACOBUS, Ana Paula. How adaptive laboratory evolution can boost yeast tolerance to lignocellulosic hydrolyses. *Current Genetics*, v. 68, n. 3-4, p. 319-342, 2022.

MIRA, Nuno P.; TEIXEIRA, Miguel Cacho; SÁ-CORREIA, Isabel. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *Omics: a journal of integrative biology*, v. 14, n. 5, p. 525-540, 2010.

MIRA, Nuno Pereira; BECKER, Jorg D.; SÁ-CORREIA, Isabel. Genomic expression program involving the Haa1p-regulon in *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid. *Omics: a journal of integrative biology*, v. 14, n. 5, p. 587-601, 2010.

MIRA, Nuno Pereira; TEIXEIRA, Miguel Cacho. Microbial Mechanisms of Tolerance to Weak Acids: An Overview. [S.l.]: Frontiers, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/research-topics/912/microbial-mechanisms-of-tolerance-to-weak-acid-stress>. Acesso em: 7 ago. 2023.

MORTIMER, Robert K., et al. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 10. *Yeast*, v. 5, n. 5, p. 321-403, 1989.

NARVHUS, J. A.; AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria. In: CABALLERO, Benjamin (Ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2003. p. 3465-3472.

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

NUGROHO, Riyanto Heru; YOSHIKAWA, Katsunori; SHIMIZU, Hiroshi. Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 120, n. 4, p. 396-404, 2015.

OHYA, Y. et al. Mechanisms of asymmetric Pma1p distribution during yeast cell division. *Molecular Biology of the Cell*, 2002.

ÖZCAN, Emrah et al. A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 103, n. 7, p. 3153-3165, 2019.

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

PAL, Parimal et al. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, n. 11-12, p. 1549-1559, 2009.

PEETERMANS, Arne; FOULQUIÉ-MORENO, María R.; THEVELEIN, Johan M. Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, v. 8, n. 6, p. 111, 2021.

PIPER, Peter W. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, n. 11-12, p. 1219-1227, 1999.

POHANKA, Miroslav. D-lactic acid as a metabolite: toxicology, diagnosis, and detection. *BioMed Research International*, v. 2020, ID 3419034, 2020.

PORRO, Danilo et al. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the

production of lactic acid. *Biotechnology progress*, v. 11, n. 3, p. 294-298, 1995.

RASAL, Rahul M.; JANORKAR, Amol V.; HIRT, Douglas E. Poly (lactic acid) modifications. *Progress in polymer science*, v. 35, n. 3, p. 338-356, 2010.

SALAZAR, Alex N. et al. Nanopore sequencing enables near-complete de novo assembly of *Saccharomyces cerevisiae* reference strain CEN. PK113-7D. *FEMS Yeast Research*, v. 17, n. 7, p. fox074, 2017.

SALMINEN, Seppo; VON WRIGHT, Atte (Eds.). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. ed. CRC Press, 2004.

SAUER, Michael et al. 16 years research on lactic acid production with yeast—ready for the market?. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 27, n. 1, p. 229-256, 2010.

SCHRADER, M.; BORNEMANN, P. Peroxisomes and the regulation of their biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007.

SCHÜGERL, K. H. Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources, Vol. 3 Aus: *Biotechnology (A Comprehensive Treatise in 8 Volumes)*. *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie*, v. 87, n. 5, p. 462-462, 1983.

SMOLKE, Christina. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Tools and Applications*. New York: CRC Press, 2009.

SNOEK, Tim et al. Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance. *Biotechnology for biofuels*, v. 8, n. 1, art. 32, 2015.

SORNLEK, Warasirin et al. D-Lactic acid production from sugarcane bagasse by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 8, p. 816, 2022.

SPROUFFSKE, Kathleen; WAGNER, Andreas. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC bioinformatics*, v. 17, art. 172, 2016.

STENMARK, H. The molecular functions of Rab GTPases in vesicular transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009.

STOUT, V. J.; HEIDEMAN, W. Regulation of glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of glucose repression and diauxic shift. *Yeast*, v. 18, n. 15, p. 1257-1265, 2001.

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

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

SUN, Jie et al. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, v. 109, n. 8, p. 2082-2092, 2012.

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

- TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. The diauxic shift of *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of glucose repression and adaptation to different carbon sources. *Yeast*, v. 27, n. 2, p. 85-94, 2010.
- THOMPSON, A., et al. Regulation of vesicular trafficking between the ER and peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 2016.
- TISHKOFF, D. X., et al. The role of PMS1 in mismatch repair and its interaction with Mlh1p. *Molecular and Cellular Biology*, 1997.
- TURNER, Timothy L. et al. Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, p. 8023-8033, 2015.
- ULLAH, Azmat et al. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Frontiers in microbiology*, v. 4, p. 142, 2013.
- VALDÉS-HEVIA, Marta D.; DE LA GUERRA, Raquel; GANCEDO, Carlos. Isolation and characterization of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, v. 258, n. 2, p. 313-316, 1989.
- VAN DER ZEE, Maarten. Biodegradability of biodegradable mulch film: A review of the scientific literature on the biodegradability of materials used for biodegradable mulch film. Wageningen: Wageningen Food & Biobased Research, 2021.
- VIZEACOMAR, F. J., et al. Peroxisome biogenesis and function: insights from mutations and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004.
- WU, Wangiang; LI, Haitao. Metabolites of Lactic Acid Bacteria. In: CHEN, Wei; NARBAD, Arjan. *Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction*. Singapura: Springer, 2018. p. 87-113.
- WU, X., et al. Std1p and Hsp30p regulate Pma1p activity and membrane distribution. *Journal of Cell Biology*, 2013.
- XU, Xin et al. Evolutionary engineering in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a TRK1-dependent potassium influx mechanism for propionic acid tolerance. *Biotechnology for biofuels*, v. 12, art. 97, 2019.
- YAMADA, T., et al. PDR3 overexpression enhances lactic acid tolerance in yeast populations. *FEMS Yeast Research*, 2021.
- YOUNG, M., et al. The SSA family of Hsp70 proteins in yeast: functional redundancy and specificity in protein quality control. *Molecular Biology of the Cell*, 2004.
- ZHANG, Y., et al. Functional analysis of REV1 and its role in translesion DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2000.
- ZHANG, Z., et al. The role of PMS1 in silencing and telomere maintenance. *Journal of Molecular Biology*, 2001.
- ZHAO, X., et al. TRAPP complexes in vesicle trafficking and cellular organization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015.
- ZHONG, Wei et al. Systematically redesigning and optimizing the expression of D-lactate dehydrogenase efficiently produces high-optical-purity D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 144, p. 217-226, 2019.

ZHU, Yibo et al. Enantioselective biosynthesis of L-phenyllactic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli*. *Molecules*, v. 22, n. 11, p. 1966, 2017.

ZHU, Pan; LUO, Rui; LI, Yize; CHEN, Xiulai. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of *l*-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr.*, v. 10, n. 6, e02277-22, 2022.