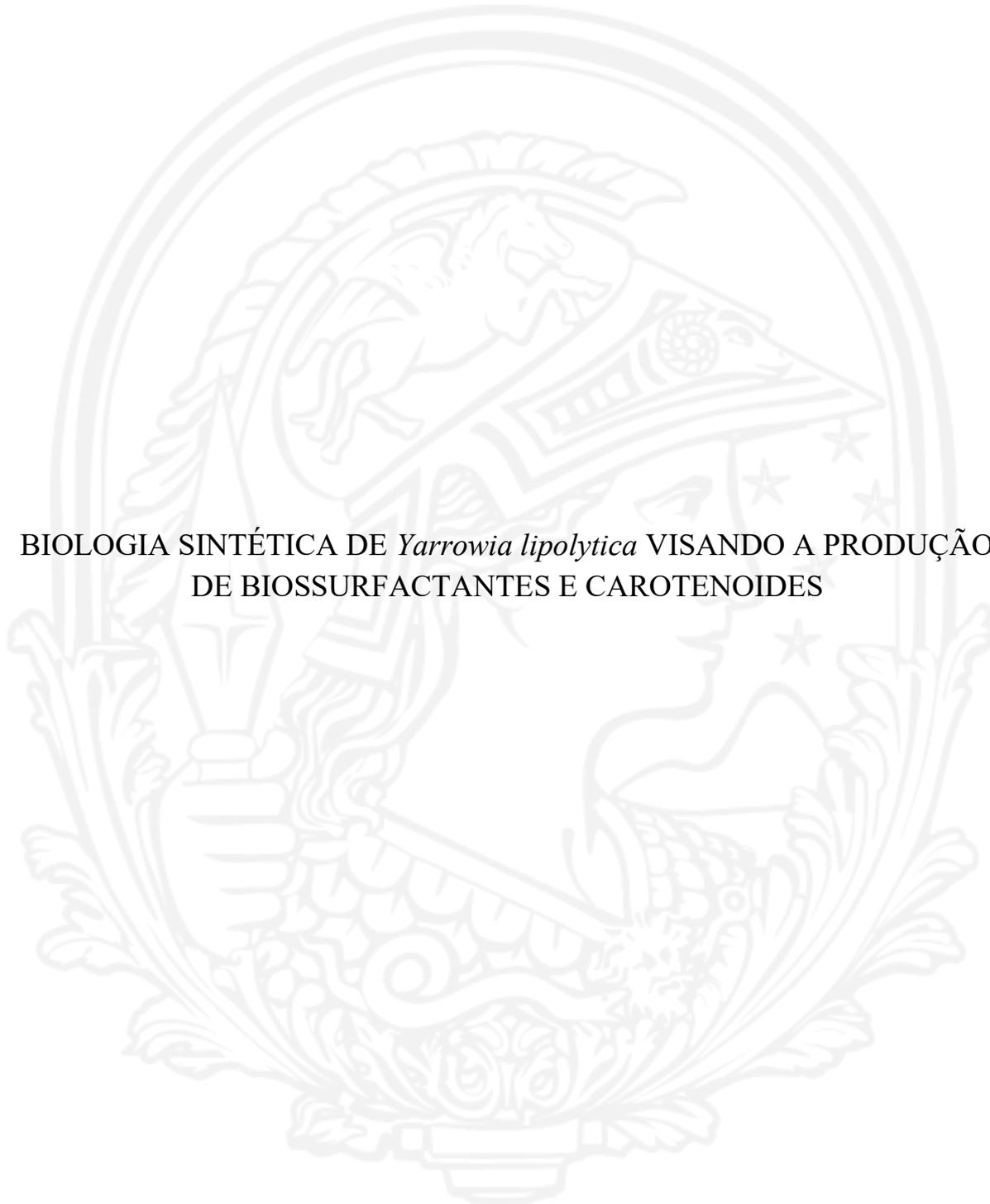


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMILLA PIRES DE SOUZA



BIOLOGIA SINTÉTICA DE *Yarrowia lipolytica* VISANDO A PRODUÇÃO  
DE BIOSURFACTANTES E CAROTENOIDES

RIO DE JANEIRO

2020

Camilla Pires de Souza

BIOLOGIA SINTÉTICA DE *Yarrowia lipolytica* VISANDO A PRODUÇÃO DE  
BIOSURFACTANTES E CAROTENOIDES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc.  
Prof<sup>a</sup>. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.  
Prof. Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

Rio de Janeiro  
2020

Camilla Pires de Souza

BIOLOGIA SINTÉTICA DE *Yarrowia lipolytica* VISANDO A PRODUÇÃO DE  
BIOSURFACTANTES E CAROTENOIDES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de  
Química, da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 04 de dezembro de 2020.

---

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc., IQ/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc., EQ/UFRJ

---

Prof. Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc., EQ/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Bianca Cruz Neves, Ph.D., IQ/UFRJ

---

Prof. Cláudio Akio Masuda, D.Sc., IBqM/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc., EQ/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Viridiana Santana Ferreira Leitão, D.Sc., INT

Rio de Janeiro  
2020

*Ao meu grande amor Cristiano, eu dedico este trabalho.  
Você é e sempre será a minha fonte de inspiração.  
Te amo.*

## AGRADECIMENTOS

*O doutorado foi uma longa e árdua trajetória, cheia de desafios e incertezas, mas de muito aprendizado, que me fizeram crescer e amadurecer em vários aspectos. Por isso, não poderia deixar de agradecer àqueles que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.*

*Aos meus pais Eliane e Antonio Lazaro, e ao meu irmão André pelo incentivo e apoio incondicional, mas especialmente minha mãe, por todo carinho e dedicação. Vocês me ensinaram a nunca desistir e viabilizaram todos os recursos necessários para que eu pudesse ir em busca dos meus sonhos. Amo vocês e muito obrigada!*

*Ao meu noivo Cristiano pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e suporte emocional em todos os momentos. Você foi essencial para que eu fosse capaz de perseverar frente aos obstáculos encontrados na vida acadêmica. Obrigada por ser essa pessoa excepcional, e por ter me presenteado com a Anádila Cristina, minha sogra querida que sempre torceu muito pelo meu sucesso. Obrigada!*

*Ao meu orientador e co-orientadores pelos valiosos ensinamentos, atenção e paciência ao longo desses anos. Ao prof. Rodrigo Almeida, que me acolheu de braços abertos em seu laboratório e me socorreu em todas as dificuldades encontradas, com muita consideração e compreensão. À prof<sup>a</sup>. Maria Alice Coelho, que sempre acreditou no meu potencial e nunca mediu esforços para me ajudar com quaisquer problemas. E, ao prof. Bernardo Ribeiro, que sempre me apoiou e confiou no meu trabalho. Sou muito grata a vocês pela oportunidade de ter feito parte desse grupo!*

*Ao prof. Jean-Marc Nicaud pela atenciosa supervisão durante o período do doutorado sanduíche no Instituto Nacional de Pesquisa para Agricultura, Alimentos e Meio Ambiente (INRAE - Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement), compartilhamento de seu vasto know-how em biologia molecular, assessoria nas técnicas empregadas, como o Golden Gate Assembly e o CRISPR/Cas9, recursos disponibilizados e todas as demais contribuições para o desenvolvimento do meu projeto. E também, à sua equipe do Laboratório de Biologia Integrativa do Metabolismo Lipídico (BIMLip - Biologie Intégrative du Métabolisme Lipidique), composta pela Lea, Heykel, Macarena, Young, Pauline e Tristan, por toda colaboração e por terem me proporcionado um ambiente bastante divertido de muitas discussões e conhecimento.*

*À todos os integrantes do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas (LaMMP), mas principalmente a Graciela, Michele, Giulia, Danielly, Luiza, Wilber, Rosane, Isabele, Araceli e Hadassa, pelo aprendizado, amizade e muita parceria. Em especial a Gabriela, por ter caminhado do meu lado do primeiro ao último dia com sua generosidade e paciência, dividindo experiências, planejando experimentos, comemorando os resultados e cada conquista; bem como a Candida, pelos sábios conselhos, companhia nos fins de semana de trabalho, e excelentes ideias. Os nossos almoços e cafés sempre alegres foram essenciais para descontrair os inúmeros momentos*

*de tensão. Nós formamos uma verdadeira família! Obrigada time LaMMP, foi um imenso prazer dividir os meus dias com vocês! E também, aos meus alunos de iniciação científica, Eduarda e Felipe, que me ajudaram bastante na bancada e me mostraram a responsabilidade e beleza que é o ato de ensinar.*

*Aos membros do Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos (BIOSE - Biological System Engineering), principalmente a Ariane, Alanna, Felipe e Luana, por compartilharem gentilmente algumas de suas experiências sobre a *Yarrowia lipolytica* que foram de grande valia, e também o Carlos Eduardo, pela ajuda com as análises no cromatógrafo gasoso.*

*À equipe do Laboratório de Biotecnologia Microbiana sob o comando da prof. Denise Freire (LaBiM), sobretudo o Rui, Francisco, Douglas e Fábio pela realização das análises de tensão superficial e momentos de descontracção.*

*À Unidade Proteômica e ao prof. Fábio Nogueira pela ajuda com as análises de espectrometria e massas, em especial, a Natalia, Jéssica e Domingos por todo o auxílio e conhecimento compartilhado.*

*Aos outros amigos que fiz no Instituto de Química (IQ) e na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), especialmente o Luís Felipe, Jéssica, Marcus, Diogo, Bianca, Marcia (in memoriam), Daniel, Igor, Rodrigo e Joab; assim como no INRAE, Gabriela, Diogo, Cecile, Caroline e Angelo, por toda ajuda, carinho, companhia, torcida, brincadeiras e sorrisos.*

*À minha grande amiga, prof. Karen Signori, por todo incentivo, apoio, carinho e conselhos em todos os momentos. Você representa para mim um verdadeiro exemplo de força, dedicação e perseverança.*

*Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) pela oportunidade de cursar o doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro através do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) e Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).*

*Por fim, à Deus por ter abençoado toda essa trajetória ...*

*... o meu mais sincero obrigada!*

*“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”*  
**Marie Curie**

## RESUMO

DE SOUZA, Camilla Pires. **Biologia sintética de *Yarrowia lipolytica* visando a produção de biossurfactantes e carotenoides**. Rio de Janeiro, 2020. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A versatilidade metabólica da levedura não-convencional *Yarrowia lipolytica* incentivou o desenvolvimento de uma vasta gama de ferramentas de biologia sintética, o que tem permitido a construção de promissoras plataformas de produção de diferentes compostos de alto valor agregado. À vista disso, o presente estudo objetivou desenvolver cepas engenheiradas de *Y. lipolytica* visando a obtenção de dois produtos de interesse biotecnológico: o manosileritritol lipídico (MEL) e o  $\beta$ -caroteno. Para a produção de MELs, os genes *emt1*, *mac1*, *mac2* e *mmf1* de *Ustilago maydis* foram clonados em cepas auxotróficas derivadas da linhagem W29 através de duas estratégias: (I) fusionados ao peptídeo autocatalítico 2A em um único cassete de expressão; e (II) separados em cassetes de expressão independentes, construídos pelo sistema *Golden Gate Assembly*. As cepas recombinantes foram capazes de sintetizar MELs em meios mínimos contendo manose e eritritol como substrato. O produto gerado pelos recombinantes provenientes da estratégia de clonagem II foi caracterizado por espectrometria de massas como MEL-C2, devido à presença apenas de um grupamento acetila na porção hidrofílica, e sua produção volumétrica alcançou 0,42 g.L<sup>-1</sup>. A clonagem da proteína transmembrana MMF1 não favoreceu a secreção do MEL-C2, e o uso do glicerol como fonte de carbono não alterou as características estruturais deste glicolipídico nas condições testadas, a fim de torna-lo relevante comercialmente. No entanto, esse é o primeiro relato na literatura da produção de MELs por *Y. lipolytica*. Para a produção de  $\beta$ -caroteno, o gene *URA3* da linhagem selvagem brasileira IMUFRJ 50682 foi nocauteado pelo método CRISPR/Cas9 através da estratégia combinatória de clivagem dupla, com eficiência de excisão de toda a sequência codificante de 5 – 28%. Os mutantes auxotróficos *ura3* $\Delta$  IMUFRJ 50682 construídos foram transformados com os genes heterólogos *carB* e *carRP* de *Mucor circinelloides*, e o gene homólogo *GGS1*. As cepas recombinantes foram capazes de sintetizar de 18,5 a 50,1 mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno, com a produção específica variando de 2,4 a 4,8 mg.g cel<sup>-1</sup> em meio rico e mínimo, contendo glicose como fonte de carbono. O emprego da glicerina loira em meio definido levou a síntese de 50,6 mg.L<sup>-1</sup> (2,9 mg.g cel<sup>-1</sup>) de carotenoides, e a redução da razão C/N permitiu que cepa recombinante carotenogênica atingisse 54,4 mg.L<sup>-1</sup> (2,7 mg.g cel<sup>-1</sup>) de carotenoides totais, composto de 91% de  $\beta$ -caroteno. A substituição dos componentes do meio por milhocina apresentou impacto positivo na síntese de carotenoides. A produtividade e as produções volumétrica e específica máximas alcançadas foram de 4,8 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 154,7 mg.L<sup>-1</sup> e 11,6 mg.g cel<sup>-1</sup>, respectivamente, mostrando pela primeira vez o potencial da cepa brasileira IMUFRJ 50682 na bioconversão de resíduos para produção em larga escala de  $\beta$ -caroteno. Assim, o presente trabalho mostra a ampla flexibilidade da espécie *Y. lipolytica* para servir como *chassi* biotecnológico em diferentes aplicações industriais.

**Palavras-chave:** *Yarrowia lipolytica*, manosileritritol lipídios,  $\beta$ -caroteno, CRISPR/Cas9, *Golden Gate Assembly*, resíduos industriais.

## ABSTRACT

DE SOUZA, Camilla Pires. **Synthetic biology of *Yarrowia lipolytica* for the production of biosurfactants and carotenoids.** Rio de Janeiro, 2020. Thesis (Doctorate in Biochemistry) - Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020

The metabolic versatility of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* has encouraged the development of a wide range of synthetic biology tools, which has allowed the construction of promising platforms for production of high added-value compounds. In view of this, the present study aimed to develop engineered strains of *Y. lipolytica* in order to obtain two products of biotechnological interest: mannosylerythritol lipid (MEL) and  $\beta$ -carotene. For MEL production, *emt1*, *mac1*, *mac2* and *mmf1* genes from *Ustilago maydis* were cloned in autotrophic strains derived from *Y. lipolytica* W29. Two cloning strategies were used: (I) genes were fused with the 2A self-cleaving peptides into a single expression cassette; and (II) genes were separated into three independent expression cassettes by the Golden Gate Assembly system. The recombinant strains were able to synthesize MELs in minimal media containing mannose and erythritol as a substrate. The product generated by the recombinants from cloning strategy II was characterized by mass spectrometry as MEL-C2, due to the presence of only an acetyl group in the hydrophilic portion, and its volumetric production reached 0.42 g.L<sup>-1</sup>. The cloning of the transmembrane protein MMF1 did not favor the secretion of MEL-C2, and the use of glycerol as a carbon source did not alter the structural characteristics of this glycolipid under the conditions tested, in order to make it commercially relevant. However, this is the first report in the literature on MEL production by *Y. lipolytica*. For  $\beta$ -carotene production, the *URA3* gene of the Brazilian IMUFRJ 50682 wild-type strain was knocked out by a combinatorial dual cleavage CRISPR/Cas9-mediated strategy. The excision efficiency of all coding sequence ranged from 5 to 28%. The *ura3* $\Delta$  IMUFRJ 50682 auxotrophic mutants were transformed with the heterologous genes *carB* and *carRP*, and the homologous gene *GGS1*. The recombinant strains were able to synthesize from 18.5 to 50.1 mg.L<sup>-1</sup> of  $\beta$ -carotene with specific production ranging from 2.4 to 4.8 mg.g cel<sup>-1</sup> in rich and minimal medium containing glucose as a carbon source. The use of crude glycerol in a defined medium led to a carotenoid production of 50.6 mg.L<sup>-1</sup> (2.9 mg.g cel<sup>-1</sup>) and the decrease of C/N ratio allowed the carotenogenic recombinant strain to reach 54.4 mg.L<sup>-1</sup> (2.7 mg.g cel<sup>-1</sup>) of total carotenoids, composed of 91% of  $\beta$ -carotene. The substitution of culture medium for corn steep liquor had a positive effect on carotenoid production. The maximum carotenoid productivity and volumetric and specific productions were 4.8 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 154.7 mg.L<sup>-1</sup> and 11.6 mg.g cel<sup>-1</sup>, respectively. It shows for the first time the potential of the Brazilian IMUFRJ 50682 strain in the bioconversion of residues for large-scale production of  $\beta$ -carotene. Thus, the present work reveals the wide flexibility of the *Y. lipolytica* species to serve as a biotechnological chassis in different industrial applications.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, mannosylerythritol lipids,  $\beta$ -caroteno, CRISPR/Cas9, Golden Gate Assembly, industrial waste.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Características morfológicas da espécie *Yarrowia lipolytica*. **(A)** Brotamento multilateral observado por microscopia eletrônica de varredura. As setas em branco indicam a presença de gêmulas nas células progenitoras (HERRERO et al., 1999). **(B)** Colônias irregulares crescidas em meio rico. **(C)** Morfologia celular leveduriforme e filamentosa verificada por microscopia óptica de contraste de fase. As setas em azul mostram células em conformação de leveduras, e em vermelho, em forma de hifas (HURTADO; RACHUBINSKI, 2002).....30
- Figura 1.2.** Principais matérias-primas e subprodutos gerados no mundo (Adaptado de WANG et al., 2019).....35
- Figura 1.3.** Sistema *Golden Gate Assembly* dedicado a *Yarrowia lipolytica*. **(A)** Representação esquemática do princípio do método. **(B)** Vetores de expressão com uma, duas ou três unidades transcricionais que podem ser construídos a partir de uma biblioteca previamente desenvolvida. **(C)** Biblioteca de vetores doadores customizada para *Y. lipolytica*. As sequências de quatro nucleotídeos nomeadas pelas letras de A-M indicam as saliências ou *overhangs* geradas após a ação da enzima de restrição *BsaI*. *SI*: sítios de inserção; *MS*: marca de seleção; *P*: promotor; *G*: gene; *T*: terminador (Adaptado de CELIŃSKA et al., 2017; LARROUDE et al., 2019).....38
- Figura 1.4.** Marcos importantes na descoberta do sistema CRISPR-Cas. *Genes cas*: codificam as nucleases Cas. *crRNA*: RNA CRISPR. *gRNA*: RNA guia. *transcrRNA*: RNA transativadores. *PAM*: motivo adjacente ao protoespaçador. *DSBs*: quebras na fita dupla do DNA (Adaptado de HSU et al., 2014; SINGH, 2020).....39
- Figura 1.5.** Imunização de procariotos pelo sistema CRISPR/Cas. *Adaptação*: mecanismo de captação e inserção do DNA exógeno no locus CRISPR (espaçadores), após a sequência líder (L) e entre as repetições. *Expressão ou biogênese do crRNA (RNA CRISPR)*: processo de formação do complexo RNA guia-nuclease Cas. *Interferência*: etapa de reconhecimento do material genético invasor por complementariedade das sequências e clivagem por reconhecimento do PAM (motivo adjacente ao protoespaçador) (Adaptado de MARRAFFINI, 2015).....40
- Figura 1.6.** Mecanismo de edição de genomas eucarióticos por CRISPR/Cas9. A proteína Cas9 combinada com o sgRNA (RNA guia único), composto por crRNA (RNA CRISPR)-tracrRNA (RNA transativador auxiliar), ao encontrar uma região complementar ao espaçador de 20 nucleotídeos e a sequência PAM (motivo adjacente ao protoespaçador) no DNA genômico, gera DSB (quebras nas fitas duplas) pelos seus domínios catalíticos HNH e RuvC. Na ausência de DNA exógeno, a via NHEJ (junção de extremidade não-homóloga), propensa a erro, é ativada e causa inserções e deleções aleatórias (*indels*) ou até mesmo substituições no local DSB, frequentemente resultando na interrupção da função do gene. Na presença de um DNA doador contendo uma sequência de interesse flanqueada por regiões de homologia, a via de reparo dirigido por HR (recombinação homóloga) pode ser iniciada e leva a inserção (*knocked-in*) do fragmento no genoma da célula (Adaptado de JIANG; DOUDNA, 2017)....42
- Figura 2.1.** Estrutura química convencional dos manosileritritol lipídios ( $n = 2$  a  $18$ ;  $R_1$  e  $R_2$  = radicais; Ac = grupos acetila) (MORITA et al., 2015).....46
- Figura 2.2.** Estrutura química não-convencional dos glicolipídios baseados em manose ( $n = 4$  a  $16$ ;  $m = 6$  a  $16$ ;  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  = radicais) (MORITA et al., 2015).....47

**Figura 2.3.** Biossíntese de manosileritritol lipídios descrita para a espécie *Ustilago maydis* UM521. Os genes *emt1*, *mac1*, *mac2*, *mat1* e *mmf1* estão rearranjados em um cluster gênico localizado no cromossomo 7. A manosiltransferase vacuolar Emt1 é responsável pela manosilação do eritritol através da GDP-manose (guanósina difosfato manose) para a formação do manosileritritol. O dissacarídeo é encaminhado para o peroxissoma, onde sofrerá acilação pela ação das aciltransferases Mac1 e Mac2, a partir de cadeias acil-CoAs provenientes da  $\beta$ -oxidação peroxissomal. O MEL diacilado é direcionado ao citosol e pode sofrer acetilações pela acetiltransferase Mat1. O glicolípido diacetilado (MEL-A), monoacetilado (MEL-B, -C) e/ou desacetilado (MEL-D) sintetizado é, então, secretado pela proteína transmembrana MMF1. *GDP*: guanósina difosfato. *CoA*: coenzima A (Adaptado de HEWALD et al., 2006; FREITAG et al., 2014).....49

**Figura 2.4.** Vias de acúmulo de lipídios em *Yarrowia lipolytica*. Na via *de novo*, a limitação de nitrogênio e elevadas concentrações de glicose levam a um aumento da concentração de acetil-CoA intramitocondrial, decorrente da desaminação da AMP (adenosina monofosfato) pela ação da enzima AMPD (AMP desaminase), resultando na acumulação de citrato nas mitocôndrias. O citrato em excesso é transportado para o citosol e clivado em acetil-CoA e oxalacetato pela ACL (ATP citrato liase). O acetil-CoA citosólico é convertido em malonil-CoA pela ACC (acetil-CoA carboxilase). Esses precursores e o NADPH fornecido pela via das PPP (pentoses fosfato) são empregados na síntese de acil-CoAs pelo FAS (ácido graxo sintase). Na via *ex novo*, os ácidos graxos livres em excesso no meio, são transportados para o citosol e ativados através da adição da coenzima A pela ACS (acil-CoA sintetase). Os acil-CoAs formados participam da síntese de triacilglicerol (TAG), os quais são estocados em corpúsculos lipídicos e degradados pela  $\beta$ -oxidação peroxissomal. *G6P*: glicose-6-fosfato. *DHAP*: dihidroxiacetona-fosfato. *GAP*: gliceraldeído-3-fosfato. *ATP*: adenosina trifosfato. *Ru5P*: ribulose 5-fosfato. *X5P*: xilulose 5-fosfato. *E4P*: eritrose 4-fosfato. *LPA*: ácido lisofosfatídico. *PA*: ácido fosfatídico. *DAG*: diacilglicerol. *PL*: fosfolípido. *FA*: ácido graxo (Adaptado de MLÍČKOVÁ et al., 2004; ABDEL-MAWGOUD et al., 2018).....56

**Figura 2.5.** Via de síntese de GDP-manose em *Yarrowia lipolytica*. A frutose-6-fosfato proveniente da glicólise é isomerizada a manose-6-fosfato pela enzima MPI (fosfomanose isomerase), a qual é convertida em manose-1-fosfato pela PPM (fosfomanomutase). Esta recebe uma molécula de GDP (difosfato de guanósina) pela ação da GMP (GDP-manose pirofosforilase), formando a GDP-manose. *GTP*: trifosfato de guanósina. *PPi*: pirofosfato (Adaptado de HOLLANDS et al., 2019).....57

**Figura 2.6.** Vias de produção e assimilação de eritritol por *Yarrowia lipolytica*. O glicerol empregado como fonte de carbono é fosforilado pela enzima GK (glicerol quinase) e subsequentemente desidrogenado para formar DHAP (dihidroxiacetona- fosfato), a qual é convertida em GAP (gliceraldeído-3-fosfato). O GAP entra na via das PPP (pentoses fosfato), onde a enzima TK (transcetolase) o converte em eritrose-4-fosfato, que é desfosforilado pela E4PP (eritrose-4-fosfato fosfatase) e reduzido pela ER (eritrose redutase) para formar o eritritol. Dependendo das condições ambientais, o eritritol pode ser consumido, pela ação das enzimas EDH (eritritol desidrogenase) e EK (eritrolase quinase), levando a formação de eritrolase e eritrolase-fosfato, respectivamente. A eritrolase-fosfato pode ser convertida a DHAP e participar da síntese de diferentes moléculas. *NADH*: nicotinamida adenina dinucleotídeo. *NADP<sup>+</sup>*: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de MIROŃCZUK et al., 2016; CARLY et al., 2018).....58

**Figura 2.7.** Atividade do peptídeo autocatalítico 2A. A proteína *upstream* ao peptídeo autocatalítico é traduzida até a adição da última glicina (G) do 2A (i). O peptidil-tRNA é

translocado do sítio A para o P (ii) e possibilita a entrada do tRNA<sup>Pro</sup> (RNA transportador ligado ao aminoácido prolina) (iii), o qual é incapaz de atacar a ligação éster peptidil-tRNA<sup>Gli</sup>, permitindo que ocorra a hidrólise da ligação entre o tRNA e o polipeptídeo (iv) para a sua liberação (v). O tRNA desacilado presente no sítio P viabiliza a translocação do tRNA<sup>Pro</sup>, ao invés do em vez do peptidil-tRNA, dos sítios A para P, para a tradução da proteína *downstream* ao peptídeo 2A seguir até o *stop codon* (vi). *mRNA*: RNA mensageiro. *Sítio A*: sítio aminoacil-tRNA. *Sítio P*: sítio peptidil-tRNA. *Sítio E*: sítio de saída (Adaptado de DONNELLY et al., 2001b).....60

**Figura 2.8.** Representação esquemática dos experimentos realizados para a biossíntese de manosileritritol lipídios por *Yarrowia lipolytica* geneticamente modificada. *TS*: tensão superficial. *IE*: índice de emulsificação. *TLC*: cromatografia em camada delgada. *HPLC-RID*: cromatografia líquida de alta eficiência com o detector de índice de refração. *GC-MS*: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *ESI-MS*: espectrometria de massas com ionização *electrospray*. A linha pontilhada destaca as etapas desenvolvidas no INRAE (Jouy-en-Josas, França), sob orientação do Prof. Jean-Marc Nicaud.....63

**Figura 2.9.** Estratégia de co-expressão gênica utilizando o peptídeo autocatalítico F2A. **(A)** Sequência aprimorada do peptídeo autocatalítico contendo 14 aminoácidos do 1D e 18 aminoácidos do 2A provenientes do FMDV, seguido de uma prolina (P), com os códons otimizados para *Y. lipolytica*. **(B)** Mapa do vetor pYLEX1-*emt1*-*mac1*-*mac2* de 12.621 pb. *hp4d*: promotor composto por quatro cópias do UAS1B e pLEU2. *emt1*: gene que codifica a manosiltransferase Emt1. *F2A*: peptídeo autocatalítico. *mac1PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac1<sub>Cit</sub>. *mac2PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac2<sub>Cit</sub>. *XPR2t*: terminador. *LEU2*: marca de seleção auxotrófica para leucina (levedura). *AmpR*: marca de seleção de resistência ao antibiótico ampicilina (bactéria); *ori*: origem de replicação bacteriana; *NotI*: sítio de restrição para linearização do vetor.....77

**Figura 2.10.** Eletroforese em gel de agarose à 1% (m/v) dos produtos de PCR para confirmação do transformante Polg-EMM. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb* (*ThermoFisher*). 2 e 3: pYLEX1-*emt1*-*mac1*-*mac2*, controle positivo. 4 e 5: Polg-EMM. 6 e 7: Polg-CN, controle negativo.....79

**Figura 2.11.** Cinética de crescimento da cepa Polg-EMM durante cultivo em microplaca contendo meio com diferentes concentrações de eritritol e manose, a 28°C e constante agitação por 48 h. **(A)** Cultivo em YNBE(0-2%). **(B)** Cultivo em YNBE1%M(1-2,5%).....80

**Figura 2.12.** Perfil de crescimento das estirpes Polg-CN (●) e Polg-EMM (▲) durante 96 h de cultivo a 28°C e 250 rpm no meio YNBE1%M2% em frascos agitados.....81

**Figura 2.13.** *Thin Layer Chromatography* dos extratos EB<sub>CN</sub> e EB<sub>EMM</sub>. 1: Manosileritritol lipídios (MELs) produzido pela cepa *Moesziomyces aphidis* em óleo de soja, conforme metodologia descrita por Rau et al., 2005. 2: Padrão de MEL-B (*Toyobo*). 3 e 4: EB<sub>CN</sub>. 5 e 6: EB<sub>EMM</sub>.....83

**Figura 2.14.** Hidrólise ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M à 100 °C) do padrão de manosileritritol lipídios (MELs) na concentração de 1g.L<sup>-1</sup> durante 3 a 7 h, com a quantificação de manose e eritritol (g.L<sup>-1</sup>) e dos MELs em função dos equivalentes de eritritol e manose (g.L<sup>-1</sup>). Este cálculo foi realizado de acordo com o fator de correção ( $f_{c\text{manose}} = 3,61$   $f_{c\text{eritritol}} = 5,33$ ) gerado a partir da determinação dos pesos moleculares dos variantes de MELs por *Electrospray Ionization - Mass Spectrometry* (ESI-MS).....84

**Figura 2.15.** Cromatogramas dos EB<sub>CN</sub> e EB<sub>EMM</sub> hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M à 100 °C durante 4 h obtidos por *High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index Detector* (HPLC-RID). As setas em vermelho indicam os tempos de retenção da manose e do eritritol. A imagem destacada pela linha pontilhada refere-se à sobreposição dos cromatogramas dos padrões de manose e eritritol submetidos ao processo de hidrólise (em azul), do EB<sub>EMM</sub> hidrolisado (em vermelho), e EB<sub>EMM</sub> não-hidrolisado (em verde).....85

**Figura 2.16.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos genes de interesse amplificados com as sequências requeridas para o *Golden Gate Assembly* a partir do pUC57-*emt1-mac1-mac2*. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2: *emt1*. 3:*mac1PTS1Δ*. 4: *mac2PTS1Δ*.....86

**Figura 2.17.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) das colônias isoladas após as reações para a montagem do novo vetor de expressão. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2, 3 e 4: clone 1. 5, 6 e 7: clone 2. 8, 9 e 10: clone 3. 11, 12 e 13: clone 4. As bandas referentes aos genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ* possuem 473, 693 e 860 pb, respectivamente, conforme indicado pelas setas em vermelho.....87

**Figura 2.18.** Mapa do vetor pGGA- *emt1-mac1-mac2* de 10.964 pb. *pTEF*: promotor constitutivo nativo. *emt1*: gene que codifica a manosiltransferase Emt1. *tLip2*: terminador nativo. *mac1PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac1<sub>Cit</sub>. *mac2PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac2<sub>Cit</sub>. *URA3*: marca de seleção auxotrófica para uracila (levedura). *zetaUp/Down*: sítio de inserção zeta. *AmpR*: marca de seleção de resistência ao antibiótico ampicilina (bactéria). *ori*: origem de replicação bacteriana *ColE1*; *NotI*: sítio de restrição para linearização do vetor.....88

**Figura 2.19.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos produtos de PCR para confirmação dos transformantes JME<sup>+</sup>(A) e JME<sup>-</sup>(B). 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2 a 11: colônias rastreadas.....91

**Figura 2.20.** Cinética de crescimento das cepas JME<sup>+</sup>EMM (A) e JME<sup>-</sup>EMM (B) durante cultivo em microplacas contendo o meio YNBE1%M(1-2,5%), a 28°C e constante agitação por 48 h.....92

**Figura 2.21.** Biomassa celular seca, tensão superficial e índice de emulsificação obtidos a partir dos cultivos em YNBEM das cepas JM-CN, JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM a 28 °C e 250 rpm durante 96 h. (A) Meio YNBE1%M1%. (B) Meio YNBE1%M2%. (em azul), Tensão Superficial (em verde), e Índice de Emulsificação (em vermelho).....93

**Figura 2.22.** Perfil de fragmentação do íon de *m/z* 349 detectado nos extratos brutos das cepas recombinantes JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM cultivadas nos meios YNBE1%M1% e YNBE1%M2%. A imagem destacada pela linha pontilhada caracteriza a perda do eritritol (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>, em vermelho), acetato (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, em azul) e da manose + C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>, em verde). Os íons de fragmentação marcados indicam os fragmentos remanescentes: eritritol (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>, em verde), manose + C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>, em vermelho) e manosileritritol (C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>, em azul); com os íons [M+Na]<sup>+</sup> teóricos.....95

**Figura 2.23.** Produção de manosileritritol lipídios pelas cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM em meio YNBE1%M1% e YNBE1%M2% durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 250 rpm por 96 h.....97

**Figura 2.24.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) da confirmação da montagem correta do vetor pGGA-mmfl por PCR e digestão com *NotI*. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2 a 4: produtos do PCR com os oligos Fw-mmfl/Rv-mmfl. 5 a 7: reação com *NotI*. As setas em vermelho indicam as bandas referentes ao cassette integrativo (5.368 pb) e *backbone* bacteriano (2.150 pb).....99

**Figura 2.25.** Mapa do vetor pGGA-mmfl de 7.518 pb. *pTEF*: promotor constitutivo nativo. *mmfl*: gene que codifica o transportador Mmfl. *iLip2*: terminador nativo. *LYS5*: marca de seleção auxotrófica para lisina (levedura). *zetaUp/Down*: sítio de inserção zeta. *AmpR*: marca de seleção de resistência ao antibiótico ampicilina (bactéria). *ori*: origem de replicação bacteriana *ColE1*; *NotI*: sítio de restrição para linearização do vetor.....100

**Figura 2.26.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos produtos de PCR para confirmação dos clones. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*New England Biolabs*). 2 a 5: colônias JME<sup>+</sup>K<sup>-</sup>EMM rastreadas. 6 a 9: colônias e JME<sup>-</sup>K<sup>-</sup>EMM rastreadas.....100

**Figura 2.27.** Cinética de crescimento das cepas recombinantes durante cultivo em microplacas contendo o meio YNBEM, a 28 °C e constante agitação por 48 h. (A) Cultivo de JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>+</sup>EMMM em YNBE1%M1%. (B) Cultivo de JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>+</sup>EMMM em YNBE1%M2%. (C) Cultivo de JME<sup>-</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMMM em YNBE1%M1%. (D) Cultivo de JME<sup>-</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMMM em YNBE1%M2%.....101

**Figura 2.28.** Produção de biomassa e manosileritritol lipídios pelas cepas JME<sup>+</sup>EMMM e JME<sup>-</sup>EMMM e suas respectivas precursoras em meio YNBE1%M1% e YNBE1%M2% durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 250 rpm por 96 h. (A) Meio YNBE1%M1%. (B) Meio YNBE1%M2%. Biomassa (em azul) e Manosileritritol lipídios (em verde).....102

**Figura 2.29.** Cinética da fermentação em YNBG12% (C/N 105 e pH 4) a 28 °C, 250 rpm durante 168 h. (A) JM-CN. (B) JME<sup>-</sup>EMM. (C) JME<sup>-</sup>EMMM. Biomassa (●). Glicerol (◆). Eritritol (▲).....105

**Figura 3.1.** Estrutura química do  $\beta$ -caroteno (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2011).....110

**Figura 3.2.** Biossíntese de isoprenos. Na via do MVA (mevalonato), duas moléculas de acetil-CoA são condensadas por uma tiolase para formar o acetoacetil-CoA, o qual é convertido em HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) pela HMG-CoA sintase, e subsequentemente em MVA pela HMG-CoA redutase. O MVA é transformado em MVAPP (difosfomevalonato) pela ação das enzimas MVA/MVAP (fosfomevalonato) quinase, e descarboxilado pela MVAPP descarboxilase para gerar o IPP (isopentenil pirofosfato). Na via do MEP (metileritritol fosfato), o piruvato é condensado ao gliceraldeído-3-fosfato pela DXP (1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato) sintase, para formar o DXP, que é reduzido em MEP pela DXP redutase. O MEP é convertido em HMBPP (a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato) pelas enzimas CDPME (4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol) sintase e quinase, MEC (2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato) sintetase e HMBPP sintase, o qual é reduzido em IPP e DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) pela HMBPP redutase. O DMAPP pode ser convertido em IPP através de uma reação reversível catalisada pela enzima IPP isomerase. *PDK*: complexo piruvato desidrogenase (Adaptado de VAYSSE et al., 2012).....113

**Figura 3.3.** Via biossintética de  $\beta$ -caroteno. A síntese de carotenoides em bactérias, fungos e plantas ocorre de forma bastante maneira similar, divergindo nos genes necessários em cada

etapa. De maneira geral, o DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) é condensado ao IPP (isopentenil pirofosfato) para formar o GPP (geranil difosfato), pela ação de uma GPP sintase. O GPP recebe mais uma ou duas moléculas de IPP, afim de gerar o FPP (farnesil difosfato) ou GGPP (geranil geranil difosfato), respectivamente. A condensação de duas moléculas de GGPP, catalisada pela enzima fitoeno sintase, leva a formação do fitoeno, o primeiro intermediário da via biossintética dos carotenoides. Em seguida, o fitoeno é convertido em fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno e licopeno por fitoeno desaturases, e subsequentemente em  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno por licopeno ciclases. Os genes destacados em azul, vermelho e verde codificam tais enzimas em bactérias, fungos e plantas, respectivamente (Adaptado de MAOKA, 2020).....115

**Figura 3.4.** Valor de mercado global de  $\beta$ -caroteno por aplicação no período de 2014 – 2024, em milhões de dólares (Adaptado de GRAND VIEW REPORT, 2020).....120

**Figura 3.5.** Biossíntese de  $\beta$ -caroteno por *Yarrowia lipolytica*. O acetil-CoA sintetizado é convertido em acetoacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA tiolase, a qual é codificada pelo gene *ERG10*, e subsequentemente em HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA) pela enzima HMG-CoA sintase, que é codificada pelo gene *ERG13*. Então, o HMG-CoA é reduzido a MVA (mevalonato) pela enzima HMG-CoA redutase, codificada pelo gene por *HMG1*, com gasto de duas moléculas de NADPH. O MVA é fosforilado e descarboxilado para formar o IPP (isopentenil pirofosfato), o qual é isomerizado em DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) pela ação da enzima sintetizada pelo gene *IDI*. A condensação de duas moléculas de IPP ao DMAPP leva a formação do FPP (farnesil difosfato), o qual recebe mais um IPP para gerar GGPP (geranil geranil difosfato), em reação catalisada pela enzima GGPP sintase, que é codificada pelo gene *GGS1*. Para ser capaz de sintetizar o  $\beta$ -caroteno, a *Y. lipolytica* requer a clonagem de genes heterólogos que codificam enzimas com atividades de fitoeno sintase, fitoeno desaturase e licopeno ciclase (em destaque). Os carotenos gerados são preferencialmente estocados nos corpúsculos lipídios. *TCA*: ciclo do ácido tricarbóxico. *TAG*: triacilglicerol (Adaptado de Zhang et al., 2020).....123

**Figura 3.6.** Representação esquemática dos experimentos realizados para a biossíntese de carotenoides por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 recombinante.....128

**Figura 3.7.** Deleção do gene *URA3* de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 por estratégia de clivagem dupla baseada no sistema CRISPR/Cas9 para a construção de mutantes auxotróficos. **(A)** Sítios dos sgRNAs (*single guide RNAs*) *upstream* e *downstream* ao gene *URA3* e as combinações realizadas entre os sgRNAs UTSS (*URA3 Transcription Start Site*) e sgRNA UTES (*URA3 Transcription End Site*). Os números entre parênteses mostram o tamanho do fragmento a ser perdido por meio da dupla quebra da fita dupla. A posição +1 indica *start codon* (ATG) e as localizações dos sgRNAs são apresentadas por sua distância da sequência da sequência codificante (em pares de bases). **(B)** Vetores CRISPR/Cas9 construídos pelo sistema *Golden Gate Assembly*. *GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP* e *GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP*: vetores de destino pré-montados. *p8UASTE*F: promotor composto por oito cópias do UAS1B e pTEF. *Cas9*: gene que codifica a nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes* com os códons otimizados para *Y. lipolytica* e fusionados ao sinal SV40. *pSCR1'-tRNA*: promotor da RNA polimerase III combinado com tRNA glicina. *RFP*: gene que codifica uma proteína fluorescente de coloração vermelha, flanqueado por sítios de restrição *BsmBI*. *NatR*: cassete que confere resistência a noursetricina (levedura). *HygR*: cassete que confere resistência a higromicina B (levedura). *ylARS*: sequências de replicação autônoma. *ColE1/AmpR*: origem de replicação e marca de seleção de resistência ao

antibiótico ampicilina (bactéria).....137

**Figura 3.8.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos vetores CRISPR/Cas9 construídos por *Golden Gate* e digeridos pela enzima *BglIII* para a confirmação da montagem correta. **(A)** Vetor CC\_sgRNA-UTSS1. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2: GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP (controle negativo). 3 a 5: plasmídeos rastreados pela inserção do sgRNA UTSS1. **(B)** Vetores CC\_sgRNA-UTSS2, CC\_sgRNA-UTES1 e CC\_sgRNA-UTES2. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2: GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP (controle negativo). 3 a 5: plasmídeos rastreados pela presença do sgRNA UTSS2. 6: GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP (controle negativo). 7 a 9: plasmídeos rastreados pela presença do sgRNAs UTES1. 10 a 12: plasmídeos rastreados pela presença do sgRNA UTES2. As setas em vermelho indicam o tamanho esperado dos fragmentos após a digestão.....138

**Figura 3.9.** Verificação fenotípica e genotípica dos co-transformantes. **(A)** Triagem dos mutantes auxotróficos nos meios YNB, YNB-Ura e YPD. As setas vermelhas indicam a presença de colônias. **(B)** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) da PCR de colônia dos candidatos incapazes de crescer em meio YNB. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*New England Biolabs*). 2: IMUFRJ 50682. 3: C01. 4: C02. 5: C07. 6: C08. 7: C09. 8: C10. 9: C13. 10: C23. 11: C59. 12: C60. 13: C62. Fragmentos com  $\leq 500$  bp mostram excisão de *URA3*.....139

**Figura 3.10.** Alinhamento múltiplo entre sequências amplificadas do gene *URA3* nativo e alguns mutantes auxotróficos. As letras em azul representam os sgRNAs UTSS1 e UTES1, as letras em verde mostram a sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), as setas vermelhas mostram o local de clivagem previsto e os *indels* estão sublinhados.....141

**Figura 3.11.** Bases PAM-proximais localizadas nos sgRNAs UTSS e UTES. As letras em verde representam a sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), as letras em azul indicam as sequências alvos de 20 nucleotídeos dos sgRNAs, as setas azuis mostram a direção de sgRNAs e as letras em vermelho destacam as bases desfavoráveis para a clivagem de Cas9.....141

**Figura 3.12.** Cura plasmidial dos mutantes *uraΔ* IMUFRJ 50682.....142

**Figura 3.13.** Cepas IMUFRJ 50682 produtoras de carotenoides em meio YNB.....144

**Figura 3.14.** Cinética de crescimento celular da linhagem selvagem IMUFRJ 50682 e os recombinantes construídos, durante o cultivo em microplaca a 28 °C, 500 rpm por 10 h. **(A)** Meio YPD. **(B)** Meio YNB. \*Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).....144

**Figura 3.15.** Concentração e rendimento de  $\beta$ -caroteno obtido pelas cepas recombinantes CRP13, CRP23 e CRP59 durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 200 rpm por 96 h. **(A)** Meio YPD. **(B)** Meio YNB. \* Indica diferença estatística entre os conjuntos de dados para cada meio - *One-Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ).....145

**Figura 3.16.** Triagem dos recombinantes carotenogênicos em meio contendo glicerol como substrato. **(A)** Alíquotas retiradas ao final do cultivo. **(B)** Consumo de glicerol e produção de biomassa e  $\beta$ -caroteno pelas cepas recombinantes CRP13, CRP23 e CRP59, durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 200 rpm por 120 h. \* Indica diferença estatisticamente significativa - *One-Way ANOVA* ( $p > 0,05$ ).....147

**Figura 3.17.** Produção de carotenos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 a 28 °C e 200 rpm durante 96 h. **(A)** Meio MGP55. **(B)** Meio MGL55. Biomassa (▲). Glicerol (■). Carotenoides (●).....149

**Figura 3.18.** Produção de carotenos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 a 28 °C e 200 rpm durante 96 h. **(A)** Meio MGL35. **(B)** Meio MGL85. Biomassa (▲). Glicerol (■). Carotenoides (●).....152

**Figura 3.19.** Pureza do  $\beta$ -caroteno extraídos durante o cultivo nos meios MGP55, MGL35, MGL55 e MGL85.....154

**Figura 3.20.** Produção de carotenos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 a partir de 3,5% de glicerina e diferentes concentrações de milhocina (MM10 = 1%, MM20 = 2%, MM30 = 3%), durante cultivo em frascos agitados a 28 °C, 200 rpm e 96 h.....155

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 2.1.</b> Produção de manosileritritol lipídios em frascos agitados pelas espécies naturalmente produtoras a partir de diferentes substratos, com suas produtividades ( $Q_{MEL}$ ) e principais variantes de MELs sintetizados.....                                   | 51  |
| <b>Tabela 2.2.</b> Lista dos genes, microrganismos, plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados no estudo sobre a síntese de manosileritritol lipídios por <i>Yarrowia lipolytica</i> recombinante.....   | 64  |
| <b>Tabela 2.3.</b> Tensão superficial e índice de emulsificação dos extratos brutos obtidos a partir dos cultivos em YNBE1%M2% das cepas Polg-CN e Polg-EMM.....  | 82  |
| <b>Tabela 2.4.</b> Manosileritritol lipídio produzido pelas cepas JME <sup>+</sup> EMM e JME <sup>-</sup> EMM a partir de fermentações nos meios YNBE1%M1% e YNBME1%M2%, identificados por <i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i> .....                               | 95  |
| <b>Tabela 2.5.</b> Acúmulo de biomassa seca e tensão superficial dos cultivos em microplaca para a triagem das cepas recombinantes de <i>Yarrowia lipolytica</i> no meio YNBG8%, a 30 °C 500 rpm por 120 h.....   | 104 |
| <b>Tabela 2.6.</b> Tensão superficial do sobrenadante e extratos brutos dos cultivos em frascos agitados no meio YNBG12%, a 28 °C 500 rpm por 120 h.....  | 106 |
| <b>Tabela 3.1.</b> Organismos produtores de $\beta$ -caroteno encontrados na natureza e suas concentrações em mg.g <sup>-1</sup> de massa seca e mg.L <sup>-1</sup> de carotenoides totais.....   | 112 |
| <b>Tabela 3.2.</b> Estratégias para produção biotecnológica de $\beta$ -caroteno descritas na literatura a partir de diferentes microrganismos, com os rendimentos e produtividades dos bioprocessos.....   | 117 |
| <b>Tabela 3.3.</b> Produtos disponíveis no mercado contendo $\beta$ -caroteno de fonte natural em sua composição.....   | 121 |
| <b>Tabela 3.4.</b> Estudos pioneiros e suas principais estratégias gênicas para o desenvolvimento de diferentes cepas de <i>Yarrowia lipolytica</i> produtoras de $\beta$ -caroteno e licopeno, bem como condições de fermentação empregadas e rendimento final de produto..... | 122 |
| <b>Tabela 3.5.</b> Lista dos plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados no estudo sobre a síntese de carotenoides por <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 recombinante.....  | 128 |
| <b>Tabela 3.6.</b> Meios empregados no estudo sobre a avaliação da produção de carotenoides por <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 geneticamente modificada.....   | 130 |
| <b>Tabela 3.7.</b> Composição da glicerina empregada com substrato alternativo nos meios de produção.....   | 130 |
| <b>Tabela 3.8.</b> Especificação da milhocina utilizada nos meios de produção, de acordo com análise realizada pelo Laboratório Agrônomo S/C Ltda.....  | 131 |
| <b>Tabela 3.9.</b> Eficiência da deleção do gene <i>URA3</i> de <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 pela estratégia combinatória de clivagem dupla baseada na tecnologia CRISPR/Cas9.....   | 140 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 3.10.</b> Parâmetros dos cultivos de <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 CRP23 em meio definido MGP55 e MGL55.....  | 149 |
| <b>Tabela 3.11.</b> Parâmetros dos cultivos de <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 CRP23 nos meios definidos MGL35, MGL55 e MGL85 a partir do uso da glicerina loira como matéria-prima de baixo custo..... | 152 |
| <b>Tabela 3.12.</b> Parâmetros dos cultivos de <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 CRP23 nos meios contendo apenas resíduos industriais MM10, MM20 e MM30.....  | 156 |
| <b>Tabela 3.13.</b> Estratégia gênica, produção volumétrica, produtividade e substrato empregado para produção de carotenos por <i>Yarrowia lipolytica</i> recombinante em cultivo em frascos agitados.....     | 158 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                      |  |
|----------------------|--|
| ACC                  | Acetil-CoA carboxilase   |
| ACL                  | ATP citrato liase  |
| ACS                  | Acil-CoA sintase   |
| ADP                  | Adenosina difosfato  |
| AM                   | Mutantes auxotróficos  |
| AMPD                 | AMD desaminase   |
| ANOVA                | Análise de Variância   |
| ATP                  | Adenosina trifosfato   |
| BHT                  | Butil hidroxitolueno   |
| BLAST                | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>   |
| C/N                  | Razão carbono/nitrogênio   |
| CID                  | <i>Collision Induced Dissociation</i>  |
| CoA                  | Coenzima A   |
| CRISPR/Cas9          | Repetições palindrômicas curtas, interespaçadas e regularmente agrupadas associadas a proteína 9 |
| CRP                  | Cepas recombinantes produtoras de carotenoides   |
| crRNA                | RNA CRISPR   |
| DMAPP                | Pirofosfato de dimetilalilo  |
| DNA                  | Ácido desoxirribonucleico  |
| DO                   | Densidade óptica   |
| DSBs                 | Quebras na fita dupla do DNA   |
| DXP                  | 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato  |
| E4PK                 | Eritrose-4-fosfato quinase   |
| EB                   | Extrato bruto da extração do sobrenadante com acetato de etila                                   |
| EDH                  | Eritritol desidrogenase  |
| EK                   | Eritrulose quinase   |
| Emt1 ( <i>emt1</i> ) | Manosiltransferase vacuolar (gene que codifica a enzima em <i>Ustilago maydis</i> )              |
| ER                   | Eritrose redutase  |
| ESI-MS               | Espectrometria de massas com ionização <i>eletrospray</i> .                                      |
| F2A                  | Peptídeo autocatalítico do vírus <i>Foot and Mouth Virus Disease</i>                             |
| FAS                  | Ácido graxo sintase  |
| FDA                  | <i>Food and Drug Administration</i>  |
| FMVD                 | <i>Foot and Mouth Virus Disease</i>  |
| FPP                  | Farnesil difosfato   |
| GC                   | Conteúdo de guanina e citosina   |
| GC-MS                | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas   |
| GC-MS                | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas   |
| GDP-manose           | Guanosina difosfato manose   |
| GGA                  | <i>Golden Gate Assembly</i>  |

|  |  |
|--|--|
| GGPP                                     | Geranyl geranyl difosfato  |
| GMP                                      | GDP-manose pirofosforilase   |
| GPP                                      | Geranyl difosfato  |
| GRAS                                     | Geralmente reconhecido como seguro   |
| gRNA                                     | RNA guia   |
| HCD                                      | <i>Higher Energy Collision Induced Dissociation</i>  |
| HMEJ                                     | Junção de extremidade homóloga   |
| HMG-CoA                                  | 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA  |
| HPLC-DAD                                 | Cromatografia líquida de alta eficiência com o detector de arranjo diodos  |
| HPLC-RID                                 | Cromatografia líquida de alta eficiência com o detector de índice de refração  |
| HR                                       | Recombinação homóloga  |
| IDH                                      | Isocitrato desidrogenase   |
| IE                                       | Índice de emulsificação  |
| IPP                                      | Pirofosfato de isopentenilo  |
| JME <sup>+</sup> EMM                     | Cepa recombinante capaz de consumir eritritol contendo os genes <i>emt1</i> , <i>mac1</i> e <i>mac</i>                 |
| JME <sup>+</sup> EMMM                    | Cepa recombinante capaz de consumir eritritol contendo os genes <i>emt1</i> , <i>mac1</i> , <i>mac</i> e <i>mmf1</i>   |
| JME <sup>-</sup> EMM                     | Cepa recombinante incapaz de consumir eritritol contendo os genes <i>emt1</i> , <i>mac1</i> e <i>mac</i>               |
| JME <sup>-</sup> EMMM                    | Cepa recombinante incapaz de consumir eritritol contendo os genes <i>emt1</i> , <i>mac1</i> , <i>mac</i> e <i>mmf1</i> |
| Kb                                       | Kilobase   |
| LiAc                                     | Acetato de lítio   |
| <i>m/z</i>                               | Razão massa/carga  |
| Mac1 ( <i>mac1</i> )                     | Aciltransferase 1 peroxissomal (gene que codifica a enzima em <i>U. maydis</i> )                                       |
| Mac1 <sub>Cit</sub> ( <i>mac1PTS1Δ</i> ) | Aciltransferase 1 com segmentação citosólica (gene que codifica a enzima em <i>U. maydis</i> sem o peptídeo sinal)     |
| Mac2 ( <i>mac2</i> )                     | Aciltransferase 2 peroxissomal (gene que codifica a enzima em <i>U. maydis</i> )                                       |
| Mac2 <sub>Cit</sub> ( <i>mac2PTS1Δ</i> ) | Aciltransferase 2 com segmentação citosólica (gene que codifica a enzima em <i>U. maydis</i> sem o peptídeo sinal)     |
| Mb                                       | Megabase   |
| MELs                                     | Manosileritritol lipídios  |
| MEP                                      | Metileritritol fosfato   |
| MGL                                      | Meio definido contendo glicerina loira   |
| MGP                                      | Meio definido contendo glicerol puro   |
| MM                                       | Meio contendo glicerina loira e milhocina  |
| MMEJ                                     | Junção de extremidade micro-homóloga   |
| Mmf1 ( <i>mmf1</i> )                     | Proteína transmembrana (gene que codifica a proteína em <i>U. maydis</i> )   |

|             |   |
|-------------|---|
| MPI         | Fosfomanose isomerase   |
| mRNA        | RNA mensageiro  |
| MVA         | Mevalonato  |
| NADP(H)     | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato   |
| NCBI        | <i>National Center for Biotechnology Information</i>  |
| NGG         | N representa qualquer nucleotídeo e G é referente a guanina   |
| NHEJ        | Junção de extremidade não-homóloga  |
| nt          | Nucleotídeos  |
| Oligos      | Oligonucleotídeos   |
| PAM         | Motivo adjacente ao protoespaçador  |
| pb          | Pares de base   |
| PCR         | Reação em cadeia da polimerase  |
| PMM         | Fosfomanomutase   |
| Polg-EMM    | Cepa recombinante contendo os genes <i>emt1</i> , <i>mac1</i> e <i>mac2</i> fusionados ao peptídeo 2A |
| PPP         | Via das Pentoses Fosfato  |
| PTS1        | <i>Peroxisomal Targeting Signal Type 1</i>  |
| rDNA        | DNA ribossomal  |
| RNA         | Ácido ribonucleico  |
| rRNA        | RNA ribossomal  |
| sgRNA       | RNA guia único  |
| TCA         | Ciclo do ácido tricarbóxico   |
| TLC         | Cromatografia em camada delgada   |
| transcrRNA  | RNA transativador   |
| tRNA        | RNA transportador   |
| TS          | Tensão superficial  |
| UTES        | <i>URA3 Transcription End Site</i>  |
| UTSS        | <i>URA3 Transcription Start Site</i>  |
| WT          | Cepa selvagem   |
| YNB         | Meio <i>Yeast Nitrogen Base</i> contendo glicose como fonte de carbono                                |
| YNBE        | Meio YNB contendo eritritol como fonte de carbono   |
| YNBEM       | Meio YNB contendo eritritol e manose como fonte de carbono  |
| YNBG        | Meio YNB contendo glicerol como fonte de carbono  |
| YNB-Lis     | Meio YNB contendo lisina  |
| YNB-Ura     | Meio YNB contendo uracila   |
| YPD         | Meio <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>  |
| YPD-Hig     | Meio YPD contendo higromicina-B   |
| YPD-Nat     | Meio YPD contendo nourseotricina  |
| YPD-Nat-Hig | Meio YPD contendo nourseotricina e higromicina-B  |

## SUMÁRIO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>vii</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>viii</b> |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>  | <b>25</b>   |
| <b>OBJETIVO GERAL .....</b>  | <b>27</b>   |
| <b>CAPÍTULO 1: A LEVEDURA <i>Yarrowia lipolytica</i> .....</b>                                   | <b>28</b>   |
| <b>1.1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>28</b>   |
| <b>1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>29</b>   |
| 1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS, FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS .....                               | 29          |
| 1.2.2. APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA BIOTECNOLÓGICA .....   | 32          |
| 1.2.2.1. <i>Valorização de Resíduos Industriais</i> .....  | 34          |
| 1.2.2.2. <i>Emprego de Técnicas de Biologia Sintética</i> .....                                  | 36          |
| 1.2.2.2.1. <i>Sistema Golden Gate Assembly</i> .....   | 36          |
| 1.2.2.2.2. <i>Tecnologia CRISPR/Cas</i> .....  | 39          |
| 1.2.3. HETEROGENEIDADE INTRAESPÉCIE .....  | 43          |
| <b>CAPÍTULO 2: MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS .....</b>   | <b>45</b>   |
| <b>2.1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>45</b>   |
| <b>2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>46</b>   |
| 2.2.1. MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS .....   | 46          |
| 2.2.1.1. <i>Características Estruturais, Microrganismos Produtores e Via Biossintética</i> ..... | 46          |
| 2.2.1.2. <i>Propriedades Físico-Químicas e Campos de Atuação</i> .....                           | 50          |
| 2.2.1.3. <i>Estratégias de Produção e Recuperação</i> .....                                      | 51          |
| 2.2.2. PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR <i>Yarrowia lipolytica</i> .....                | 54          |
| 2.2.2.1. <i>Biossíntese dos Precursores: Lipídios, Manose e Eritritol</i> .....                  | 55          |
| 2.2.2.2. <i>Alternativa de Co-Expressão Gênica: Peptídeo Autocatalítico 2A</i> .....             | 59          |
| <b>2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>  | <b>62</b>   |
| <b>2.4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>63</b>   |
| 2.4.1. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....   | 63          |
| 2.4.2. GENES, MICRORGANISMOS, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS .....                               | 64          |
| 2.4.3. MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES .....  | 67          |
| 2.4.4. CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE EM <i>Yarrowia lipolytica</i> .....                       | 68          |
| 2.4.4.1. <i>Construção dos Vetores de Expressão</i> .....  | 68          |

|   |            |
|---|------------|
| 2.4.4.2. <i>Transformação de Escherichia coli Quimiocompetente</i> .....  | 70         |
| 2.4.4.3. <i>Transformação de Yarrowia lipolytica e Confirmação dos Recombinantes</i> .....  | 70         |
| 2.4.5. CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS .....  | 71         |
| 2.4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS .....   | 72         |
| 2.4.6.1. <i>Quantificação da Biomassa Celular</i> .....   | 72         |
| 2.4.6.2. <i>Quantificação de Glicerol e Eritritol</i> .....   | 72         |
| 2.4.6.3. <i>Extração e Quantificação de Manosileritritol Lipídios</i> .....   | 73         |
| 2.4.7. CARACTERIZAÇÃO DOS MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS .....   | 73         |
| 2.4.7.1. <i>Medição da Tensão Superficial</i> .....   | 73         |
| 2.4.7.2. <i>Determinação do Índice de Emulsificação</i> .....   | 74         |
| 2.4.7.3. <i>Avaliação do Equilíbrio Hidrofílico-Hidrofóbico</i> .....   | 74         |
| 2.4.7.4. <i>Análise por Cromatografia em Camada Delgada</i> .....   | 74         |
| 2.4.7.5. <i>Análise por Cromatografia Gasosa</i> .....  | 74         |
| 2.4.7.6. <i>Análise por Espectrometria de Massas</i> .....  | 75         |
| 2.4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....  | 75         |
| <b>2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>76</b>  |
| 2.5.1. INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR<br><i>Yarrowia lipolytica</i> GENETICAMENTE MODIFICADA.....      | 76         |
| 2.5.1.1. <i>Estratégia de Clonagem 1: Genes Fusionados ao Peptídeo 2A em Cassete de<br/>Expressão</i> .....                       | 76         |
| 2.5.1.2. <i>Estratégia de Clonagem 2: Genes em Cassetes de Expressão Independentes</i> .....                                      | 87         |
| 2.5.2. INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA TRANSMEMBRANA MMF1 NA SECREÇÃO DE<br>MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR <i>Yarrowia lipolytica</i> ..... | 98         |
| 2.5.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR<br><i>Yarrowia lipolytica</i> A PARTIR DE GLICEROL.....             | 104        |
| <b>2.6. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>CAPÍTULO 3: <math>\beta</math>-CAROTENO.....</b>   | <b>109</b> |
| <b>3.1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>3.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>110</b> |
| 3.2.1. $\beta$ -CAROTENO .....  | 110        |
| 3.2.1.1. <i>Estrutura Química, Propriedades e Funções</i> .....   | 110        |
| 3.2.1.2. <i>Organismos Produtores e Biossíntese</i> .....   | 111        |
| 3.2.1.3. <i>Vias de Obtenção e Aplicações Industriais</i> .....   | 116        |
| 3.2.2. PRODUÇÃO DE BETA-CAROTENO POR <i>Yarrowia lipolytica</i> .....   | 121        |
| <b>3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>   | <b>126</b> |
| <b>3.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>127</b> |
| 3.4.1. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....   | 127        |
| 3.4.2. MICRORGANISMOS, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS .....   | 128        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.4.3. MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES .....  | 129        |
| 3.4.4. CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES AUXOTRÓFICOS POR CRISPR/CAS9 .....  | 131        |
| 3.4.4.1. <i>Design dos sgRNAs</i> .....  | 131        |
| 3.4.4.2. <i>Montagem dos Vetores CRISPR/Cas9</i> .....   | 132        |
| 3.4.4.3. <i>Co-Transformação de Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682</i> .....   | 132        |
| 3.4.4.4. <i>Avaliação Fenotípica e Verificação Genotípica dos Co-Transformantes</i> .....  | 132        |
| 3.4.4.5. <i>Cura Plasmidial dos Mutantes Auxotróficos</i> .....  | 133        |
| 3.4.4.6. <i>Determinação da Eficiência de Clonagem</i> .....   | 133        |
| 3.4.5. CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE EM <i>Yarrowia lipolytica</i> .....   | 133        |
| 3.4.6. CULTIVOS PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO .....   | 133        |
| 3.4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS .....  | 134        |
| 3.4.7.1. <i>Dosagem da Biomassa, Glicerol, Eritritol e Manitol</i> .....   | 134        |
| 3.4.7.2. <i>Extração e Quantificação de Carotenoides</i> .....   | 134        |
| 3.4.7.3. <i>Análise da Pureza de <math>\beta</math>-Caroteno</i> .....   | 135        |
| 3.4.7.4. <i>Determinação dos Parâmetros do Cultivo</i> .....   | 135        |
| 3.4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....   | 135        |
| <b>3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>136</b> |
| 3.5.1. CONSTRUÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 PELA ESTRATÉGIA COMBINATÓRIA DE CLIVAGEM DUPLA BASEADA NO SISTEMA CRISPR/CAS9..... | 136        |
| 3.5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO POR <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 .....  | 143        |
| 3.5.3. USO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682.....                                       | 148        |
| <b>3.6. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>160</b> |
| <b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>   | <b>161</b> |
| <b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>  | <b>162</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>163</b> |
| <b>APÊNDICES.....</b>  | <b>186</b> |

# INTRODUÇÃO GERAL

---

Ao longo dos anos, os organismos vivos têm sido explorados como plataformas de produção para uma grande variedade de compostos de relevância industrial (MA; ZHOU; ZENG, 2018). Entretanto, o estabelecimento de processos biotecnológicos eficientes e competitivos ainda são um grande desafio à ciência (YU; WU; CHEN, 2019). A crescente demanda por inovações sustentáveis que desacoplem o crescimento econômico de altos índices de poluição ambiental, impulsionou a expansão do campo da biologia sintética para a otimização dos bioprocessos (HERMANN et al., 2018).

Os avanços substanciais nos âmbitos da tecnologia do DNA recombinante, engenharia metabólica, biologia de sistemas, bioinformática e bioquímica (NORDMANN, 2015), levou ao surgimento de uma área denominada de biologia sintética, a qual destina-se ao *design*, construção, reprogramação, caracterização e compreensão de sistemas biológicos usando os princípios da engenharia (ZHAO, 2013). Apesar de ser considerada um campo emergente, a biologia sintética atua sobrepondo características de outras áreas científicas, e na maioria das vezes, abrangendo seus objetivos e metodologias (HERMANN et al., 2018). A Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica define biologia sintética como “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para construir ou modificar produtos ou processos para um uso específico”, embora não haja uma definição amplamente aceita (CBD, 2015).

O investimento global no campo da biologia sintética atingiu quase US\$ 2,7 bilhões em 2013 (CBD, 2015), e estimou-se um aumento no financiamento dessa área para US\$ 40 bilhões em 2020 (TRUMP et al., 2020). Em vista disso, a biologia sintética fez grandes progressos no desenvolvimento de ferramentas para a engenharia de hospedeiros microbianos, como a modulação de vias metabólicas, a caracterização e engenharia de promotores, a construção de circuitos sintéticos e sistemas de clonagem modulares, e a edição de genoma baseada no método de repetições palindrômicas curtas, interespaçadas e regularmente agrupadas associadas a proteínas (CRISPR/Cas - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated proteins*). Tais tecnologias tem se mostrado promissoras no direcionamento do fluxo metabólico para a melhoria da produção de diferentes compostos de importância comercial (CZAJKA et al., 2017; GAMBOA-MELENDEZ et al., 2018).

A rentabilidade de um bioprocesso está relacionada a elevados índices de rendimento e produtividade que compensem os custos operacionais. Por isso, a construção de fábricas celulares eficazes deve ser baseada na identidade da molécula alvo e nas características metabólicas intrínsecas do microrganismo (GARCIA-RUIZ; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018). Como sistema de produção, as leveduras são hospedeiras valiosas devido às vantagens importantes, incluindo crescimento rápido, manipulação genética simples, fermentação facilmente escalonável, altas densidades celulares, capacidade de realizar modificações pós-traducionais apropriadas e produção geralmente segura (BAGHBAN et al., 2019). Entre as espécies disponíveis, a levedura não-convencional *Yarrowia lipolytica* aparece como uma das mais atraentes (MADZAK; BECKERICH, 2013).

A expectativa em torno da levedura *Y. lipolytica* se deve ao seu potencial biossintético rico e variado de notável interesse científico e industrial. Muitas estratégias vêm sendo exploradas para elevar a competitividade dos bioprocessos baseados nesta espécie, como biologia sintética, novas tecnologias de fermentação e uso de matéria-prima de baixo custo (COELHO; AMARAL; BELO, 2010). Isto é evidenciado pelo elevado número de publicações e patentes sobre seus múltiplos campos de atuação (SOUZA; SALGUEIRO; ALBUQUERQUE, 2012; SOUZA; SCHWAN; DIAS, 2014; MIROŃCZUK et al., 2015; KILDEGAARD et al., 2017; PARK et al., 2018; LARROUDE et al., 2020).

Em razão da natureza oleaginosa da levedura *Y. lipolytica* e de seus eficientes mecanismos de assimilação de uma variedade de substratos alternativos, o emprego dessa levedura como plataforma biotecnológica para a produção de compostos que requerem um grande aporte de intermediários do metabolismo de lipídios é promissor (MA et al., 2020). Vários estudos com linhagens selvagens e/ou recombinantes de *Y. lipolytica* mostram resultados relevantes na síntese de diversos oleoquímicos de valor agregado, e alguns produtos já estão em escala piloto ou já chegaram à comercialização (XUE et al., 2013; SUN et al., 2017; DARVISHI et al., 2018).

À vista disso, o presente trabalho se propôs a explorar ainda mais o potencial biotecnológico da espécie *Y. lipolytica*, empregando diferentes abordagens da biologia sintética para o desenvolvimento de cepas geneticamente modificadas capazes de produzir manosileritritol lipídios e carotenoides a partir de subprodutos industriais.

# OBJETIVO GERAL

---

O objetivo geral deste trabalho foi a aplicação da biologia sintética em *Yarrowia lipolytica* para a obtenção de diferentes produtos de interesse biotecnológico: o biossurfactante manosileritritol lipídico e o carotenoide  $\beta$ -caroteno.

Assim, a tese foi estruturada em capítulos para uma melhor compreensão:

- *Capítulo 1* – foi apresentado uma revisão sobre os aspectos gerais da levedura *Y. lipolytica*, incluindo as suas principais características genéticas, fisiológicas e metabólicas, e aplicações na indústria biotecnológica com a valorização de resíduos industriais e o emprego de ferramentas da biologia sintética atualmente disponíveis, com ênfase no sistema *Golden Gate Assembly* e no método CRISPR/Cas9;
- *Capítulo 2* – linhagens laboratoriais de *Y. lipolytica* foram empregadas pela primeira vez como plataforma de produção alternativa de manosileritritol lipídios, a partir da clonagem dos genes essenciais para a biossíntese desse biossurfactante, utilizando diferentes estratégias de co-expressão gênica;
- *Capítulo 3* – uma linhagem selvagem de *Y. lipolytica* foi submetida a edição gênica para a construção de mutantes auxotróficos, e então, engenheirada para a produção de  $\beta$ -caroteno a partir de subprodutos industriais de baixo valor comercial como substrato, em uma abordagem não vista antes na literatura.

Em seguida, foram apresentadas as conclusões gerais do trabalho, perspectivas futuras, referências bibliográficas e apêndices.

# CAPÍTULO 1:

## A LEVEDURA *Yarrowia lipolytica*

---

### 1.1. INTRODUÇÃO

A levedura *Yarrowia lipolytica* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Trichomonascaceae (WIJAYAWARDENE et al., 2018). Originalmente, esta espécie foi denominada como *Mycotorula lipolytica* (HARISSON, 1928) e sofreu uma série de reclassificações baseadas em suas características fisiológicas, principalmente a presença de ascos e a forma de seus ascósporos, sendo anteriormente nomeada de *Candida lipolytica*, *Endomycopsis lipolytica* e *Saccharomycopsis lipolytica* (VAN DER WALT; VON ARX, 1980).

O nome do gênero “*Yarrowia*” foi proposto por Van der Walt e Von Arx (1980) em reconhecimento ao pesquisador David Yarrow por suas contribuições à sistemática de leveduras, e o nome da espécie “*lipolytica*” está associado à habilidade de hidrolisar gorduras (PETERS; NELSON, 1948). No final da década de 40, a identificação de elevada atividade proteásica e lipásica nos cultivos de *Y. lipolytica* despertou o interesse para um maior conhecimento acerca desta levedura (MADZAK; NICAUD; GAILLARDIN, 2005), que foi impulsionado em meados dos anos 60, devido à descoberta da sua capacidade de crescer em n-parafinas como única fonte de carbono e produzir altas quantidades de ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Em virtude das diferenças genéticas, fisiológicas e metabólicas frente aos modelos celulares mais conhecidos até então, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, *Y. lipolytica* foi incluída no grupo das leveduras não-convencionais, se tornando a espécie mais estudada deste (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Consequentemente, nos anos 80, várias patentes sobre o emprego de *Y. lipolytica* em processos de expressão gênica e secreção de proteínas recombinantes foram registradas, representando os primeiros passos da biologia sintética dessa levedura para estudos acadêmicos e aplicações industriais (MADZAK, 2018).

## 1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS, FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS

Os progressos nas técnicas de biologia molecular e ferramentas computacionais permitiram o sequenciamento de diferentes linhagens de *Y. lipolytica* (MADZAK, 2015). Em 2004, o genoma da estirpe E150<sup>1</sup> foi totalmente sequenciado e anotado pelo *Génolevures Consortium* (DUJON et al., 2004). Em seguida, outras linhagens foram sendo sequenciadas, e hoje, o genoma das cepas selvagens WSH-Z06 (GUO et al., 2014), W29 (MAGNAN et al., 2016), A-101 (DEVILLERS et al., 2016) e H222 (DEVILLERS; NEUVÉGLISE, 2019), bem como das cepas laboratoriais Po1f (LIU; ALPER, 2014) e Po1g *ku70::hph* (BREDEWEG et al., 2017) também estão disponíveis. No geral, o genoma de *Y. lipolytica* possui aproximadamente 20,5 Mb de tamanho, elevado conteúdo GC ( $\pm$  49%), baixa densidade gênica ( $\pm$  46%) e cerca de 6.700 sequências codificantes, organizado em seis cromossomos que variam de 2,3 a 4,2 Mb (DUJON et al., 2004; BREDEWEG et al., 2017).

A análise genômica comparativa intraespécie revelou divergências entre as linhagens de *Y. lipolytica*, relacionadas ao tamanho do cromossomo, presença e distribuição de elementos transponíveis, e número de repetições dos genes ribossomais (BEOPOULOS et al., 2010). Em comparação com outros ascomicetos, *Y. lipolytica* apresentou centrômeros de tamanhos maiores e sem regiões de homologia (YAMANE et al., 2008), alta frequência de *introns* com sítios conservados (MEKOUAR et al., 2010), genes homólogos com baixo nível de similaridade (GAILLARDIN et al., 2013), conteúdo de transposons atípico (NEUVÉGLISE et al., 2005), estrutura incomum dos genes rRNA e ausência de sequências consenso na RNA polimerase I (FOURNIER et al., 1986). Os estudos filogenéticos baseados em genes glicolíticos e ribossomais incluíram *Y. lipolytica* em um ramo separado das demais leveduras ascomicéticas (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Por outro lado, *Y. lipolytica* compartilha propriedades com eucariotos superiores, como a dispersão dos *clusters* gênicos de rDNA e RNA 5S, o tamanho do snRNA, o processo de secreção de proteínas e, em particular, o RNA 7S da partícula de reconhecimento de sinal (CASAREGOLA et al., 2000).

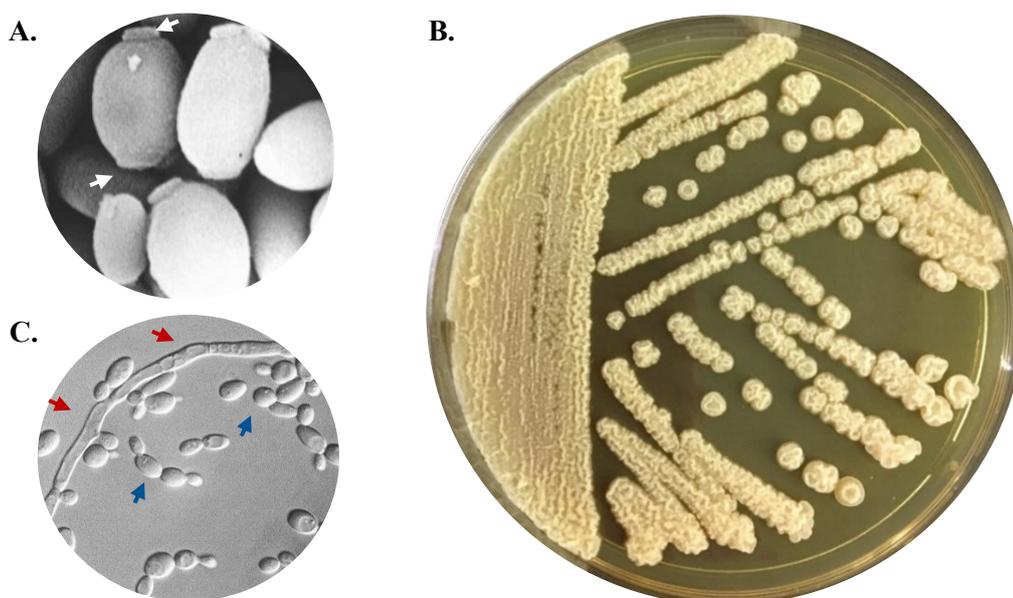
A espécie *Y. lipolytica* é estritamente aeróbica e heterotática, apresentando reprodução sexuada e assexuada, e, portanto, ciclos de vida contendo fases haploides e diploides. A

---

<sup>1</sup>A cepa de referência E150 ou CLIB 122 foi erroneamente denominada de CLIB99 na publicação de Dujon et al. (2004). Fonte: *Yarrowia lipolytica* CLIB122. **NCBI Taxonomy Database**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=284591>. Acesso em: 10 fev. 2020.

maioria das linhagens selvagens isoladas são haploides, e se proliferam por brotamento multilateral com formação de gêmulas nas células progenitoras (Figura 1.1A). No entanto, estirpes haploides de *Y. lipolytica* com tipos de acasalamento opostos A e B, controlados pelos alelos *MatA* e *MatB*, respectivamente, são capazes de se fundir para produzir uma célula diploide estável, a qual pode ser induzida a esporular e formar ascos contendo de um a quatro ascósporos com baixa viabilidade. Conseqüentemente, a ocorrência de acasalamento é rara, e estirpes diploides de *Y. lipolytica* são dificilmente isoladas na natureza (HARZEVILI, 2014).

As linhagens de *Y. lipolytica* formam colônias irregulares, as quais podem variar de suaves e cintilantes a fortemente contorcidas e foscas (Figura 1.1B) (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Tal morfologia está relacionada com suas características celulares, que se alteram de acordo com o perfil genético e as condições de cultivo, como composição do meio, tempo de incubação, oxigenação e pH (NICAUD, 2012). As células de *Y. lipolytica* apresentam conformação esferoidal ou elipsoidal, mas podem se alongar e formar pseudo-hifas e hifas septadas com um único microporo central (Figura 1.1C). A transição da conformação celular leveduriforme para filamentosa em resposta às condições ambientais caracteriza *Y. lipolytica* como uma levedura dimórfica, que se tornou o microrganismo modelo em estudos de dimorfismo fúngico (MARTINEZ-VAZQUEZ et al., 2013).



**Figura 1.1.** Características morfológicas da espécie *Yarrowia lipolytica*. **(A)** Brotamento multilateral observado por microscopia eletrônica de varredura. As setas em branco indicam a presença de gêmulas nas células progenitoras (HERRERO et al., 1999). **(B)** Colônias irregulares crescidas em meio rico. **(C)** Morfologia celular leveduriforme e filamentosa verificada por microscopia óptica de contraste de fase. As setas em azul mostram células em conformação de leveduras, e em vermelho, em forma de hifas (HURTADO; RACHUBINSKI, 2002).

Embora seja amplamente distribuída na natureza, a levedura *Y. lipolytica* é frequentemente encontrada em ambientes com alto teor de lipídios ou hidrocarbonetos, como alimentos gordurosos: queijos e outros produtos lácteos (VASDINYEI; DEÁK, 2003), salsichas, linguiças (ENCINAS et al., 2000; GARDINI et al., 2001), carnes, aves (DEAK; CHEN; BEUCHAT, 2000), camarão e seus produtos derivados (BARTH; GAILLARDIN, 1997); assim como oceanos hipersalinos (SPENCER, 1984), águas residuais agroindustriais (MAFAKHER et al., 2010) e áreas contaminadas com petróleo e outros oleoquímicos (CHI et al., 2007; HASSANSHAHIAN; TEBYANIAN; CAPPELLO, 2012). Isso se deve ao seu metabolismo versátil, permitindo que *Y. lipolytica* seja capaz de sobreviver em condições ambientais distintas e extremas (BEOPOULOS et al., 2010).

As propriedades fisiológicas peculiares de *Y. lipolytica* atraíram o interesse científico, e esta levedura não-patogênica se tornou alvo em estudos de degradação de substratos hidrofóbicos (FICKERS et al., 2005), acúmulo de óleo microbiano (BEOPOULOS et al., 2009), expressão e secreção de proteínas recombinantes (NICAUD et al., 2002) e produção de diversos metabólitos nativos de relevância industrial, tais como: diversas enzimas (BRÍGIDA et al., 2013; SOUZA et al., 2017); ácidos graxos; ácidos orgânicos, incluindo principalmente ácido cítrico, ácido isocítrico (DA SILVA et al., 2020), ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, pirúvico e succínico; polióis, englobando eritritol, manitol e arabitol (HARZEVILI, 2014; DA SILVA et al., 2018); aromas (CELÍNSKA et al., 2013; DE SOUZA; RIBEIRO; COELHO, 2019); e compostos tensoativos (AMARAL et al., 2006a; LUNA; RUFINO; SARUBBO, 2016).

A assimilação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, lipídios e ácidos graxos por *Y. lipolytica* é normalmente acompanhada da produção de moléculas com propriedades tensoativas, glicoproteínas ancoradas na parede celular e lipases extracelulares, que auxiliam a interação do substrato hidrofóbico, presente na fase orgânica, com a superfície da célula, para o seu transporte intracelular. Estes compostos tensoativos são biossurfactantes e bioemulsificantes com diferentes características estruturais e físico-químicas, as quais variam de acordo com a linhagem produtora e o substrato utilizado para a produção (FICKERS et al., 2005; GONÇALVES; COLEN; TAKAHASHI, 2014).

O teor lipídico de *Y. lipolytica* pode atingir 40% do seu peso seco celular, caracterizando esta levedura como oleaginosa. Estes lipídios são compostos majoritariamente de triacilglicerol, mas também podem ser encontrados na forma de outros lipídios neutros, como monoacilglicerol e diacilglicerol, ácidos graxos livres, esteróis e frações polares

(BEOPOULOS et al., 2009). A composição de ácidos graxos dos lipídios produzido por *Y. lipolytica* é variável, mas, no geral, apresenta ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) (LI; DU; LIU, 2008), sendo bastante similar aos óleos e/ou gorduras de origem vegetal e animal (ZHU; JACKSON, 2015).

Os mecanismos de secreção de proteínas por *Y. lipolytica* são altamente eficientes, e ocorrem, predominantemente, através da via de translocação cotranslacional (BECKERICH; BOISRAMÉ-BAUDEVIN; GAILLARDIN, 1998). A capacidade de secreção de uma variedade de proteínas por esta via, os sistemas versáteis de expressão de heteróloga, a ausência de hiperglicosilação, a adequada conversão de substrato em produto e a reprodutibilidade de desempenho são vantagens adicionais de *Y. lipolytica* (COELHO; AMARAL; BELO, 2010). As enzimas mais importantes naturalmente secretadas por esta espécie são lipases, esterases, proteases, fosfatases e RNAses. Entretanto, uma infinidade de proteínas de vírus, bactérias, fungos, protistas, plantas, insetos, humanos e demais mamíferos já foram produzidas com sucesso nesta levedura (HARZEVILI, 2014).

A síntese de um metabólito em vez de outro, é influenciado pelas condições de crescimento às quais *Y. lipolytica* é submetida, principalmente o substrato utilizado como fonte de carbono e energia. Esta levedura é capaz de consumir eficientemente, além de substratos hidrofóbicos, glicose, N-acetilglicosamina, glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, acetato, lactato, malato, succinato e citrato; e apresenta crescimento variável em galactose, sorbose, ribose, ribitol e gluconato; bem como crescimento fraco ou negativo na presença de celobiose e salicina (BARTH; GAILLARDIN, 1997; KURTZMAN; FELL; BOEKOUT, 2011). Assim, o uso do substrato ideal, a cuidadosa determinação dos parâmetros de fermentação, e a seleção de uma linhagem com base no seu perfil fenotípico, são particularidades essenciais para a modulação do metabolismo celular e síntese do composto de interesse.

### 1.2.2. APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA BIOTECNOLÓGICA

A versatilidade metabólica de *Y. lipolytica* desejável em muitos processos biotecnológicos e seu status de segurança GRAS (*Generally Recognized As Safe*) concedido pela *Food and Drug Administration* (FDA), justifica os esforços para a aplicação desta levedura em diferentes segmentos que movimentam grande volume da economia mundial,

envolvendo as indústrias de alimentos, cosméticos, fármacos e energia, assim como a biorremediação e biodegradação de poluentes ambientais (HARZEVILI, 2014).

O uso pioneiro de *Y. lipolytica* na indústria biotecnológica foi para a produção de biomassa microbiana pela *British Petroleum* (Reino Unido), em 1957. O produto, nomeado de Toprina G, foi produzido por uma linhagem selvagem a partir de n-alcenos para ração animal. Entretanto, a sua produção foi interrompida em 1978, devido aos altos preços da matéria-prima resultante da crise do petróleo de 1973 (GROENEWALD et al., 2014). Outras estirpes selvagens também já foram empregadas industrialmente para a produção de lipases (*Amano Enzymes*, EUA; *Artechno*, Bélgica); ácido cítrico (*Pfizer* e *ADM*, EUA) e eritritol (*Baolingbao Biology*, China). Além disso, células de *Y. lipolytica* liofilizadas são produzidas pela *Artechno* (Bélgica) para biorremediação de efluentes (DARVISHI et al., 2012; 2018).

Algumas estirpes geneticamente modificadas de *Y. lipolytica* também já estão sendo aplicadas em bioprocessos para a produção em larga escala de enzimas lisossômicas humanas, para o tratamento de doenças de armazenamento lisossomal (*Oxyrane*, Bélgica e Reino Unido); lipases, para o tratamento da insuficiência pancreática exócrina (*Mayoly Spindler*, França); e ácido eicosapentaenóico, para o uso como aditivo alimentar em ração de peixes (*DuPont*, EUA) (SIBIRNY; MADZAK; FICKERS, 2014). A liberação para a comercialização de tais produtos comprovam a segurança e estabilidade genética das linhagens mutantes de *Y. lipolytica* (LIU; JI; HUANG, 2015), o que tem motivado a construção de cepas superprodutoras de diversos compostos.

Vários estudos tem desenvolvido cepas recombinantes para a síntese de elevadas concentrações de carotenoides (LARROUDE et al., 2018a); manitol (RAKICKA et al., 2016); metil cetonas (HANKO et al., 2018); ácido ricinoléico (BEOPOULOS et al., 2014); ácidos linoléicos conjugados (IMATOUKENE et al., 2017); óleos que se assemelham à manteiga de cacau, cuja composição é rica em ácido esteárico (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2003); polihidroxicarboxilatos (PHAs), que são bons candidatos para uso em bioplásticos renováveis e biodegradáveis (GAO et al., 2015); várias proteínas (THEERACHAT et al., 2012; SHENG et al., 2014) e ácidos orgânicos (MIRONCZUK et al., 2016). Apesar dos resultados promissores, o escalonamento industrial e a implementação da levedura *Y. lipolytica* como *chassi* biotecnológico requerem o desenvolvimento de estratégias que diminuam os custos com a matéria-prima e procedimentos operacionais, tornando os bioprocessos economicamente competitivos no mercado.

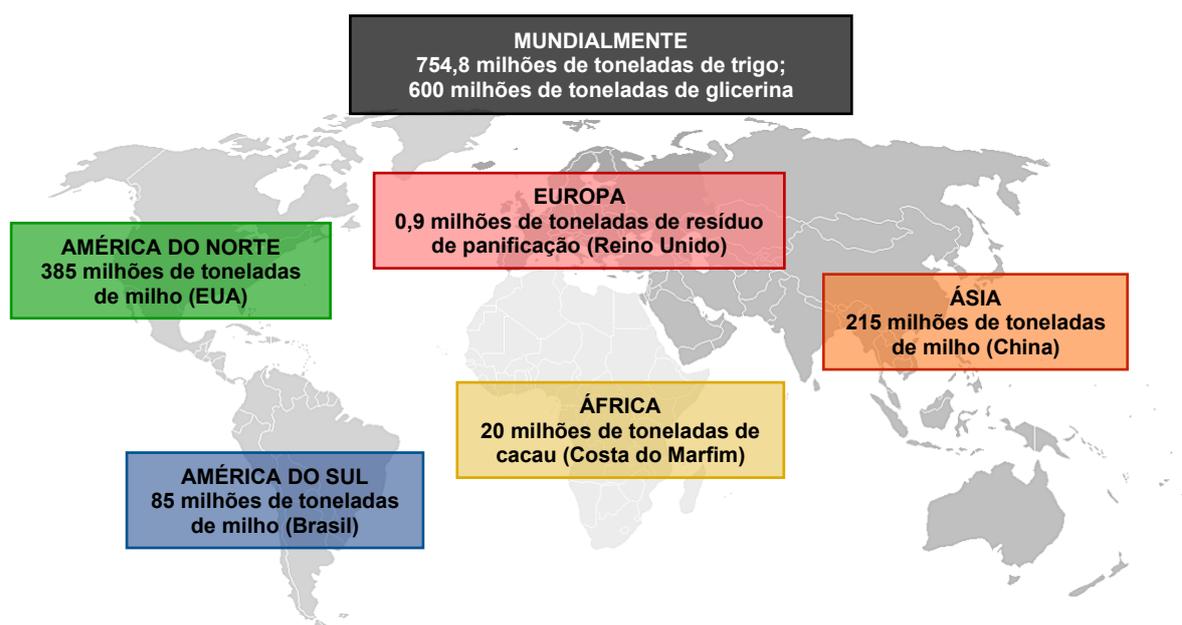
### 1.2.2.1. Valorização de Resíduos Industriais

A geração anual de resíduos orgânicos é estimada em mais de 100 bilhões de toneladas em todo o mundo (WANG et al., 2019). Em vista disso, a bioconversão de subprodutos industriais em compostos de valor agregado tem sido intensamente investigada nas últimas décadas, devido às crescentes preocupações sobre questões de sustentabilidade e a tentativa de rentabilidade dos processos biotecnológicos. Tais substratos alternativos normalmente possuem impurezas, o que pode afetar negativamente o metabolismo celular e reduzir o rendimento e a produtividade dos bioprocessos (DO; THERON; FICKERS, 2019). Contudo, a levedura *Y. lipolytica* tem mostrado elevada tolerância à diversos subprodutos, como a glicerina loira (DA SILVA et al., 2012; LOPES et al., 2014), milhocina (LIU et al., 2015; SANTOS et al., 2018), gordura animal e vegetal (KAMZOLOVA et al., 2005; LOPES et al., 2016; SOUZA et al., 2017), óleo de fritura (NUNES et al., 2013; XIAOYAN et al., 2017), melão (YAN et al., 2018), entre outros resíduos agroindustriais (FONTES et al., 2008; PEREIRA; SANT'ANA; AMARAL, 2019; SALES et al., 2020).

De acordo com Wang et al. (2019), entre os subprodutos mais produzidos mundialmente, está a glicerina bruta, com cerca de 600 milhões de toneladas ao ano (Figura 1.2). A glicerina bruta é o principal subproduto da indústria de biodiesel, com geração de 10% a cada kg de biodiesel produzido (OLIVEIRA et al., 2013; SAMUL; LEJA; GRAJEK, 2014). Este subproduto obtido a partir de diferentes matérias-primas, tais como óleos de sementes de mostarda, colza, canola, crambe, soja e resíduos de óleos de cozinha, pode possuir o teor de carbono em torno de 25% e a concentração de glicerol na faixa de 75 - 83%. Os teores de gordura e proteína variam de 1 - 13% e 0,06 - 0,44%, respectivamente, enquanto metais (Ca, K, Mg) e outros macroelementos (P e S) podem estar presentes em pequenas quantidades, de 4 - 163 ppm, exceto Na, com média de pouco mais de 1% (THOMPSON; HE, 2006).

O atual valor de mercado do glicerol puro é de cerca de US\$ 0,46 a 0,90 por kg, enquanto que a glicerina bruta com 80% de pureza, chega a apenas US\$ 0,08 a 0,19 por kg (ABDUL RAMAN; TAN; BUTHIYAPPAN, 2019). Vários níveis e designações da glicerina estão disponíveis comercialmente, diferindo em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas. A designação glicerina loira é normalmente utilizada para a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel, onde a fase glicerínica sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Estudos anteriores já relataram a preferência de *Y. lipolytica* por glicerol, em comparação com a glicose, com base em sua taxa de crescimento (WORKMAN; HOLT; THYKAER, 2013; LUBUTA et al., 2019). Em 2009, a empresa Skotan (Polônia) iniciou a produção de biomassa de *Y. lipolytica* utilizando glicerol residual como substrato, e obteve autorização para sua comercialização como aditivo alimentar pela *Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés* (FEFAC) (RYWIŃSKA et al., 2013).



**Figura 1.2.** Principais matérias-primas e subprodutos gerados no mundo (Adaptado de WANG et al., 2019).

A elevada produção de milho, de aproximadamente 685 milhões de toneladas ao ano, principalmente pelos EUA, Brasil e China (Figura 1.2), é também responsável por grande parte da geração de resíduos, como a milhocina (WANG et al., 2019). A milhocina é um subproduto do processo de maceração do milho e representa aproximadamente 40-50% do peso seco do milho processado, consistindo de uma substância complexa, rica em aminoácidos, vitaminas e polipeptídios, que são excelentes fontes de nitrogênio orgânico. Além disso, este subproduto normalmente contém aproximadamente  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  de biotina, podendo contribuir significativamente para a necessidade nutricional microbiana, com valor de mercado de cerca de US\$ 0,20 por kg (XI et al., 2013; LIU et al., 2015; TAN et al., 2016). Há relatos da capacidade de *Y. lipolytica* em assimilar milhocina com produção de ácido cítrico (LIU et al., 2015; CAVALLO et al., 2020), eritritol (SILVA et al., 2019; TOMASZEWSKA-HETMAN; RYMOWICZ; RYWIŃSKA, 2020) e biossurfactantes

(SANTOS et al., 2018), sugerindo que este subproduto pode ser usado como fonte alternativa de nitrogênio e vitaminas.

Os processos de valorização de resíduos envolvendo linhagens engenheiradas de *Y. lipolytica* estão sendo testados em escala laboratorial por alguns estudos (YOVKOVA et al., 2014; RAKICKA et al., 2015; SARA; BRAR; BLAIS, 2016; DARVISHI et al., 2017). As informações sobre a viabilidade dessa abordagem que envolvem os efeitos variáveis da composição da matéria-prima e sua pureza no comportamento celular, juntamente com o aprimoramento genético de tais recombinantes são importantes, e abrem possibilidades para o estabelecimento de bioprocessos eficientes e rentáveis.

#### 1.2.2.2. Emprego de Técnicas de Biologia Sintética

Nos últimos anos, diversas ferramentas de biologia sintética foram desenvolvidas e empregadas em *Y. lipolytica* para a construção de *chassis* biotecnológicos mais controláveis, padronizados e previsíveis, em menor tempo e com custo reduzido. Entre as principais estratégias disponíveis estão:

- Métodos de montagem de DNA - *One-step integration PCR*, sistemas de clonagem *Gateway*, *YaliBricks*, *Gibson* e *Golden Gate Assembly*;
- Edição de genoma baseada na atividade de nucleases - técnica TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) e tecnologia CRISPR/Cas9;
- Modelos metabólicos em escala genômica - iNL895, iYL619\_PCP, iMK735, iYali4 e iYLI647 (LARROUDE et al., 2018b; MA et al., 2020).

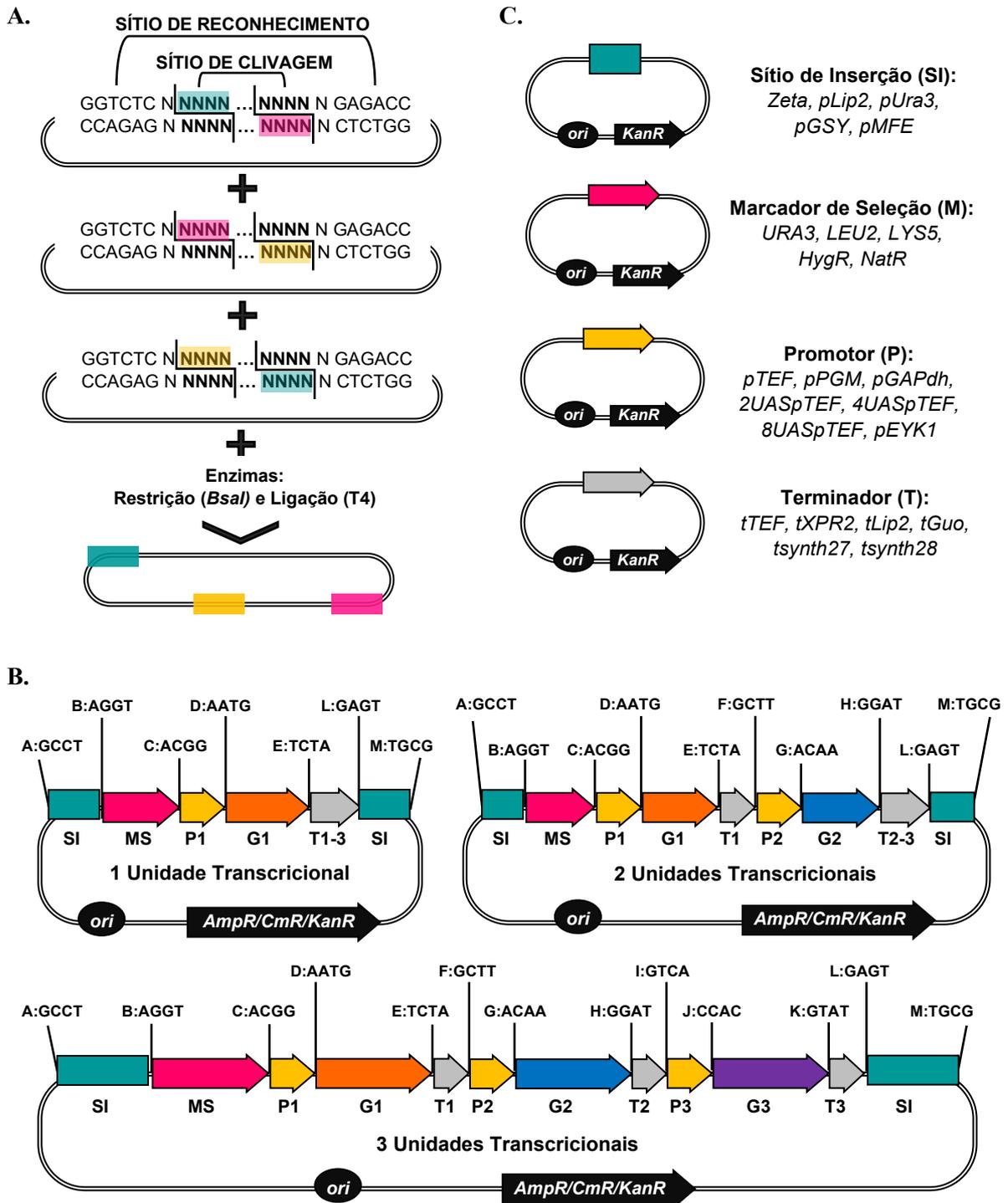
##### 1.2.2.2.1. Sistema *Golden Gate Assembly*

A montagem de DNA é uma das tecnologias fundamentais mais importantes para a biologia sintética e a engenharia metabólica. Desde o desenvolvimento dos protocolos tradicionais baseados no método de digestão por restrição e ligação no início da década de 70, uma quantidade significativa de técnicas com maior eficiência, fidelidade e modularidade foram sendo desenvolvidas, visando a construção de cassetes multigênicos de forma simplificada para a geração de linhagens com funcionalidades genéticas complexas (CHAO; YUAN; ZHAO, 2015; LARROUDE et al., 2018b).

O sistema de clonagem modular *Golden Gate Assembly* (GGA) aparece como uma das técnicas mais robustas nesse campo. O núcleo da estratégia GGA reside na utilização de enzimas de restrição do tipo II, com o sítio de reconhecimento adjacente à região de clivagem, e no estabelecimento de uma biblioteca de fragmentos de DNA (*building blocks*) padronizadas e intercambiáveis, que poderão ser posteriormente combinados em uma reação de etapa única. A vantagem do modo de atuação destas endonucleases está relacionada ao fato da sequência de reconhecimento ser independente do local de corte, resultando em extremidades coesivas (saliências ou *overhangs*) de quatro nucleotídeos, os quais podem ser personalizáveis. As extremidades complementares expostas são ligadas em ordem definida para a montagem dos vetores de expressão e secreção de proteínas (Figura 1.3A) (ENGLER; KANDZIA; MARILLONNET, 2008; GARCIA-RUIZ; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018).

Recentemente, uma biblioteca customizada foi desenvolvida para *Y. lipolytica* por Celińska et al. (2017) e Larroude et al. (2019), permitindo a montagem de plasmídeos com até três unidades transcricionais, devido ao desenvolvimento de treze diferentes saliências (A-M) para integração dos genes de interesse no genoma de linhagens desta espécie (Figura 1.3B). A viabilidade e robustez da plataforma GGA foram validadas através da expressão de genes para a biossíntese de carotenoides (CELÍŃSKA et al., 2017) e utilização de xilose (LARROUDE et al., 2019) por *Y. lipolytica*. O *GGA toolkit* dedicado para esta levedura não-convencional inclui uma série de elementos genéticos como: (I) promotores constitutivos, híbridos e induzíveis; (II) terminadores nativos e sintéticos; (III) diferentes sítios de inserção no genoma; e (IV) marcadores de seleção auxotróficos, defectivos e dominantes para a construção de vetores integrativos (Figura 1.3C) (LARROUDE et al., 2019). Agora, também já estão disponíveis outras saliências (N:GTCT e O: CTGA), as quais foram utilizadas para montagem de vetores replicativos (LARROUDE et al., 2020).

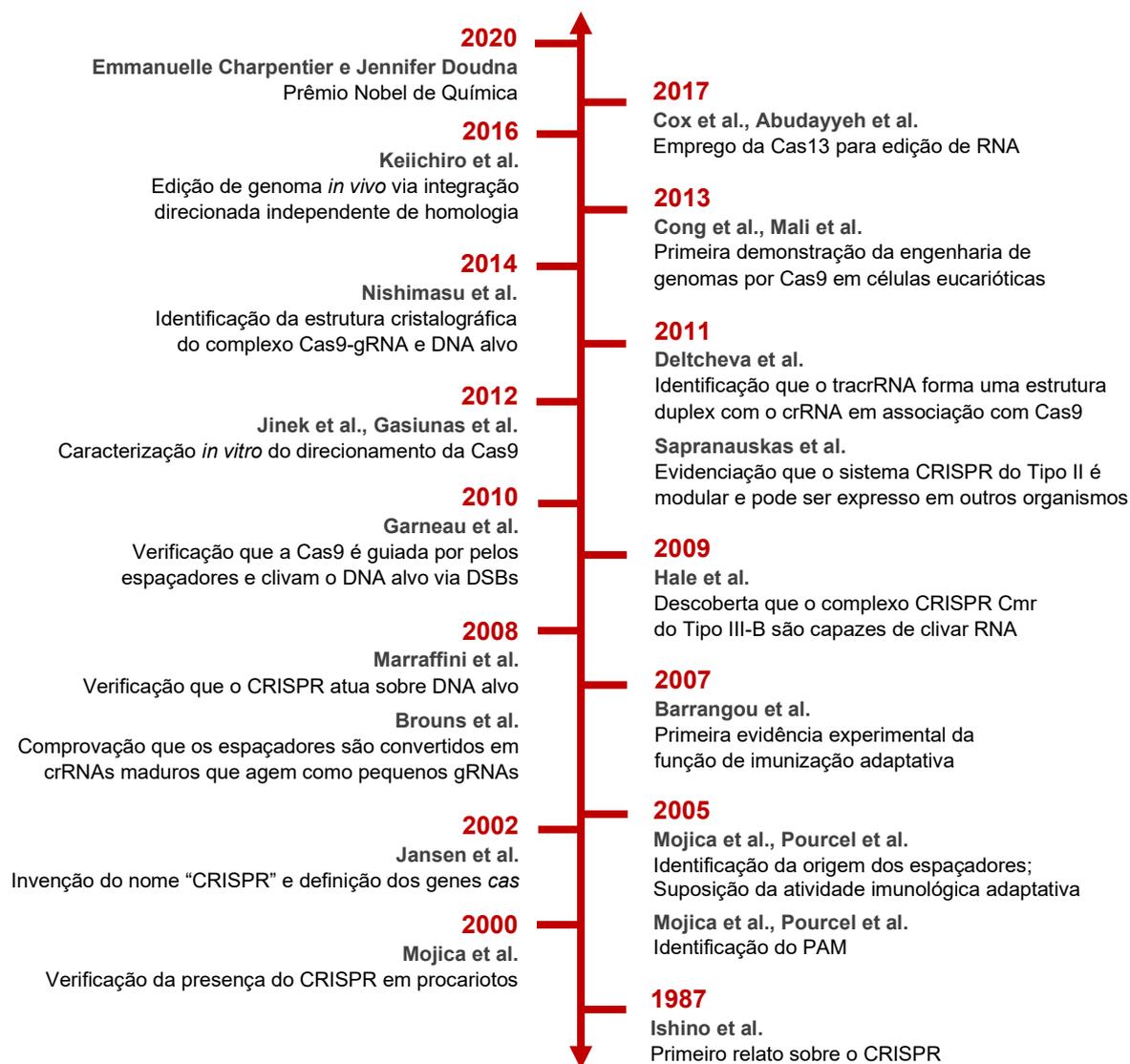
A flexibilidade e modularidade do sistema GGA fez com que este método fosse rapidamente adotado como um padrão-ouro para a montagem de DNA (GARCIA-RUIZ; HAMEDIRAD; ZHAO, 2018), sendo utilizado para inúmeras aplicações, desde a engenharia da arquitetura de promotores induzíveis para regular e aumentar a expressão de genes em *Y. lipolytica* (PARK et al., 2019), até a construção de vetores CRISPR/Cas9 para explorar a diversidade de linhagens selvagens (LARROUDE et al., 2020).



**Figura 1.3.** Sistema *Golden Gate Assembly* dedicado a *Yarrowia lipolytica*. **(A)** Representação esquemática do princípio do método. **(B)** Vetores de expressão com uma, duas ou três unidades transcricionais que podem ser construídos a partir de uma biblioteca previamente desenvolvida. **(C)** Biblioteca de vetores doadores customizada para *Y. lipolytica*. As sequências de quatro nucleotídeos nomeadas pelas letras de A-M indicam as saliências ou *overhangs* geradas após a ação da enzima de restrição *BsaI*. *SI*: sítios de inserção; *MS*: marca de seleção; *P*: promotor; *G*: gene; *T*: terminador (Adaptado de CELÍNSKA et al., 2017; LARROUDE et al., 2019).

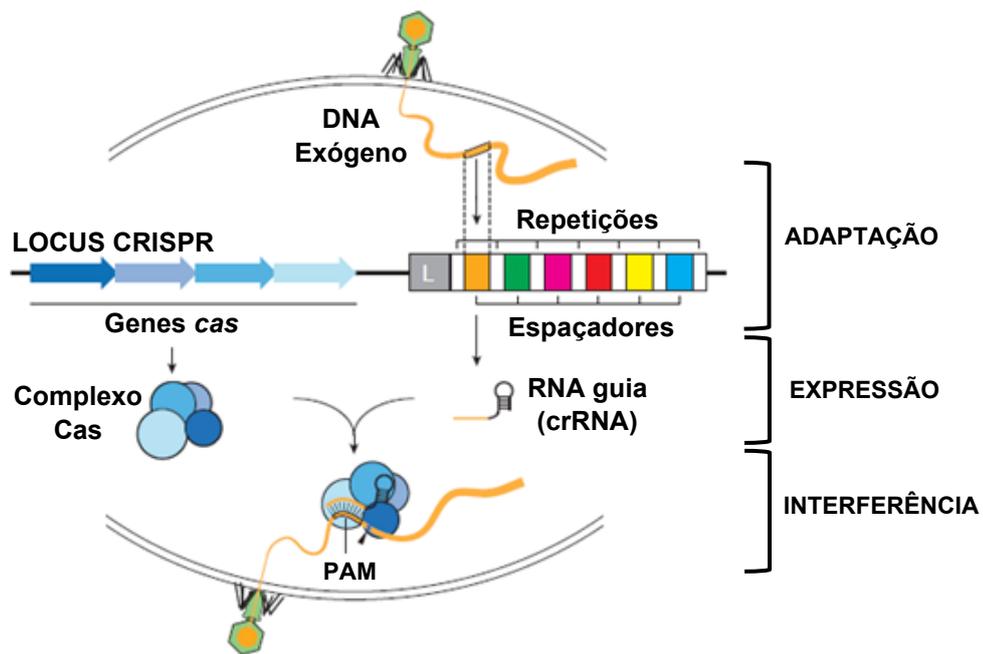
#### 1.2.2.2.2. Tecnologia CRISPR/Cas

A primeira descrição do sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) foi realizada por Ishino et al. (1987) a partir da identificação de sequências de DNA repetitivas e incomuns no genoma de *Escherichia coli*. Inicialmente, acreditou-se que tais sequências estavam associadas a diversas funções celulares, como particionamento de *replicons*, adaptação térmica, reparo de DNA e rearranjo cromossômico. No entanto, após inúmeras descobertas a partir dos anos 2000, o sistema CRISPR/Cas foi identificado como um mecanismo que confere imunidade adaptativa à procariotos por Barrangou et al. (2007), e o seu modo de atuação foi totalmente compreendido, permitindo que uma nova ferramenta de edição de genomas fosse desenvolvida e empregada em diferentes organismos (Figura 1.4) (SINGH, 2020).



**Figura 1.4.** Marcos importantes na descoberta do sistema CRISPR-Cas. *Genes cas*: codificam as nucleases Cas. *crRNA*: RNA CRISPR. *gRNA*: RNA guia. *tracrRNA*: RNA transativadores. *PAM*: motivo adjacente ao protoespaçador. *DSBs*: quebras na fita dupla do DNA (Adaptado de HSU et al., 2014; SINGH, 2020).

No geral, a imunização mediada pelo sistema CRISPR/Cas ocorre em três etapas principais: adaptação, expressão ou biogênese do RNA CRISPR (crRNA - *CRISPR RNA*) e interferência (Figura 1.5) (MARRAFFINI, 2015). O processo de adaptação caracteriza-se pela captação do material genético exógeno e sua integração no *locus* CRISPR. Os *loci* CRISPR consistem de sequências repetitivas curtas e parcialmente palindrômicas, nomeadas de repetições, as quais são espaçadas por pequenos fragmentos de DNA adquiridos do invasor, denominados de espaçadores. A matriz de repetições/espaçadores é precedida por uma sequência líder, a qual contém um promotor para sua expressão, e é flanqueada por um *operon* de genes *cas*, os quais codificam as proteínas Cas e toda a maquinaria do sistema. Geralmente, os sistemas CRISPR/Cas e seus elementos são altamente variáveis e diferem amplamente em termos de ocorrência, genes, sequências, número e tamanho entre os genomas procarióticos. As repetições podem variar de tamanho, apresentando 23-55 nucleotídeos (nt), embora tenham tipicamente de 28-37 nt. Os espaçadores também variam, de 21-72 nt, mas normalmente possuem de 32-38 nt (BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014).

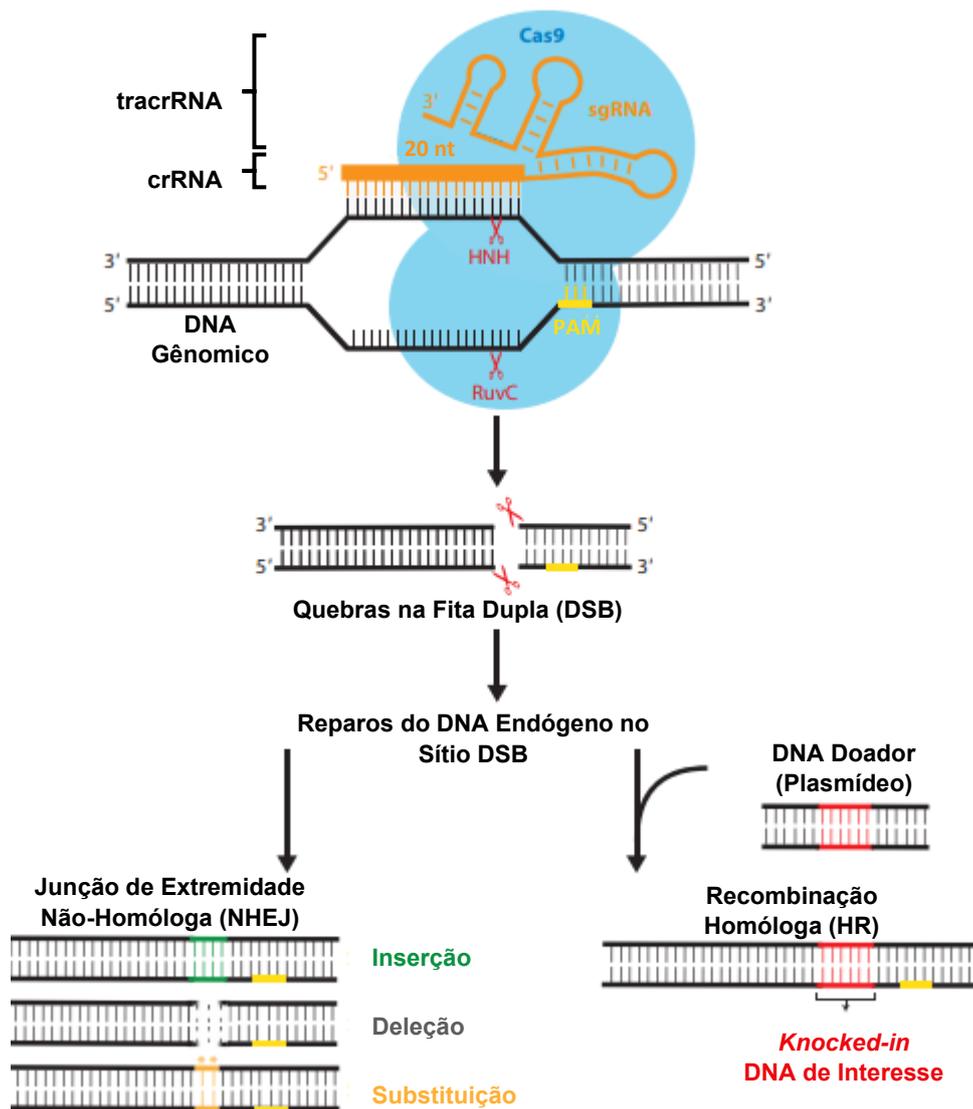


**Figura 1.5.** Imunização de procariotos pelo sistema CRISPR/Cas. *Adaptação:* mecanismo de captação e inserção do DNA exógeno no locus CRISPR (espaçadores), após a sequência líder (L) e entre as repetições. *Expressão ou biogênese do crRNA (RNA CRISPR):* processo de formação do complexo RNA guia-nuclease Cas. *Interferência:* etapa de reconhecimento do material genético invasor por complementariedade das sequências e clivagem por reconhecimento do PAM (motivo adjacente ao protoespaçador) (Adaptado de MARRAFFINI, 2015).

O mecanismo de expressão ou biogênese do crRNA corresponde a transcrição e processamento dos RNAs guias (gRNA - *guide RNA*). Cada gRNA é composto de apenas um espaçador que vai se associar as endonucleases Cas para direcioná-las ao material genético invasor. A interferência é o passo final, onde as sequências exógenas são reconhecidas por complementaridade e posteriormente clivadas pela Cas (MARRAFFINI, 2015). O complexo Cas-crRNA identifica o motivo adjacente ao protoespaçador (PAM - *Protospacer Adjacent Motif*) no DNA ou RNA alvo, o que leva a uma modificação estrutural da proteína Cas com ativação da sua atividade nucleásica (JIANG; DOUDNA, 2017). A clivagem pelo reconhecimento do PAM é essencial para o sucesso do sistema e impede o ataque contra os *loci* CRISPR no genoma microbiano (GLEDITZSCH et al., 2019).

Os sistemas CRISPR/Cas são funcionalmente divididos em duas classes (1 e 2) e seis tipos (I, II, III, IV, V e VI), de acordo com a composição dos genes da nuclease efetora, diferindo nos mecanismos de processamento dos crRNAs. A era da tecnologia CRISPR/Cas para edição de genoma eucariótico emergiu de aplicações do sistema classe 2 e tipo II de *Streptococcus pyogenes*, devido à sua simplicidade, eficiência e acessibilidade (JIANG; MARRAFFINI, 2015; LARROUDE et al., 2018b; MOON et al., 2019).

O sistema tipo II é constituído pela endonuclease Cas9 e o gRNA híbrido, composto por um crRNA que confere especificidade no reconhecimento da sequência alvo, e um RNA transativador auxiliar (tracrRNA - *trans-activating RNA*) que apresenta papel crucial para o recrutamento da Cas9. O crRNA precursor é capaz de se hibridizar com o tracrRNA, formando o complexo crRNA-tracrRNA, o qual é processado pela RNase III para formar o gRNA maduro. *In vitro*, este mecanismo foi facilitado pela síntese do crRNA-tracrRNA fusionado em um único transcrito, gerando a molécula quimérica conhecida como RNA guia único (sgRNA - *single guide RNA*). A associação do sgRNA à Cas9 e o reconhecimento do espaçador de 20 nt, bem como da sequência PAM rica em guanina (5'-NGG-3', onde N pode ser qualquer nucleotídeo) no DNA genômico, permite a quebra nas fitas duplas (DSBs - *Double-Strand Breaks*) (JIANG; DOUDNA, 2017). As DSBs ocorrem normalmente de 3-4 pares de base (pb) *upstream* a sequência PAM, pela atuação de dois diferentes domínios da Cas9. Esta proteína apresenta dois lóbulos distintos, o lóbulo de reconhecimento REC e o lóbulo catalítico NUC, o qual contém os domínios HNH e RuvC de atividade nucleásica, bem como o domínio de interação com o PAM. O domínio HNH é responsável por clivar a fita de DNA complementar ao sgRNA, enquanto que o domínio RuvC cliva a fita oposta, onde está localizado o PAM (Figura 1.6) (JINEK et al., 2012; 2014).



**Figura 1.6.** Mecanismo de edição de genomas eucarióticos por CRISPR/Cas9. A proteína Cas9 combinada com o sgRNA (RNA guia único), composto por crRNA (RNA CRISPR)-tracrRNA (RNA transativador auxiliar), ao encontrar uma região complementar ao espaçador de 20 nucleotídeos e a sequência PAM (motivo adjacente ao protoespaçador) no DNA genômico, gera DSB (quebras nas fitas duplas) pelos seus domínios catalíticos HNH e RuvC. Na ausência de DNA exógeno, a via NHEJ (junção de extremidade não-homóloga), propensa a erro, é ativada e causa inserções e deleções aleatórias (*indels*) ou até mesmo substituições no local DSB, frequentemente resultando na interrupção da função do gene. Na presença de um DNA doador contendo uma sequência de interesse flanqueada por regiões de homologia, a via de reparo dirigida por HR (recombinação homóloga) pode ser iniciada e leva a inserção (*knocked-in*) deste fragmento no genoma da célula (Adaptado de JIANG; DOUDNA, 2017).

As DSBs são comumente reparadas por junção de extremidade não-homóloga (NHEJ - *Non-Homologous End-Joining*). Entretanto, esta via é intrinsecamente propensa ao erro, podendo gerar mutações *indels* pela inserção, deleção ou substituição de nucleotídeos no sítio de clivagem ou próximo a ele. Há também a possibilidade de reparo por recombinação homóloga (HR - *Homologous Recombination*), junção de extremidade homóloga (HMEJ -

*Homology-Mediated End-Joining*) ou junção de extremidade micro-homóloga (MMEJ - *Micro-homology-Mediated End-Joining*). Nesses casos é necessário um DNA doador contendo regiões de homologia com o genoma, para que ocorra a incorporação do fragmento exógeno. Tais alterações podem comprometer a funcionalidade do gene e levar ao seu nocaute (Figura 1.6) (ZHANG et al., 2020).

Assim, a tecnologia CRISPR/Cas9 pode ser orientada para deleção ou inserção de genes, interferência (CRISPRi) e ativação (CRISPRa) (SHARMA; KAUR; SINGH, 2017; SHI et al., 2018). O CRISPRi é usado para a repressão genética por meio de uma Cas9 sem atividade catalítica (dCas9 - *deactivated Cas9*), a qual se liga ao DNA alvo e reprime sua expressão (LARSON et al., 2013). Para melhorar a atividade de repressão, repressores transcricionais geralmente são expressos fusionados a proteína Cas9 (ZHANG et al., 2018). Da mesma forma, o CRISPRa foi desenvolvido para a melhorar os níveis de expressão gênica, através da fusão da dCas9 a ativadores de transcrição que se ligam aos promotores (SIMEONOV et al., 2017).

Em 2016, o método CRISPR/Cas9 foi adaptado pela primeira vez para realizar a interrupção e integração de genes sem marcadores no genoma de *Y. lipolytica* (SCHWARTZ et al., 2016). O gene da *Cas9* foi expresso a partir de um promotor híbrido 8UAS1B-pTEF, juntamente com o sgRNA sob o promotor da RNA-PolIII nativo, combinado com um RNA transportador (tRNA) em um único vetor replicativo, o qual foi nomeado de pCRISPRyl. A interrupção de um único gene chegou a mais de 90% de eficiência, e a co-transformação com uma sequência codificante ocasionou na integração do gene de interesse em cerca de 70% dos casos. A partir de então, diversos estudos estão empregando a técnica CRISPR/Cas9 em diferentes estratégias para edição do genoma de *Y. lipolytica*, expandindo o potencial biotecnológico desta espécie (SCHWARTZ; WHEELDON, 2018; SHI et al., 2018; EGERMEIER; SAUER; MARX, 2019; SCHWARTZ et al., 2019; DE SOUZA et al., 2020; LARROUDE et al., 2020).

### 1.2.3. HETEROGENEIDADE INTRAESPÉCIE

A levedura *Y. lipolytica* exibe naturalmente variabilidade genotípica e fenotípica entre as linhagens isoladas a partir de diferentes ambientes. Por isso, a escolha da cepa parental apropriada é fundamental para o desempenho bem-sucedido de um bioprocessamento industrial

(EGERMEIER et al., 2017). As estirpes selvagens de *Y. lipolytica* mais amplamente exploradas quanto ao seu potencial biotecnológico são as cepas: W29, isolada de um esgoto na França; H222, isolada de um solo na Alemanha; CBS6124-2, isolada de uma planta de processamento de milho nos EUA; e A101, isolada de um solo contaminado na Polônia (NICAUD, 2012; LARROUDE et al., 2018b). Embora a estirpe de referência seja a E150, cujo genoma foi primeiramente sequenciado, esta é uma estirpe laboratorial, derivada de vários cruzamentos entre as cepas W29 e CBS6124-2 (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

A relevância industrial da cepa W29 motivou o desenvolvimento de uma variedade de cepas hospedeiras da série Po1, para a expressão e secreção de proteínas heterólogas. Estas cepas apresentam auxotrofia para um ou dois compostos vitais, como marcador de seleção para manipulação gênica (LARROUDE et al., 2018b; MADZAK, 2018). Consequentemente, os estudos de engenharia genética e/ou metabólica se concentraram nas cepas auxotróficas para as quais já estão disponíveis marcadores. Entretanto, algumas estirpes selvagens superaram fortemente cepas laboratoriais para determinados bioprocessos, o que tem encorajado a engenharia de outras cepas promissoras (LARROUDE et al., 2020).

A linhagem IMUFRJ 50682 foi isolada da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981), e tem demonstrado notável aplicação em vários processos de bioconversão e biorremediação (COELHO; AMARAL; BELO, 2010). Esta cepa exibiu características peculiares relacionadas à sua superfície celular altamente hidrofóbica, com maior capacidade de adesão a solventes não polares, quando comparada à cepa W29 (AMARAL et al., 2006b). Já foi relatado que a cepa brasileira é capaz de consumir isoprenoides e hidrocarbonetos aromáticos, como o grupo de naftalenos e fenantrenos (FERREIRA; COELHO; DA ROCHA-LEÃO, 2012), assim como de servir como biocatalisador de baixo custo para reações de esterificação de ácidos graxos presentes em matérias-primas ácidas, visando a síntese de biodiesel (DA SILVA et al., 2019) e geração de ésteres comerciais (DE SOUZA; RIBEIRO; COELHO, 2019). Contudo, a ausência de informações sobre sua genética tem limitado uma maior exploração do seu potencial. Tais inconvenientes têm sido contornados pelas ferramentas atualmente disponíveis, permitindo a ampliação de sua gama de aplicações (DE SOUZA et al., 2020).

# CAPÍTULO 2:

## MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS

---

### 2.1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são produtos de grande importância industrial. Estima-se que o seu mercado global atinja US\$ 6,4 bilhões em 2027, com uma taxa de crescimento anual de 2,3% (RESEARCH AND MARKETS, 2020). Como a maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados do petróleo, os processos de produção são, muitas vezes, prejudiciais ao meio ambiente. Dentro desse panorama, a produção sustentável de surfactantes tem ganhado atenção, e diversas estratégias vêm sendo empregadas no desenvolvimento dos biosurfactantes como uma alternativa aos produtos existentes, devido à sua maior biodegradabilidade, baixa toxicidade e produção com base em recursos renováveis (BRUMANO; SOLER; DA SILVA, 2016).

Os biosurfactantes são agentes tensoativos produzidos por microrganismos, cujas principais propriedades são a redução da tensão superficial e interfacial de fases imiscíveis de sistemas heterogêneos. Estas características são provenientes de sua estrutura molecular, onde há a coexistência de um domínio de caráter hidrofílico, composto por mono- oligo- ou polissacarídeos, peptídeos ou proteínas, e outro de caráter hidrofóbico, constituído de álcoois ou ácidos graxos (PACWA-ŁŁOCINICZAK et al., 2011). Tal estrutura permite a formação de um filme molecular ordenado nas interfaces, tornando-os adequados para diversas aplicações industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante e molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

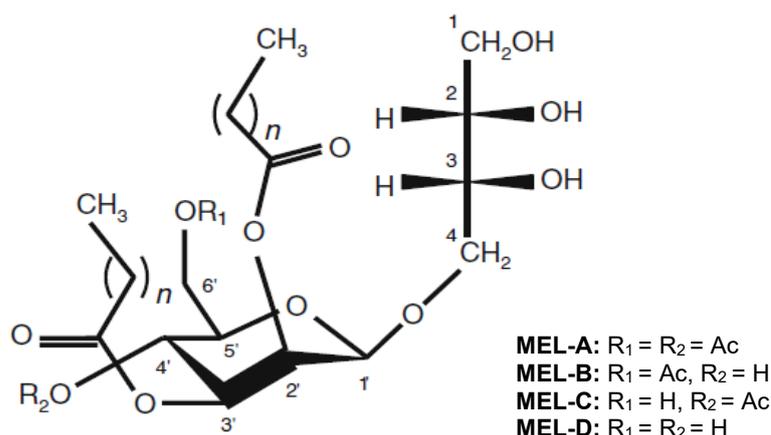
A classe dos biosurfactantes mais extensivamente estudada compreendem os glicolipídios, dos quais os manosileritritol lipídios têm emergido como promissores compostos, devido às suas versáteis funções bioquímicas (YU et al., 2015). Apesar do crescente interesse, o escalonamento do bioprocessamento encara dificuldades, visto que seus níveis de produtividade ainda não compensam os custos operacionais, impossibilitando a sua real penetração no mercado (ROELANTS et al., 2014). Embora algumas estratégias baseadas no uso de substratos de baixo custo (FARIA et al., 2014), na otimização das condições de cultivo (NIU et al., 2017) e no aperfeiçoamento dos processos *downstream* (RAU et al., 2005) venham sendo empregadas, o desenvolvimento de outras espécies geneticamente modificadas para a produção de MELs é uma abordagem que ainda não foi explorada.

## 2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.2.1. MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS

#### 2.2.1.1. Características Estruturais, Microrganismos Produtores e Via Biossintética

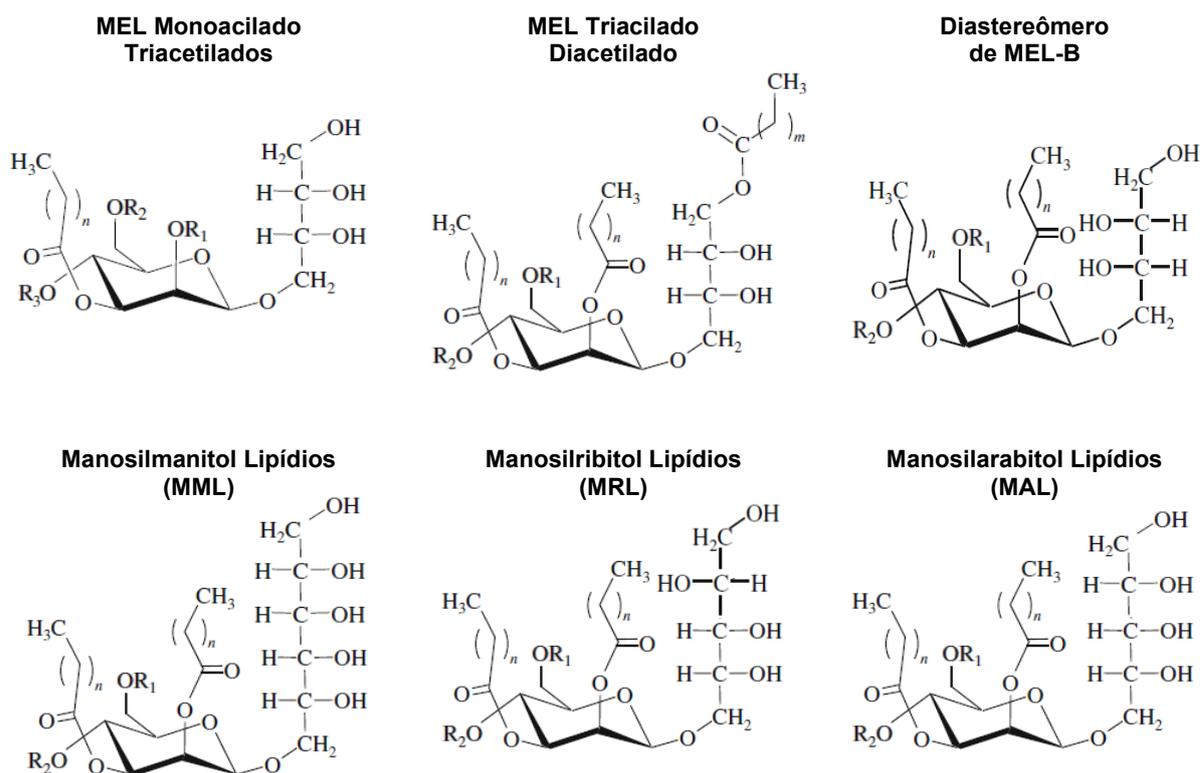
Os manosileritritol lipídios (MELs) foram descritos pela primeira vez por Haskins, Thorn e Boothroyd, em 1955. A sua estrutura convencional consiste do dissacarídeo 4-O- $\beta$ -D-manopiranosil-eritritol como a porção hidrofílica, e grupamentos acila de cadeia curta em C2' (C2 a C8) e média ou longa em C3' (C10 a C18), bem como grupos acetila adicionais em C4' e/ou C6', constituindo a fração hidrofóbica. Com base no grau de acetilação, estes glicolipídios são tradicionalmente classificados como MEL-A, -B, -C ou -D. O MEL-A representa o composto diacetilado, enquanto o MEL-B e -C são monoacetilados em C6' e C4', respectivamente, e o MEL-D não possuiu acetilação (Figura 2.1) (HEWALD et al., 2006).



**Figura 2.1.** Estrutura química convencional dos manosileritritol lipídios ( $n=2$  a 18;  $R_1$  e  $R_2$ =radicais; Ac=grupos acetila)(MORITA et al., 2015).

Outras estruturas não convencionais já foram identificadas e caracterizadas como: MELs monoacilado triacetilados, pela presença de ácidos graxos somente na região C3', com C2', C4' e C6' acetilados; MELs triacilados diacetilados, devido à acilação em C2', C3' e C1 do eritritol; e diastereômeros de MEL-B, onde a porção glicídica foi identificada como 1-O- $\beta$ -D-manopiranosil-eritritol, estereoquimicamente diferente da estrutura clássica dos MELs (FUKUOKA et al., 2007a; 2007b; 2008). Além dessas variações, também foi reportado a substituição do eritritol por outros polióis, com a formação do manosilmanitol lipídios (MML), manosilribitol lipídios (MRL) e manosilarabitol lipídios (MAL) (Figura 2.2) (MORITA et al., 2009; 2012).

Portanto, a diversidade estrutural destes glicolipídios está relacionada com: (I) a presença, quantidade e posições de acetilações; (II) o número de grupamentos acila presentes em diferentes regiões da fração glicídica, assim como o seu comprimento e características de saturação; e (III) a configuração óptica e composição da porção hidrofílica (ARUTCHELVI et al., 2008; BECK; WERNER; ZIBEK, 2019).



**Figura 2.2.** Estrutura química não-convencional dos glicolipídios baseados em manose ( $n = 4$  a  $16$ ;  $m = 6$  a  $16$ ;  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  = radicais) (MORITA et al., 2015).

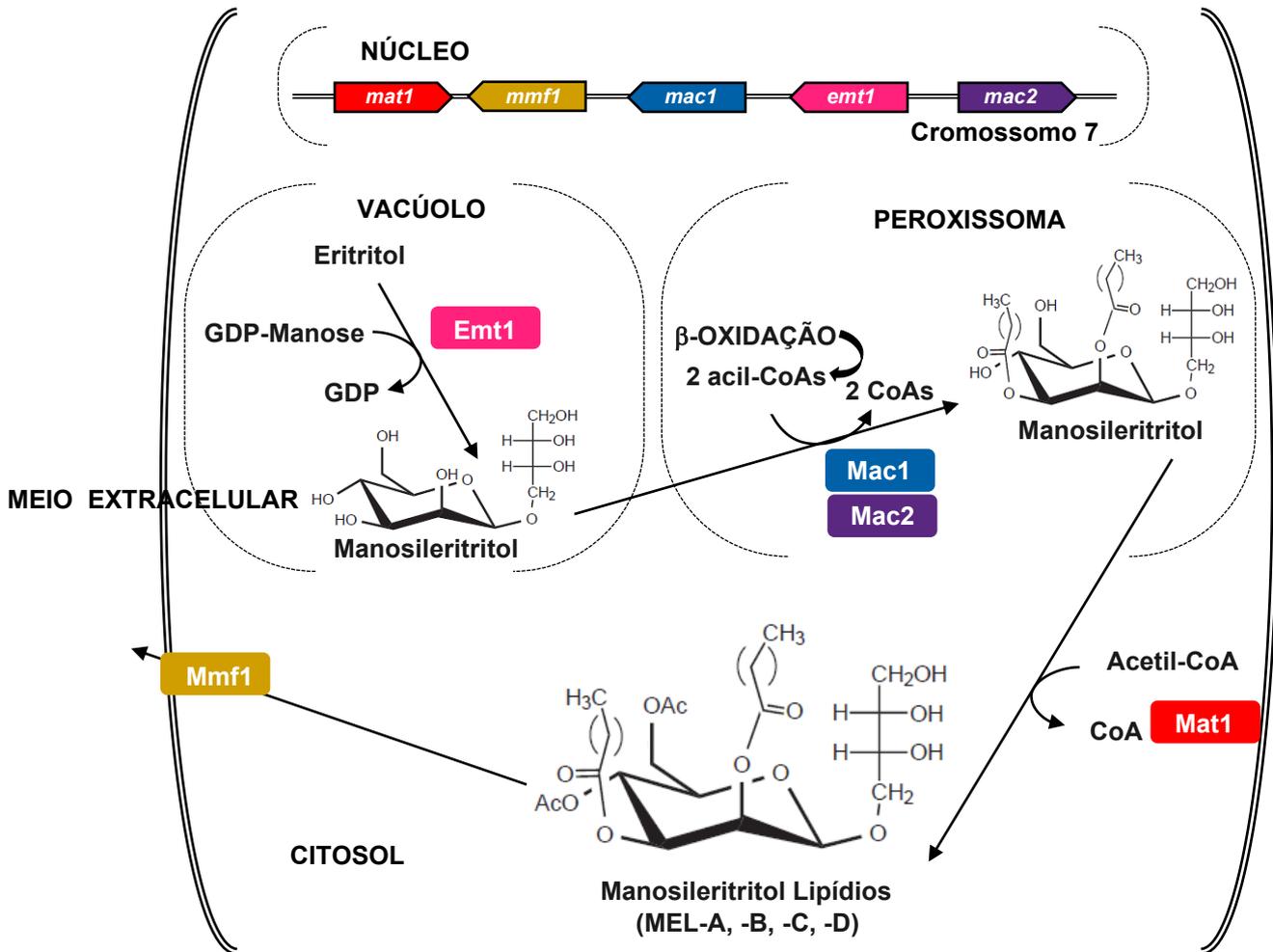
Os MELs são sintetizados por diversas espécies fúngicas como metabólitos secundários, dentre elas *Kurtzmanomyces* sp., *Schizonella melanogramma*, *Ceriporia lacerate*, *Geotrichum candidum*, *Dirkmeia churashimaensis*, *Kalmanozyma fusiformata* e *Triodionyces crassus*. Contudo, as mais estudadas pertencem aos gêneros *Ustilago*, *Sporisorium*, *Moesziomyces* e *Pseudozyma pro tem.*<sup>2</sup> (HEWALD; JOSEPHS; BÖLKER, 2005; MORITA et al., 2015).

<sup>2</sup> As espécies dos gêneros *Sporisorium* e *Moesziomyces* foram originalmente classificadas juntas como *Pseudozyma* sp., com base em características morfológicas e fisiológicas. No entanto, análises filogenéticas recentes baseadas em genes ribossômicos e proteicos resultaram na transferência dessas espécies para novos gêneros dentro da classe Ustilaginomycetes. Além disso, as espécies *Pseudozyma hubeiensis* e *Pseudozyma tsukubaensis* também foram reclassificadas, mas como ainda não receberam um novo nome, estão sendo denominadas temporariamente de *P. hubeiensis pro tempore (pro tem.)* e *P. tsukubaensis pro tem.* (BECK; WERNER; ZIBEK, 2019).

Embora a função biológica dos MELs não seja completamente compreendida, acredita-se que este glicolípido possa atuar como molécula de armazenamento de energia e contribuir na colonização, por aumentar a disponibilidade de nutrientes em superfícies hidrofóbicas (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002). Como o primeiro relato sobre a produção de MELs foi relacionada à espécie *Ustilago maydis*, os estudos foram direcionadas a este fungo filamentosso, o que possibilitou a identificação dos genes, a suposição da via metabólica e a localização subcelular das enzimas envolvidas em sua biossíntese (HEWALD et al., 2006; FREITAG et al., 2014).

A síntese de MELs abrange uma série de enzimas residentes em diferentes compartimentos celulares, cujos genes envolvidos estão rearranjados em um *cluster* gênico, facilitando desse modo a sua ativação e regulação. O gene *emt1* codifica a manosiltransferase vacuolar Emt1, envolvida no primeiro passo da via biossintética: a manosilação do eritritol a partir de uma guanosina difosfato manose (GDP-manose - *Guanosine Diphosphate Mannose*) para a formação do dissacarídeo manosileritritol. Os genes *mac1* e *mac2* codificam duas aciltransferases peroxissomais Mac1 e Mac2, específicas em regioselectividade e nas suas preferências pelo comprimento dos ácidos graxos, sendo responsáveis pelas acilações do manosileritritol em C2' e C3' com cadeias acil-CoAs curtas e médias ou longas, respectivamente, provenientes da  $\beta$ -oxidação peroxissomal, para a geração do MEL mono- e/ou diacilado. O gene *mat1* codifica a acetiltransferase Mat1 ancorada à membrana interna e relacionada com a acetilação do glicolípido nas regiões C4' e/ou C6', originando os MELs mono- e/ou diacilado mono- e/ou diacetilados. E, o gene *mmf1* codifica uma proteína transmembrana da superfamília dos principais facilitadores (MFS - *Major Facilitator Superfamily*), para mediar a secreção dos MELs para o meio extracelular (Figura 2.3) (HEWALD et al., 2005; 2006; FREITAG et al., 2014; SAIKA et al., 2018).

Entretanto, Freitag et al. (2014) investigaram a atividade das aciltransferases Mac1 e Mac2 no citosol da espécie *U. maydis*, pela remoção do peptídeo sinal peroxissomal (PTS1 - *Peroxisomal Targeting Signal Type 1*), presente na região C-terminal destas enzimas. O direcionamento de ambas aciltransferases para o citoplasma da cepa recombinante não bloqueou a síntese de MELs e levou a produção dos mesmos variantes, porém, com um padrão de acilação alterado, quando comparado com o produto secretado pela cepa selvagem. A composição de ácidos graxos apresentou uma variabilidade substancialmente reduzida, o que segundo os autores, ocorreu provavelmente devido ao menor espectro de cadeias acil-CoAs disponíveis no citosol, em comparação com o peroxissoma.



**Figura 2.3.** Biossíntese de manosileritritol lipídios descrita para a espécie *Ustilago maydis* UM521. Os genes *emt1*, *mac1*, *mac2*, *mat1* e *mmf1* estão rearranjados em um cluster gênico localizado no cromossomo 7. A manosiltransferase vacuolar Emt1 é responsável pela manosiilação do eritritol através da GDP-manose (guanosina difosfato manose) para a formação do manosileritritol. O dissacarídeo é encaminhado para o peroxissoma, onde sofrerá acilação pela ação das aciltransferases Mac1 e Mac2, a partir de cadeias acil-CoAs provenientes da β-oxidação peroxissomal. O MEL diacilado é direcionado ao citosol e pode sofrer acetilações pela acetiltransferase Mat1. O glicolípido diacetilado (MEL-A), monoacetilado (MEL-B, -C) e/ou desacetilado (MEL-D) sintetizado é, então, secretado pela proteína transmembrana MMF1. *GDP*: guanosina difosfato. *CoA*: coenzima A. (Adaptado de HEWALD et al., 2006; FREITAG et al., 2014).

A posteriori, o *cluster* responsável para biossíntese de MELs também foi encontrado nas espécies *M. antarcticus* (MORITA et al., 2013), *P. hubeiensis pro tem.* (KONISHI; HATADA; HORIUCHI, 2013), *M. aphidis* (LORENZ et al., 2014), *P. tsukubaensis pro tem.* (SAIKA et al., 2016) e *U. hordei* (DEINZER et al., 2019). As seqüências de aminoácidos das proteínas envolvidas apresentaram elevado grau de identidade entre si (> 50% de homologia), sugerindo similaridade nos mecanismos metabólicos empregados para síntese do glicolípido pelas cepas (SAIKA et al., 2016; DEINZER et al., 2019).

### 2.2.1.2. Propriedades Físico-Químicas e Campos de Atuação

As propriedades físico-químicas dos MELs estão relacionadas com a sua estrutura, que por sua vez depende do microrganismo produtor e do substrato utilizado para sua síntese. Em geral, o MEL-A é o mais abundante, enquanto que MEL-D normalmente é produzido em menores concentrações. Esta família de moléculas tensoativas é capaz de reduzir a tensão superficial para menos de  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , com valores de CMC (Concentração Micelar Crítica) na faixa de  $2,7\text{-}6,0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , além de se organizar espontaneamente em estruturas singulares (ARUTCHELVI et al., 2008) e apresentar boa estabilidade quando submetidas a elevadas temperaturas, concentrações de sais e em ampla faixa de valores de pH (SAJNA et al., 2013).

A microemulsão de água-em-óleo (W/O - *Water-in-Oil*) comumente requer o uso de uma mistura de agentes tensoativos com sal ou álcool. No entanto, já foi relatado que MEL-A é capaz de formar microemulsões W/O estáveis no sistema ternário MEL-A/água/decano, sem quaisquer outros aditivos, com diâmetro variando de 20 - 60 nm e valor máximo da razão molar água/agente tensoativo de 20, a qual é tão elevada como da lecitina de soja. Adicionalmente, foi observada a formação de vesículas unilamelares gigantes (GUV - *Giant Unilamellar Vesicles*) por MEL-B e -C, de diâmetro maior do que  $10 \mu\text{m}$  em solução aquosa, indicando uma surpreendente propriedade de orientação molecular e um equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico superior (KITAMOTO et al., 2009). Em contraste, foi verificado a formação das fases  $L_3$  e  $L_\alpha$ , por MEL-A e -D, respectivamente. A fase  $L_3$  é geralmente preparada a partir de sistemas com vários componentes, como agentes tensoativos com sal/co-solvente ou dois polieletrólitos de cargas opostas. Curiosamente, MEL-A foi descrito como o primeiro composto a demonstrar individualmente tal estrutura molecular. A fase  $L_\alpha$  normalmente ocorre em sistemas tensoativos concentrados, entretanto MEL-D mostrou capacidade de formar este arranjo em todas as concentrações. A diferença causada pela presença do grupo acetila na porção da manose, é provavelmente muito importante para a auto modelagem dos MELs (FUKUOKA et al., 2011).

Considerando as suas propriedades, os MELs encontram múltiplas aplicações industriais, englobando, principalmente, as áreas cosméticas e farmacêuticas. As empresas *Kanebo*, *Daito Kasei Kogyo* e *Toyobo* (Japão) têm comercializado e patenteado estas moléculas como ingredientes cosméticos em formulações hidratantes de pele e cabelos e fixadores de pigmentos. A *Aventis Pharma* (Alemanha) publicou uma patente relativa à um glicolipídio produzido por *U. maydis* DSM11494 para ser utilizado no tratamento da esquizofrenia ou doenças causadas por disfunção metabólica de dopamina (ROELANTS et

al., 2014). Ademais, já foram descritos na literatura o uso promissor destes compostos na atividade antitumoral e indutora de diferenciação celular, desenvolvimento de terapias genéticas para transfecção de genes facilitada por lipossomas catiônicos, isolamento de glicoproteínas, aditivo em agroquímicos e biopesticidas, e biodegradação de contaminantes orgânicos e petróleo (ARUTCHELVI et al., 2008; YU et al., 2015; FUKUOKA et al., 2016).

### 2.2.1.3. Estratégias de Produção e Recuperação

Os processos biotecnológicos de produção de MELs ostentam elevadas produções específicas do glicolipídio, principalmente a partir de substratos hidrofóbicos como os óleos vegetais, em condições de limitação de nitrogênio e/ou uma elevada razão C/N (ARUTCHELVI et al., 2008). A preferência por tais compostos ocorre pelo fato da fração lipídica ser gerada diretamente da oxidação parcial dos ácidos graxos proveniente do óleo, sem requerer a síntese *de novo*, normalmente levando a formação de uma mistura de MELs (Tabela 2.1)(KITAMOTO et al., 1998; FARIA et al., 2014; BECK; WERNER; ZIBEK, 2019).

**Tabela 2.1.** Produção de manosileritritol lipídios em frascos agitados pelas espécies naturalmente produtoras a partir de diferentes substratos, com suas produtividades ( $Q_{MEL}$ ) e principais variantes de MELs sintetizados.

| Microrganismos Produtores                | Substrato (Fonte de Carbono)               | MEL (g.L <sup>-1</sup> ) | $Q_{MEL}$ * (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )* | Variantes de MELs                |
|--|--|--------------------------|--|----------------------------------|
| <i>Moesziomyces rugulosus</i> NBRC10877  | Óleo de Soja + Eritritol (8%) <sup>a</sup> | 142,0                    | 0,211  | MEL-A, -B, -C Diacilado          |
| <i>Moesziomyces rugulosus</i> JCM10323   | Glicerol (10%)                             | 1,3                      | 0,007  | MEL Monoacilado<br>MEL Diacilado |
| <i>Moesziomyces antarcticus</i> T-34     | Octadecano (6%) <sup>ab</sup>              | 140,0                    | 0,208  | MEL-A, -B, -C, -D Diacilado      |
|  | Óleo de Soja (8%) <sup>b</sup>             | 47,0                     | 0,326  | MEL-A, -B, -C, -D Diacilado      |
|  | Óleo de Soja (8%)                          | 40,0                     | 0,238  | MEL-A, -B, -C, -D Diacilado      |
|  | Glicose (10%)                              | 5,6                      | 0,033  | MEL Monoacilado<br>MEL Diacilado |
| <i>Moesziomyces antarcticus</i> JCM10317 | Glicerol (10%) + Manose (2%) <sup>a</sup>  | 16,3                     | 0,067  | MEL-A, -B, -C Diacilado          |
|  | Glicose (10%)                              | 4,5                      | 0,026  | MEL Monoacilado<br>MEL Diacilado |

| Continuação  |  |  |                |                                   |
|--|--|--|----------------|-----------------------------------|
|  | Xilana (4%)  | 1,3  | 0,006          | MEL<br>Diacilado                  |
| <i>Moesziomyces antarcticus</i><br>PYCC5048 <sup>T</sup>           | Celulose (4% m/v;<br>4% de glucana)                  | 2,9(SSF) <sup>c</sup><br>4,0(SHF) <sup>c</sup> | 0,012<br>0,017 | MEL<br>Diacilado                  |
|  | Palha de Trigo (6%<br>m/v; 4% de glucana)            | 1,1(SSF) <sup>c</sup><br>1,4(SHF) <sup>c</sup> | 0,004<br>0,006 | MEL<br>Diacilado                  |
| <i>Moesziomyces parantarcticus</i><br>JCM 11752                    | Óleo de Soja (16%) <sup>a</sup>                      | 106,7  | 0,158          | MEL Diacilado;<br>MEL Triacilado  |
|  | Glicerol (10%)                                       | 4,6  | 0,027          | MEL Monoacilado<br>MEL Diacilado  |
| <i>Moesziomyces aphidis</i><br>DSM70725                            | Óleo de Soja (8%) <sup>a</sup>                       | 75,0   | 0,312          | MEL-A, -B, -C, -D<br>Diacilado    |
| <i>Moesziomyces aphidis</i><br>PYCC5535 <sup>T</sup>               | Celulose (4% m/v;<br>4% de glucana)                  | 1,9(SSF)<br>1,1(SHF)                           | 0,007<br>0,004 | MEL<br>Diacilado                  |
|  | Palha de Trigo (6%<br>m/v; 4% de glucana)            | 0,9(SSF)<br>0,9(SHF)                           | 0,003<br>0,003 | MEL<br>Diacilado                  |
| <i>Moesziomyces aphidis</i><br>JCM10318                            | Glicerol (10%)                                       | 1,6  | 0,009          | MEL Monoacilado<br>MEL Diacilado  |
| <i>Pseudozyma hubeiensis</i><br><i>pro tem.</i> SY62 $\Delta$ MAT1 | Óleo de Oliva<br>+ Glicose (10%) <sup>a</sup>        | 91,6   | 0,545          | MEL-D Diacilado<br>MEL Triacilado |
| <i>Pseudozyma hubeiensis</i><br><i>pro tem.</i> KM-59              | Óleo de Soja (4%) <sup>a</sup>                       | 74,3   | 0,19           | MEL-A, -B, -C<br>Diacilado        |
| <i>Pseudozyma tsukubaensis</i><br><i>pro tem.</i> JCM16987         | Óleo de Oliva (12%)                                  | 45,0   | 0,375          | MEL-B<br>Diacilado                |
| <i>Pseudozyma tsukubaensis</i><br><i>pro tem.</i> JCM10324 +LIPB   | Óleo de Oliva (6%)<br>+ Glicerol (0,2%) <sup>a</sup> | 37,0   | 0,308          | MEL-B<br>Diacilado                |
| <i>Pseudozyma tsukubaensis</i><br><i>pro tem.</i> JCM10324         | Óleo de Oliva (4%)                                   | 25,0   | 0,148          | MEL-B<br>Diacilado                |
|  | Óleo de Ricínio (10%)                                | 22,0   | 0,130          | MEL-B<br>Diacilado                |
| <i>Ustilago siamensis</i><br>NII08165                              | Óleo de Soja (8%)                                    | 34,0   | 0,157          | MEL-A, -B, -C<br>Diacilado        |
| <i>Ustilago siamensis</i><br>CBS9960                               | Óleo de Cártamo<br>+ Glicose (4%)                    | 18,5   | 0,085          | MEL-B, -C<br>Diacilado            |
| <i>Sporisorium</i> sp.<br>aff. <i>Sorghii</i> SAM20                | Óleo de Soja (4%)                                    | 32,0   | 0,190          | MEL-A, -B, -C<br>Diacilado        |
| <i>Ustilago maydis</i><br>DSM4500                                  | Óleo de Girassol<br>(4,5%) <sup>a</sup>              | 30,0   | 0,208          | MEL-A, -B<br>Diacilado            |

| Continuação                                 |  |      |       |                            |
|---|--|------|-------|----------------------------|
| <i>Triodomyces crassus</i><br>CBS9959       | Ácido Oléico<br>+ Glicose (4%)         | 4,6  | 0,027 | MEL-A, -B, -C<br>Diacilado |
| <i>Ustilago shanxiensis</i><br>CBS10075     | Óleo de Soja (4%)                      | 2,7  | 0,028 | MEL-B, -C<br>Diacilado     |
| <i>Ustilago cynodontis</i><br>NBRC7530      | Óleo de Soja (4%)                      | 1,4  | 0,008 | MEL-C<br>Diacilado         |
| <i>Sporisorium scitamineum</i><br>NBRC32730 | Suco de Laranja<br>(22,4% de açúcares) | 25,1 | 0,149 | MEL-B<br>Diacilado         |
| <i>Dirkmeia churashimaensis</i><br>OK96     | Óleo de Lula (5%)                      | 9,6  | 0,057 | MEL<br>Diacilado           |
|   | Glicose (5%)                           | 3,8  | 0,031 | MEL-A<br>Diacilado         |

Adaptada de BECK, WERNER e ZIBEK (2019).

\*  $Q_{MEL}$  calculado a partir das informações fornecidas pelos autores.

<sup>a</sup> Cultivos com alimentação

<sup>b</sup> Abordagem de *resting cells*.

<sup>c</sup> SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*) e SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

Entretanto, a produtividade dos bioprocessos é geralmente baixa, variando de 0,13-0,37 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Tabela 2.1), e as fermentações possuem altos custos operacionais, relacionados, essencialmente, aos processos *downstream*. Isso porque, o uso de substrato lipídico leva a coexistência de subprodutos, como ácidos graxos livres, mono- e diacilgliceróis, provenientes de sua degradação por lipases extracelulares secretadas durante a fermentação, requerendo complexos processos de extração e purificação do produto final. Desse modo, a recuperação do glicolipídio necessita de várias etapas com solventes orgânicos seguidos de cromatografia em coluna para a obtenção de altos níveis de pureza e separação dos diferentes MELs, levando a perdas significativas no rendimento (RAU et al., 2005; FARIA et al., 2014).

Uma abordagem alternativa para a extração de MELs foi patenteada por Rau et al. (2004). O princípio se baseia no tratamento térmico da suspensão da cultura à 110 °C por 10 min, onde há a formação de duas fases. A fase sólida inferior apresentou 88% de MEL e apenas pequenas quantidades, de 6,6 e 5,1% de ácidos graxos e óleo residual, respectivamente. Além disso, 93% do MEL inicialmente presente na suspensão da cultura, foram transferidos para esta fase sólida, indicando uma alta eficiência do processo. Porém, este método não foi testado em outros sistemas de produção, especialmente quando as produções específicas de MELs são consideravelmente mais baixos (< 100 g.L<sup>-1</sup>) (RAU et al., 2005).

Assim, o uso de resíduos de natureza hidrofílica, como materiais lignocelulósicos e glicerol, representa uma alternativa para a produção sustentável e rentável de MELs, pela redução dos custos do substrato e dos inconvenientes dos processos *downstream*. Porém, tais substratos, assim como outros carboidratos, levaram a uma drástica redução no rendimento por certas estirpes produtoras (Tabela 2.1) (MORITA et al., 2007; FARIA et al., 2014; 2015). Fukuoka et al. (2007) ao investigar a produção extracelular de MEL de leveduras representativas, utilizando de fontes de carbono hidrossolúveis em vez de óleos vegetais, detectou concentrações máximas de aproximadamente 6 g.L<sup>-1</sup> do glicolipídio a partir de 10% glicose, pelas leveduras *M. antarcticus*, *M. aphidis*, *M. rugulosus*, *M. parantarcticus* e *Pseudosyma pro tem.* spp. Recentemente, Andrade et al. (2017) aplicaram a ultrafiltração com membranas de 100 kDa MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) para a recuperação de MELs presentes na espuma formada durante a fermentação a partir da manipueira, em biorreatores de bancada. O sistema levou à purificação do MEL em única etapa, com recuperação de 80% do glicolipídio, se mostrando um método promissor.

A produção de MELs também tem sido relatada por cepas engenheiradas, derivadas das espécies naturalmente produtoras, para modificações no padrão de acilação e/ou acetilação (BECK; WERNER; ZIBEK, 2019). A biossíntese seletiva de grandes quantidades de MEL-D foi alcançada devido à deleção do gene *mat1* em *P. hubeiensis pro tem.* (KONISHI; MAKINO, 2018). Em outra abordagem, Saika et al. (2018) construiu uma cepa de *P. tsukubaensis pro tem.* capaz de produzir somente MEL monoacilado pela deleção do gene que codifica a aciltransferase (*PtMAC2*). Apesar destes avanços, a clonagem dos genes envolvidos na síntese de MELs em microrganismos não produtores, são abordagens que ainda não foram exploradas.

### 2.2.2. PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica*

Até o momento, não há relatos na literatura da produção de MELs por *Y. lipolytica*. Entretanto, esta levedura reúne vantajosas propriedades para atuar como uma plataforma alternativa para tal bioprocessos, incluindo intenso metabolismo lipídico (BEOPOULOS; NICAUD, 2012), capacidade de produção de eritritol a partir de subprodutos (RAKICKA et al., 2016), altas densidades celulares durante o cultivo em biorreatores (VANDERMIES; FICKERS, 2019) e versáteis ferramentas de biologia sintética (LARROUDE et al., 2018b).

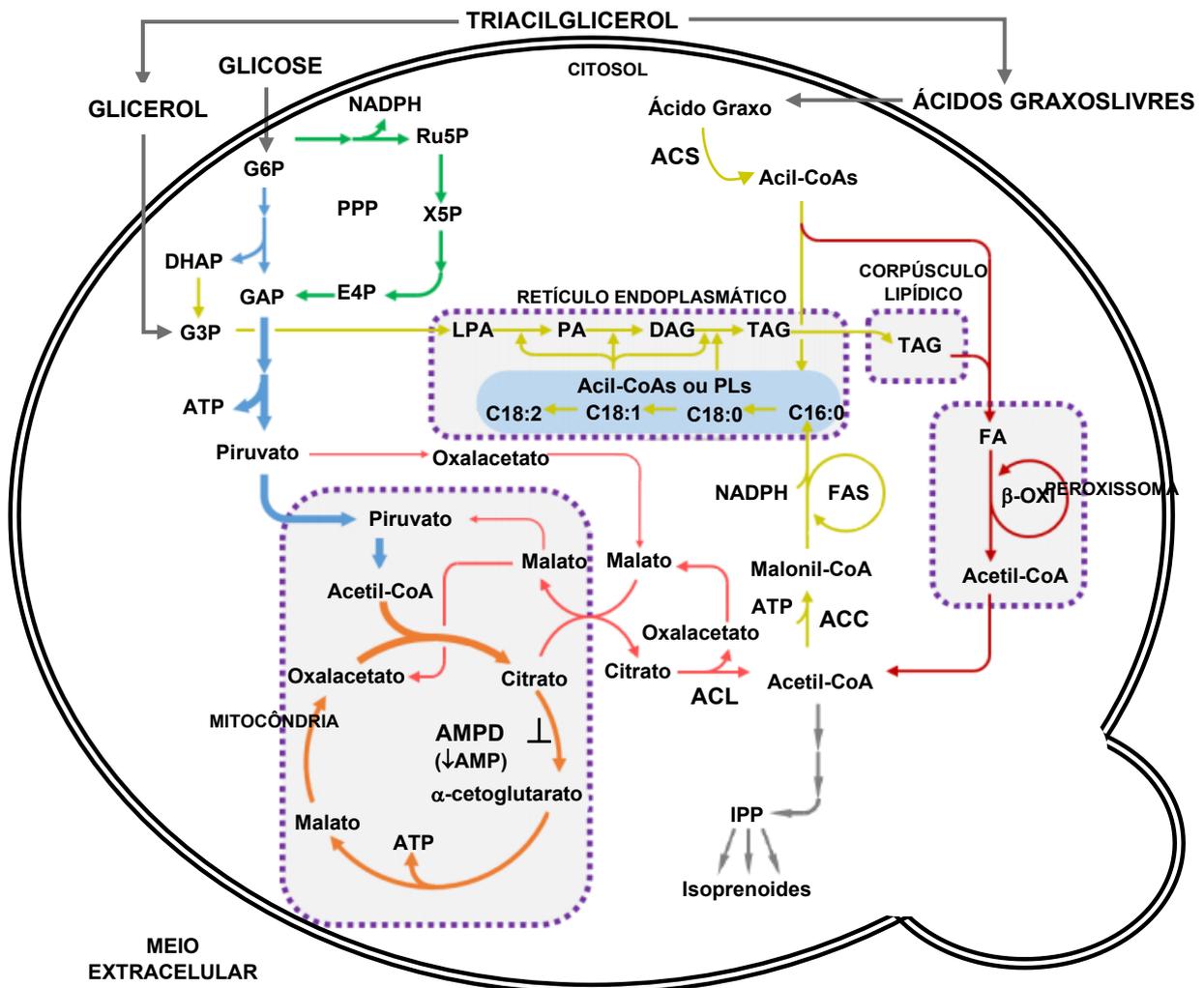
### 2.2.2.1. Biossíntese dos Precursores: Lipídios, Manose e Eritritol

O acúmulo de lipídios por *Y. lipolytica* pode ocorrer através de duas vias metabólicas distintas: via de síntese *de novo* e via de acumulação *ex novo*. Ambas as vias são normalmente induzidas quando a concentração de nitrogênio no meio se torna limitante e a quantidade de carbono presente está em excesso. Isto porque, durante o crescimento microbiano, o fluxo de nitrogênio é direcionado para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, enquanto que o fluxo de carbono é distribuído não só para o metabolismo destes, mas também de lipídios e polissacarídeos. No entanto, em baixos níveis de nitrogênio, a proliferação celular diminui rapidamente, ao passo que a taxa de assimilação de carbono é reduzida de forma mais gradual. Desse modo, as vias de síntese de ácido nucleico e proteínas passam a serem reprimidas à medida que outras são induzidas, resultando na canalização preferencial do fluxo de carbono para a síntese e acúmulo de lipídios (RATLEDGE; WYNN, 2002; BEOPOULOS et al., 2009).

A via *de novo* envolve a formação dos precursores da síntese de ácidos graxos pela atividade cooperativa das enzimas: AMP desaminase (AMPD - *AMP Deaminase*), ATP-citrato liase (ACL - *ATP-Citrate Lyase*) e acetil-CoA carboxilase (ACC - *Acetyl-CoA Carboxylase*), causando uma série de eventos regulatórios em cascata. Em condições de limitação de nitrogênio e altas concentrações de substratos de natureza hidrofílica, há uma rápida diminuição nos níveis intracelulares de adenosina monofosfato (AMP - *Adenosine Monophosphate*), devido à ação da AMPD (RATLEDGE; WYNN, 2002). A baixa concentração de AMP causa a inibição da isocitrato desidrogenase (IDH - *isocitrate dehydrogenase*), o que leva à regulação negativa do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA - *Tricarboxylic Acid*) e acúmulo de citrato nas mitocôndrias. O citrato intramitocondrial em excesso é transportado para o citosol, onde é clivado pela ACL em acetil-CoA e oxalacetato. O acetil-CoA citosólico sofre carboxilação pela ACC formando malonil-CoA, o qual é adicionado a cadeia acil-CoA crescente pela ação do complexo multienzimático ácido graxo sintase (FAS - *Fatty Acid Synthase*), na presença do co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), fornecido pela via das Pentoses Fosfato (PPP - *Pentose Phosphate Pathway*) (Figura 2.4) (BLAZECK et al., 2014; LAZAR; LIU; STEPHANOPOULOS, 2018).

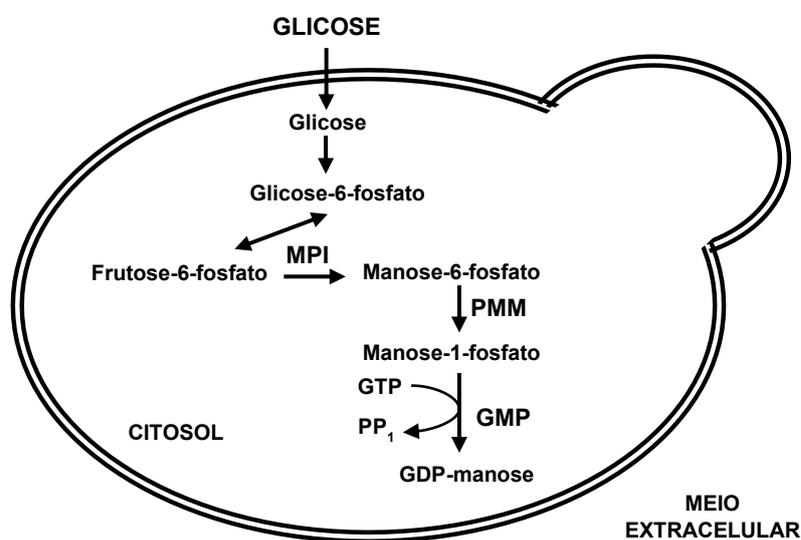
Em contrapartida, a via *ex novo* envolve a incorporação de ácidos graxos presentes no meio e o seu armazenamento intracelular. Em condição de excesso de substrato hidrofóbico, a levedura *Y. lipolytica* secreta lipases extracelulares para a hidrólise e liberação de ácidos graxos livres. Estes são transportados para dentro da célula com auxílio de agentes emulsificantes e posteriormente ativados pela adição da coenzima A, através da ação da

enzima acil-CoA sintetase (ACS - *Acetyl-CoA Synthetase*). Os acil-CoAs formados pelas vias de síntese *de novo* e via de acumulação *ex novo* são empregados na montagem de triacilglicerol ou outros lipídios, os quais podem ser utilizados para síntese de membrana, acumulados em corpúsculos lipídicos ou subsequentemente degradados pela  $\beta$ -oxidação peroxissomal (Figura 2.4) (BEOPOULOS; NICAUD, 2012; GÁLVEZ-LÓPEZ et al., 2019).



**Figura 2.4.** Vias de acúmulo de lipídios em *Yarrowia lipolytica*. Na via *de novo*, a limitação de nitrogênio e elevadas concentrações de glicose levam a um aumento da concentração de acetil-CoA intramitocondrial, decorrente da desaminação da AMP (adenosina monofosfato) pela ação da enzima AMPD (AMP desaminase), resultando na acumulação de citrato nas mitocôndrias. O citrato em excesso é transportado para o citosol e clivado em acetil-CoA e oxalacetato pela ACL (ATP citrato liase). O acetil-CoA citosólico é convertido em malonil-CoA pela ACC (acetil-CoA carboxilase). Esses precursores e o NADPH fornecido pela via das PPP (pentoses fosfato) são empregados na síntese de acil-CoAs pelo FAS (ácido graxo sintase). Na via *ex novo*, os ácidos graxos livres em excesso no meio, são transportados para o citosol e ativados através da adição da coenzima A pela ACS (acil-CoA sintetase). Os acil-CoAs formados por ambas as vias participam da síntese de triacilglicerol (TAG), que são estocados em corpúsculos lipídicos e degradados pela  $\beta$ -oxidação peroxissomal. *G6P*: glicose-6-fosfato. *DHAP*: dihidroxiacetona-fosfato. *GAP*: gliceraldeído-3-fosfato. *ATP*: adenosina trifosfato. *Ru5P*: ribulose 5-fosfato. *X5P*: xilulose 5-fosfato. *E4P*: eritrose 4-fosfato. *LPA*: ácido lisofosfatídico. *PA*: ácido fosfatídico. *DAG*: diacilglicerol. *PL*: fosfolipídio. *FA*: ácido graxo (Adaptado de MLÍČKOVÁ et al., 2004; ABDEL-MAWGOUD et al., 2018).

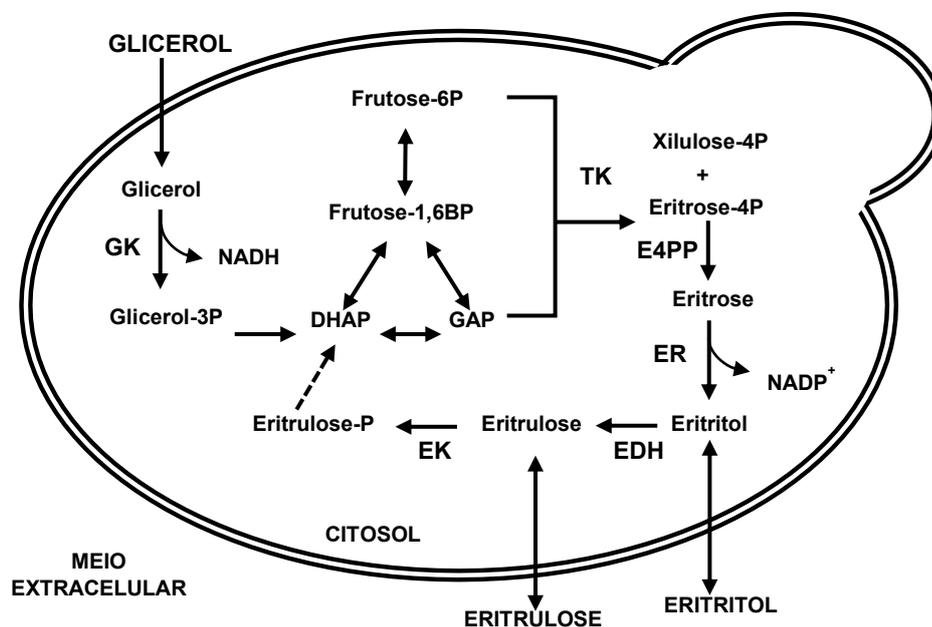
A biossíntese de D-manose e GDP-D-manose é de extrema importância para a manutenção da atividade celular em eucariotos, participando das vias de síntese de polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios (GAO; DEAN, 2000). A GDP-D-manose é sintetizada a partir da frutose-6-fosfato em três reações sucessivas, as quais incluem a isomerização em manose-6-fosfato catalisada por uma fosfomanose isomerase (MPI - *Mannose-6 Phosphate Isomerase*), seguida de conversão em manose-1-fosfato mediada por uma fosfomanomutase (PMM - *Phosphomannomutase*) e adição de GDP por uma GDP-manose pirofosforilase (GMP - *GMP-Mannose Pyrophosphorylase*) (Figura 2.5) (HOLLANDS et al., 2019).



**Figura 2.5.** Via de síntese de GDP-manose em *Yarrowia lipolytica*. A frutose-6-fosfato proveniente da glicólise é isomerizada a manose-6-fosfato pela enzima MPI (fosfomanose isomerase), a qual é convertida em manose-1-fosfato pela PPM (fosfomanomutase). Esta recebe uma molécula de GDP (difosfato de guanosina) pela ação da GMP (GDP-manose pirofosforilase), formando a GDP-manose. *GTP*: trifosfato de guanosina. *PPi*: pirofosfato (Adaptado de HOLLANDS et al., 2019).

O mecanismo de produção de eritritol por *Y. lipolytica* ocorre em resposta à alta pressão osmótica do meio, gerada por elevadas concentrações de sais, como NaCl e KCl, e/ou carboidratos. Isso se deve pelo fato do eritritol atuar como osmoprotetor celular (TOMASZEWSKA; RYWIŃSKA; GLADKOWSKI, 2012), estabilizando as enzimas e permitindo a manutenção das funções celulares em condições osmóticas desfavoráveis (BROWN, 1976). Além do eritritol, outros solutos compatíveis podem ser produzidos, como manitol e arabitol. No entanto, a produção de cada polioliol pode ser modulada por fatores como o pH, concentração de sais e fonte de carbono (YANG et al., 2014; EGERMEIER et al., 2017).

A via metabólica proposta para obtenção de eritritol por *Y. lipolytica* é acoplada a via das pentoses fosfato até a síntese de eritrose 4-fosfato. Em situações de estresse osmótico e pH ácido, a eritrose-4-fosfato é convertida em eritrose pela enzima eritrose-4-fosfato fosfatase (E4PP - *Erythrose-4-Phosphate Phosphatase*), com subsequente redução a eritritol pela enzima eritrose redutase (ER - *Erythrose Redutase*) e oxidação de NADPH (Figura 2.6) (MOON et al., 2010). A maior atividade enzimática da ER parece estar relacionada ao pH, uma vez que em ambientes menos ácidos, a produção de eritritol tem seu rendimento reduzido, devido ao direcionamento da síntese de ácido cítrico (YANG et al., 2014).



**Figura 2.6.** Vias de produção e assimilação de eritritol por *Yarrowia lipolytica*. O glicérol empregado como fonte de carbono é fosforilado pela enzima GK (glicérol quinase) e subsequentemente desidrogenado para formar DHAP (dihidroxiacetona- fosfato), a qual é convertida em GAP (gliceraldeído-3-fosfato). O GAP entra na via das PPP (pentoses fosfato), onde a enzima TK (transcetolase) o converte em eritrose-4-fosfato, que é desfosforilado pela E4PP (eritrose-4-fosfato fosfatase) e reduzido pela ER (eritrose redutase) para formar o eritritol. Dependendo das condições ambientais, o eritritol pode ser consumido, pela ação das enzimas EDH (eritritol desidrogenase) e EK (eritrulose quinase), levando a formação de eritrulose e eritrulose-fosfato, respectivamente. A eritrulose-fosfato pode ser convertida a DHAP e participar da síntese de diferentes moléculas. *NADH*: nicotinamida adenina dinucleotídeo. *NADP<sup>+</sup>*: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de MIRONCZUK et al., 2016; CARLY et al., 2018).

Outro fator que também diminui o rendimento de produção do eritritol por *Y. lipolytica*, é o fato deste poliol também poder ser catabolizado. Recentemente, os genes *EYD1* e *EYK1* que codificam as enzimas eritritol desidrogenase (EDH - *Erythritol Dehydrogenase*), que converte o eritritol em eritrulose, e eritrulose quinase (EK - *Erythritol Kinase*), a qual

fosforila a eritrulose em eritrulose fosfato, respectivamente (Figura 2.6), foram identificados em *Y. lipolytica*. Carly et al. (2018) e Park et al. (2019) silenciaram os genes *EYDI* e *EYKI* e mostraram que as cepas *edh1Δ* e/ou *eyk1Δ* foram incapazes de crescer apenas na presença de baixas concentrações de eritritol como única fonte de carbono, o que favoreceu a sua secreção para o meio extracelular.

Alguns estudos anteriores relataram que a síntese de eritritol a partir de glicerol alcança maiores rendimentos de produção, em comparação com a glicose (RYMOWICZ; RYWIŃSKA; MARCINKIEWICZ, 2009; RYWIŃSKA et al., 2013). Embora não seja uma reação redox balanceada, uma vez que requer uma quantidade líquida de cofatores oxidados, é mais vantajoso do que usar glicose, já que haverá um consumo de cofatores reduzidos que devem ser reabastecidos por oxidação da glicose (CARLY et al., 2017). Ademais, o uso do glicerol purificado ou residual por *Y. lipolytica* também tem gerado resultados promissores para o acúmulo de lipídios (RAKICKA et al., 2015; BACK et al., 2016). Assim, visto a demanda pela valorização de subprodutos industriais e a bioconversão eficaz do glicerol em precursores da biossíntese de MELs por esta levedura, a clonagem das enzimas envolvidas no metabolismo desse glicolípido em *Y. lipolytica* poderá solucionar os problemas ambientais e econômicos deste bioprocessos.

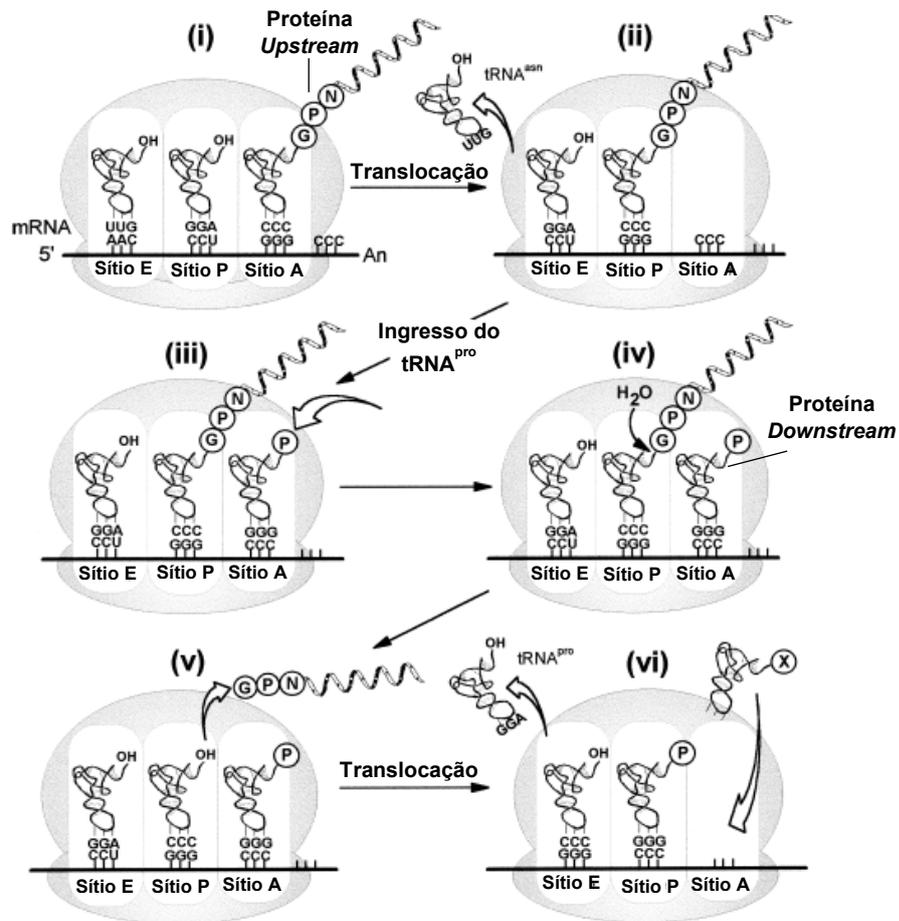
#### 2.2.2.2. Alternativa de Co-Expressão Gênica: Peptídeo Autocatalítico 2A

Em eucariotos, as estratégias para clonagem de múltiplos genes requerem a montagem de vários cassetes individuais ou a construção de proteínas de fusão, que apresentem um sítio de reconhecimento de uma protease para a clivagem proteolítica e separação das proteínas fusionadas. No entanto, a primeira estratégia torna-se dificultada em casos de genes muito longos, enquanto que a segunda é bastante complexa, pela necessidade da expressão de uma protease específica no mesmo compartimento celular que as proteínas fusionadas serão direcionadas, para que ocorra a separação e as mesmas não sejam acumuladas na célula (OSBORN et al., 2005; CHUANG et al., 2010).

Uma alternativa corresponde ao uso de peptídeos capazes de proporcionar autocatálise. Estes peptídeos autocatalíticos foram inicialmente observados em alguns vírus da família Picornaviridae, como o vírus da febre aftosa (FMVD - *Foot and Mouth Virus Disease*), no qual foram identificados os peptídeos autocatalíticos 2A e 2B, que têm sido

extensivamente explorados como ferramentas de clonagem em biologia sintética (DONNELLY et al., 2001a; EL AMRANI et al., 2004; ARAÚJO et al., 2015).

Os estudos iniciais de Ryan, Belsham e King (1989) mostraram que os peptídeos 2A e 2B encontram-se localizados entre genes virais e promovem autoclivagem durante a tradução, permitindo a liberação de proteínas maduras a partir de um único mRNA, em um processo posteriormente denominado de *ribosomal skipping* (salto ribossomal) por Donnelly et al. (2001b) (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Atividade do peptídeo autocatalítico 2A. A proteína *upstream* ao peptídeo autocatalítico é traduzida até a adição da última glicina (G) do 2A (i). O peptidil-tRNA é translocado do sítio A para o P (ii) e possibilita a entrada do tRNA<sup>Pro</sup> (RNA transportador ligado ao aminoácido prolina) (iii), o qual é incapaz de atacar a ligação éster peptidil-tRNA<sup>Gli</sup>, permitindo que ocorra a hidrólise da ligação entre o tRNA e o polipeptídeo (iv) para a sua liberação (v). O tRNA desacilado presente no sítio P viabiliza a translocação do tRNA<sup>Pro</sup>, ao invés de em vez do peptidil-tRNA, dos sítios A para P, para a tradução da proteína *downstream* ao peptídeo 2A seguir até o *stop codon* (vi). *mRNA*: RNA mensageiro. *Sítio A*: sítio aminoacil-tRNA. *Sítio P*: sítio peptidil-tRNA. *Sítio E*: sítio de saída (Adaptado de DONNELLY et al., 2001b).

Tal mecanismo envolve o bloqueio da tradução pelo ribossomo na região entre a última glicina do 2A e a primeira prolina (P) do 2B, devido à sequência motivo característica DXEXNPG P. Esta sequência provavelmente adota uma conformação desfavorável no sítio de saída, que prejudica a formação da ligação peptídica entre a G no sítio P e o fraco aminoácido nucleofílico P no sítio A. Assim, há a translocação da proteína *upstream* nascente nos sítios ribossomais até a sua liberação, contendo em sua porção C-terminal toda a extensão do 2A. A continuidade da tradução, ocorre a partir da P do 2B até o *stop codon*, e por isso, a proteína *downstream* permanece com este peptídeo em sua porção N-terminal (Figura 2.7) (RYAN; KING; THOMAS, 1991; ATKINS et al., 2007). Os autores também observaram que a sequência composta por 16 aminoácidos do peptídeo 2A (NFDLLKLAGDVESNPG), seguida apenas de uma P na região C-terminal proveniente do peptídeo 2B, era suficiente para promover a clivagem durante a tradução. Além disso, foi verificado que os resíduos do peptídeo autocatalítico remanescentes nas proteínas não eram capazes de afetar suas atividades (RYAN; KING; THOMAS, 1991).

Adicionalmente, Donnelly et al. (2001a) potencializaram a atividade catalítica do peptídeo 2A em mais de 99% pela adição de 14 aminoácidos do capsídeo 1D do FMVD a sua região N-terminal, e observaram que o uso dessa sequência garante uma proporção de expressão de 1:1 dos genes fusionados, o que é interessante para inserção de rotas metabólicas em que o balanço enzimático é um fator importante. Vários estudos utilizaram o peptídeo 2A otimizado para a co-expressão de até três genes com sucesso em diferentes células eucarióticas (EL AMRANI et al., 2004; LEE et al., 2012; RASALA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2015), embora ainda não tenha relatos na literatura sobre seu uso em *Y. lipolytica* até o presente momento.

### 2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

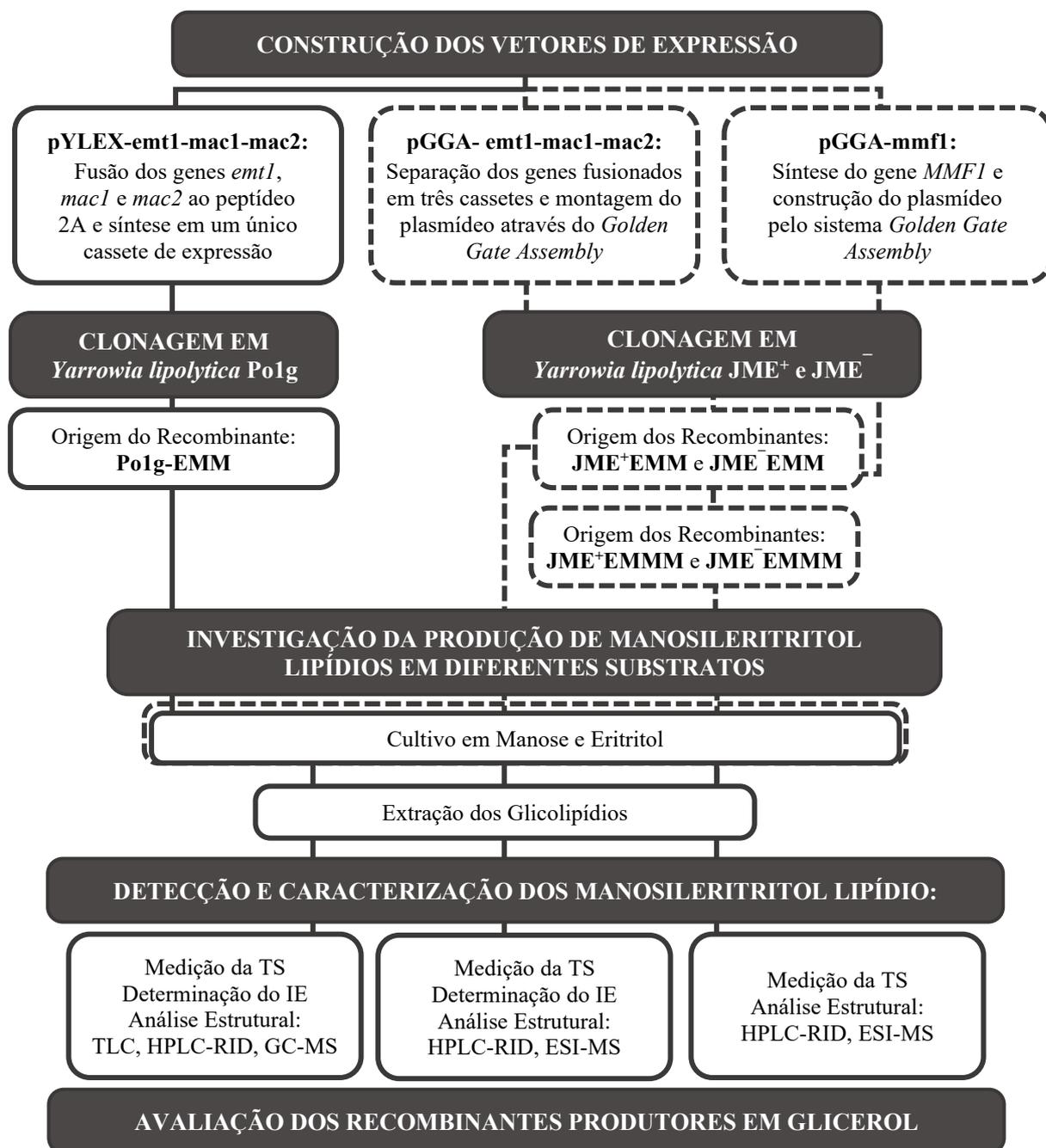
Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- Construir cepas recombinantes de *Y. lipolytica* para a síntese de MELs pela clonagem dos genes *emt1*, *mac1* e *mac2* fusionados ao peptídeo 2A em um único cassete de expressão, e em cassetes independentes;
- Investigar a capacidade de produção de MELs pelas cepas recombinantes utilizando como substratos os precursores manose e eritritol;
- Clonar a o gene *mmfl*, que codifica a proteína transmembranar, nos recombinantes produtores e verificar a sua influência na secreção dos MELs sintetizados;
- Avaliar a capacidade de produção de MELs a partir de glicerol pelas cepas recombinantes produtoras;
- Caracterizar a estrutura dos MELs recuperados por espectrometria de massas.

## 2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.4.1. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos experimentais realizados na elaboração desta etapa do estudo foram esquematizados no organograma presente na Figura 2.8.



**Figura 2.8.** Representação esquemática dos experimentos realizados para a biossíntese de manosileritritol lipídios por *Yarrowia lipolytica* geneticamente modificada. *TS*: tensão superficial. *IE*: índice de emulsificação. *TLC*: cromatografia em camada delgada. *HPLC-RID*: cromatografia líquida de alta eficiência com o detector de índice de refração. *GC-MS*: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *ESI-MS*: espectrometria de massas com ionização *eletronspray*. A linha pontilhada destaca as etapas desenvolvidas no INRAE (Jouy-en-Josas, França), sob orientação do Prof. Jean-Marc Nicaud.

## 2.4.2. GENES, MICRORGANISMOS, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os genes, microrganismos, plasmídeos e oligonucleotídeos usados nesta etapa do trabalho foram listados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Lista dos genes, microrganismos, plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados no estudo sobre a síntese de manosileritritol lipídios por *Yarrowia lipolytica* recombinante.

| GENES  |   |                            |                                    |                      |
|--|---|----------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Nome   | Número de Acesso<br>( <i>GenBank</i> )  | Espécie de Origem          | Tamanho (pb)                       | Referência           |
| <i>emt1</i>  | XM_011391166.1  | <i>Ustilago maydis</i> 521 | 1.848                              | Kämper et al. (2006) |
| <i>mac1</i>  | XM_011391165.1  | <i>Ustilago maydis</i> 521 | 1.776                              | Kämper et al. (2006) |
| <i>mac2</i>  | XM_011391228.1  | <i>Ustilago maydis</i> 521 | 1.653                              | Kämper et al. (2006) |
| <i>mmf1</i>  | XM_011391164.1  | <i>Ustilago maydis</i> 521 | 1.860                              | Kämper et al. (2006) |
| MICRORGANISMOS   |   |                            |                                    |                      |
| Nome <sup>a</sup>  | Aplicação / Descrição   |                            | Fonte                              |                      |
| <i>Escherichia coli</i><br>DH5 $\alpha$                  | Clonagem, propagação e estoque dos plasmídeos. Genótipo: F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, ( <i>lacZYA-argF</i> ) $\Delta$ U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> ,mK <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>thi 1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .   |                            | Invitrogen                         |                      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i><br>Po1g                       | Clonagem dos genes de interesse para produção de MELs. Genótipo: <i>MatA</i> , <i>leu2-270</i> , <i>ura3-302::URA3</i> , <i>xpr2-332</i> , <i>xpr2-2</i> . Fenótipo: Leu <sup>-</sup> , AEP $\Delta$ , AXP $\Delta$ , Suc <sup>+</sup> , plataforma pBR322.   |                            | Yeastern<br>Biotech                |                      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i><br>JM (JMY1350)               | Controle negativo nos ensaios para a produção de MELs pelas cepas JME <sup>+</sup> e JME <sup>-</sup> . Genótipo: <i>MatA</i> , <i>ura3-302-URA3-zeta</i> , <i>leu2-270-LEU2-zeta</i> , <i>xpr2-322</i> , <i>lip2<math>\Delta</math></i> , <i>lip7<math>\Delta</math></i> , <i>lip8<math>\Delta</math></i> . Fenótipo: Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>+</sup> , AEP $\Delta$ , Lip2 $\Delta$ , Lip7 $\Delta$ , Lip8 $\Delta$ .   |                            | INRAE<br>Larroude et al.<br>(2019) |                      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i><br>JME <sup>+</sup> (JMY7121) | Clonagem dos genes de interesse para produção de MELs. Genótipo: <i>MatA</i> , <i>ura3-302</i> , <i>leu2-270-LEU2-zeta</i> , <i>xpr2-322</i> , <i>lip2<math>\Delta</math></i> , <i>lip7<math>\Delta</math></i> , <i>lip8<math>\Delta</math></i> , <i>lys5<math>\Delta</math></i> . Fenótipo: Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>-</sup> , Lys <sup>-</sup> , EYK1 <sup>+</sup> , AEP $\Delta$ , Lip2 $\Delta$ , Lip7 $\Delta$ , Lip8 $\Delta$ .                                  |                            | INRAE<br>Park et al.<br>(2019)     |                      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i><br>JME <sup>-</sup> (JMY7126) | Clonagem dos genes de interesse para produção de MELs. Genótipo: <i>MatA</i> , <i>ura3-302</i> , <i>leu2-270-LEU2-zeta</i> , <i>xpr2-322</i> , <i>lip2<math>\Delta</math></i> , <i>lip7<math>\Delta</math></i> , <i>lip8<math>\Delta</math></i> , <i>lys5<math>\Delta</math></i> , <i>eyk1<math>\Delta</math></i> . Fenótipo: Leu <sup>+</sup> , Ura <sup>-</sup> , Lys <sup>-</sup> , EYK1 <sup>-</sup> , AEP $\Delta$ , Lip2 $\Delta$ , Lip7 $\Delta$ , Lip8 $\Delta$ . |                            | INRAE<br>Park et al.<br>(2019)     |                      |
| PLASMÍDEOS   |   |                            |                                    |                      |
| Nome <sup>a</sup>  | Aplicação / Descrição   |                            | Fonte                              |                      |
| pYLEX1   | Vetor integrativo baseado na plataforma pBR322 para expressão dos genes <i>emt1</i> , <i>mac1</i> e <i>mac2</i> fusionados em <i>Yarrowia lipolytica</i> . Marca de seleção <i>AmpR</i> (bactéria) e <i>LEU2</i> (levedura), promotor hp4d, e terminador XPR2t.   |                            | Yeastern<br>Biotech                |                      |
| pCR4-Blunt-TOPO  | Vetor doador utilizado para a clonagem dos genes <i>emt1</i> , <i>mac1</i> e <i>mac2</i> e montagem do pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  |                            | Invitrogen                         |                      |

**Continuação**

|   |  |                                    |
|---|--|------------------------------------|
| pUC57-MMF1<br>(E4720)                           | Vetor doador contendo o gene <i>MMF1</i> para a montagem do pGG- <i>mmf1</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | GenScript                          |
| pSB1A3-ZetaUP-URA3-<br>RFP-ZetaDOWN<br>(GGE114) | Vetor de destino para a montagem do pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> pelo <i>Golden Gate</i> contendo marca de seleção <i>AmpR</i> (bactéria) e <i>URA3</i> (levedura) e sítio de inserção zeta, e o cromóforo RFP para identificação visual dos clones bacterianos positivos. | INRAE<br>Larroude et al.<br>(2019) |
| pCR4Blunt-TOPO-<br>P1 pTEF (GGE144)             | Vetor doador contendo o promotor pTEF (posição P1) para a montagem dos pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> e pGG- <i>mmf1</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-<br>P2 pTEF (GGE006)             | Vetor doador contendo o promotor pTEF (posição P2) para a montagem do pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-P3<br>pTEF (GGE291)              | Vetor doador contendo o promotor pTEF (posição P3) para a montagem do pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-T1<br>Lip2 (GGE014)              | Vetor doador contendo o terminador Lip2 (posição T1) para a montagem do pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-<br>T2 Lip2 (GGE015)             | Vetor doador contendo o terminador Lip2 (posição T2) para a montagem do pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-<br>T3 Lip2 (GGE080)             | Vetor doador contendo o terminador Lip2 (posição T3) para a montagem do pGG- <i>emt1-mac1-mac2</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pSB1A3-GB3<br>(GGE029)                          | Vetor de destino para a montagem do pGG- <i>mmf1</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>AmpR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-Zeta-<br>NotI_Up (GGE067)        | Vetores doador contendo o sítio de inserção zeta para a montagem do pGG- <i>mmf1</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-Zeta<br>NotI_Down (GGE038)       | Vetores doador contendo o sítio de inserção zeta para a montagem do pGG- <i>mmf1</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-<br>M-LYS5 (GGE176)              | Vetor doador contendo o gene <i>LYS5</i> para a montagem do pGG- <i>mmf1</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| pCR4Blunt-TOPO-<br>TLip2 (E-L) (GGE020)         | Vetor doador contendo o terminador Lip2 (posição T1-3) para a montagem do pGG- <i>mmf1</i> pelo <i>Golden Gate</i> . Marca de seleção <i>KanR</i> .  | INRAE<br>Celińska et al.<br>(2017) |
| JMP62-Lys5ex<br>(E3265)                         | Vetor integrativo contendo o <i>LYS5</i> cassette para reconstituição da prototrofia em cepas <i>Lys<sup>-</sup></i> . Marca de seleção <i>KanR</i> e sítio de inserção zeta.  | INRAE                              |

| Continuação         |  |                     |               |
|---------------------|--|---------------------|---------------|
| OLIGONUCLEOTÍDEOS   |  |                     |               |
| Oligonucleotídeos   | Sequência (5'→3') <sup>b</sup>                         | T <sub>m</sub> (°C) | Amplicon (pb) |
| Fw- <i>emt1</i> -GG | gg <b>GGTCTC</b> t <b>AATG</b> aaggtggccctgctggc       | 68                  | 1.871         |
| Rv- <i>emt1</i> -GG | gg <b>GGTCTC</b> t <b>TAGACTA</b> gtcagatccccggtggaag  | 67                  | 1.871         |
| Fw- <i>mac1</i> -GG | gg <b>GGTCTC</b> t <b>ACAA</b> atgattaacaacgccctccg    | 65                  | 1.793         |
| Rv- <i>mac1</i> -GG | gg <b>GGTCTC</b> t <b>ATCCCTA</b> gaagacaggagcggtagcgt | 69                  | 1.793         |
| Fw- <i>mac2</i> -GG | gg <b>GGTCTC</b> t <b>CCAC</b> atgcaggetgacaagcacgc    | 71                  | 1.670         |
| Rv- <i>mac2</i> -GG | gg <b>GGTCTC</b> t <b>ATAC</b> ctactcaggggctcaacaggaa  | 68                  | 1.670         |
| Fw- <i>emt1</i>     | gtaccaagaaggacctctacgcc                                | 62                  | 473           |
| Rv- <i>emt1</i>     | ctccagactgctctacagtcgt                                 | 63                  | 473           |
| Fw- <i>mac1</i>     | agtccatgctgtacctattctgcc                               | 60                  | 693           |
| Rv- <i>mac1</i>     | cctgcattcgggagaaagagggtc                               | 63                  | 693           |
| Fw- <i>mac2</i>     | caccattctgaccaccaaccacacc                              | 61                  | 860           |
| Rv- <i>mac2</i>     | ccatagcggaaatgatgtgaggggt                              | 60                  | 860           |
| Fw- <i>mmf1</i> (1) | gcactcttgccgtggatctct                                  | 61                  | 363           |
| Rv- <i>mmf1</i> (1) | gtttgcacgtaggcaaccgagg                                 | 61                  | 636           |
| Fw- <i>mmf1</i> (2) | caccaccaggtgtcttcaagtct                                | 60                  | 1.064         |
| Rv- <i>mmf1</i> (2) | accgcctcctagaccctggatac                                | 61                  | 1.064         |
| Fw-EM2A             | cattctcgtgagcgattcg                                    | 56                  | 1.136         |
| Rv-EM2A             | ggaacagggtgtgaagacc                                    | 56                  | 1.136         |
| Fw-MM2A             | cattacct acctcgcctctg                                  | 55                  | 1.208         |
| Rv-MM2A             | cagcagtctctgcaatccac                                   | 56                  | 1.208         |
| Fw-LYS5             | gttttctctccaactgccaaca                                 | 56                  | 1.032         |
| Rv-LYS5             | ccagagcgatcacatgattg                                   | 53                  | 1.032         |

<sup>a</sup>A nomenclatura em parênteses dos microrganismos e plasmídeos refere-se ao número de depósito no laboratório BIMLip (INRAE, Jouy-en-Josas, França).

<sup>b</sup>As letras maiúsculas na sequência dos oligos indicam: o sítio de restrição para *BsaI* (em negrito); as saliências para o *Golden Gate Assembly* nas posições G1 (em vermelho), G2 (em verde) e G3 (em azul); e o *stop codon* (sublinhado).

Os genes *emt1*, *mac1*, *mac2* e *mmf1* foram alinhados contra o genoma de referência de *Y. lipolytica* através do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool X* (BLASTX), pelo banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e/ou *Genome Resources for Yeast Chromosomes* (GRYC) para a busca de genes homólogos. Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio dos softwares *Benchling* ou *Snapgene*. As culturas foram estocadas em solução de glicerol 20% (m/v) a -80 °C até a realização dos experimentos.

Todas as técnicas de biologia molecular foram realizadas conforme previamente descrito por Sambrook e Russell (2001), salvo exceções indicadas.

### 2.4.3. MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES

Os meios de cultivo utilizados neste estudo foram:

- Meio LB (*Luria Bertani*)—extrato de levedura 0,5%, triptona 1%, NaCl 0,5% (m/v).
- Meio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*)—extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% (m/v). Para tamponamento em pH 4 foi utilizado tampão citrato 50 mM.
- Meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) – base nitrogenada de leveduras sem aminoácidos 0,17%, NH<sub>4</sub>Cl 0,5%, glicose 2% (m/v) e tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 50 mM, pH 6.8.

O meio LB foi suplementado com os antibióticos ampicilina (LB-Amp) ou canamicina (LB-Can) (ambos *Sigma-Aldrich*) para concentrações finais de 100 ou 50 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, de acordo com a marca de seleção do plasmídeo de interesse. O meio YNB foi acrescido de 0,8 g.L<sup>-1</sup> de lisina (YNB-Lis) (*Sigma-Aldrich*) para o cultivo de cepas auxotróficas *LYS5*<sup>-</sup>. Quando necessário, foi adicionado ágar bacteriológico 1,5% (m/v) aos meios líquidos para a obtenção dos meios sólidos.

A investigação da produção de MELs pelas cepas recombinantes foi realizada em meio YNB modificado: os meios YNBEM e YNBG, onde a glicose foi substituída por glicerol puro 8% (m/v) (YNBG8%) (*Labsynth*) e diferentes concentrações de eritritol (0,5-2%; m/v) (YNBE0,5-2%) acrescido de manose (0-2,5%; m/v) (YNBE1%M0-2,5%) (ambos *Sigma-Aldrich*). Alternativamente, o meio YNBG sofreu alterações pela adição de glicerol 12% e NH<sub>4</sub>Cl 0,2% (m/v) para a razão C/N 105 (molC.molN<sup>-1</sup>) e pH 4.

As reações de amplificação dos genes de interesse foram realizadas por *Q5*<sup>®</sup> *High-Fidelity DNA Polymerase* (*New England Biolabs*) ou *GoTaq*<sup>®</sup> *Green Master Mixes* (*Promega*). Os genes clonados no pCR4-Blunt-TOPO pelo *Zero Blunt*<sup>™</sup> *TOPO*<sup>™</sup> *PCR Cloning Kit for Sequencing* (*Invitrogen*) foram previamente purificados com o *kit NucleoSpin*<sup>®</sup> *PCR Clean-up* (*Macherey-Nagel*) e posteriormente sequenciados pelo método de Sanger através do *Mix2Seq Kit* (*Eurofins Genomics*) para subsequente alinhamento pelo *CLUSTAL W*. A extração do DNA plasmidial foi realizada pelos *kits PureYield*<sup>™</sup> *Plasmid Mini-prep* (*Promega*) ou *NucleoSpin*<sup>®</sup> *Plasmid* (*Macherey-Nagel*). As endonucleases de restrição, ligases e quinases foram obtidas da *New England Biolabs*, enquanto que os oligonucleotídeos foram fornecidos pela *Eurofins Genomics* ou *Integrated DNA Technologies* e a água livre de nucleases pela

*Invitrogen* ou *Quiagen*. Todas as reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

Os demais reagentes utilizados nos ensaios de extração, identificação, quantificação e caracterização dos MELs produzidos possuíam elevado grau de pureza (> 99%) e serão indicados mais adiante.

#### 2.4.4. CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE EM *Yarrowia lipolytica*

##### 2.4.4.1. Construção dos Vetores de Expressão

###### ○ Vetor pYLEX-*emt1-mac1-mac2*

O vetor pYLEX-*emt1-mac1-mac2* foi desenvolvido a partir da fusão dos genes *emt1*, *mac1*, *mac2* ao peptídeo 2A do FMVD (F2A). Os *stop codons* de *emt1* (5'-TGA-3') e *mac1* (5'-TAG-3'), bem como o peptídeo sinal de *mac1* (5'-GCTCGTCTC-3') e *mac2* (5'-GCCAAGCTC-3') foram removidos, e a sequência aprimorada do F2A foi adicionada entre os genes, para a construção do inserto. Este teve os códons otimizados para expressão em *Y. lipolytica* e foi sintetizado no pUC57 para sub-clonagem no pYLEX1, pela empresa *GenScript*.

###### ○ Vetores pGGA-*emt1-mac1-mac2* e pGGA-*mmf1*

Os vetores pGG-*emt1-mac1-mac2* e pGG-*mmf1* foram construídos pelo sistema GGA, segundo Celińska et al. (2017) e Larroude et al. (2019) com algumas modificações. Os oligonucleotídeos Fw-*emt1-GG/RV-emt1-GG*, Fw-*mac1-GG/RV-mac1-GG* e Fw-*mac2-GG/RV-mac2-GG* contendo as saliências desejadas e sítios de restrição para *BsaI* foram usados para amplificar os genes de interesse a partir do pUC57-*emt1-mac1-mac2*, conforme apresentados na Tabela 2.2. O gene *mmf1* teve os códons otimizados e foi adicionado das saliências requeridas e sítios de restrição para *BsaI*, para subsequente síntese no vetor pUC57 pela empresa *GenScript*.

As sequências amplificadas foram purificadas e clonadas no vetor doador pCR4-Blunt-TOPO para subsequente transformação em células de *E. coli* quimiocompetentes, dando origem aos plasmídeos TOPO-*emt1*, TOPO-*mac1* e TOPO-*mac2*. Estes foram extraídos e verificados por digestão com a enzima *BsaI*, PCR com os oligos específicos (Fw-

emt1/Rv-emt1, Fw-mac1/Rv-mac1 e Fw-mac2/Rv-mac2) e inespecíficos (M13fw/M13rv fornecidos pela *Invitrogen*) e sequenciamento.

Para a montagem dos vetores de expressão, cada plasmídeo contendo os fragmentos do GGA foram quantificados (*NanoDrop, Thermo Fisher Scientific*) e misturados em concentrações equimolares de aproximadamente 50 pmol, para as seguintes construções:

- (I) pGGA-emt1-mac1-mac2 – os vetores doadores com os promotores pTEF, os genes *emt1*, *mac1* e *mac2*, e os terminadores tLip2 foram pré-montados em três diferentes reações para cada cassette de expressão (pCR4Blunt-TOPO-P1 pTEF, TOPO-emt1 e pCR4Blunt-TOPO-T1 Lip2; pCR4Blunt-TOPO-P2 pTEF, TOPO-mac1 e pCR4Blunt-TOPO-T2 Lip2; e pCR4Blunt-TOPO-P3 pTEF, TOPO-mac2 e pCR4Blunt-TOPO-T2 Lip2) com 5 U de *BsaI*, 200 U de *T4 DNA ligase*, 1 µL do tampão da enzima 10X e água livre de nucleases para volume final de 10 µL, em ciclo térmico de [37 °C por 3 min, 16 °C por 2 min] x 30, 55 °C for 5 min, 80 °C for 5 min, 15 °C ∞. Posteriormente, 10 µL das reações de pré-montagem foram misturadas com o vetor de destino (pSB1A3-ZetaUP-URA3-RFP-ZetaDOWN) e 20 U de *BsaI*, 400 U de *T4 DNA ligase*, 4 µL do tampão da enzima 10X e água livre de nucleases para volume final de 40 µL,
- (II) pGGA-mmfl – o vetor de destino (pSB1A3-GB3) e os vetores doadores com o promotor pTEF (pCR4Blunt-TOPO-P1 pTEF), terminador tLip2 (pCR4Blunt-TOPO-TLip2 (E-L)), marca de seleção *LYS5* (pCR4Blunt-TOPO-M-LYS5), sítios de inserção zeta (pCR4Blunt-TOPO-Zeta-NotI\_Up e pCR4Blunt-TOPO-Zeta-NotI\_Down) e o gene *mmfl* (pUC57-mmfl) foram adicionados à 10U de *BsaI*, 400 U de *T4 DNA ligase*, 2 µL do tampão da enzima 10X água livre de nucleases para volume final de 20 µL.

As reações foram conduzidas em termocilador (*Applied Biosystems*) com o seguinte ciclo térmico: [37 °C por 5 min, 16 °C por 5 min] x 50, 55 °C for 5 min, 80 °C for 5 min, 15 °C ∞; e cerca de 10 µL foi usado para transformação de células de *E. coli* quimiocompetentes. As colônias crescidas com coloração branca foram rastreadas para a identificação da montagem correta dos vetores de expressão através da PCR de colônia ou PCR do plasmídeo extraído, com os oligos Fw-emt1/Rv-emt1, Fw-mac1/Rv-mac1 e Fw-mac2/Rv-mac2 para o pGG-emt1-mac1-mac2 e Fw-mmfl(1)/Rv-mmfl(1) para o pGG-mmfl, assim como linearização com *NotI*.

#### 2.4.4.2. Transformação de *Escherichia coli* Quimiocompetente

As células quimiocompetentes de *E. coli* foram preparadas pelo método do cloreto de cálcio para posterior transformação com os plasmídeos de interesse pelo método do choque térmico. A cepa DH5 $\alpha$  foi crescida em 5 mL de meio LB a 37 °C sob agitação de 160 rpm *overnight*. Em seguida, 1 mL do cultivo foi transferido para 100 mL de meio LB e mantido a 37 °C e 180 rpm até a cultura atingir a densidade óptica em 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) entre 0,2 e 0,4. Aproximadamente, 40 mL do cultivo foram mantidos no gelo por 15 min e centrifugados a 4 °C e 10.000 rpm por 1 min. Os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL da solução de CaCl<sub>2</sub> 50 mM previamente resfriada e centrifugados a 4 °C e 10.000 rpm por 1 min. Esta etapa foi repetida por mais uma vez e então, as células foram ressuspensas em 3 mL da solução de CaCl<sub>2</sub> 50 mM contendo glicerol 15% (m/v). Aliquotas foram transferidas para microtubos, os quais foram mantidos a -80 °C até o passo seguinte.

Para a transformação, foi adicionado cerca de 1-2  $\mu$ L contendo 100-250 ng do DNA plasmidial às células quimiocompetentes. Estas foram submetidas a um banho de gelo por 30 min e imediatamente em seguida, incubação a 42 °C por 30 s e em gelo por 1 min. Após o choque térmico, foram adicionados 250  $\mu$ L de LB na suspensão celular, a qual foi incubada a 37 °C sob constante agitação por 1 h. Ao fim, as células foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com antibiótico necessário e incubadas a 37 °C por 24 h, para a seleção dos transformantes e verificação dos clones positivos.

#### 2.4.4.3. Transformação de *Yarrowia lipolytica* e Confirmação dos Recombinantes

A transformação de *Y. lipolytica* foi realizada através do método do acetato de lítio (Chen, Beckerich & Gaillardin, 1997, modificado). A cepa Po1g foi transformada segundo o protocolo do fornecedor (*Yeastern Biotech*). As demais cepas foram cultivadas no meio YPD sólido a 28 °C *overnight*. Em seguida, uma alçada de células foi lavada com 1 mL de água estéril e a suspensão celular foi centrifugada a 16.000 *xg* por 1 min. O *pellet* foi ressuspensado em 600  $\mu$ L da solução de LiAc 0,1 M pH 6 e incubado a 28 °C por 1 h. Após, as células foram centrifugadas a 800 g por 2 min e ressuspensas em 60  $\mu$ L da solução de LiAc 0,1 M pH 6. Uma alíquota de 40  $\mu$ L das células competentes foi adicionada a um microtubo, juntamente com 3  $\mu$ L do carreador de DNA (*Single-strand Salmon DNA* 5 mg.mL<sup>-1</sup>, *Sigma-Aldrich*) e 200–500 ng do DNA plasmidial, previamente linearizado com a enzima *NotI*. A mistura foi incubada a 28 °C por 15 min e em seguida, foi adicionado 350  $\mu$ L da solução de LiAc 0,1 M

pH 6 com PEG4000 40%, prosseguindo com uma nova incubação a 28 °C por 1 h, e a 39 °C por 10 min. Ao fim, 600 µL da solução de LiAc 0,1 M pH 6 foi adicionado e todo o conteúdo do microtubo foi plaqueado em meio YNB ou YNB-Lis sólido, de acordo com a auxotrofia da cepa, sendo incubados a 28 °C por até 72 h para a seleção dos transformantes.

A confirmação da inserção dos genes no genoma de *Y. lipolytica* foi realizada através da PCR de colônia com os oligos Fw-EM2A/Rv-EM2A e Fw-MM2A/Rv-MM2A para a cepa Po1g-EMM; Fw-emt1/Rv-emt1, Fw-mac1/Rv-mac1, Fw-mac2/Rv-mac2 para as cepas JME<sup>+</sup>K-EMM e JME<sup>-</sup>K-EMM; Fw-LYS5/Rv-LYS5 para as cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM; e Fw-mmfl(2)/Rv-mmfl(2) para as cepas JME<sup>+</sup>EMMM e JME<sup>-</sup>EMMM. Para tanto, uma pequena alçada das colônias crescidas em meio seletivo foi adicionada a 2 µL de água estéril livre de nuclease, e submetida ao seguinte ciclo térmico: 65 °C por 30 s, 8 °C por 30 s, 65 °C por 1 min e 30 s, 97 °C por 3 min, 8 °C por 1 min, 65 °C por 30 min, 97 °C por 1 min, 65 °C por 1 min e 80 °C por 10 min. Às células lisadas foi adicionado um *mix* para o PCR: 2 µL dos oligos (*forward* e *reverse*, na concentração de 10 µM cada), 10 µL *Master Mix* e água estéril livre de nuclease para volume final de 20 µL. A reação foi conduzida a 94 °C por 6 min para desnaturação inicial, ciclos de [94 °C por 35 s, T<sub>m</sub>+3 °C por 45 s com diminuição de 1 °C a cada ciclo, 68 °C por 2 min e 30 s] x 8 e [94 °C por 35 s, T<sub>m</sub>-5 °C por 45 s, 68 °C por 1 min] x 32, e extensão final a 68 °C por 10 min. Alternativamente, uma alçada das colônias foi tratada com 10 µL de NaOH 20 mM e submetidas a 100 °C e 300 rpm por 10 min, com posterior resfriamento a -20 °C por 10 s. Aproximadamente 5 µL do lisado foi utilizado para 45 µL do *mix* de PCR. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 ou 1% (m/v) (*Sigma-Aldrich*) e visualizados em transiluminador UV.

#### 2.4.5. CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS

A propagação das cepas foi realizada em meio YPD líquido a 28 °C e 180 rpm por 24 h. As células foram lavadas com água destilada estéril e o volume necessário para obtenção da DO<sub>600nm</sub> inicial de 0,1 foi adicionado aos meios de cultivo. Para os ensaios em microplacas, as cepas foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços contendo 1,5 mL dos meios YNBE, YNBEM ou YNBG8% e incubadas em *microplate shakers*. Os cultivos nos meios YNBE ou YNBEM foram realizados no *Synergy MX* (*Biotek*) a 28°C e constante agitação por 48 h, com medição da DO<sub>600nm</sub> a cada 1 h. No meio YNBG8%, os cultivos foram conduzidos no *Incubator LSI22* (*Labstac*) a 30°C e 500 rpm por 120 h, em triplicata. Ao final do período de

incubação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 20 min (*Sorvall Legend MicroCL 17R Microcentrifuge, Thermo Scientific*) para a quantificação da biomassa e investigação da síntese de biossurfactantes do tipo MELs.

Para os ensaios em frascos agitados, as cepas foram cultivadas em 20 mL do meio YNBEM em erlenmeyers de 100 mL de volume a 28 °C e 250 rpm por 96 h ou em 100 mL do meio YNGB12% em erlenmeyers de 500 mL de volume a 28 °C e 250 rpm por 168 h (*Innova 42, Eppendorf New Brunswick*), em duplicata. Amostras foram retiradas ao longo da fermentação em YNBG12% e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min (*Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific*) para a quantificação da biomassa, glicerol residual e eritritol, bem como verificação da produção de MELs.

#### 2.4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 2.4.6.1. *Quantificação da Biomassa Celular*

A dosagem da biomassa foi realizada pela secagem das células previamente lavadas com e em volume conhecido a 100°C, até um peso constante. O crescimento celular foi acompanhado pela medição da DO<sub>600nm</sub> e os valores adquiridos foram convertidos para g.L<sup>-1</sup> através do fator de conversão obtido pela curva de peso seco, para cada recombinante.

##### 2.4.6.2. *Quantificação de Glicerol e Eritritol*

A concentração de glicerol e eritritol foi determinada a partir do sobrenadante livre de células por *High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index Detector* (HPLC-RID) (*LC 20A Prominence, Shimadzu*), em coluna Aminex HPX-87H (*Bio-Rad*) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions de dimensões de 30 x 4,6 mm (*Bio-Rad*). A fase móvel foi composta de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mM (*Tedia*) e mantida em fluxo constante de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, com a temperatura do forno a 60 °C. O volume de injeção foi fixado em 10 µL e os valores das áreas obtidas nos tempos de retenção referentes aos compostos de interesse foram convertidos em g.L<sup>-1</sup>, utilizando-se curvas analíticas previamente estabelecidas. Todas as amostras foram filtradas com membrana de 0,22 µM (*Millipore*).

#### 2.4.6.3. Extração e Quantificação de Manosileritritol Lipídios

Os MELs foram extraídos do sobrenadante livre de células com o solvente orgânico acetato de etila (*Sigma-Aldrich*) em volume 1:1, de acordo com Kitamoto et al. (2001), Morita et al. (2007) e Beck et al. (2019). Para as extrações de menor volume, as fases foram agitadas por 10 min (*Agitador KLINE CT-150*) e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min. Para as extrações de maior volume, as fases foram agitadas vigorosamente em funil separador e mantidas em repouso por 15 min para a separação. As fases orgânicas foram coletadas e evaporadas na capela (*overnight*) ou em rotaporador a 240 mbar e 40 °C (*IKA RV10*), gerando o extrato bruto (EB) utilizados nas análises posteriores.

Uma metodologia alternativa de quantificação de MELs, em função da concentração de eritritol, foi estabelecida a partir da hidrólise ácida dos extratos brutos ressuspensos em água *MilliQ* estéril, segundo Giani et al. (1995) e Jourdier; Ben Chaabane (2015). Para a investigação de uma condição de lise branda, 900 µL do padrão MEL-B (1 g.L<sup>-1</sup>) (*Toyobo*), gentilmente cedido pelo Prof. Cristiano José de Andrade da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foi submetido a hidrólise com 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10M (*Tedia*) a 100 °C, durante diferentes tempos de incubação (3-7 h). Em seguida, os hidrolisados foram resfriados a temperatura ambiente e neutralizados com 100 µL de NaOH 10M (*Vetec*), para subsequente análise por HPLC-RID, conforme o item 2.4.6.2. A curva analítica foi realizada com padrões de manose e eritritol (ambos *Sigma-Aldrich*), submetidos ao mesmo processo de hidrólise. A concentração de MELs foi estimada através da conversão dos valores de manose e eritritol obtidos, por um fator de correlação calculado com base nos pesos moleculares dos congêneres do glicolipídio mais abundantes, para compensar a massa dos demais constituintes da molécula.

#### 2.4.7. CARACTERIZAÇÃO DOS MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS

##### 2.4.7.1. Medição da Tensão Superficial

A tensão superficial (TS) foi determinada através do tensiômetro *DSA 100S Drop Shape Analyzer* (*Krüss*), segundo o método da gota (SONG; SPRINGER, 1996). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada, e como controle foram empregados os meios estéreis ou extraídos.

#### 2.4.7.2. Determinação do Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação (IE) dos extratos brutos foi avaliado pelo método descrito por Cooper e Goldenberg (1987) contra n-hexadecano (TCI), em volume 1:1. O resultado foi calculado pela razão entre a altura da região emulsificada ( $H_e$ ) e a altura total da mistura ( $H_t$ ), de acordo com a Equação 2.1.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_e}{H_t} \times 100 \quad (2.1)$$

#### 2.4.7.3. Avaliação do Equilíbrio Hidrofílico-Hidrofóbico

O valor do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB - *Hydrophilic-Lipophilic Balance*) dos MELs produzidos foi calculado através da razão entre a massa molecular da fração hidrofílica ( $M_w$ ) e a massa molecular da molécula inteira ( $M$ ), usando a fórmula de Griffin (1954) para surfactantes não iônicos, conforme a Equação 2.2.

$$HBL = 20 \times \frac{M_w}{M} \quad (2.2)$$

#### 2.4.7.4. Análise por Cromatografia em Camada Delgada

Os extratos brutos foram analisados por *Thin Layer Chromatography* (TLC), através da adição em placas de sílica 60 F<sub>254</sub> (*Merck*) com auxílio de capilares de vidro. As placas foram submetidas à corrida em fase móvel composta de de diclorometano:acetona (60:40, v/v) (ambos *Sigma-Aldrich*), com posterior a pulverização do reagente de orcinol 0,1% (*Sigma-Aldrich*) e aquecimento a 110 °C por 5-10 min, para a detecção dos MEL (GOSENS *et al.*, 2016).

A levedura *Moeszomyces aphidis* URM 6351 adquirida na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foi cultivada conforme descrito em Rau *et al.* (2005) para a obtenção do *mix* de MEL-A, -B, -C e -D. Para a distinção dos diferentes variantes foi utilizado o padrão de MEL-B (*Toyobo*), como base de comparação.

#### 2.4.7.5. Análise por Cromatografia Gasosa

Os extratos brutos foram secos, ressuspensos em 1 mL de CHCl<sub>3</sub> (*Tedia*), 0,85 mL de CH<sub>3</sub>OH (*Scielab*) e 0,15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*Tedia*), e aquecidos a 100 °C por 140 min. Em seguida, 1 mL de água destilada foi adicionado e agitado por 30 s. A reação foi mantida em

repouso para a separação das fases e a fase inferior foi analisada por *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) (*GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu*) em a coluna RTX Wax (*Restek*), segundo protocolo adaptado de Smyth et al. (2010), em um tempo total de corrida de 25 min. Os ésteres metílicos de ácido graxos foram identificados pela biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e estimados de acordo com áreas dos picos.

#### 2.4.7.6. Análise por Espectrometria de Massas

Os extratos brutos foram secos, ressuspensos em de metanol e filtrados para a exclusão de quaisquer contaminantes. As amostras foram analisadas por injeção direta de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  no espectrômetro de massa *Linear Trap Quadrupole Orbitrap Velos™* (*Thermo Fisher Scientific*), equipado com fonte de ionização por *eletrospray* (*Electrospray Ionization – ESI*), a uma voltagem de 5 kV e temperatura do capilar a 275°C. As análises foram realizadas no modo negativo e positivo de ionização, com poder de resolução de 60.000 em uma faixa de  $m/z$  de 100 a 1.000. Os íons precursores de maior intensidade foram fragmentados por dissociação induzida por colisão *CID* (*Collision Induced Dissociation*) ou *HCD* (*Higher Energy Collision Induced Dissociation*), com a energia normalizada de 35% e poder de resolução de 7.500.

A aquisição e processamento dos dados foi realizado através do programa *Thermo Xcalibur 2.2*. Os íons  $\text{MS}^1$  candidatos foram selecionados a partir das fórmulas moleculares geradas, levando em consideração os adutos  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e analisados de acordo com as bibliotecas desenvolvidas para os diferentes homólogos de MELs, segundo as massas dos compostos precursores adquiridas no banco de dados *PubChem*. O  $m/z$  teórico dos íons  $\text{MS}^2$  investigados foi calculado pelo *software Mmass* e foi assumido uma tolerância de 5 ppm para a validação da identidade da molécula.

#### 2.4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism 8.4.3*, com significância para valores de  $p < 0,05$  para os testes empregados.

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1. INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica* GENETICAMENTE MODIFICADA

A manosiltransferase vacuolar Emt1 e as aciltransferases peroxissomais Mac1 e Mac2 são as enzimas-chave para a biossíntese de MELs, segundo a rota metabólica descrita por Hewald et al. (2006). Por isso, as sequências dos genes correspondentes a estas enzimas foram identificadas no banco de dados *GenBank* do NCBI e alinhadas contra o genoma de referência de *Y. lipolytica* através do algoritmo BLASTX. Os alinhamentos indicaram ausência de sequências homólogas para *emt1*, *mac1* e *mac2* nesta espécie, visto que as sequências que representaram maiores *hits* para cada um dos genes possuíram menos de 35% de identidade.

À vista disso, foram determinadas duas estratégias para co-expressão dos genes de interesse em cepas hospedeiras de *Y. lipolytica* derivadas da linhagem W29, com o intuito de fornecer uma plataforma alternativa para a produção de MELs. Com base em estudo prévio de Freitag et al. (2014), o peptídeo sinal nativo foi mantido no gene *emt1* e removido dos genes *mac1* e *mac2* (*mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ*), na construção dos vetores de expressão no presente trabalho, visando o direcionamento da manosiltransferase para o vacúolo e de ambas aciltransferases para o citosol da levedura hospedeira.

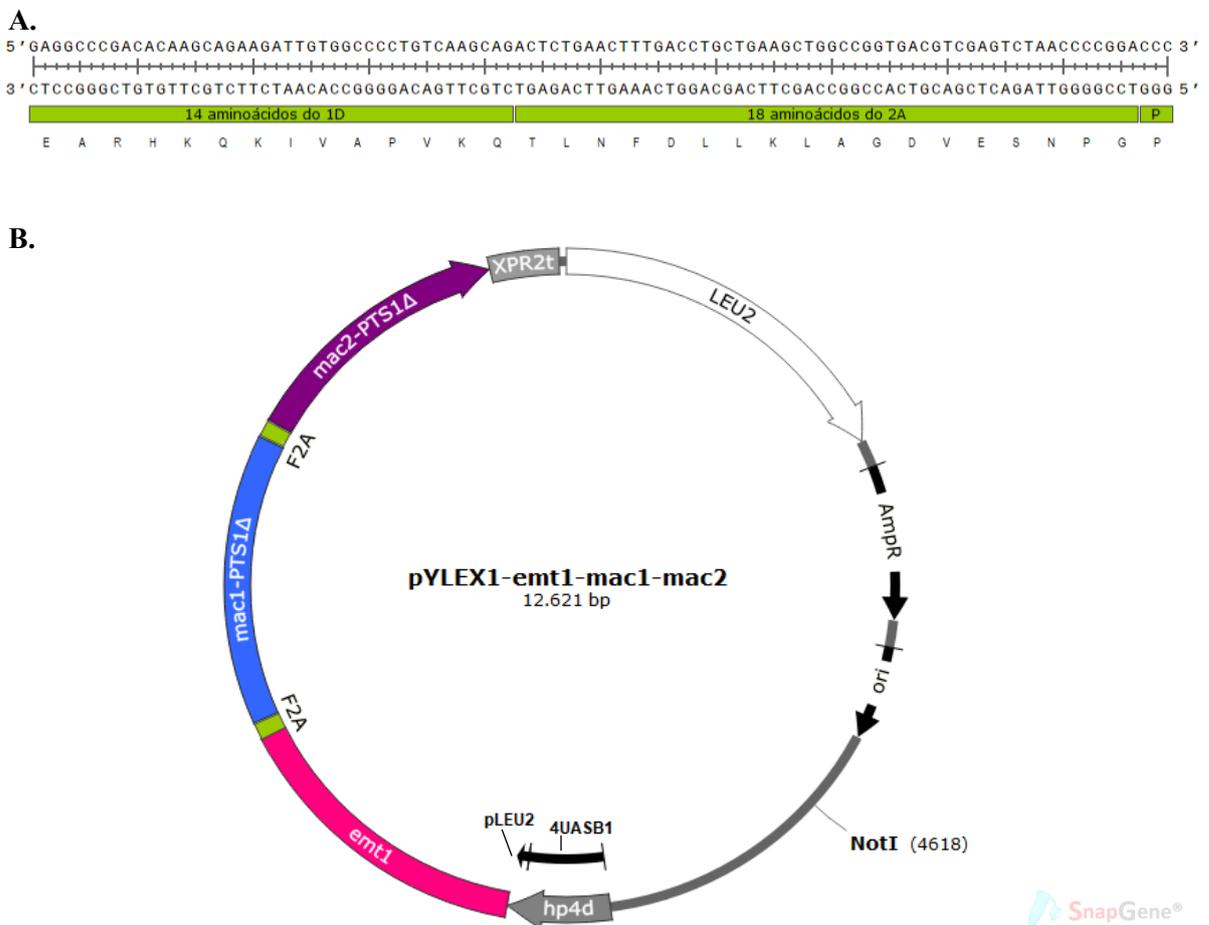
A clonagem das enzimas Mac1 e Mac2 com segmentação citosólica (Mac1<sub>Cit</sub> e Mac2<sub>Cit</sub>) em *Y. lipolytica* propendeu a redução dos variantes de MELs, em relação ao comprimento dos grupamentos acila para a síntese direcionada de MEL diacilado desacetilado contendo majoritariamente C2, C4, C16 e/ou C18. Além disso, Mac1<sub>Cit</sub> e Mac2<sub>Cit</sub> buscaram impedir o ciclo fútil de energia e favorecer a produção de MELs pelas cepas recombinantes, a partir de substratos de natureza hidrofílica. Isso porque os intermediários da via de síntese de lipídios *de novo* presentes no citosol poderiam ser sequestrados pelas aciltransferases para a montagem do glicolipídio, evitando a formação de triacilglicerol e seu acúmulo em corpúsculos lipídicos, para subsequente degradação através da β-oxidação peroxissomal, e então, biossíntese de MELs.

#### 2.5.1.1. Estratégia de Clonagem 1: Genes Fusionados ao Peptídeo 2A em Cassete de Expressão

- Construção do Vektor de Expressão pYLEX1-*emt-mac1-mac2*:

A estratégia de clonagem 1 consistiu na fusão dos genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ* a sequência otimizada de 99 pb do peptídeo autocatalítico F2A, desenvolvida por

Donnelly et al. (2001a) (Figura 2.9A), para a síntese das enzimas a partir de um único cassete de expressão. Portanto, o *stop codon* de *emt1* e *mac1PTS1Δ* foi removido e mantido apenas em *mac2PTS1Δ*, dando origem ao fragmento *emt1-F2A-mac1PTS1Δ-F2A-mac2PTS1Δ*, afim de possibilitar a formação de um extenso mRNA policistrônico para a tradução das três proteínas separadamente. O inserto *emt1-F2A-mac1PTS1Δ-F2A-mac2PTS1Δ* de 5.476 pb teve os códons otimizados para a levedura *Y. lipolytica* (Apêndice 1A) e foi clonado no plasmídeo comercial pYLEX1, resultando no vetor de expressão pYLEX1-*emt1-mac1-mac2*. Este plasmídeo monocópia apresenta: o forte promotor híbrido *hp4d*; o terminador *tXPR2*; a marca de seleção auxotrófica para leucina (*LEU2*); a plataforma pBR322 como sítio de inserção; e a maquinaria para propagação em *E. coli* (Figura 2.9B).



**Figura 2.9.** Estratégia de co-expressão gênica utilizando o peptídeo autocatalítico F2A. **(A)** Sequência aprimorada do peptídeo autocatalítico contendo 14 aminoácidos do 1D e 18 aminoácidos do 2A provenientes do FMVD, seguido de uma prolina (P), com os códons otimizados para *Y. lipolytica*. **(B)** Mapa do vetor pYLEX1-*emt1-mac1-mac2* de 12.621 pb. *hp4d*: promotor composto por quatro cópias do UAS1B e pLEU2. *emt1*: gene que codifica a manosiltransferase Emt1. *F2A*: peptídeo autocatalítico do FMDV. *mac1PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac1<sub>Cit</sub>. *mac2PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac2<sub>Cit</sub>. *tXPR2*: terminador. *LEU2*: marca de seleção auxotrófica para leucina (levedura). *AmpR*: marca de seleção de resistência ao antibiótico ampicilina (bactéria); *ori*: origem de replicação bacteriana; *NotI*: sítio de restrição para linearização do vetor.

O pYLEX1 foi desenhado para integração dos genes de interesse no genoma da levedura *Y. lipolytica* Po1g, por recombinação homóloga na região pBR322, a qual foi inserida no locus *URA3* desta linhagem por Madzak, Tréton e Blanchin-Roland (2000). Além dessa modificação genética, a cepa Po1g sofreu outras alterações, tais como: a inserção do gene *SUC2* de *S. cerevisiae* para expressão da invertase  $\beta$ -frutofuranosidase e assimilação de sacarose pela cepa; a deleção dos genes *XPR2* e *AXP* que codificam proteases com atividades em ambientes alcalinos e ácidos, respectivamente, para impedir a degradação de proteínas extracelulares; e a inativação do gene *LEU2* que codifica a enzima  $\beta$ -isopropilmalato desidrogenase da via de síntese de L-leucina, para tornar a célula incapaz de sintetizar este aminoácido e servir como marcador de auxotrofia.

O emprego de cepas auxotróficas para expressão homóloga/heteróloga de proteínas baseia-se na suposição de que a complementação nutricional do fator de crescimento auxotrófico no meio de cultivo resulta em uma situação que é fenotipicamente idêntica à linhagem selvagem. Entretanto, esta suposição não se verifica totalmente na prática, visto que a suplementação nutricional requer a absorção do composto auxotroficamente requerido pelas células, normalmente interferindo na biossíntese de compostos essenciais e levando a taxas de crescimento específicas menores, quando comparada com a complementação genética, onde há a reinserção do gene marcador de seleção no genoma da célula (PRONK, 2002). Por essa razão, foram construídas cepas Po1g com fenótipo  $Leu^+$  a partir do pYLEX1, nomeadas de Po1g-CN, para atuar como controle negativo nos ensaios de produção de MELs, e assim garantir que a única diferença entre as cepas fosse a expressão dos genes de interesse.

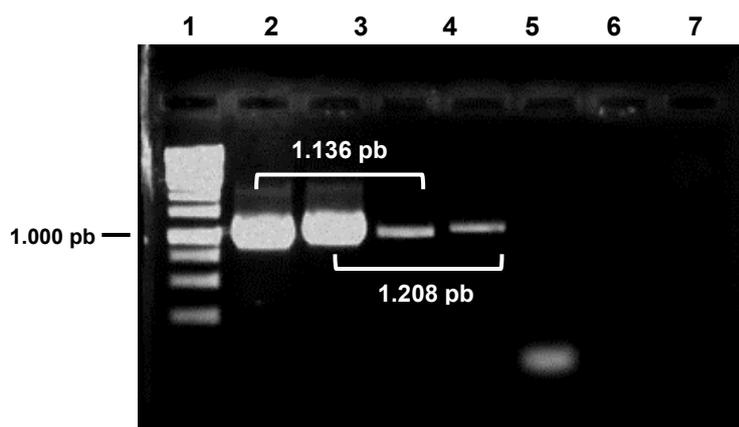
○ *Construção da Cepa Recombinante Po1g-EMM:*

Os plasmídeos pYLEX1 e pYLEX1-*emt1-mac1-mac2* linearizados com a enzima *NotI* foram utilizados no processo de transformação. Os transformantes foram selecionados pela capacidade de crescer no meio mínimo YNB, sem a presença de aminoácidos. As células transformadas com o pYLEX1-*emt1-mac1-mac2* foram submetidas a PCR de colônia para a confirmação da clonagem do fragmento *emt1-F2A-mac1PTS1 $\Delta$ -F2A-mac2PTS1 $\Delta$* . Após várias etapas de transformação, apenas uma colônia foi capaz de crescer na ausência de leucina e amplificar as regiões alvo, como pode ser verificado na Figura 2.10.

A análise eletroforética em gel de agarose a 1% (m/v) revelou a presença de bandas de aproximadamente 1.000 pb, equivalentes ao tamanho dos fragmentos esperados, de 1.136 e

1.208 pb, para reações com os oligos Fw-EMF2A/Rv-EMF2A e Fw-MMF2A/Rv-MMF2A, respectivamente, nos poços correspondentes ao pYLEX1-*emt1-mac1-mac2* (controle positivo) e a colônia isolada (Figura 2.10). A cepa recombinante contendo os genes fusionados ao F2A foi nomeada de Po1g-EMM e direcionada para os ensaios de produção.

Embora as principais vantagens do uso do sistema YLEX1 seja a alta eficiência de transformação e o direcionamento preciso de eventos de integração monocópia dos genes de interesse no genoma da cepa Po1g (MADZAK; BECKERICH, 2013), o escasso número de clones positivos no presente trabalho pode estar relacionado ao grande tamanho do pYLEX1-*emt1-mac1-mac2*, o qual possui 12.621 pb. Segundo Fickers et al. (2003), vetores com mais de 12 Kb podem dificultar o processo de clonagem em *Y. lipolytica*, levando a baixas eficiências de transformação.

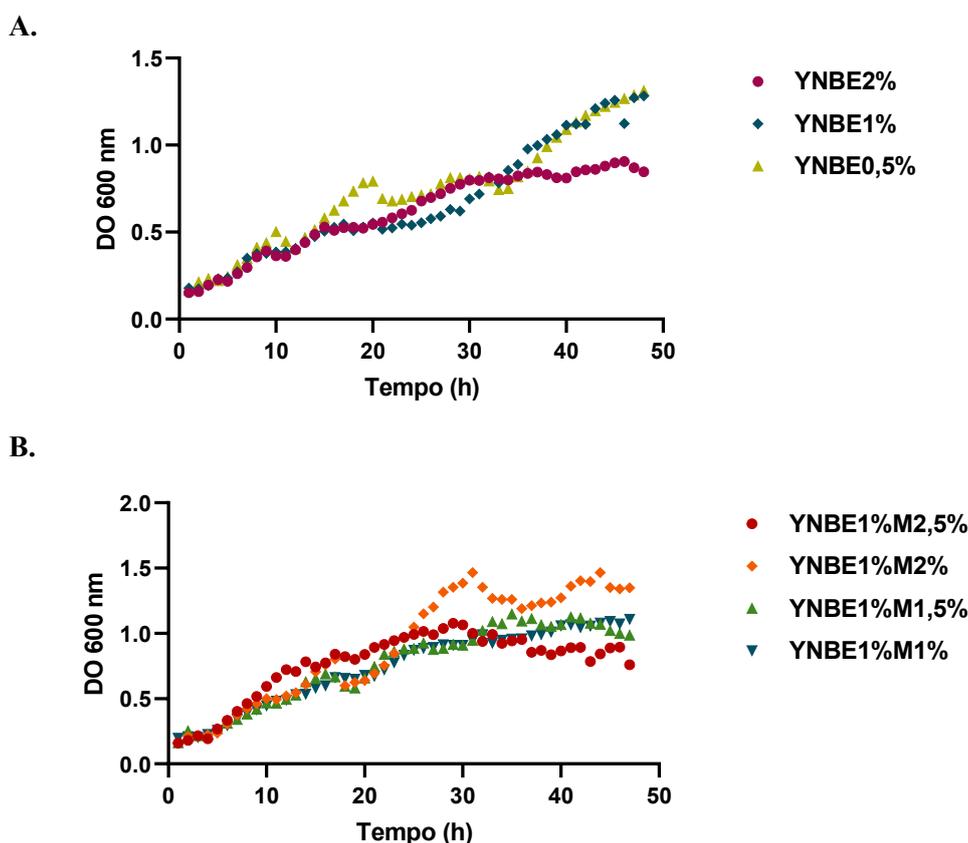


**Figura 2.10.** Eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) dos produtos de PCR para confirmação do transformante Po1g-EMM. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb* (ThermoFisher). 2 e 3: pYLEX1-*emt1-mac1-mac2*, controle positivo. 4 e 5: Po1g-EMM. 6 e 7: Po1g-CN, controle negativo.

#### ○ *Cultivos de Produção de MELs:*

A investigação da capacidade de produção de biossurfactantes do tipo MELs pela estirpe recombinante foi realizada na presença dos precursores manose e eritritol como substrato, com o propósito de favorecer a síntese deste glicolipídio, conforme relatado anteriormente para as espécies naturalmente produtoras (RAU et al., 2005; MORITA et al., 2007; LIU; KOH; JI, 2011). Por essa razão, foi necessária a determinação das concentrações destes carboidratos no meio YNB que proporcionasse o crescimento celular e a expressão dos genes de interesse.

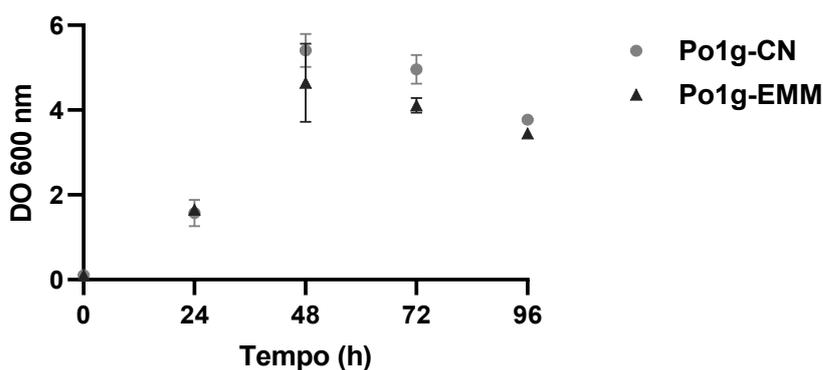
Inicialmente, a estirpe Po1g-EMM foi cultivada em microplacas apenas na presença de eritritol, em concentrações de 0,5, 1 e 2%, a 28 °C durante 48 h. De acordo com a Figura 2.11A, foi possível inferir que a melhor condição para o crescimento desta cepa foi em torno de 0,5 a 1% de eritritol, enquanto que o aumento da concentração deste polioliol para 2% levou a redução da sua taxa de crescimento. Sendo assim, o meio YNBE1% foi selecionado e suplementado com 1, 1,5, 2 e 2,5% de manose, para a avaliação da influência de ambos os precursores no crescimento da cepa Po1g-EMM, sob as mesmas condições do cultivo anterior. A Figura 2.11B revelou que a concentração de manose acima de 2%, na presença de 1% de eritritol, foi desfavorável para o crescimento da cepa recombinante, e que o maior acúmulo de células ocorreu no meio YNBE1%M2%. Por esse motivo, este meio foi selecionado para os ensaios seguintes.



**Figura 2.11.** Cinética de crescimento da cepa Po1g-EMM durante cultivo em microplaca contendo meio com diferentes concentrações de eritritol e manose, a 28°C e constante agitação por 48 h. **(A)** Cultivo em YNBE(0-2%). **(B)** Cultivo em YNBE1%M(1-2,5%).

As cepas Po1g-EMM e Po1g-CN foram submetidas a fermentações em frascos agitados contendo o meio YNBE1%M2% a 28 °C e 250 rpm. Em 96 h de cultivo, a cepa

Po1g-EMM apresentou uma mesma tendência no perfil de crescimento celular em comparação com a cepa precursora Po1g-CN, conforme mostrado na Figura 2.12. A fase estacionária foi atingida em torno de 72 h por ambas as cepas, sugerindo que a clonagem dos genes fusionados ao peptídeo autocatalítico F2A não levou a um aumento da carga metabólica na estirpe Po1g-EMM capaz de interferir na sua cinética de crescimento.



**Figura 2.12.** Perfil de crescimento das estirpes Po1g-CN (●) e Po1g-EMM (▲) durante 96 h de cultivo a 28°C e 250 rpm no meio YNBE1%M2% em frascos agitados.

Os MELs sob investigação foram extraídos do sobrenadante livre de células com o solvente orgânico acetato de etila e concentrados, a fim de reduzir a presença de interferentes e facilitar a sua identificação e caracterização, através de métodos indiretos, como a medição da TS e determinação do IE, e métodos diretos, como as análises por TLC, HPLC-RID e GC-MS. Devido à diversidade estrutural dos MELs, uma ampla variedade de técnicas são necessárias e usualmente empregadas para a sua detecção e quantificação, variando de metodologias bem simples (TS, IE, TLC) até as mais complexas (MS, NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*), tendo como alvo diferentes características das moléculas (SMYTH et al., 2010; MORITA et al., 2015; BECK et al., 2019). Todos os ensaios de detecção, identificação e caracterização dos glicolipídios foram realizados a partir dos extratos brutos (EB).

Os extratos brutos provenientes dos cultivos com as cepas Po1g-CN (EB<sub>CN</sub>) e Po1g-EMM (EB<sub>EMM</sub>) foram capazes de reduzir a TS para valores menores de 49,5 mN.m<sup>-1</sup>, com  $\Delta$ TS variando de 23,5 - 29,3 mN.m<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando a presença de moléculas tensoativas em ambas as amostras. As medições obtidas para o EB<sub>CN</sub> e o EB<sub>EMM</sub>, apresentaram diferença estatística significativa, o que pode estar relacionado com a

concentração de tais moléculas nos extratos brutos, bem como diferenças estruturais determinantes para suas propriedades (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3.** Tensão superficial e índice de emulsificação dos extratos brutos obtidos a partir dos cultivos em YNBE1%M2% das cepas Po1g-CN e Po1g-EMM.

| Amostras          | Tensão Superficial (mN.m <sup>-1</sup> ) |                           | Índice de Emulsificação (E <sub>24</sub> %) |
|-------------------|--|---------------------------|---|
|                   | TS                                       | $\Delta$ TS <sup>a</sup>  |   |
| EB <sub>CN</sub>  | 49,43 ± 0,89 <sup>b</sup>                | 23,49 ± 0,89 <sup>b</sup> | -   |
| EB <sub>EMM</sub> | 43,58 ± 2,76 <sup>b</sup>                | 29,33 ± 2,76 <sup>b</sup> | 20,30 ± 3,57                                |

<sup>a</sup> $\Delta$ TS calculado com base na tensão superficial da água destilada (72,92 mN.m<sup>-1</sup>).

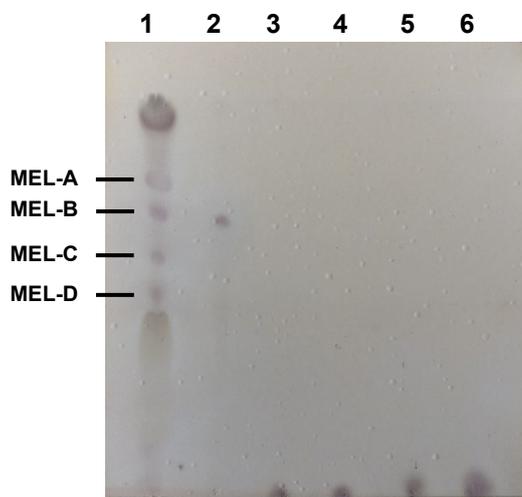
<sup>b</sup>Valores apresentam diferença estatística para 95% de confiança no *T-test* (p=0,0068).

Apenas o EB<sub>EMM</sub> gerou emulsões estáveis em 24 h, com IE de aproximadamente 20%, demonstrando além da atividade tensoativa, capacidade emulsificante, mesmo que baixa, dos compostos produzidos pela cepa Po1g-EMM (Tabela 2.3), assim como é observado para os MELs (KITAMOTO et al., 2001; FUKUOKA et al., 2007; KONISHI; MAKINO, 2018). Contudo, as análises de TS e IE são apenas qualitativas e não fornecem informações sobre a estrutura das moléculas produzidas (SMYTH et al., 2014). Além disso, ambos os métodos são susceptíveis a presença de outros compostos com características semelhantes, podendo levar a interferências nos resultados.

Assim, os MELs sob pesquisa foram submetidos a análise por TLC de fase normal (Figura 2.13), visto que essa metodologia é amplamente utilizada para a triagem de espécies produtoras e distinção entre os variantes de MELs produzidos, pelo fato de possibilitar a separação destes glicolipídios de acordo com seu grau de acetilação e acilação (KITAMOTO et al., 1990; HEWALD; JOSEPHS; BÖLKER, 2005; MORITA et al., 2007; ONGHENA et al., 2011; VAN KERREBROECK et al., 2012; GOOSSENS et al., 2016).

Como observado na Figura 2.13, a análise por TLC não revelou a presença de MELs nos EB<sub>CN</sub> e EB<sub>EMM</sub>, já que não foram verificadas bandas com o perfil de migração similar ao extrato contendo uma mistura dos diferentes tipos de MELs (MEL-A, -B, -C e -D), e o padrão purificado de MEL-B. No entanto, tal fato pode estar relacionado a baixa concentração destes compostos nas amostras. Em análises realizadas com o padrão de MEL purificado, a visualização das bandas só foi possível em concentrações do glicolipídio acima de 10 g.L<sup>-1</sup>

(dados não apresentados). Assim, o EB<sub>CN</sub> e o EB<sub>EMM</sub> foram hidrolisados para a identificação separadamente das frações hidrofílicas e hidrofóbicas por métodos mais sensíveis.



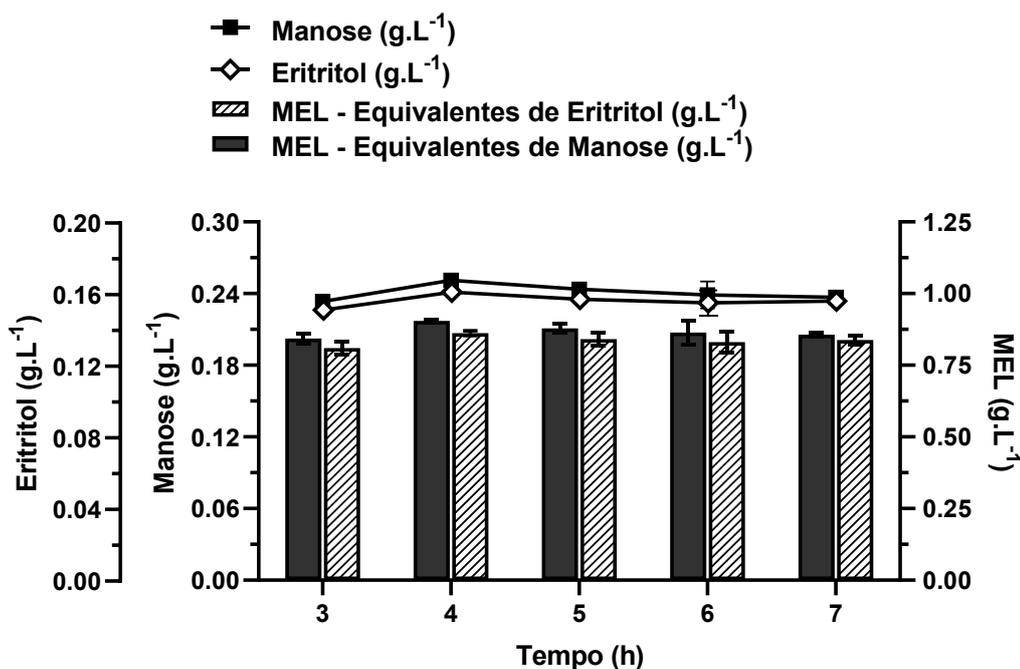
**Figura 2.13.** *Thin Layer Chromatography* dos extratos EB<sub>CN</sub> e EB<sub>EMM</sub>. 1: Manosileritritol lipídios (MELs) produzido pela cepa *Moesziomyces aphidis* em óleo de soja, conforme metodologia descrita por Rau et al., 2005. 2: Padrão de MEL-B (*Toyobo*). 3 e 4: EB<sub>CN</sub>. 5 e 6: EB<sub>EMM</sub>.

○ *Determinação de Método Alternativo de Quantificação de MELs:*

Considerando a natureza lábil dos carboidratos, foi determinada uma condição de hidrólise em que fosse possível a separação da manose e do eritritol sem a degradação destes açúcares. O estabelecimento de um método alternativo foi baseado em patentes relacionadas com a produção de ramnose e sofrorose a partir de ramnolipídios (GIANI et al., 1995) e sofrorolipídios (JOURDIER; BEM CHAABANE, 2015), respectivamente. A partir destas metodologias, soluções de 1 g.L<sup>-1</sup> do padrão de MELs foram submetidas a hidrólise ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) a 100 °C por um período de 3 - 7 h e analisadas por HPLC-RID.

Os resultados mostraram que a hidrólise ocorreu em toda a faixa de tempo testada, devido à presença de picos nos cromatogramas com tempos de retenção de 9,36 e 11,49 min, referentes ao padrão de manose e eritritol, respectivamente (Apêndice 2). Entretanto, a maior concentração de manose (0,25 g.L<sup>-1</sup>) e eritritol (0,16 g.L<sup>-1</sup>) foi alcançada em torno de 4 h. Conseqüentemente, neste mesmo tempo também foi calculado a melhor taxa de conversão de MELs em manose (95,3%) e eritritol (90,7%). Isso porque, a partir dos fatores de correção determinados por análise do padrão em ESI-MS (Apêndice 3), a concentração de MELs estimada foi de 0,91 e 0,86 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, levando em consideração 95% de pureza

do padrão de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante (Figura 2.14). Portanto, é possível inferir que o processo levou a uma baixa degradação de ambos os carboidratos (< 10%), e por isso, foi utilizado neste trabalho para a avaliação da presença destes nos extratos brutos e como uma metodologia alternativa para a estimativa da concentração dos MELs.

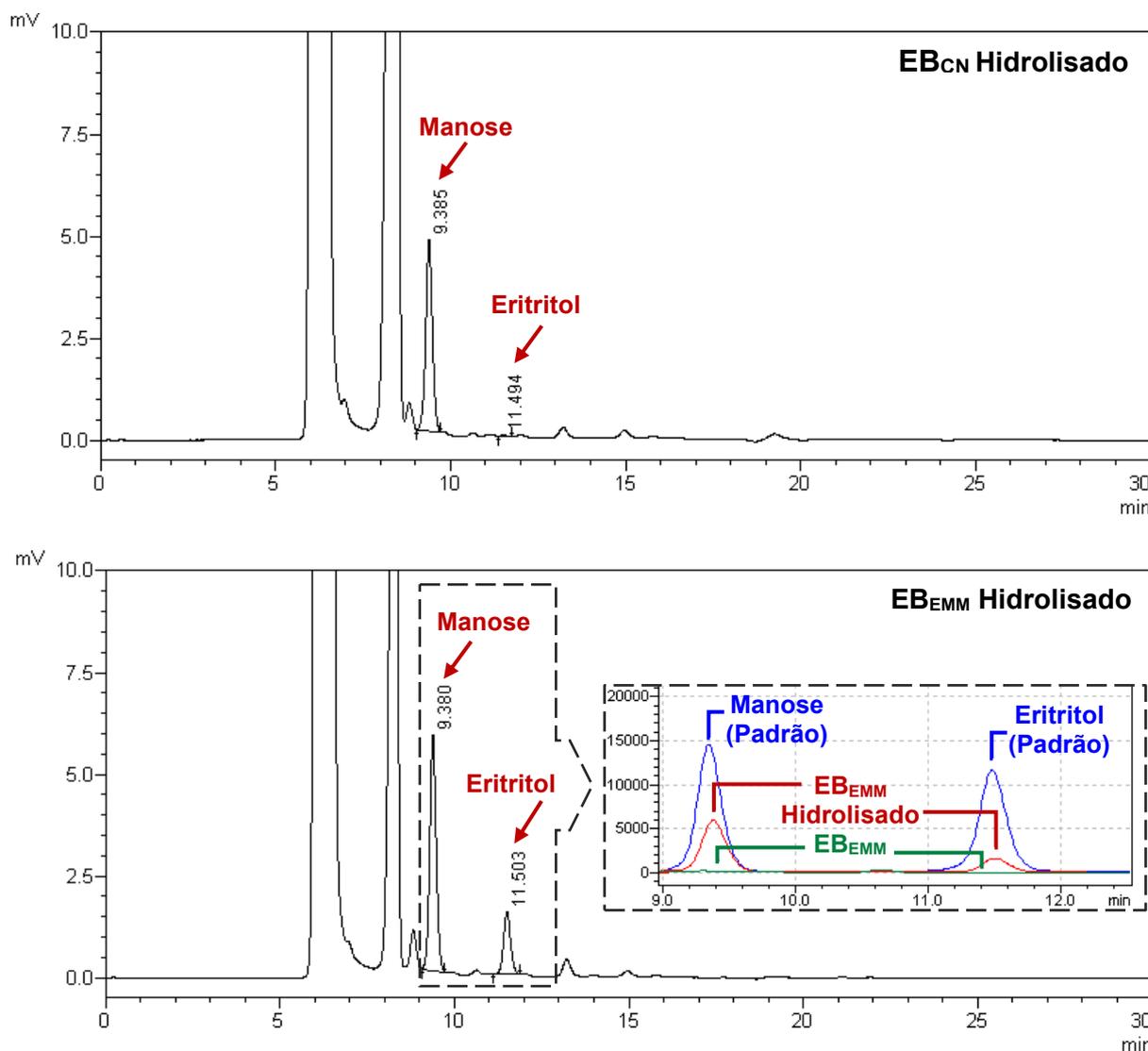


**Figura 2.14.** Hidrólise ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M à 100 °C) do padrão de manosileritritol lipídios (MELs) na concentração de 1g.L<sup>-1</sup> durante 3 a 7 h, com a quantificação de manose e eritritol (g.L<sup>-1</sup>) e dos MELs em função dos equivalentes de eritritol e manose (g.L<sup>-1</sup>). Este cálculo foi realizado de acordo com o fator de correção ( $fc_{\text{manose}} = 3,61$   $fc_{\text{eritritol}} = 5,33$ ) gerado a partir da determinação dos pesos moleculares dos variantes de MELs por *Electrospray Ionization - Mass Spectrometry* (ESI-MS).

○ *Quantificação e Caracterização de MELs:*

Os cromatogramas obtidos após o período de hidrólise dos extratos EB<sub>CN</sub> e EB<sub>EMM</sub> revelaram a presença de manose em ambas as amostras, em concentrações de 0,14 g.L<sup>-1</sup> e 0,21 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, uma vez que foram identificados picos no tempo de retenção de 9,38 min. Por outro lado, o eritritol foi detectado somente no EB<sub>EMM</sub> hidrolisado, na concentração de 0,07 g.L<sup>-1</sup>. As análises do EB<sub>EMM</sub> antes do processo de hidrólise confirmaram a ausência do pico referente ao eritritol nos cromatogramas (11,50 min), excluindo a possibilidade de sua co-extração do meio de cultivo (Figura 2.15). Tais resultados sinalizam uma provável produção de MELs pela cepa recombinante Po1g-EMM, e corroboram com os resultados prévios de ΔTS e IE. Além disso, apontam para a síntese concomitante de outro

composto tensoativo contendo manose na composição, visto que os extratos da cepa Po1g-CN mostraram redução da TS e foi observado a presença de manose após a hidrólise ácida.



**Figura 2.15.** Cromatogramas dos EB<sub>CN</sub> e EB<sub>EMM</sub> hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M à 100 °C durante 4 h obtidos por *High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index Detector* (HPLC-RID). As setas em vermelho indicam os tempos de retenção da manose e do eritritol. A imagem destacada pela linha pontilhada refere-se à sobreposição dos cromatogramas dos padrões de manose e eritritol submetidos ao processo de hidrólise (em azul), do EB<sub>EMM</sub> hidrolisado (em vermelho), e EB<sub>EMM</sub> não-hidrolisado (em verde).

Para a análise da porção lipídica, os extratos brutos foram novamente submetidos ao processo de hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, porém, na presença de metanol, para análise por GC-MS dos ésteres metílicos gerados no processo de derivatização das cadeias de ácidos graxos hidrolisadas. No EB<sub>CN</sub> hidrolisado foram detectados palmitato de metila (C16:0; 32,4%), estearato de metila (C18:0; 32,9%) e oleato de metila (C18:1; 34,8%). Um perfil bastante

similar foi encontrado no EB<sub>EMM</sub> hidrolisado: laurato de metila (C12:0; 0,5%), palmitato de metila (C16:0; 31,0%), estearato de metila (C18:0; 31,0%) e oleato de metila (C18:1; 37,5%). Visto que a determinação da fração hidrofílica foi realizada diretamente dos extratos brutos, sem um processo de purificação prévia para a eliminação de co-produtos extraídos (como apontado nas análises anteriores), não foi possível afirmar que os ácidos graxos identificados são provenientes dos potenciais MELs sintetizados pela cepa recombinante. De acordo com Beck, Werner e Zibek (2019), a principal desvantagem do uso do GC-MS na análise dos MELs é a necessidade do processo de hidrólise, o que leva a perda das informações sobre as combinações dos ácidos graxos e posições na molécula.

Desse modo, a concentração dos potenciais MELs no EB<sub>EMM</sub> não foi estimada em função de equivalentes de eritritol, uma vez que o uso do fator de correção previamente calculado para o padrão de MEL, é arbitrário. Porém, ainda assim, as evidências indicam uma possível produção de MELs pela cepa Po1g-EMM. No entanto, para a real confirmação, são necessários métodos que permitam a análise das moléculas intactas. É válido, ressaltar que o indício de produção deste glicolipídio apenas pela cepa recombinante Po1g-EMM, aponta para a atividade catalítica do peptídeo F2A nesta espécie, com a liberação das enzimas Emt1, Mac1<sub>Cit</sub> e Mac2<sub>Cit</sub> funcionais.

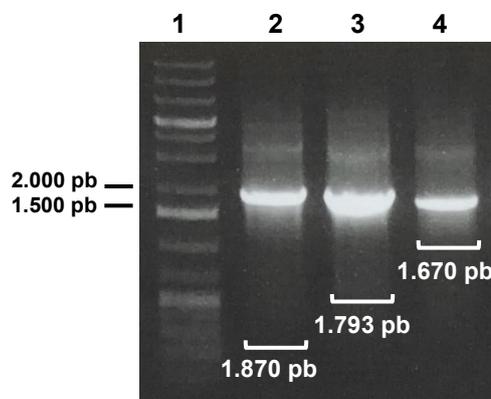
Recentemente, Müntjes et al. (2020) analisaram a eficiência de clivagem de diferentes peptídeos autocatalíticos em *U. maydis*. Os autores verificaram que os peptídeos 2A dos vírus *Porcine teschovirus-1* (P2A), *Thosea asigna* (T2A), *Equine rhinitis A* (E2A), *Porcine rotavirus* (Po2A) e FMVD (F2A) foram capazes de separar proteínas fluorescentes fusionadas com 100, 40, 60, 30 e 20% de eficiência, respectivamente. Em seguida, eles avaliaram a aplicabilidade do peptídeo P2A na biossíntese constitutiva de MELs, uma vez que estes glicolipídios são produzidos por *U. maydis* durante a fase estacionária de crescimento e sob condições limitantes de nitrogênio. A manosiltransferase Emt1 e as versões citosólicas das aciltransferases Mac1 e Mac2 foram traduzidas a partir de um único mRNA e as análises por *Western Blot* confirmaram a síntese das três enzimas separadamente. Em condições de fraca limitação de nitrogênio, a cepa recombinante foi capaz de produzir MELs após 10 h de cultivo, ao passo que a cepa selvagem foi sintetizou MELs algumas horas posteriores. Estes resultados certificam que a atividade enzimática de Emt1, Mac1<sub>Cit</sub> e Mac2<sub>Cit</sub> de *U. maydis* não foi afetada pela permanência de fragmentos do peptídeo autocatalítico nas porções N- e C-terminais destas enzimas (MÜNTJES et al., 2020), o que reforça as evidências de atividade do 2A no presente trabalho.

### 2.5.1.2. Estratégia de Clonagem 2: Genes em Cassetes de Expressão Independentes

#### ○ Construção do Vetor de Expressão pGGA-*emt1-mac2*:

A estratégia de clonagem 2 baseou-se na separação dos genes fusionados em diferentes cassetes de expressão. Em vista disso, um novo vetor foi construído através do sistema GGA. Os genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ* foram amplificados para a adição das saliências complementares nas extremidades 5' e 3' (D: A e E: TCTA, G: ACAA e H: GGAT, e J: CCAC e K: GTAT, respectivamente), bem como sítios de restrição para a enzima *BsaI*. Adicionalmente, as sequências codificantes de *emt1* e *mac1PTS1Δ* tiveram a inclusão do *stop codon*, o qual havia sido removido no pYLEX1-*emt1-mac1-mac2* (Figura 2.16).

A Figura 2.16 mostra a análise eletroforética em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos genes amplificados com os fragmentos requeridos, para a montagem da nova construção. Como pode-se observar, a amplificação dos três genes foi bem sucedida, uma vez que é possível verificar a presença de bandas com tamanhos entre 2.000 e 1.500 pb, equivalente a 1.870, 1.793 e 1.670 pb, esperados para os genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ* com as sequências adicionais, respectivamente.



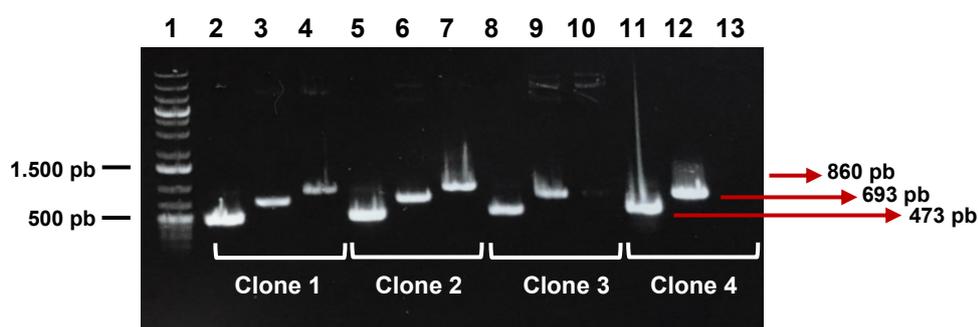
**Figura 2.16.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos genes de interesse amplificados com as sequências requeridas para o *Golden Gate Assembly* a partir do pUC57-*emt1-mac1-mac2*. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2: *emt1*. 3: *mac1PTS1Δ*. 4: *mac2PTS1Δ*.

Os produtos da PCR foram purificados e clonados no plasmídeo pCR4-Blunt-TOPO, dando origem aos vetores doadores TOPO-*emt1*, TOPO-*mac1* e TOPO-*mac2*, contendo os genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ* para as posições G1, G2 e G3 das unidades transcricionais, respectivamente. Estes foram submetidos a novas PCRs com oligos inespecíficos (M13fw/M13rv fornecidos pela *Invitrogen*) e específicos (Fw-*emt1*/Rv-*emt1*,

Fw-*mac1*/Rv-*mac1* e Fw-*mac2*/Rv-*mac2*, respectivamente), digestão com a enzima *BsaI* e sequenciamento para a confirmação da amplificação e clonagem correta (Apêndice 4).

Os plasmídeos TOPO-*emt1*, TOPO-*mac1* e TOPO-*mac2* confirmados foram submetidos às reações para a montagem do vetor de expressão, juntamente com os vetores doadores que abrigavam o promotor, o terminador e o vetor de destino, contendo a marca de seleção, os sítios de inserção e a maquinaria para a replicação em *E. coli*, nas mesmas concentrações equimolares. As reações foram realizadas em duas etapas, onde foi feita uma pré-montagem dos cassetes individualmente. Isso porque, Larroude et al. (2019) verificaram que para a montagem de vetores com duas ou três unidades transcricionais, a realização de reações para cada cassette separadamente aumentou a eficiência do sistema GGA.

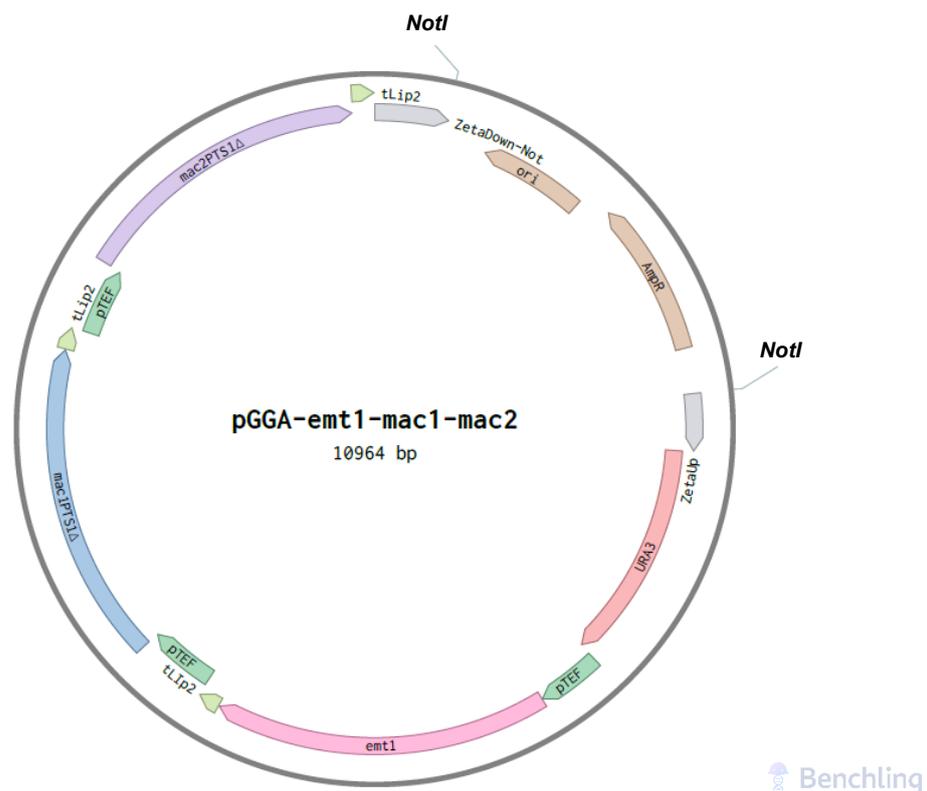
Os vetores de expressão corretamente montados foram rastreados a partir de colônias resistentes à ampicilina e com coloração branca, visto que o vetor de destino pSB1A3-ZetaUP-URA3-RFP-ZetaDOWN possui o gene *RFP*, o qual codifica uma proteína fluorescente de coloração vermelha, flanqueado por sítios de restrição para *BsaI*. Assim, na montagem do vetor com os fragmentos de interesse, este gene é perdido, e então, as colônias transformadas com a nova construção perdem a coloração avermelhada, permitindo a identificação visual de clones negativos (LARROUDE et al., 2019). Do total de 142 colônias com coloração branca, 4 foram testadas e 2 foram capazes de amplificar os genes *emt1* (473 pb), *mac1PTS1Δ* (693 pb) e *mac2PTS1Δ* (860 pb), conforme mostrado na Figura 2.17.



**Figura 2.17.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) das colônias isoladas após as reações para a montagem do novo vetor de expressão. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (ThermoFisher). 2, 3 e 4: clone 1. 5, 6 e 7: clone 2. 8, 9 e 10: clone 3. 11, 12 e 13: clone 4. As bandas referentes aos genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ* possuem 473, 693 e 860 pb, respectivamente, conforme indicado pelas setas em vermelho.

O vetor de expressão construído foi denominado de pGGA-*emt1-mac1-mac2* e apresenta: o promotor constitutivo pTEF e o terminador tLip2 para as três unidades

transcricionais; a marca de seleção auxotrófica para uracila (*URA3*); os sítios de inserção zeta; e a maquinaria para propagação em *E. coli* (Figura 2.18). Diferentemente do pYLEX1 que foi desenhado para integração dos genes de interesse no genoma da cepa Polg especificamente (MADZAK; TRÉTON; BLANCHIN-ROLAND, 2000), os vetores abrigoando as sequências zeta foram projetados para uma variedade de cepas derivadas da estirpe Pold, nomeadas de JMY, as quais foram equipadas com *zeta docking-plataform* (MADZAK, 2015).



**Figura 2.18.** Mapa do vetor pGGA-*emt1-mac1-mac2* de 10.964 pb. *pTEF*: promotor constitutivo nativo. *emt1*: gene que codifica a manosiltransferase Emt1. *tLip2*: terminador nativo. *mac1PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac1<sub>Cit</sub>. *mac2PTS1Δ*: gene que codifica a aciltransferase Mac2<sub>Cit</sub>. *URA3*: marca de seleção auxotrófica para uracila (levedura). *zetaUp/Down*: sítio de inserção zeta. *AmpR*: marca de seleção de resistência ao antibiótico ampicilina (bactéria). *ori*: origem de replicação bacteriana *ColE1*; *NotI*: sítio de restrição para linearização do vetor.

As regiões zeta são sequências repetitivas longas (LTRs - *Long Terminal Repeats*), de 714 pb, encontradas nas extremidades de elementos genéticos móveis, o retrotransposon Ylt1, o qual foi identificado em algumas linhagens selvagens de *Y. lipolytica* (SCHMID-BERGER; SCHMID; BARTH, 1994). Quando estas sequências estão presentes no genoma das cepas e nos vetores integrativos, a inserção dos genes de interesse ocorre quase que exclusivamente por eventos únicos de recombinação homóloga (JURETZEK et al., 2001; BORDES et al.,

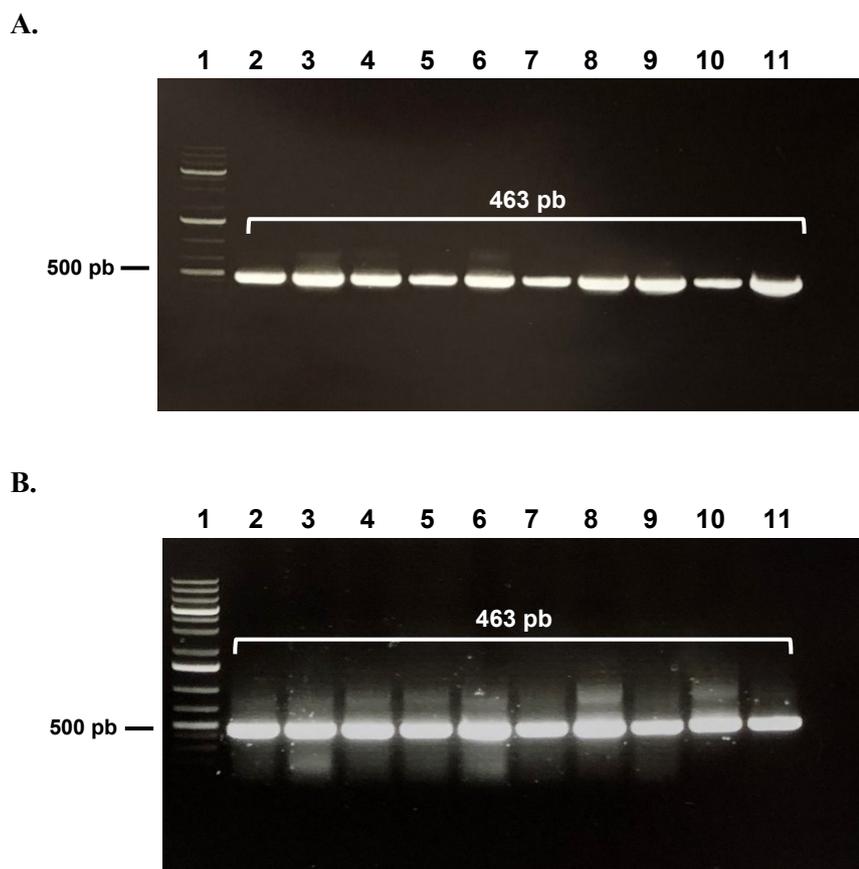
2007; LARROUDE et al., 2018b), evitando qualquer variabilidade de expressão relacionada ao *locus* de integração (PARK et al., 2019).

○ *Construção das Cepas Recombinantes JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM:*

O pGGA-*emt1-mac1-mac2* foi linearizado com a enzima *NotI* e utilizado nos processos de transformação das cepas JMY7121 e JMY7126, renomeadas neste trabalho como JME<sup>+</sup> e JME<sup>-</sup>, respectivamente, para melhor compreensão. A cepa JME<sup>+</sup> apresenta o gene *EYK1* funcional e, portanto, é capaz de catabolizar eritritol, enquanto que a cepa JME<sup>-</sup> teve este gene nocauteado, o que impossibilita o consumo de eritritol em baixas concentrações. Tal fenótipo é bastante interessante para a biossíntese de MELs, o que justifica a sua escolha neste trabalho. Outras características destas cepas incluem: a inativação do gene *XPR2* e dos genes *lip2*, *lip7* e *lip8* que codificam lipases extracelulares; inserção da plataforma zeta no locus *LEU2*; e a disrupção dos genes *URA3* e *LYS5* que codificam as enzimas orotidina 5'-fosfato descarboxilase e  $\alpha$ -aminoácido redutase das vias de síntese de uracila e L-lisina, respectivamente, tornando as células incapazes de sintetizar estes compostos (NICAUD, 2012; PARK et al., 2019).

Com o vetor pGGA-*emt1-mac1-mac2*, uma melhor eficiência de transformação foi observada, e cerca de 10 colônias crescidas no meio YNB-Lis de cada fenótipo (JME<sup>+</sup> e JME<sup>-</sup>) foram submetidas à PCR de colônia. A análise eletroforética em gel de agarose a 0,8% (m/v) confirmou a amplificação do gene *emt1* pelo aparecimento de bandas de cerca de 500 pb, de acordo com o tamanho esperado, de 463 pb, para todos os transformantes JME<sup>+</sup> e JME<sup>-</sup> rastreados, os quais foram nomeados de JME<sup>+</sup>K-EMM (Figura 2.19A) e JME<sup>-</sup>K-EMM (Figura 2.19B), respectivamente. Adicionalmente, foi realizada a PCR multiplex para a constatação da clonagem dos demais genes (*mac1PTS1 $\Delta$*  e *mac2PTS1 $\Delta$* ), em ao menos 3 transformantes de cada fenótipo, e todos apresentaram resultados positivos (dados não apresentados).

Estas cepas resultantes são desprovidas de DNA bacteriano, visto que a digestão do pGGA-*emt1-mac1-mac2* com a enzima *NotI* libera o cassete requerido para replicação em *E. coli* (*ColE1* e *AmpR*), ao contrário da cepa Polg-EMM, que detém tais sequenciais. Segundo Nicaud et al. (2000) e Pignede et al., (2000), a presença de material genético bacteriano em leveduras recombinantes podem ser uma desvantagem para a aceitação pelas autoridades reguladoras para fins comerciais e aplicações industriais, mesmo estas apresentando o *status* de segurança GRAS.



**Figura 2.19.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos produtos de PCR para confirmação dos transformantes  $JME^+$ (**A**) e  $JME^-$ (**B**). 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2 a 11: colônias rastreadas.

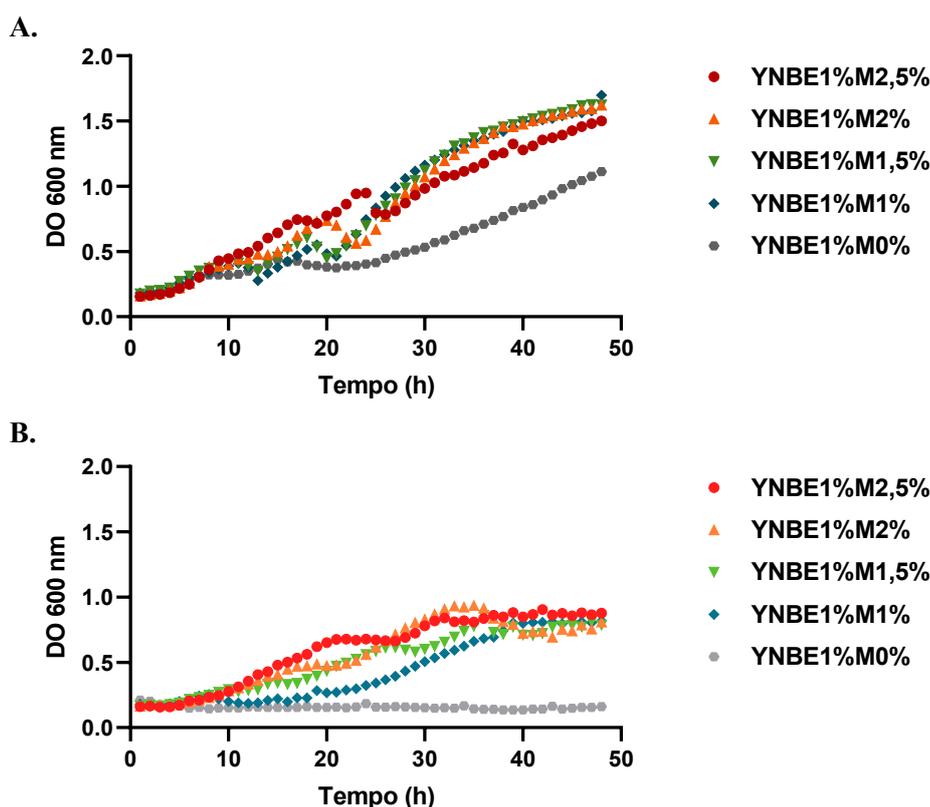
Em seguida, as cepas  $JME^+K^-EMM$  e  $JME^-K^-EMM$  foram submetidas a novo processo de transformação para a reconstituição da prototrofia com o vetor JMP62-Lys5ex. Os clones confirmados por PCR de colônia foram nomeados de  $JME^+EMM$  e  $JME^-EMM$  e direcionados para os ensaios de produção.

○ *Cultivos de Produção de MELs:*

As cepas  $JME^+EMM$  e  $JME^-EMM$  foram cultivadas em microplacas com o meio YNBE1%M(0-2,5%) a 28 °C por 48 h, para análise inicial do crescimento celular. Conforme pode ser analisado na Figura 2.19, ambas as cepas foram capazes de crescer nos meios testados, apontando que a clonagem dos genes de interesse não levou a alterações metabólicas letais. No geral, a cepa  $JME^+EMM$  apresentou um melhor crescimento utilizando manose e eritritol como fonte de carbono, e atingiu a  $DO_{600nm}$  de 1,5 em torno de 30 h, enquanto a cepa  $JME^-EMM$  alcançou a  $DO_{600nm}$  de apenas 0,8 ao fim de 48 h. Este fato já era esperado, uma

vez que a cepa  $JME^-EMM$  é incapaz de consumir o eritritol em baixas concentrações, e, portanto, a disponibilidade total de fonte de carbono era menor.

Em todos os meios YNBEM testados, com exceção do YNBE1%M0%, foi observado uma mesma tendência de crescimento pela cepa  $JME^+EMM$ , com uma curta fase de declínio em torno de 20 – 25 h, o que parece estar relacionado ao fenômeno de diauxia por efeito da presença de duas fontes de carbono (Figura 2.20A). Por outro lado, maiores diferenças podem ser observadas no perfil cinético da cepa  $JME^-EMM$ . No meio YNBE1%M1%, a fase de latência foi bastante longa, se estendendo até aproximadamente 20 h, e o cultivo atingiu a fase estacionária em 40 h (Figura 2.20B). Em vista disso, este meio foi selecionado, juntamente com o meio YNBE1%M2%, para as fermentações em frascos agitados, a fim de esclarecer se tais divergências comportamentais estariam relacionadas à produção de MELs.

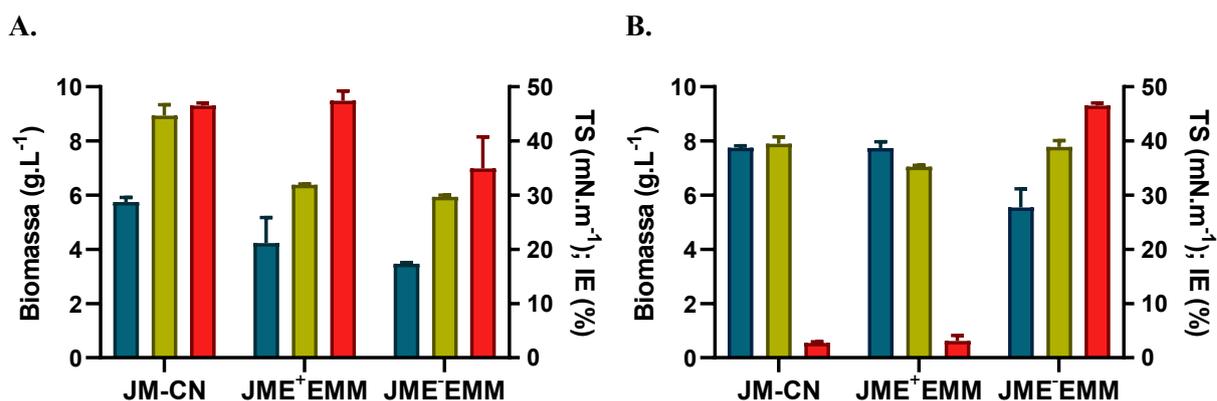


**Figura 2.20.** Cinética de crescimento das cepas  $JME^+EMM$  (A) e  $JME^-EMM$  (B) durante cultivo em microplacas contendo o meio YNBE1%M(1-2,5%), a 28°C e constante agitação por 48 h.

As cepas  $JME^+EMM$  e  $JME^-EMM$  foram submetidas a fermentações a 28 °C e 250 rpm, em frascos agitados contendo os meios YNBE1%M1% e YNBE1%M2%, juntamente com a cepa JMY1350, renomeada no presente trabalho como JM-CN, para servir como

controle negativo nos ensaios seguintes. Esta cepa prototrófica possui o mesmo *background* genético das estirpes recombinantes desenvolvidas, diferindo apenas na expressão dos genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ*.

A Figura 2.21 apresenta os resultados obtidos de biomassa celular seca, redução da tensão superficial e índice de emulsificação ao final de 96 h de cultivo das cepas JM-CN, JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM, nos diferentes meios estudados. No meio YNBE1%M1% (Figura 2.21A), o acúmulo de células foi aproximadamente 1,6 vezes inferior quando comparado com o meio YNBE1%M2% (Figura 2.21B) para todas as cepas, o que provavelmente está relacionado com a maior concentração de manose neste último. Além disso, o crescimento celular da cepa JME<sup>-</sup>EMM foi cerca de 1,3 vezes menor, em relação a cepa JME<sup>+</sup>EMM, em ambos os meios, o que corrobora com os cultivos em microplacas.



**Figura 2.21.** Biomassa celular seca, tensão superficial e índice de emulsificação obtidos a partir dos cultivos em YNBEM das cepas JM-CN, JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM a 28 °C e 250 rpm durante 96 h. **(A)** Meio YNBE1%M1%. **(B)** Meio YNBE1%M2%. Biomassa (em azul), Tensão Superficial (em verde), e Índice de Emulsificação (em vermelho).

Os extratos brutos obtidos dos sobrenadantes dos cultivos das cepas JM-CN (EB<sub>JCN</sub>), JME<sup>+</sup>EMM (EB<sub>E+EMM</sub>) e JME<sup>-</sup>EMM (EB<sub>E-EMM</sub>) em ambos os meios apresentaram reduções significativas de TS. Em relação aos extratos provenientes do meio YNBE1%M1%, o EB<sub>E-EMM</sub> levou a uma maior redução da TS (29,7 mN.m<sup>-1</sup>), seguido do EB<sub>E+EMM</sub> (31,9 mN.m<sup>-1</sup>), enquanto que o EB<sub>JCN</sub> apresentou valores (44,7 mN.m<sup>-1</sup>) mais próximos aos observados anteriormente por EB<sub>JCN</sub> e EB<sub>EMM</sub> (49,4 e 43,6 mN.m<sup>-1</sup>, respectivamente). Em comparação com o meio YNBE1%M2%, os valores de redução de TS obtidos dos EB<sub>JCN</sub>, EB<sub>E+EMM</sub> e EB<sub>E-EMM</sub> foram similares entre si ( $\approx 38$  mN.m<sup>-1</sup>) (Figura 2.21).

Ademais, a partir do meio YNBE1%M1%, foi verificada capacidade emulsificante de EB<sub>JCN</sub>, EB<sub>E+EMM</sub> e EB<sub>E-EMM</sub>, com valores superiores a 35%, ao passo que no meio YNBE1%M2%, os índices de EB<sub>JCN</sub> e EB<sub>E+EMM</sub> curiosamente sofreram drásticas reduções. Sil et al. (2013) observaram comportamento semelhante da linhagem W29, quanto cultivada em meio contendo 3% de glicose. O IE observado a partir do sobrenadante foi inferior a 10% em 72 h de cultivo, e com o aumento da biomassa celular, estes valores foram reduzidos. Contrariamente, o EB<sub>E-EMM</sub> apresentou os valores próximos para os dois meios testados, de 35 e 46%, respectivamente (Figura 2.21).

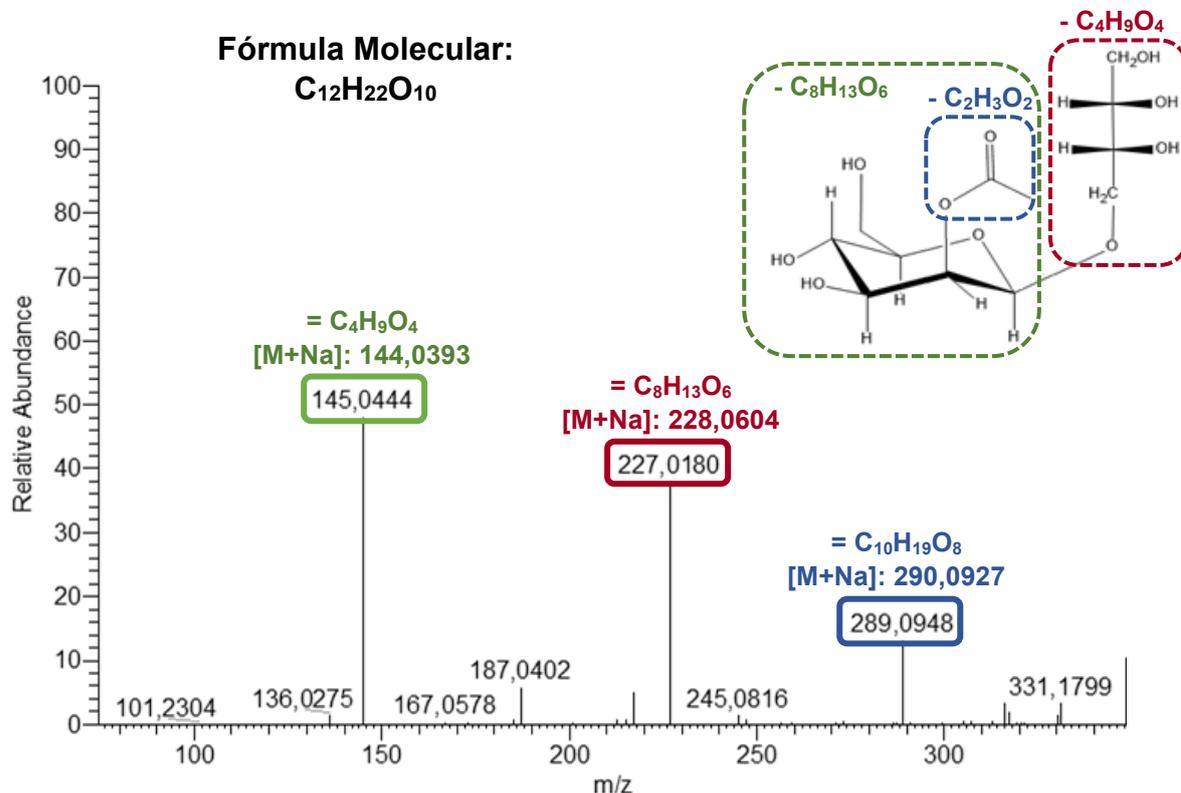
Analisando os dados em conjunto, é possível inferir que todas as cepas produziram compostos com propriedades tensoativas. Entretanto, apenas a cepa JME-EMM sintetizou moléculas com atividades emulsificantes em ambas as condições avaliadas, assim como a cepa Po1g-EMM (em YNBE1%M2%). Os extratos EB<sub>JCN</sub>, EB<sub>E+EMM</sub> e EB<sub>E-EMM</sub> dos dois meios foram analisados por MS para a detecção e caracterização dos potenciais MELs produzidos.

○ *Caracterização e Quantificação de MELs:*

A análise ESI-MS por injeção direta dos extratos brutos foi realizada no modo positivo e negativo. Nenhum íon candidato foi detectado nas análises no modo negativo, somente no modo positivo, os quais foram confirmados por fragmentação MS/MS. O íon de  $m/z$  349,11 foi identificado como MEL e detectado nos extratos de todas as cepas recombinantes cultivadas em ambos os meios. Entretanto, a sua abundância relativa foi variada e por isso, este íon precursor só foi fragmentado nas corridas dos EB<sub>E-EMM</sub>, uma vez que o método de análise foi configurado para a fragmentação dos íons mais intensos (Apêndice 5).

O perfil de fragmentação do íon  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  349,11 foi detalhado na Figura 2.22. A análise do espectro MS<sup>2</sup> apontou para a perda neutra de fragmentos referentes ao eritritol (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>;  $m/z$  122,09), a um grupamento acetila (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>;  $m/z$  60,01) e a manose acetilada (C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>;  $m/z$  204,06), devido à presença dos íons de  $m/z$  227,01, 289,09 e 145,04 respectivamente, os quais se mostraram os mais abundantes tanto na fragmentação por CID quanto por HCD. A diferença de 1 Da observada para os  $[M+Na]^+$  teóricos e identificados no espectro, está relacionado a maior preferência do H pelo O, conforme demonstrado antes por Steckel e Schlosser (2019) e observado por Hewald et al. (2006) nos espectros MS<sup>2</sup> e MS<sup>3</sup> dos MELs. Adicionalmente, este mesmo MEL foi identificado como o aduto  $[M+K]^+$  de  $m/z$

365,08, onde pôde-se observar perdas características de fragmentos correspondentes ao grupo acetila ( $m/z$  307,08), bem como ao eritritol ( $m/z$  245,09), conforme listado na Tabela 2.4.



**Figura 2.22.** Perfil de fragmentação do íon de  $m/z$  349 detectado nos extratos brutos das cepas recombinantes JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM cultivadas nos meios YNBE1%M1% e YNBE1%M2%. A imagem destacada pela linha pontilhada caracteriza a perda do eritritol ( $C_4H_9O_4$ , em vermelho), acetato ( $C_2H_3O_2$ , em azul) e da manose +  $C_2H_3O_2$  ( $C_8H_{13}O_6$ , em verde). Os íons de fragmentação marcados indicam os fragmentos remanescentes: eritritol ( $C_4H_9O_4$ , em verde), manose +  $C_2H_3O_2$  ( $C_8H_{13}O_6$ , em vermelho) e manosileritritol ( $C_{10}H_{19}O_8$ , em azul); com os íons  $[M+Na]^+$  teóricos.

**Tabela 2.4.** Manosileritritol lipídio produzido pelas cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM a partir de fermentações nos meios YNBE1%M1% e YNBME1%M2%, identificados por *Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*.

| Íon Molecular MS1 ( $m/z$ ) |         |            | Massa Molecular | Fórmula Molecular    | Íons de Fragmentação MS2 ( $m/z$ ) | Espécie de MELs |
|-----------------------------|---------|------------|-----------------|----------------------|------------------------------------|-----------------|
| Real                        | Teórico | Erro (ppm) |                 |                      |                                    |                 |
| 349,11                      | 349,11  | - 1,44     | 326,12          | $C_{12}H_{22}O_{10}$ | 145,04; 227,02; 289,10             | MEL-C2          |
| 365,08                      | 365,08  | -1,21      | 326,12          | $C_{12}H_{22}O_{10}$ | 245,09; 307,08                     | MEL-C2          |

Sendo assim, a molécula produzida pelas cepas recombinantes foi caracterizada como MEL-C2, uma vez que a metodologia empregada não permitiu a identificação da localização

exata do grupamento acetila e, portanto, sua classificação como MEL monoacilado desacetilado, pela presença desse radical em C2' ou C3', ou como MEL monoacetilado, no caso deste C2 está presente em C4' ou C6', respectivamente. Segundo as modificações genéticas realizadas, é provável que a acetilação esteja presente em C2', pela especificidade de Mac1, conforme observado por Saika et al. (2018). Para tal grau de informação, técnicas complementares, como o NMR, são necessárias. Este método é capaz de identificar grupos funcionais, bem como a posição das ligações dentro das moléculas de carboidratos e lipídios, e por isso requer amostras com elevado nível de pureza (SMYTH et al., 2014). No entanto, MS representa um método poderoso para análise de glicolipídios, mesmo em extratos brutos contendo complexas misturas, e vem sendo amplamente utilizado na identificação de MELs (SPOECKNER et al., 1999; ONGHENA et al., 2011; GOOSSENS et al., 2016; ANDRADE et al., 2017; BECK et al., 2019).

A ausência de acilação na molécula pode ser explicada pela baixa atividade das enzimas Mac1<sub>Cit</sub> e Mac2<sub>Cit</sub> e/ou o metabolismo lipídico comprometido. Uma vez que a síntese *de novo* de lipídios em *Y. lipolytica* requer excesso de carbono combinado com escassez de nitrogênio (BEOPOULOS et al., 2009), as condições empregadas podem ter desfavorecido esta via metabólica. Ambos os meios YNBE1%M1% e YNBE1%M2% possuem baixas razões C/N e fontes de carbono que necessitam de um aparato enzimático pouco usual para a célula.

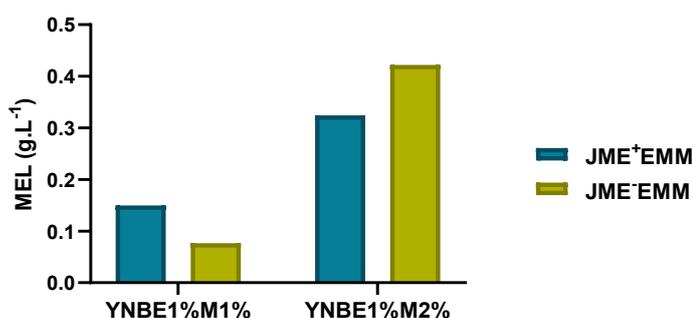
Devido à presença apenas do acetato como a porção hidrofóbica, o HLB da molécula é bastante elevado, de 16,3, segundo a escala de Griffin para categorizar surfactantes não-iônicos (GRIFFIN, 1946). Como o HLB avalia o equilíbrio do tamanho e da força das porções hidrofílicas e lipofílicas de um surfactante para o direcionamento de potenciais aplicações, a faixa de 8 a 18 na qual se encontra o MEL-C2, indica que esta molécula é mais adequada para o uso em emulsões O/W (ZHENG et al., 2015).

Similarmente, Fukuoka et al. (2007), isolaram uma mistura de MELs monoacilados desacetilados sintetizados por *M. antarcticus* a partir de glicose, com os radicais variando de C4-C14, cujo HLB foi calculado em torno de 12,15 e com medições de TS de 33,8 mN.m<sup>-1</sup>. Tais valores estão de acordo com os medidos para os EB<sub>E+EMM</sub> e EB<sub>E-EMM</sub>, entretanto, neste trabalho foi detectado apenas o MEL-C2, o que salienta para uma possível produção concomitante de moléculas com propriedades tensoativas, como observado anteriormente para a cepa recombinante Polg-EMM e os controles negativos Polg-CN e JM-CN.

Com a elucidação da estrutura dos MELs sintetizados pelas cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM, foi possível realizar uma estimativa da sua produção em função de equivalentes de eritritol, através da metodologia alternativa desenvolvida no presente trabalho. Isso porque, conhecendo o peso molecular do MEL, um fator de correção para compensar a massa dos demais constituintes pôde ser calculado. Logo, os extratos foram analisados por HPLC-RID, antes e após a hidrólise ácida por 4 h.

Como o esperado, nos cromatogramas dos EB<sub>JCN</sub> após a hidrólise não foi detectado o pico referente ao eritritol, o que corrobora com as análises por ESI-MS. Curiosamente, apenas nos cromatogramas dos EB<sub>E-EMM</sub> hidrolisados foi observado um pico de co-eluição com o eritritol (Apêndice 6). Mesmo assim, os valores de concentração do eritritol nos extratos foram calculados e utilizados apenas com indicadores aproximados da quantidade real dos MELs, uma vez que podem estar super ou subestimados. Além disso, as etapas de extração e hidrólise vão incorporando imprecisões nos resultados finais. Porém, como todas as amostras foram igualmente processadas, assumiu-se as mesmas oscilações em todos os ensaios.

No meio YNBE1%M1%, a cepa JME<sup>+</sup>EMM produziu aproximadamente 0,11 g.L<sup>-1</sup> de MEL-C2, enquanto que a cepa JME<sup>-</sup>EMM foi capaz de sintetizar 0,08 g.L<sup>-1</sup>. Com o aumento da concentração da manose no meio YNBE1%M2%, a produção de MELs foi aumentada em 2,9 (0,32 g.L<sup>-1</sup>) e 5,2 (0,42 g.L<sup>-1</sup>) vezes pelas cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM, respectivamente. Visto que a cepa JME<sup>-</sup>EMM é incapaz de consumir eritritol a 1%, a maior produção observada no meio YNBE1%M2%, em comparação com a da cepa JME<sup>+</sup>EMM, mostra que este poliol favoreceu a biossíntese de MEL (Figura 2.23). Em estudos anteriores, Rau et al. (2005), Morita et al. (2006) e Liu, Koh e Ji (2011) já haviam verificado que a adição de eritritol ao meio de cultivo contendo óleo vegetal ou glicerol incrementa substancialmente a produção de MELs.



**Figura 2.23.** Produção de manosileritritol lipídios pelas cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM em meio YNBE1%M1% e YNBE1%M2% durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 250 rpm por 96 h.

Apesar das baixas concentrações estimadas, este é o primeiro relato na literatura da produção de MELs por *Y. lipolytica*. Cabe ressaltar, que o uso de carboidratos como substrato para a produção deste glicolípido, é relatado por levar a consideráveis reduções no rendimento e produtividade das fermentações conduzidas pelas espécies naturalmente produtoras. Investigando a produção de MEL a partir da glicose, Morita et al. (2009) relataram que as cepas *M. antarcticus*, *U. siamensis*, *U. maydis* e *S. scitamineum* foram capazes de sintetizar entre 1,0 e 6,4 g.L<sup>-1</sup> deste glicolípido, enquanto que na presença de óleo de soja, estas espécies secretaram até 13,0 g.L<sup>-1</sup> de MELs. Em outros estudos, estes mesmos autores observaram que *D. churashimaensis* também produziu MEL a partir de glicose e outros açúcares, como sacarose, frutose e manose, em concentrações máximas de 3,8 g.L<sup>-1</sup> (MORITA et al., 2011); e que *M. aphidis* não foi capaz de secretar MEL utilizando glicose (MORITA et al., 2007).

Ademais, Kitamoto et al. (1992) identificou elevado teor de MEL intracelular em células de *M. antarcticus*, excedendo 10% do seu peso seco celular, quando esta espécie foi cultivada em glicose ou outros carboidratos como substrato, enquanto que no sobrenadante o glicolípido não foi identificado. Em manose, frutose, glicerol e eritritol, o conteúdo de MEL intracelular foi de 12,8, 4,6, 21,1 e 5,1 %, respectivamente, junto com os triacilgliceróis.

A investigação da produção de MEL intracelular pelas cepas recombinantes de *Y. lipolytica* não foi possível, visto que a lise das células levou a liberação de uma infinidade de compostos que interferiram nos métodos analíticos de quantificação da concentração de MELs (dados não apresentados). No entanto, como é descrito na literatura que o *cluster* gênico para a biossíntese de MELs apresenta uma proteína transportadora responsável pela secreção do glicolípido, o presente trabalho se propôs a avaliar a atuação da Mmfl no transporte de MELs para o meio extracelular por *Y. lipolytica*.

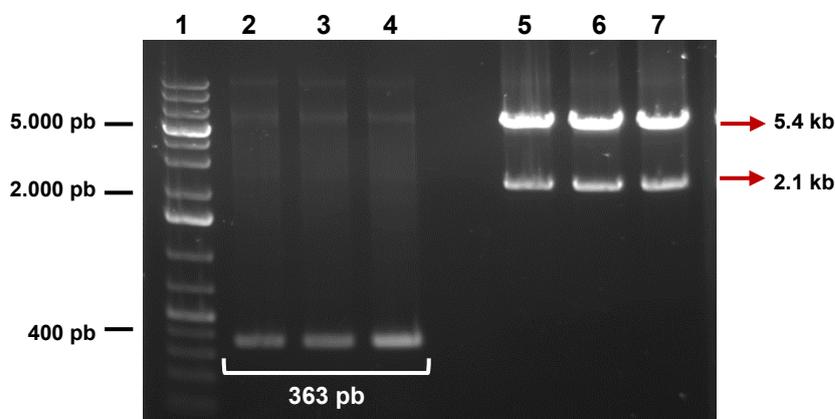
## 2.5.2. INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA TRANSMEMBRANA MMF1 NA SECREÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica*

### ○ Construção do Vetor de Expressão pGGA-mmfl:

A proteína transmembrana Mmfl é membro de uma das maiores famílias de transportadores, a MFS (HEWALD et al., 2006), presentes em uma ampla variedade de organismos (QUISTGAARD et al., 2016). Contudo, o alinhamento do gene *mmfl* contra o genoma de referência de *Y. lipolytica* por BLASTX pelos bancos de dados GRYC e NCBI,

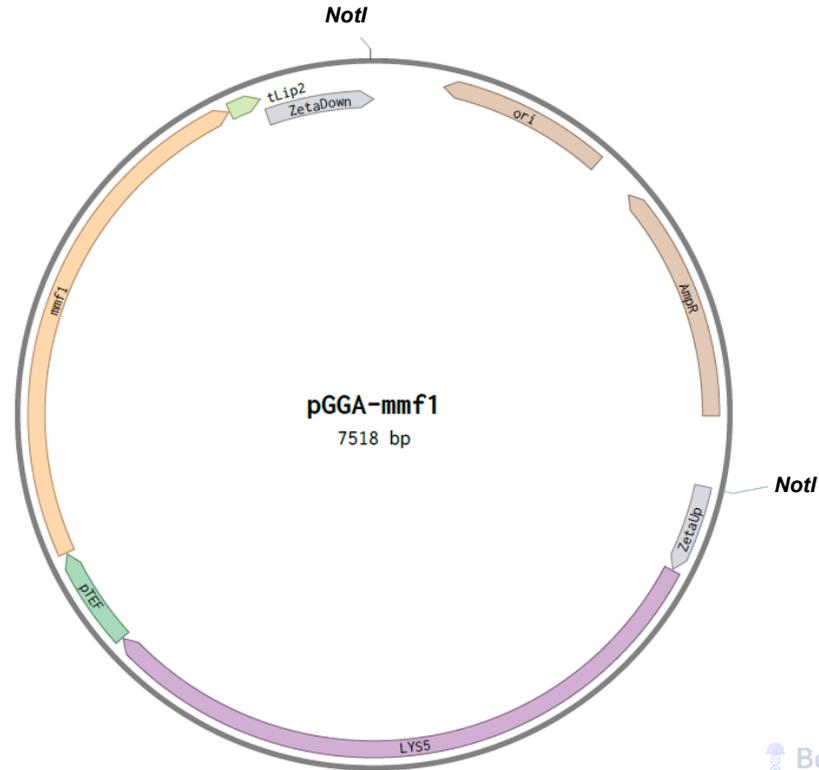
mostrou, mais uma vez, ausência de sequências homólogas. Tal informação sugere que a esta espécie tenha utilizado outro mecanismo para a secreção do MEL-C2 sintetizado pelas cepas recombinantes JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM.

Em vista disso, a sequência do gene *mmf1* teve os códons otimizados para *Y. lipolytica* (Apêndice 1B) e foi sintetizado no vetor pUC57, para a construção do vetor de expressão pelo sistema GGA. Por essa razão, foram adicionados à sequência as saliências complementares nas extremidades 5' e 3' para a posição G1 (D: A e E: TCTA) e os sítios de restrição para *BsaI*. As construções corretamente montadas foram rastreadas a partir de colônias brancas resistentes à ampicilina, das quais os plasmídeos foram previamente extraídos e analisados pela PCR e digestão com a enzima *NotI*. A análise eletroforética em gel de agarose a 0,8% (m/v) demonstrou que a amplificação do gene *mmf1* foi bem sucedida, pelo aparecimento de bandas abaixo de 400 pb, de acordo com o tamanho esperado (363 pb) para os três plasmídeos analisados. Ademais, os vetores foram corretamente digeridos, uma vez que foi possível observar a presença de duas bandas, referentes ao inserto integrativo (5.368 pb) e o *backbone* bacteriano (2.150 pb) (Figura 2.24).



**Figura 2.24.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) da confirmação da montagem correta do vetor pGGA-*mmf1* por PCR e digestão com *NotI*. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2 a 4: produtos do PCR com os oligos Fw-*mmf1*/Rv-*mmf1*. 5 a 7: reação com *NotI*. As setas em vermelho indicam as bandas referentes ao cassete integrativo (5.368 pb) e *backbone* bacteriano (2.150 pb).

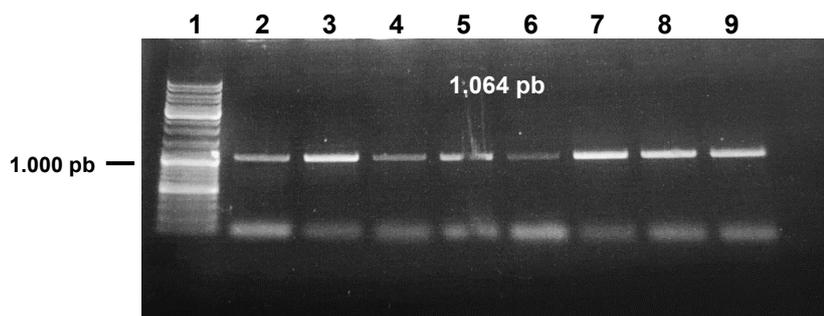
O vetor de expressão desenvolvido foi denominado de pGGA-*mmf1* e possui: o promotor constitutivo pTEF e o terminador tLip2 nativos; a marca de seleção auxotrófica para lisina (*LYS5*); os sítios de inserção zeta; e a maquinaria para propagação em *E coli* (Figura 2.25).



**Figura 2.25.** Mapa do vetor pGGA-mmf1 de 7.518 pb. *pTEF*: promotor constitutivo nativo. *mmf1*: gene que codifica o transportador Mmf1. *tLip2*: terminador nativo. *LYS5*: marca de seleção auxotrófica para lisina (levedura). *zetaUp/Down*: sítio de inserção zeta. *AmpR*: marca de seleção de resistência ao antibiótico ampicilina (bactéria). *ori*: origem de replicação bacteriana *ColEI*; *NotI*: sítio de restrição para linearização do vetor.

○ *Construção das Cepas Recombinantes JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM:*

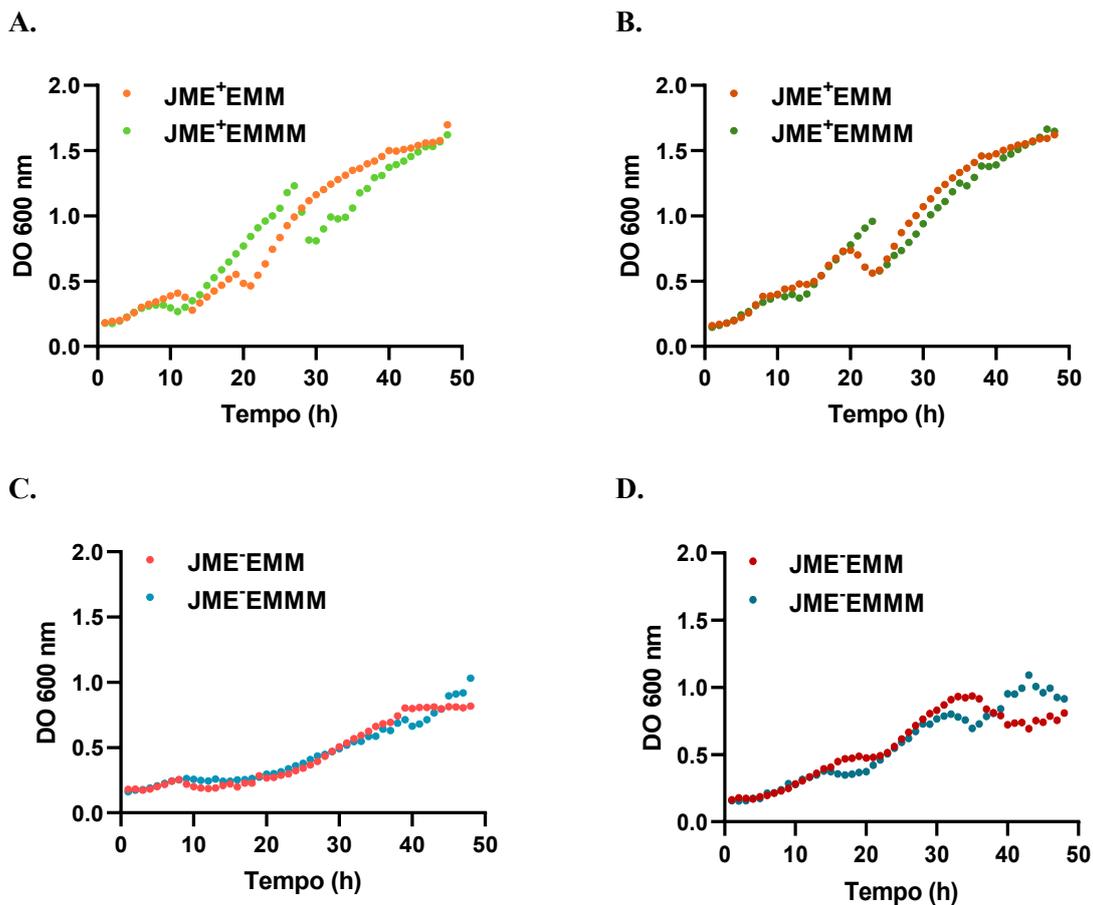
O pGGA-mmf1 linearizado foi empregado nos processos de transformação das cepas com o fenótipo *Lys<sup>-</sup>*: JME<sup>+</sup>K<sup>-</sup>EMM e JME<sup>-</sup>K<sup>-</sup>EMM. As colônias crescidas no meio YNB foram submetidas a PCR de colônia para a confirmação da clonagem do gene *mmf1*. Como esperado, a análise eletroforética a 0,8% (m/v) mostrou bandas na altura aproximada de 1.000 pb, correspondentes ao tamanho do fragmento amplificado, de 1.064 pb (Figura 2.26).



**Figura 2.26.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos produtos de PCR para confirmação dos clones. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*New England Biolabs*). 2 a 5: colônias JME<sup>+</sup>K<sup>-</sup>EMM rastreadas. 6 a 9: colônias e JME<sup>-</sup>K<sup>-</sup>EMM rastreadas.

○ *Cultivos de Produção de MELs:*

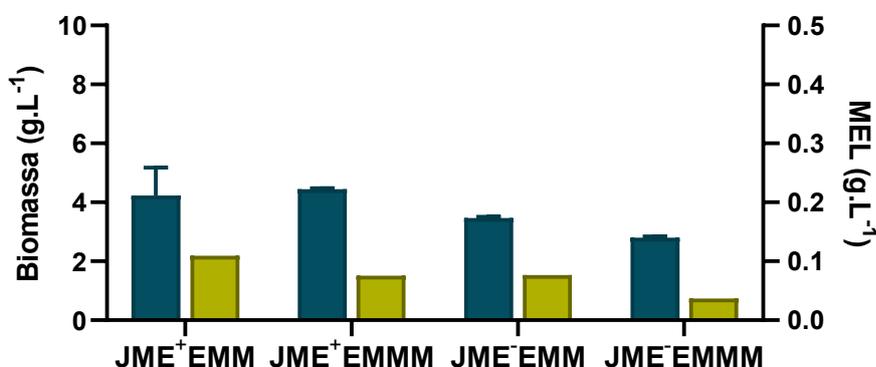
As cepas confirmadas foram nomeadas de JME<sup>+</sup>EMMM e JME<sup>-</sup>EMMM e submetidas a cultivo em microplacas a 28 °C por 48 h, para a comparação do crescimento celular com suas cepas precursoras, JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM, respectivamente, nos meios YNBE1%M1% e YNBE1%M2%. Conforme apresentado na Figura 2.27, os perfis de crescimento das cepas recombinantes contendo as enzimas Emt1, Mac1<sub>Cit</sub> e Mac2<sub>Cit</sub> e de suas derivadas com o transportador Mmf1, não mostraram diferenças significativas em ambas as condições testadas, e, portanto, salientam que a clonagem da proteína transmembrana não levou a desordens metabólicas. Assim, as estirpes JME<sup>+</sup>EMMM e JME<sup>-</sup>EMMM seguiram para cultivos em frascos agitados com os meios YNBE1%M1% e YNBE1%M2%, a 28 °C e 250 rpm por 96 h para a avaliação secreção de MELs.



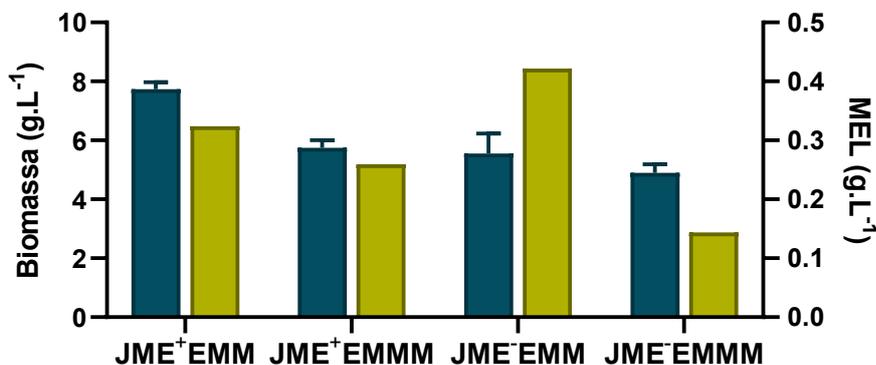
**Figura 2.27.** Cinética de crescimento das cepas recombinantes durante cultivo em microplacas contendo o meio YNBEM, a 28 °C e constante agitação por 48 h. **(A)** Cultivo de JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>+</sup>EMMM em YNBE1%M1%. **(B)** Cultivo de JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>+</sup>EMMM em YNBE1%M2%. **(C)** Cultivo de JME<sup>-</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMMM em YNBE1%M1%. **(D)** Cultivo de JME<sup>-</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMMM em YNBE1%M2%.

Em ambos os meios YNBE1%M1% e YNBE1%M2%, as cepas JME<sup>+</sup>EMMM e JME<sup>-</sup>EMMM tiveram o acúmulo de células similar ao de as suas precursoras, porém o a secreção de MELs foi reduzida (Figura 2.28). A cepa JME<sup>+</sup>EMMM secretou 0,08 g.L<sup>-1</sup> do glicolipídio, enquanto que a cepa JME<sup>-</sup>EMMM externalizou apenas 0,04 g.L<sup>-1</sup>de MELs, no meio YNBE1%M1% (Figura 2.28A). Estes valores aumentaram cerca de 3,6 no cultivo em YNBE1%M2% (JME<sup>+</sup>EMMM: 0,26 g.L<sup>-1</sup>; e JME<sup>-</sup>EMMM: 0,14 g.L<sup>-1</sup>) (Figura 2.28B), porém, ainda foram inferiores aos das cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM.

A.



B.



**Figura 2.28.** Produção de biomassa e manosileritritol lipídios pelas cepas JME<sup>+</sup>EMMM e JME<sup>-</sup>EMMM e suas respectivas precursoras em meio YNBE1%M1% e YNBE1%M2% durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 250 rpm por 96 h. (A) Meio YNBE1%M1%. (B) Meio YNBE1%M2%. Biomassa (em azul) e Manosileritritol lipídios (em verde).

A análise por MS revelou apenas a presença do MEL-C2 nas amostras, conforme previamente observado para as cepas JME<sup>+</sup>EMM e JME<sup>-</sup>EMM (Apêndice 5). Curiosamente, Hewald et al. (2006) relataram que cepas mutantes de *U. maydis mac1Δ* ou *mac2Δ* resultaram em total perda da produção de MEL extracelular. Embora os autores não tenham avaliado a

síntese intracelular de MELs para a confirmação da obrigatoriedade da ação de ambas aciltransferases, os dados sugerem que MELs monoaciladas não são secretadas por esta enzima especificamente. Diferentemente, Fukuoka et al. (2007) e Saika et al. (2018) identificaram MELs monoacilados extraídos a partir do sobrenadante de cepas selvagens de *M. antarcticus*, *M. aphidis*, *M. rugulosus* entre outras; bem como da cepa recombinante *P. tsukubaensis pro tem. PtMAC2Δ*. Entretanto, de acordo com a análise por BLASTP, a sequência da *Mmf1* de *U. maydis* possui entre 71 a 81% de homologia com as proteínas correspondentes nas leveduras *M. antarcticus*, *M. aphidis* e *P. tsukubaensis pro tem* (SAIKA et al., 2018).

Além disso, a clonagem do gene *mmf1* de *U. maydis* em *Y. lipolytica* não foi acompanhada de adição de peptídeos sinais nativos da levedura. Isso porque, o transporte de proteínas para a membrana celular, visando a integração ou secreção, ocorre por uma via secretora padrão, na qual a proteína-alvo se move do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e, em seguida, para vesículas transportadoras (HADLINGTON; DENECKE, 2000; SURPILI; MÜLLER-RÖBER; WILLMTZER, 2002). E, em um extenso estudo de homologia realizado por Swennen e Beckerich (2007), entre 165 proteínas implicadas na secreção vesicular em *Y. lipolytica* e suas contrapartes em outros organismos, foi mostrado que 72% destas proteínas estavam mais próximas de em fungos filamentosos do que de outros microrganismos, o que facilitaria o reconhecimento e endereçamento adequado.

Em face do exposto, a clonagem da proteína transmembrana *Mmf1* de *U. maydis* em *Y. lipolytica*, empregando os peptídeos nativos do fungo filamentoso, não levou a uma maior secreção de MEL-C2 pelas cepas recombinantes JME+EMMM e JME-EMMM, nas condições avaliadas. Este cenário pode ser diferente, ao considerar a síntese de MELs diacilados pelas cepas recombinantes. Como a prova de conceito foi realizada a partir dos carboidratos precursores como substrato, para facilitar a síntese da porção hidrofílica do glicolipídio, ocorreu a produção direcionada de MEL-C2, um biosurfactante com propriedades físico-químicas pouco atrativas industrialmente. Por isso a avaliação da produção de MELs por *Y. lipolytica* em condições que favoreçam a síntese de todos os intermediários foi explorada.

### 2.5.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANOSILERITRITOL LIPÍDIOS POR *Yarrowia lipolytica* A PARTIR DE GLICEROL

Os fatores nutricionais e ambientais aos quais os microrganismos são submetidos podem afetar o rendimento e a composição dos MELs pelas espécies produtoras (ARUTCHELVI et al., 2008). Embora não haja nenhuma informação sobre os parâmetros relevantes para a biossíntese deste glicolípido por *Y. lipolytica*, deduz-se que em condições ideais para o alcance de bons rendimentos dos precursores, a produção de MELs será favorecida. Tendo em vista que o glicerol é caracterizado como substrato preferido para o crescimento celular (WORKMAN; HOLT; THYKAER, 2013) e síntese de eritritol (TOMASZEWSKA, 2012) e de lipídios (BACK et al., 2016) por esta levedura, a produção de MELs a partir desse subproduto industrial foi investigada.

A razão C/N elevada é apontada como um dos principais parâmetros para o acúmulo de lipídios por *Y. lipolytica* (SARA; BRAR; BLAIS, 2016), e concomitantemente, também favorece a produção de eritritol (TOMASZEWSKA, 2012). Adicionalmente, Egermeier et al. (2017) identificaram o pH em torno de 3,5 – 4,0, como a melhor faixa para o direcionamento da produção de eritritol, em detrimento dos demais polióis também sintetizados por *Y. lipolytica*. Assim, as cepas recombinantes JME<sup>+</sup>EMM, JME<sup>-</sup>EMM, JME<sup>+</sup>EMMM e JME<sup>-</sup>EMMM foram submetidas a uma triagem em microplacas no meio YNB contendo 8% de glicerol, a 30 °C, 500 rpm por 120 h.

**Tabela 2.5.** Acúmulo de biomassa seca e tensão superficial dos extratos brutos provenientes dos cultivos em microplaca para a triagem das cepas recombinantes de *Yarrowia lipolytica* no meio YNB8%, a 30 °C 500 rpm por 120 h.

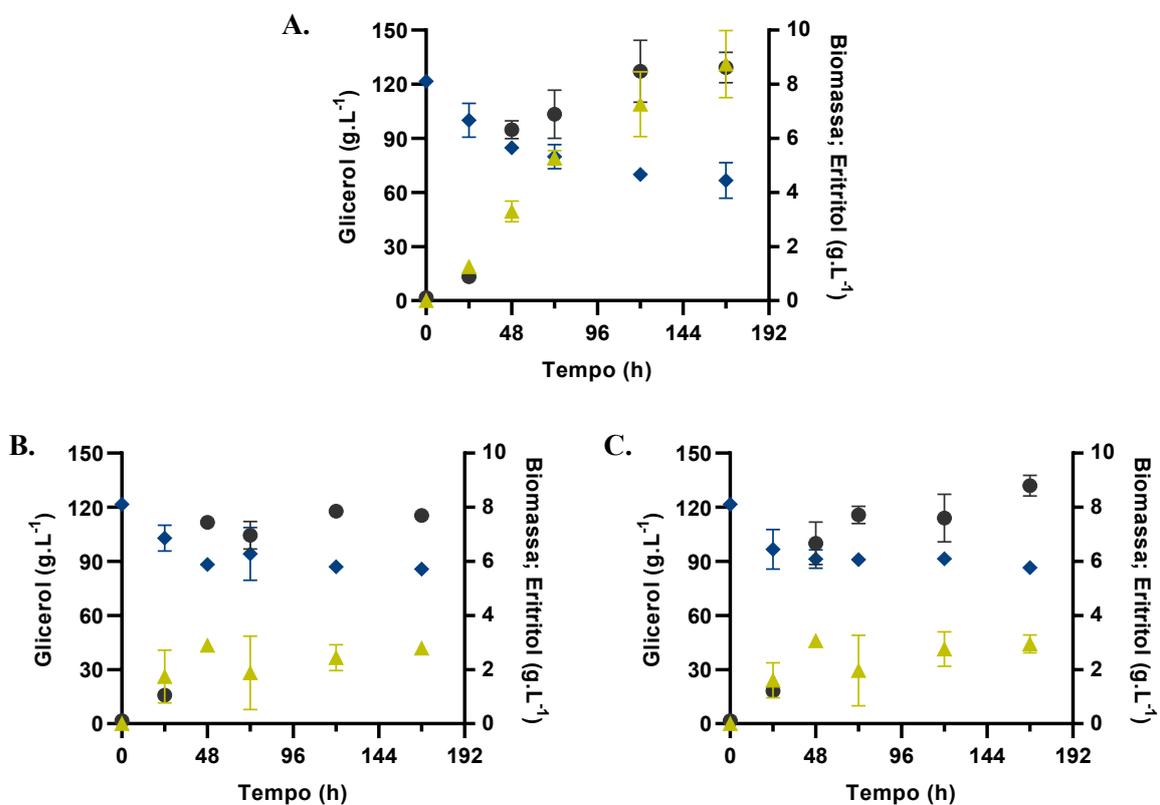
| Estirpes                  | Biomassa Seca<br>(mg.mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> | Tensão Superficial (mN.m <sup>-1</sup> ) |                   |
|---------------------------|--|--|-------------------|
|                           |  | TS <sup>b</sup>                          | ΔTS <sup>ab</sup> |
| JME <sup>+</sup> EMM (1)  | 8,47 ± 0,82  | 65,83 ± 1,28                             | 6,34 ± 1,28       |
| JME <sup>+</sup> EMM (2)  | 8,29 ± 0,15  | 67,30 ± 1,68                             | 4,88 ± 1,68       |
| JME <sup>+</sup> EMM (3)  | 7,76 ± 0,32  | 65,35 ± 4,40                             | 6,82 ± 4,40       |
| JME <sup>+</sup> EMMM (1) | 7,87 ± 0,62  | 69,40 ± 0,92                             | 2,78 ± 0,92       |
| JME <sup>+</sup> EMMM (2) | 7,93 ± 1,18  | 70,75 ± 0,48                             | 1,42 ± 0,48       |
| JME <sup>+</sup> EMMM (3) | 7,84 ± 1,06  | 68,81 ± 2,22                             | 3,37 ± 2,22       |
| JME <sup>-</sup> EMM (1)  | 8,00 ± 0,46  | 67,48 ± 2,65                             | 4,69 ± 2,65       |
| JME <sup>-</sup> EMM (2)  | 7,84 ± 0,87  | 69,01 ± 1,15                             | 3,17 ± 1,15       |
| JME <sup>-</sup> EMM (3)  | 8,16 ± 0,85  | 67,55 ± 0,70                             | 4,63 ± 0,70       |
| JME <sup>-</sup> EMMM (1) | 7,73 ± 1,73  | 71,09 ± 0,23                             | 1,08 ± 0,23       |
| JME <sup>-</sup> EMMM (2) | 6,18 ± 0,15  | 70,74 ± 0,26                             | 1,43 ± 0,26       |
| JME <sup>-</sup> EMMM (3) | 7,24 ± 0,46  | 67,10 ± 3,49                             | 5,07 ± 3,49       |

<sup>a</sup>ΔTS calculado com base na tensão superficial da água destilada (72,17 mN.m<sup>-1</sup>).

<sup>b</sup>Valores não apresentam diferença estatística para 95% de confiança no *One-way ANOVA* (p > 0,05).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 2.5, a concentração da biomassa e redução da tensão superficial não diferiu significativamente entre os três clones de um mesmo fenótipo e de fenótipos diferentes. Os valores de TS dos extratos brutos foram bastante elevados, indicando que não houve produção do glicolípido com propriedades tensoativas. Além disso, todas as linhagens recombinantes apresentaram transição dimórfica, com formação de hifas e pseudo-hifas (dados não apresentados). Este fato pode estar relacionado ao estresse gerado durante o cultivo em microplaca, como a elevada concentração de glicerol, que provavelmente dificultou a oxigenação das células.

Sendo assim, as cepas JME-EMM e JME-EMMM foram selecionadas para o cultivo em frascos agitados, com algumas alterações na composição do meio e nas condições de fermentação. A escolha por estas cepas se deu pelos ensaios anteriores, já que não houve diferenças no cultivo em microplaca. Em 168 h de cultivo no meio YNBG12% (C/N 105 e pH 4), as cepas JM-CN, JME-EMM e JME-EMMM apresentaram uma cinética de crescimento com pouca variação, e atingiram valores em torno de 7-8 g.L<sup>-1</sup> de células (Figura 2.29).



**Figura 2.29.** Cinética da fermentação em YNBG12% (C/N 105 e pH 4) a 28 °C, 250 rpm durante 168 h. (A) JM-CN. (B) JME-EMM. (C) JME-EMMM. Biomassa (●). Glicerol (◆). Eritritol (▲).

O consumo de glicerol divergiu para a cepa controle e as cepas recombinantes. Enquanto que o glicerol residual na fermentação com a JM-CN chegou a cerca 66 g.L<sup>-1</sup>, nos cultivos com as cepas JME·EMM e JME·EMMM a sua concentração final ficou em torno de 86 g.L<sup>-1</sup>. Além disso, a síntese de eritritol também foi bastante diferente. A cepa JM-CN foi capaz de secretar 8,74 g.L<sup>-1</sup> e as cepas recombinantes produziram cerca de 3 vezes menos (Figura 2.29). No entanto os valores de redução de TS foram muito similares entre si, tanto das medições diretamente do sobrenadante livre de células, quanto a partir os extratos brutos (Tabela 2.6), o que mostra que esta condição avaliada não levou a produção de biossurfactantes de interesse.

**Tabela 2.6.** Tensão superficial do sobrenadante e extratos brutos dos cultivos em frascos agitados no meio YNBG12%, a 28 °C 500 rpm por 120 h.

| Estirpes | Tensão Superficial (mN.m <sup>-1</sup> ) |                            |
|----------|--|----------------------------|
|          | Sobrenadante <sup>a</sup>                | Extrato Bruto <sup>b</sup> |
| JM-CN    | 48,98 ± 5,70                             | 45,02 ± 3,18               |
| JME·EMM  | 51,69 ± 4,38                             | 44,28 ± 1,00               |
| JME·EMMM | 52,44 ± 5,83                             | 46,05 ± 0,69               |

<sup>a</sup>0 h a tensão superficial foi de 54,61 ± 1,90 mN.m<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup>Extração do meio estéril levou a valores de 67,48 ± 1,46 mN.m<sup>-1</sup>.

A análise por HPLC-RID dos extratos brutos revelou a presença de vários produtos, que foram co-extraídos com o solvente orgânico acetato de etila (dados não apresentados), como principalmente o glicerol, que remanesceu em excesso no sobrenadante. Nos ensaios anteriores com o meio YNBEM, os extratos brutos dos cultivos com as cepas JME·EMM e JME·EMMM, já haviam mostrado a co-extração do eritritol. Os extratos dos ensaios com YNBG, após a hidrólise apresentaram-se muito poluídos, o que impossibilitou a análise.

A metodologia clássica de quantificação dos MELs requer a extração prévia das moléculas com acetato de etila (FUKUOKA et al., 2007; MORITA et al., 2011; SAIKA et al., 2016) ou outro solventes, como éter metil-terc-butílico (RAU et al., 2005), e é amplamente empregada independentemente do substrato a ser utilizado e das características estruturais do produto gerado. Segundo Arévalo (2015), as técnicas utilizadas até o momento para isolar os MELs não são eficientes e têm um alto impacto no meio ambiente. Mesmo assim, métodos alternativos de quantificação direta não são alvo de estudos.

Outro aspecto importante a ser discutido, é relacionado a segmentação citosólica das enzimas Mac1 e Mac2. Freitag et al. (2014), ao direcionar Mac1 e Mac2 para o citosol de *U. maydis*, não observou diferença estatística significativa na produção de MELs ( $p > 0,01$ ), embora em valores absolutos, a concentração de MELs tenha reduzido. Tal fato pode estar relacionado com a menor quantidade de cadeias acil-CoAs disponíveis no citoplasma, o que também pode ter ocorrido no presente trabalho.

Xu et al. (2016) realizaram a engenharia de vias metabólicas em *Y. lipolytica* para o desenvolvimento de uma plataforma de biorrefinaria. Especificamente, as enzimas de processamento acil-CoA/acil-ACP (*Acyl Carrier Protein*) foram direcionadas ao citoplasma, peroxissomo ou retículo endoplasmático para gerar ésteres etílicos de ácidos graxos e alcanos graxos com comprimento de cadeia personalizado. As enzimas foram expressas nesses compartimentos sem perda de atividade, e a concentração dos compostos de interesse não foi determinado pela localização subcelular das enzimas, mas pela disponibilidade dos precursores nos diferentes compartimentos. Portanto, estudar os efeitos da segmentação peroxissomal das aciltransferases e estratégias de aumento do suprimento de intermediários, via engenharia metabólica ou otimização dos bioprocessos, são alguns dos objetivos futuros.

Mediante o exposto, o presente trabalho abre novas possibilidades de aplicação biotecnológica da espécie *Y. lipolytica*. No entanto, um maior conhecimento acerca dos parâmetros relevantes para a biossíntese de MELs por esta levedura é necessário, bem como a implementação de metodologias de quantificação mais fidedignas para a obtenção de dados mais precisos.

## 2.6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- A clonagem dos genes *emt1*, *mac1PTS1Δ* e *mac2PTS1Δ* em diferentes cassetes de expressão levou a síntese de MELs pelas cepas recombinantes de *Y. lipolytica* a partir do uso dos carboidratos manose e eritritol como substrato.
- Os MELs produzidos pelas cepas recombinantes foram caracterizados como MEL-C2, segundo as análises por espectrometria de massas do extrato bruto, pela presença de apenas um grupamento acetila como porção hidrofóbica.
- As cepas recombinantes com o fenótipo EYK<sup>-</sup> foram capazes de produzir aproximadamente 0,42 g.L<sup>-1</sup> de MELs na presença de 1% de eritritol e 2% de manose, enquanto que as cepas mutantes com o fenótipo EYK<sup>+</sup> alcançaram um máximo de 0,32 g.L<sup>-1</sup> nas mesmas condições, de acordo com os métodos analíticos empregados.
- A clonagem da proteína transmembrana Mmf1 nas cepas recombinantes produtoras influenciou negativamente na secreção do MEL-C2, independentemente da habilidade de catabolismo do eritritol, segundo as condições utilizadas.
- Com os dados obtidos não foi possível avaliar a eficiência do peptídeo autocatalítico F2A como uma ferramenta de co-expressão gênica em *Y. lipolytica*. Os resultados indicaram potencial produção de MELs pela cepa recombinante desenvolvida (Po1g-EMM), utilizando manose e eritritol como substrato, o que aponta para a atividade catalítica do F2A nesta espécie.

# CAPÍTULO 3:

## $\beta$ -CAROTENO

---

### 3.1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são uma família de pigmentos terpenoides de grande interesse científico desde o início do século XIX, devido à sua ampla diversidade de estruturas e funções biológicas (ISLER, 1971). Atualmente, existem mais de 1.200 carotenoides de ocorrência natural descritos, os quais são sintetizados por uma extensa variedade de organismos, englobando plantas, algas, fungos, bactérias, arqueas e alguns animais invertebrados (YABUZAKI, 2020). Além do importante papel como corantes fotoprotetores responsáveis pelas cores amarelo, laranja, vermelho e violeta nas espécies portadoras (MAOKA, 2020), os carotenoides também apresentam vários efeitos benéficos para a saúde humana, como: ação antioxidante, atividade de pró-vitamina A e anti-inflamatória, modulação de fatores de crescimento e vias de sinalização intracelular, estimulação do sistema imunológico, e redução do risco de câncer e doenças degenerativas (FIEDOR; BURDA, 2014). Por isso, estes compostos têm sido extensivamente explorados por diferentes segmentos industriais (SATHASIVAM; KI, 2018).

O mercado global de carotenoides atingiu US\$ 1,65 bilhões em 2018, e estima-se que alcançará US\$ 2,19 bilhões até 2026, com uma taxa de crescimento anual de 3,5%. Entre os carotenoides existentes, o  $\beta$ -caroteno é considerado um dos mais relevantes comercialmente, sendo responsável por mais de 20% da participação do mercado total de carotenoides. A expectativa é que o mercado global de  $\beta$ -caroteno ultrapasse US\$ 650 milhões em 2027, com o maior crescimento voltado para a produção a partir de fontes naturais, devido ao aumento das preocupações por parte dos consumidores com os efeitos a longo prazo dos produtos sintéticos (REPORTS AND DATA, 2019).

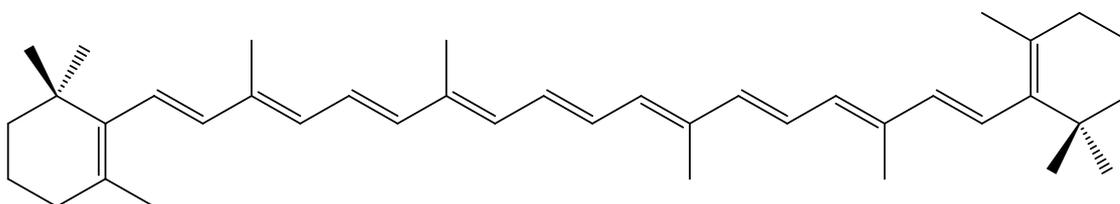
Afim de atender o aumento da demanda industrial, diversas alternativas para a produção biotecnológica de  $\beta$ -caroteno vêm sendo desenvolvidas, como a engenharia racional de potenciais hospedeiros para a biossíntese heteróloga (REYES; GOMEZ; KAO, 2014) e o emprego de substratos de baixo custo (JACOBSEN; LEDESMA-AMARO; MARTINEZ, 2020). Dentre as espécies geneticamente modificadas, a levedura não-convencional *Y. lipolytica* tem se destacado, e possui o maior rendimento de  $\beta$ -caroteno recombinante até o momento (LARROUDE et al., 2018a).

## 3.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.2.1. β-CAROTENO

#### 3.2.1.1. Estrutura Química, Propriedades e Funções

O β-caroteno foi isolado pela primeira vez por Wackenroder em 1831, a partir das raízes da cenoura (*Daucus carota*), o que deu origem ao seu nome. Porém, a sua composição e estrutura foi totalmente determinada apenas no século XX. A fórmula empírica do β-caroteno, C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, foi estabelecida por Willstatter e Mieg em 1907, e a estrutura química foi elucidada por Karrer em 1930, o que lhe concedeu o Prêmio Nobel de Química em 1937 (ISLER, 1971). Este composto é o principal membro do grupo dos carotenos, consistindo de oito unidades de isoprenos (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) unidas de tal forma que o seu arranjo seja invertido no centro da molécula. Portanto, a cadeia linear é simétrica e possui os dois radicais metilas centrais separados por seis átomos de C, enquanto que os demais são separados por cinco átomos de C. As extremidades da molécula são ciclizadas e formam dois anéis β-ionona (Figura 3.1) (GOODWIN, 1980).



**Figura 3.1.** Estrutura química do β-caroteno (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2011).

A simetria estrutural do *all-trans*-β-caroteno é responsável pela sua propriedade mais importante, a atividade de pró-vitamina A, sendo o único carotenoide com potencial para produzir duas moléculas de retinal pela clivagem oxidativa da ligação central, catalisada pela enzima 15-15' β-caroteno monooxigenase. O *all-trans*-retinal, por sua vez, pode ser convertido de forma reversível a retinol (vitamina A) e irreversível a ácido retinóico (GRUNE et al., 2010). A vitamina A é um nutriente essencial para muitas funções no organismo humano, como crescimento, desenvolvimento e manutenção de tecidos epiteliais, reprodução, sistema imunológico e, em especial, no funcionamento do ciclo visual pela regeneração de fotorreceptores. Em vista disso, têm sido amplamente incentivado o consumo de alimentos e suplementos ricos em β-caroteno, uma vez que o homem não é capaz de sintetizar vitamina A (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006).

A presença de nove ligações duplas conjugadas na molécula do  $\beta$ -caroteno contribui para outras características relevantes: (I) pigmentação laranja, por atuar como cromóforo responsável pela absorção do comprimento de onda da luz visível, na faixa de 400-500 nm, tornando-o um corante bioativo relevante para a indústria; e (II) ação antioxidante, por atribuir a capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, como o radical peroxil e o oxigênio singlete, prevenindo inúmeros danos celulares e desempenhando a função de fotoprotetores. Entretanto, em altas pressões parciais de oxigênio ou elevadas concentrações de carotenoides, o  $\beta$ -caroteno pode apresentar atividade pró-oxidante (OSLO, 1999). A estrutura poliênica também confere instabilidade química, tornando o  $\beta$ -caroteno suscetível a oxidações e isomerizações geométricas por meio da incidência de luz, elevada temperatura ou acidez. A exposição a tais agentes resulta na formação de isômeros cis, epóxidos, perda da intensidade da cor, diminuição da atividade de pró-vitamina A e degradação da molécula (BRITTON, 1995).

### 3.2.1.2. Organismos Produtores e Biossíntese

O  $\beta$ -caroteno é naturalmente encontrado na cenoura, damasco, brócolis, manga, acerola, aspargos, couve chinesa, toranjas, pimenta em pó e páprica (GUL et al., 2015). Entretanto, outros vegetais têm sido apontados com de grande potencial para a servir de fonte de  $\beta$ -caroteno, tais como buriti, caruru, pajurá, piquiá e umari (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2011), como mostrado na Tabela 3.1.

A microalga *Dunaliella salina* também é uma fonte natural promissora de  $\beta$ -caroteno, na qual este carotenoide pode compreender até 10% de seu peso seco celular, em condições de estresse, como: elevada temperatura, salinidade e intensidade de luz, e privação de nutrientes (LAMERS et al., 2010; 2012). Dentre os fungos zigomicetos, especificamente os da ordem Mucorales, três espécies se destacam pela capacidade de produzir quantidades significativas de  $\beta$ -caroteno como pigmento majoritário: *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus* e *Mucor circinelloides*; e, portanto, estes têm sido utilizados como microrganismos modelo em estudos sobre a biossíntese de carotenos (ALCAÍNO; BAEZA; CIFUENTES, 2016). Em relação as leveduras e bactérias, já foram descritas algumas espécies carotenogênicas naturais, as quais tem atraído o interesse pela capacidade de utilizar diferentes resíduos agroindustriais como substrato (Tabela 3.1) (OTERO et al., 2019).

**Tabela 3.1.** Organismos produtores de β-caroteno encontrados na natureza e suas concentrações em mg.g<sup>-1</sup> de massa seca e mg.L<sup>-1</sup> de carotenoides totais.

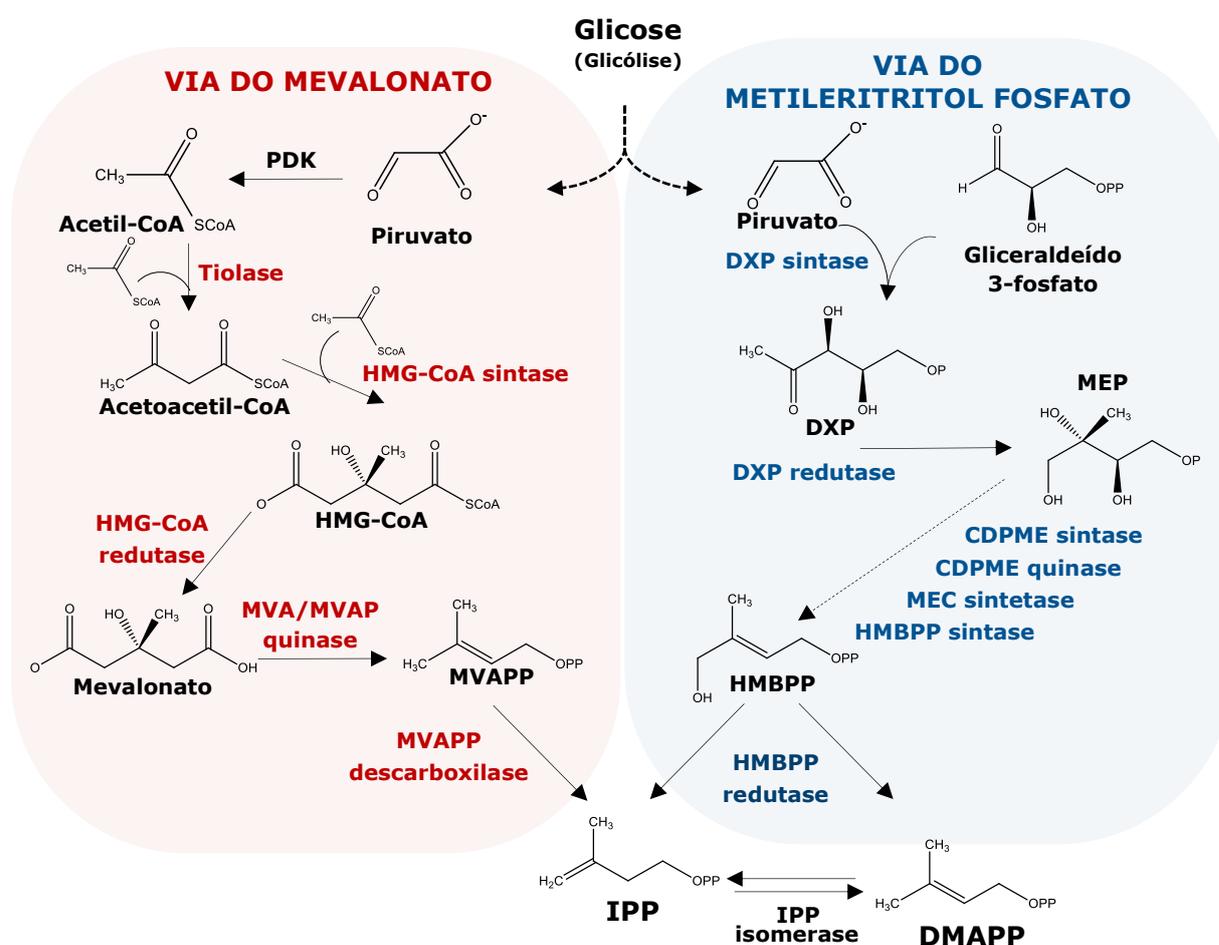
| Organismos Produtores                 | Carotenoides Totais   |                       | β-caroteno (%) |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
|                                       | (mg.g <sup>-1</sup> ) | (mg.L <sup>-1</sup> ) |                |
| <b>VEGETAIS</b>                       |                       |                       |                |
| Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )      | 0,08 - 0,17           | –                     | 49,0 - 65,0    |
| Acerola ( <i>Malpighia glabra</i> )   | 0,01 - 0,02           | –                     | 69,8 - 90,6    |
| Brócolis ( <i>Brassica oleracea</i> ) | 0,02                  | –                     | 29,4           |
| Damasco ( <i>Prunus armeniaca</i> )   | 0,06                  | –                     | 100,0          |
| Manga ( <i>Mangifera indica</i> )     | 0,01                  | –                     | 28,1           |
| Buriti ( <i>Mauritia vinifera</i> )   | 0,51                  | –                     | 72,5           |
| Caruru ( <i>Amaranthus viridis</i> )  | 0,10                  | –                     | 27,5           |
| Pajurá ( <i>Couepia bracteosa</i> )   | 0,02                  | –                     | 92,1           |
| Piquiá ( <i>Caryocar villosum</i> )   | 0,02                  | –                     | 85,4           |
| Umari ( <i>Poraqueiba sericea</i> )   | 0,10                  | –                     | 78,9           |
| <b>MICROALGAS</b>                     |                       |                       |                |
| <i>Dunaliella salina</i>              | 46,60                 | –                     | 80             |
| <i>Dunaliella bardawil</i>            | –                     | 69.000                | 75             |
| <b>FUNGOS FILAMENTOSOS</b>            |                       |                       |                |
| <i>Blakeslea trispora</i>             | 67,00                 | 828                   | 87,0           |
| <i>Phycomyces blakesleeanus</i>       | 32,80                 | –                     | 95,0           |
| <i>Mucor circinelloides</i> *         | 0,66 - 2,00           | –                     | 100            |
| <b>LEVEDURAS</b>                      |                       |                       |                |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>           | 0,90                  | 19,40                 | 81,0           |
| <i>Rhodotorula graminis</i>           | 0,80                  | 4,34                  | 50,0           |
| <i>Sporobolomyces roseus</i>          | 0,07                  | 0,24                  | 50,0           |
| <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>     | 0,91                  | 0,25                  | 32,0           |
| <b>BACTÉRIAS</b>                      |                       |                       |                |
| <i>Flavobacterium multivorum</i>      | 2,96                  | 9,49                  | 82,0           |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      | 5,10                  | 51                    | 89,0           |

Adaptada de RIBEIRO, BARRETO e COELHO (2011) e RODRIGUEZ-AMAYA (2001).

\* Referência: ZHANG et al. (2016).

A biossíntese do β-caroteno e dos demais carotenoides é um processo complexo, envolvendo uma série de genes e enzimas que diferem fortemente entre as espécies produtoras (SANZ et al., 2011). No geral, o primeiro passo envolve a síntese de isopreno, os precursores pirofosfato de isopentenilo (IPP - *isopentenyl pyrophosphate*) e seu isômero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP - *dimethylallyl pyrophosphate*), a partir de duas vias metabólicas independentes, de acordo com o organismo produtor e a localização subcelular do produto alvo: (I) a via do mevalonato (MVA - *mevalonate*) (MIZIORKO, 2011); e (II) a via do metileritritol fosfato (MEP - *methylerythritol phosphate*), também referida como 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) (EISENREICH et al., 2004).

A via do MVA envolve a condensação de duas moléculas de acetil-CoA em uma molécula de acetoacetil-CoA pela ação de uma acetil-CoA tiolase. Em seguida, o acetoacetil-CoA é convertido em mevalonato por meio do intermediário 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), através da HMG-CoA sintase e HMG-CoA redutase, com gasto de NADPH e ATP, respectivamente. O IPP é produzido a partir do mevalonato pela ação outras três enzimas, mevalonato quinase, fosomevalonato quinase e fosomevalonato descarboxilase (Figura 3.2) (ALCAÍNO; BAEZA; CIFUENTES, 2016).

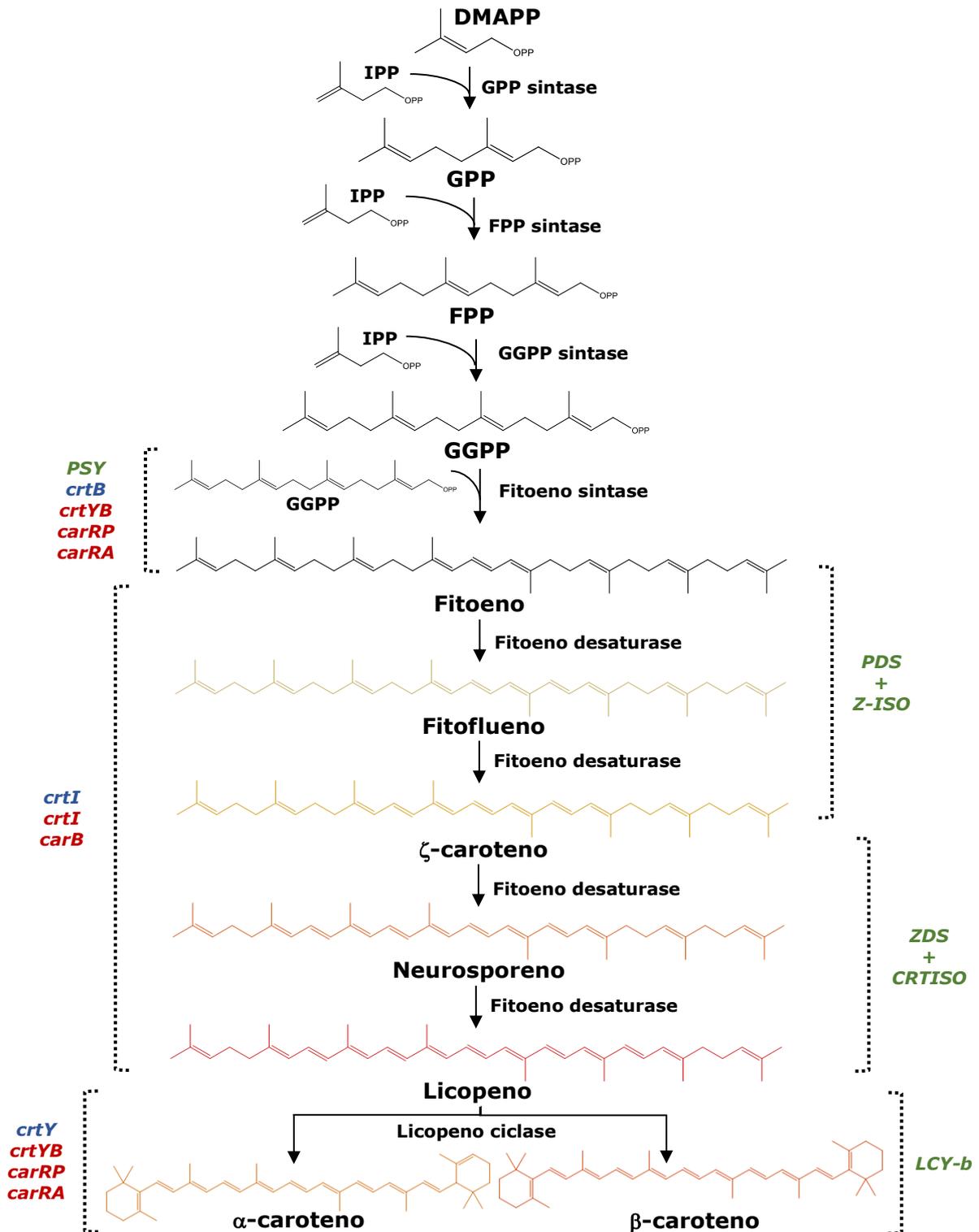


**Figura 3.2.** Biossíntese de isoprenos. Na via do MVA (mevalonato), duas moléculas de acetil-CoA são condensadas por uma tiolase para formar o acetoacetil-CoA, o qual é convertido em HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) pela HMG-CoA sintase, e subsequentemente em MVA pela HMG-CoA redutase. O MVA é transformado em MVAPP (difosfomevalonato) pela ação das enzimas MVA/MVAP (fosfomevalonato) quinase, e descarboxilado pela MVAPP descarboxilase para gerar o IPP (isopentenil pirofosfato). Na via do MEP (metileritritol fosfato), o piruvato é condensado ao gliceraldeído-3-fosfato pela DXP (1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato) sintase, para formar o DXP, que é reduzido em MEP pela DXP redutase. O MEP é convertido em HMBPP (a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato) pelas enzimas CDPME (4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol) sintase e quinase, MEC (2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato) sintetase e HMBPP sintase, o qual é reduzido em IPP e DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) pela HMBPP redutase. O DMAPP pode ser convertido em IPP através de uma reação reversível catalisada pela enzima IPP isomerase. PDK: complexo piruvato desidrogenase (Adaptado de VAYSSE et al., 2012).

A via do MEP inicia-se com a condensação do piruvato e gliceraldeído-3-fosfato, pela ação da DXP sintase, gerando DXP, que é subsequentemente reduzido em MEP pela DXP redutase. O MEP é convertido a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (HMBPP) pela ação das enzimas 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDPME) sintase, CDPME quinase, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEC) sintetase e HMBPP sintase. Finalmente, a HMBPP redutase catalisa a conversão do HMBPP em IPP e DMAPP, em uma proporção de 5-6: 1, e a IPP isomerase interconverte IPP e DMAPP para ajustar seus níveis, conforme os requisitos celulares. Assim, enquanto a via MEP gera DMAPP e IPP, a via MVA produz somente IPP, requerendo a atividade da IPP isomerase para gerar DMAPP (Figura 3.2). Com exceção das plantas, a maioria dos organismos tem apenas uma via para a síntese de IPP e DMAPP. As bactérias, incluindo cianobactérias, usam exclusivamente a via MEP, enquanto que os demais eucariotos possuem apenas a via MVA (ZHANG, 2018).

Os metabólitos IPP e DMAPP são condensados, formando o geranyl difosfato (GPP - *geranyl diphosphate*; C10) ou farnesil difosfato (FPP - *farnesyl diphosphate*; C15), pela ação das prenilttransferases GPP sintase ou FPP sintase, respectivamente. A GGPP sintase catalisa a adição de outro IPP em FPP, a fim de gerar o geranyl geranyl difosfato (GGPP - *geranyl geranyl diphosphate*; C20). Após, a fitoeno sintase catalisa a formação de uma molécula de fitoeno (C40), a partir de duas moléculas de GGPP. O fitoeno é um caroteno acíclico e incolor, com apenas três ligações duplas conjugadas, o qual sofre desidrogenação por diferentes fitoeno desidrogenases para gerar o fitotlueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno e licopeno, sequencialmente. Todos esses carotenos apresentam coloração, devido à presença de cinco ou mais ligações duplas conjugadas em suas cadeias lineares. O licopeno, por sua vez sofre ciclização por licopeno ciclastes em uma e/ou ambas extremidades, dando origem ao  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, respectivamente (Figura 3.3) (MAOKA, 2020).

No geral, a fitoeno sintase é codificada pelo gene *crtB* em bactérias e pelo gene *PSY* em plantas, algas e cianobactérias (SIEIRO et al., 2003), embora análises de suas sequências tenham sugerido que esses genes compartilham um ancestral comum (TAKAICHI, 2013). Por outro lado, uma enzima bifuncional foi descrita em leveduras e fungos filamentosos, a qual possui atividade de fitoeno sintase na região C-terminal e atividade licopeno ciclase na região N-terminal. Logo, esta enzima fúngica codificada pelos genes *crtYB*, *carRP* ou *carRA* foi denominada de fitoeno  $\beta$ -caroteno sintase (PBS - *phytoene  $\beta$ -carotene synthase*), ou simplesmente licopeno ciclase/ fitoeno sintase (Figura 3.3) (SANZ et al., 2011; ALCAÍNO; BAEZA; CIFUENTES, 2016).



**Figura 3.3.** Via biossintética de β-caroteno. A síntese de carotenoides em bactérias, fungos e plantas ocorre de forma bastante maneira similar, divergindo nos genes necessários em cada etapa. De maneira geral, o DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) é condensado ao IPP (isopentenil pirofosfato) para formar o GPP (geranyl difosfato), pela ação de uma GPP sintase. O GPP recebe mais uma ou duas moléculas de IPP, afim de gerar o FPP (farnesil difosfato) ou GGPP (geranyl geranyl difosfato), respectivamente. A condensação de duas moléculas de GGPP, catalisada pela enzima fitoeno sintase, leva a formação do fitoeno, o primeiro intermediário da via biossintética dos carotenoides. Em seguida, o fitoeno é convertido em fitoflueno, ζ-caroteno, neurosporeno e licopeno por fitoeno desaturases, e subsequentemente em α- e β-caroteno por licopeno ciclases. Os genes destacados em azul, vermelho e verde codificam tais enzimas em bactérias, fungos e plantas, respectivamente (Adaptado de MAOKA, 2020).

Nos organismos carotenogênicos, várias modificações na estrutura dos carotenos sintetizados podem ocorrer, como a desaturação, a ciclização, a oxidação e a glicosilação pela ação de diferentes enzimas, dando origem a outros carotenoides. Todas essas modificações contribuem para a diversidade destes compostos na natureza (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

### 3.2.1.3. *Vias de Obtenção e Aplicações Industriais*

A produção industrial de  $\beta$ -caroteno ocorre através da extração de fontes vegetais, síntese química ou biossíntese microbiana (MATA-GÓMEZ et al., 2014). O processo de extração é um método físico-químico, onde os carotenoides são recuperados de flores, frutos, sementes, raízes, tubérculos e partes verdes das plantas (DASGUPTA; KLEIN, 2014). O procedimento consiste em diferentes etapas: operações de purificação e trituração de material, prensagem de suco, coagulação de proteínas, sedimentação, centrifugação e extração com solvente orgânico, filtração, desodorização, evaporação e cristalização. Em alguns casos, a matéria-prima é submetida a fermentação, secagem ou fragmentação para aumentar a eficiência da extração dos carotenos (BOGACZ-RADOMSKA; HARASYM, 2018).

A fonte vegetal mais popular para obtenção do  $\beta$ -caroteno é a cenoura. Porém, a fim de se atingir poucos gramas deste caroteno, normalmente são necessários que várias dezenas de quilos de material vegetal sejam processados. Por exemplo, a partir de 50 kg de cenouras, apenas 2 g de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno são obtidos na forma cristalina. Portanto, as principais desvantagens da produção de  $\beta$ -caroteno por extração de fonte vegetal são o alto custo, os determinantes geográficos e a sazonalidade da matéria-prima. Ademais, os carotenoides naturais apresentam baixa resistência a fatores externos e composição variável, sendo difícil a obtenção de cores com tons padronizados. Tais inconvenientes podem ser evitados pela obtenção por síntese química (BOGACZ-RADOMSKA; HARASYM, 2018).

Os primeiros métodos para sintetizar o  $\beta$ -caroteno quimicamente foram desenvolvidos em 1954 e 1960 pelas empresas Roche (Suíça) e BASF (Alemanha), respectivamente (ISLER, 1971). Contudo, a sua importância econômica aumentou somente nas décadas seguintes, e foi observado um crescimento particularmente rápido neste segmento desde 1990 (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2011). No geral, a síntese química de  $\beta$ -caroteno baseia-se em reações de Wittig ou compostos de Grignard, a partir de acetona, butadieno, dialdeído e metanol (ÁLVAREZ et al., 2014). Embora o  $\beta$ -caroteno sintético tenha a mesma estrutura molecular do  $\beta$ -caroteno natural, este último contém vários outros carotenoides em baixas

concentrações, tornando os mais eficazes em termos de bioatividade, e, portanto, mais valiosos e desejáveis comercialmente (DUFOSSÉ et al., 2005). Além disso, a síntese química normalmente gera resíduos indesejáveis que são, em muitos casos, nocivos ao meio ambiente (MATA-GÓMEZ et al., 2014).

Uma alternativa promissora aos métodos pioneiros para a produção de β-caroteno são os processos biotecnológicos. A biossíntese microbiana de carotenoides em escala industrial tem sido extensivamente explorada desde 1980. Apesar de muitos microrganismos carotenogênicos serem conhecidos, somente as espécies *D. salina* e *B. trispora* são comercialmente aplicadas, devido aos elevados rendimentos de produção em condições aprimoradas (CARDOSO et al., 2017). Mesmo assim, a principal limitação do uso de sistemas microbianos na produção de β-caroteno é a baixa produtividade, o crescimento lento, composição complexa e o alto custo operacional, em comparação com a síntese química. Entretanto, diferentes estratégias para melhorar a rentabilidade da produção biotecnológica deste caroteno estão sob investigação, as quais incluem o melhoramento genético de espécies carotenogênicas, engenharia racional de linhagens não-carotenogênicas, otimização das condições dos bioprocessos e emprego de substratos residuais de baixo custo (VACHALI; BHOSALE; BERNSTEIN, 2012; MATA-GÓMEZ et al., 2014), conforme alguns exemplos apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Estratégias para produção biotecnológica de β-caroteno descritas na literatura a partir de diferentes microrganismos, com os rendimentos e produtividades dos bioprocessos.

| Espécies  | Estratégia Empregada   | β-caroteno            |                       | Q <sub>β-caroteno</sub> *<br>(mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | Referência                           |
|---|--|-----------------------|-----------------------|---|--------------------------------------|
|   |  | (mg.g <sup>-1</sup> ) | (mg.L <sup>-1</sup> ) |   |                                      |
|   | Otimização da produção pela adição de acetato de sódio ao meio de cultivo  | 59,91                 | 2130,00               | 14,79   | JING et al. (2016)                   |
| <i>Blakeslea trispora</i><br>ATCC 14271<br>ATCC 14272 | Uso da milhocina e do óleo de fritura como substrato de baixo custo  | 36,56                 | 695,80                | 4,83  | NANOU et al. (2017)                  |
|   | Controle da taxa de transferência oxigênio e uso da milhocina como substrato alternativo                             | -                     | 704,10                | 3,66  | MANTZOURIDO U; ROUKAS; ACHATZ (2005) |
| <i>Blakeslea trispora</i><br>MTCC 884                 | Uso de casca de laranja, cenoura e mamão como substrato e otimização das condições de cultivo, como pH e temperatura | -                     | 127,00                | 1,32  | KAUR; GHOSHAL; JAIN (2019)           |

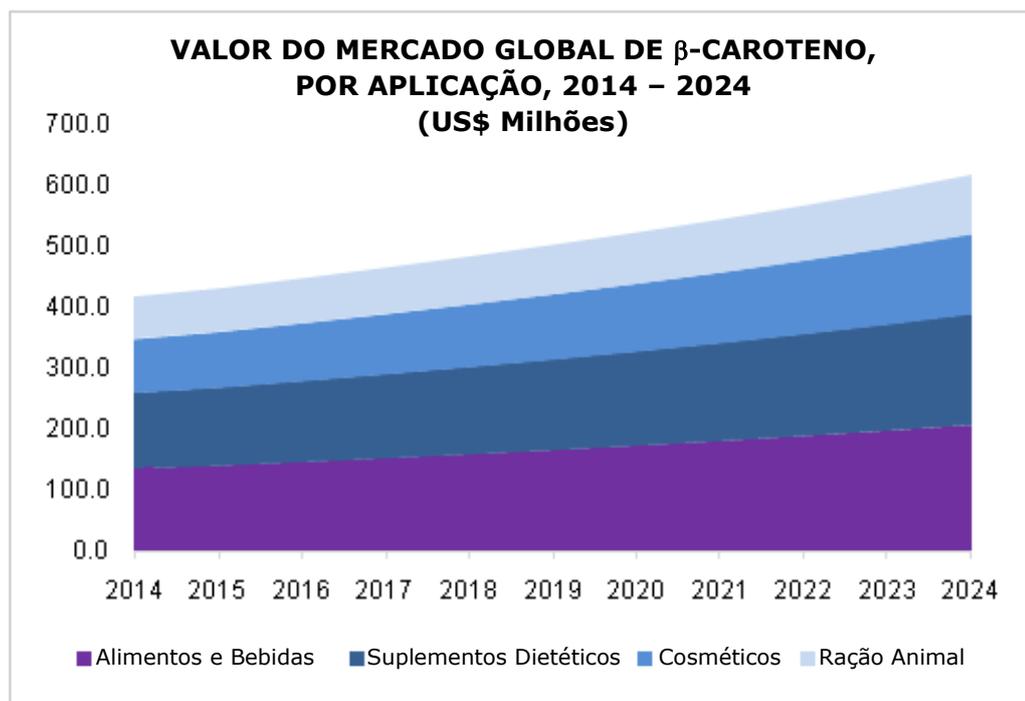
| Continuação                                 |   |       |         |      |                                  |
|---|---|-------|---------|------|----------------------------------|
| <i>Dunaliella salina</i> H001               | Otimização da produção através da salinidade do meio de cultivo   | -     | 2312,00 | 9,63 | HERMAWAN et al. (2018)           |
| <i>Dunaliella salina</i> UTEX LB #200       | Evolução adaptativa por exposição à diodos emissores de luz   | 9,50  | -       | -    | WICHUK; BRYNJÓLFSSON ; FU (2014) |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739           | Clonagem do <i>crt</i> operon de <i>Pantoea agglomerans</i> e engenharia da via MEP, TCA e PP para maior fornecimento de IPP e DMAPP e dos co-fatores ATP e NADPH | 59,88 | 2100,00 | 210  | ZHAO et al. (2013)               |
|   | Engenharia da morfologia da membrana através da superexpressão de genes que codificam proteínas que influenciam na dobra  | 44,20 | 268,10  | 5,58 | WU et al. (2017)                 |
| <i>Rhodotorula acheniorum</i> MRN           | Mutagênese através da exposição à radiação UV e otimização do meio de produção contendo soro do leite ultrafiltrado como substrato                                | 10,69 | 262,12  | -    | NASRABADI; RAZAVI (2011)         |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> CCY 20-2-26     | Uso do soro de leite processado como substrato  | 1,48  | 51,22   | 0,64 | MAROVA et al. (2012)             |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> KU550702        | Uso de extrato ácido resíduos da cebola como substrato de baixo custo   | -     | 204,29  | 2,83 | BAGY et al. (2016)               |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CCY 20-7-31 | Uso do soro de leite processado como substrato  | 0,38  | 11,33   | 0,14 | MAROVA et al. (2012)             |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SR8         | Clonagem dos genes <i>crtYB</i> , <i>crtE</i> , e <i>crtI</i> da espécie <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> e emprego de xilose como substrato                  | 11,40 | 772,80  | 5,40 | SUN et al. (2020)                |
| <i>Sporobolomyces roseus</i> CCY 19-4-8     | Uso do soro de leite processado como substrato  | 2,89  | 29,40   | 0,36 | MAROVA et al. (2012)             |

\* Q<sub>β-caroteno</sub> calculado a partir das informações fornecidas pelos autores.

As múltiplas funções biológicas do  $\beta$ -caroteno o torna valioso para aplicações nas indústrias de alimentos, nutracêuticos, cosméticos e ração animal (BOGACZ-RADOMSKA; HARASYM, 2018). Em 1979, foi concedido ao  $\beta$ -caroteno sintético e natural o *status* de segurança GRAS pela FDA, para atuação como corante e suplemento nutricional em produtos destinados aos animais e humanos (USDA, 2011). No entanto, os carotenos de fontes sintéticas podem causar efeitos perigosos em altas doses, conforme subsequentemente alertado pela mesma agência regulamentadora (KLÄUI; BAUERNFEIND, 1981). Tais descobertas aliadas ao aumento da preocupação com a promoção da saúde pela população em geral e a popularidade crescente dos produtos de origem naturais, estão levando ao declínio da participação do  $\beta$ -caroteno obtido através da síntese química no comércio mundial, segundo as projeções atuais (GRAND VIEW REPORT, 2020).

O setor de alimentos e bebidas representam a aplicação industrial mais dominante no mercado global de  $\beta$ -caroteno, projetada a ultrapassar US\$ 100 milhões em 2024 (Figura 3.4) (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Este carotenoide de fonte natural é comumente utilizado em tais segmentos em concentrações entre 2-50 ppm, como alternativas aos corantes sintéticos, a fim de: conferir cor, preservar, realçar ou uniformizar a coloração de frutas, vegetais, laticínios, peixes, carnes processadas e bebidas não-alcoólicas, para torna estes produtos mais atraentes para o consumidor; e enriquecer o seu valor nutricional, devido à atividade de pró-vitamina A e ação antioxidante (BRITTON, 1995). A hipovitaminose A ainda é um dos principais problemas nutricionais nos países subdesenvolvidos, apresentando como consequências frequentes a xerofthalmia e a cegueira, principalmente em crianças, bem como a morte prematura (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2011).

No setor de nutracêuticos e cosméticos, há uma crescente demanda para o emprego do  $\beta$ -caroteno e outros carotenoides como suplementos e aditivos bioativos, respectivamente. Uma vez que o estresse oxidativo e o desequilíbrio redox celular foram identificados como os principais responsáveis pelo desenvolvimento de uma ampla gama de doenças (CHO et al., 2018), o uso dos carotenoides com suas propriedades antioxidantes tem sido estimulado, para prevenir ou retardar enfermidades crônicas, danos celulares e envelhecimento (GRIFFITHS et al., 2016). Especificamente, o  $\beta$ -caroteno é apontado como potencial agente para reduzir o risco de câncer, arterosclerose, doenças cardiovasculares e oculares, incluindo carata e degeneração macular relacionada à idade (GUL et al., 2015). Ademais, o  $\beta$ -caroteno é utilizado como fotoprotetor contra a radiação UV para prevenir o fotoenvelhecimento, em protetores solares orais e tópicos (STAHL; SIES, 2012).



**Figura 3.4.** Valor de mercado global de β-caroteno por aplicação no período de 2014 – 2024, em milhões de dólares (Adaptado de GRAND VIEW REPORT, 2020).

Embora o setor de ração animal seja o menos expressivo no mercado global de β-caroteno, acredita-se que este segmento mostre um crescimento notável nos próximos anos (Figura 3.4) (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Há um incentivo para o mercado nacional de carotenoides como aditivos em ração para animais aquáticos, visto que a *Food and Agriculture Organization of United Nations* estima que o Brasil deve registrar um crescimento de 104% na pesca e aquicultura até 2025 (FAO, 2018). Além de melhorar as características nutricionais para o consumo humano, o β-caroteno contribui para a imunidade das espécies aquáticas e aumenta da sobrevivência dos ovos e estágios iniciais das larvas dos peixes, favorecendo assim, a sua reprodução e sobrevivência (TORRISEN; CHRISTIANSEN, 1995; DE CARVALHO; CARAMUJO, 2017).

Atualmente, o comércio mundial de β-caroteno obtido a partir de fontes naturais é dominado pelas empresas *BASF* (Alemanha) e *Royal DSM* (Holanda), como fornecedores. Entretanto, a *Abbott Laboratories* (EUA), *LycoRed* (Suíça) e *PAN Quian* (Hong Kong) aparecem como os principais fabricantes de produtos inovadores (BOGACZ-RADOMSKA; HARASYM; PIWOWAR, 2020). Diversos produtos contendo β-caroteno natural já estão disponíveis no mercado, conforme alguns exemplos mostrados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Produtos disponíveis no mercado contendo β-caroteno de fonte natural em sua composição.

| Nome do Produto                | Fornecedores/ Fabricante               | Aplicação/Uso               | Referência*   |
|--------------------------------|--|-----------------------------|---------------|
| <i>Betatene</i> <sup>®</sup>   | <i>BASF</i>                            | Suplemento alimentar        | BASF, 2020    |
| <i>CaroCare</i> <sup>®</sup>   | <i>Royal DSM</i>                       | Suplemento alimentar        | DSM, 2020     |
| <i>Betanat</i> <sup>®</sup>    | <i>Royal DSM</i>                       | Corante e Aditivo alimentar | DSM, 2020     |
| <i>BetaBeads</i> <sup>®</sup>  | <i>LycoRed</i>                         | Corante e Aditivo alimentar | LYCORED, 2020 |
| <i>Lyc-O-Beta</i> <sup>®</sup> | <i>LycoRed</i>                         | Suplemento alimentar        | LYCORED, 2020 |
| <i>Pivot</i> <sup>®</sup>      | <i>Abbott Laboratories</i>             | Suplemento alimentar        | ABBOTT, 2020  |
| <i>Ensure</i> <sup>®</sup>     | <i>Abbott Laboratories</i>             | Suplemento alimentar        | ABBOTT, 2020  |
| <i>Eclae</i>                   | <i>Eclae</i><br>(Grupo <i>Salins</i> ) | Cosméticos tópicos          | ECLAE, 2020   |

\* As informações foram retiradas do site dos fornecedores/produtores.

### 3.2.2. PRODUÇÃO DE BETA-CAROTENO POR *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Y. lipolytica* está emergindo como uma robusta plataforma biotecnológica para a produção de carotenoides, a fim de fornecer uma alternativa sustentável aos processos convencionais (MA et al., 2019). Isso se deve graças a suas características particulares, envolvendo: altos fluxos nativos de acetil-CoA como substrato inicial da via do MVA para a síntese dos precursores GPP, FPP e GGPP (ZHANG, 2018); acúmulo de elevadas concentrações de lipídios para o armazenamento intracelular de tais compostos terpenoides lipofílicos (LARROUDE et al., 2018a); vasto repertório de ferramentas de biologia sintética para a engenharia de vias metabólicas (SCHWARTZ et al., 2017); assim como eficientes mecanismos para degradação de uma ampla variedade de resíduos industriais (DO; THERON; FICKERS, 2019).

Os estudos pioneiros empregando *Y. lipolytica* recombinante para a síntese de β-caroteno e demais carotenoides datam a última década (MILLER; ALPER, 2019), e aqueles de maiores relevância foram listados na Tabela 3.4.

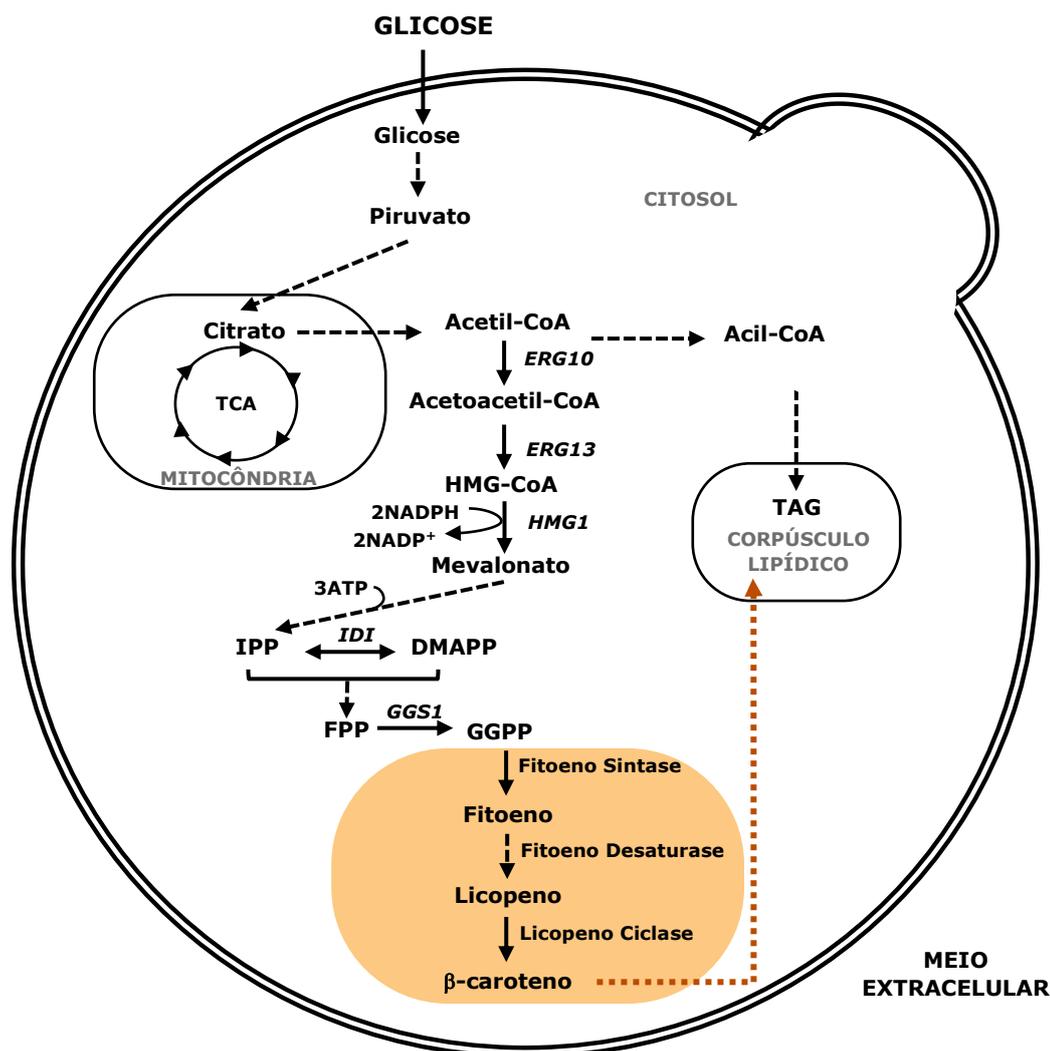
**Tabela 3.4.** Estudos pioneiros e suas principais estratégias gênicas para o desenvolvimento de diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica* produtoras de β-caroteno e licopeno, bem como condições de fermentação empregadas e rendimento final de produto.

| <b>Linhagem Parental</b> | <b>Estratégia Gênica*</b>   | <b>Caroteno (mg.g<sup>-1</sup>)</b> | <b>Condições de Cultivo</b>  | <b>Referência</b>          |
|--------------------------|---|-------------------------------------|--|----------------------------|
| H222                     | <i>crtB, crtI, GGS1, HMGI, ΔPOXI-6, ΔGUT2</i>                                   | Licopeno<br>16,0                    | Batelada alimentada (192 h);<br>meio YPD (glicose 5%);<br>pH 3,5                                   | Matthäus<br>et al. (2014)  |
| W29<br>(Po1f)            | <i>Δku70, carB, carRP(4),<br/>GGS1, tHMGI(3), ERG10(2)</i>                      | β-caroteno<br>49,0                  | Batelada alimentada (264 h);<br>meio YPD (glicose 3%,<br>peptona 1%, extrato de<br>levedura 0,5%); | Gao et al.<br>(2017)       |
| W29<br>(Po1d)            | <i>DGA2, GPD1, ΔPOXI-6,<br/>ΔTGL4, carB(3), carRP(3),<br/>GGS1(3), tHMGI(1)</i> | β-caroteno<br>89,6                  | Batelada alimentada (122 h);<br>meio YPD (glicose 0,5%,<br>peptona 4%, extrato de<br>levedura 5%); | Larroude<br>et al. (2018a) |

\* Os genes utilizados nas estratégias codificam para as enzimas: *crtB* - fitoeno sintase; *crtI* e *carB* - fitoeno desidrogenase; *carRP* - fitoeno sintase/licopeno ciclase; *GGS1* - geranylgeranyl difosfato sintase; (*t*)*HMG* - HMG-CoA redutase; *ERG10* - acetoacetil-CoA tiolase; *DGA2* - aciltransferase; *GPD1* - glicerol-3-fosfato desidrogenase; *TGL4* - lipase intracelular; *POXI-6* - acil-CoA oxidases 1-6; *GUT2* - glicerol quinase; *ku70* - helicase dependente de ATP. Os números em parênteses indicam o número de cópias inseridos no genoma da cepa recombinante e o Δ indica genes deletados.

De maneira geral, a síntese de β-caroteno e dos demais carotenoides pela levedura *Y. lipolytica* requer somente a clonagem de três enzimas heterólogas, a fitoeno sintase, fitoeno desidrogenase e licopeno ciclase, pelo fato desta espécie apresentar endogenamente todas as enzimas necessárias para a formação do GGPP, provindo da via do MVA. Por isso, as estratégias para otimizar a produção destes terpenos não-nativos buscam melhorar o aporte dos substratos da via do MVA por desviar acetil-CoA citosólico para a síntese de IPP e DMAPP, e aumentar os níveis de condensação destes para obter maiores rendimentos e produtividades (Figuras 3.5). (MA et al., 2019).

Tendo em vista que a síntese do MVA é irreversível, a HMG-CoA redutase é considerada a primeira enzima limitante, sendo um importante ponto regulador para o metabolismo dos carotenoides (POLAKOWSKI; STAHL; LANG, 1998). Outras formas de aprimorar a produção baseiam-se em elevar a disponibilidade dos precursores terpenoides endógenos, como o GGPP, e os exógenos, como fitoeno e licopeno (GAO et al., 2017; LARROUDE et al., 2018a; QIANG et al., 2020; ZHANG et al., 2020).



**Figura 3.5.** Biossíntese de  $\beta$ -caroteno por *Yarrowia lipolytica*. O acetil-CoA sintetizado é convertido em acetoacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA tiolase, a qual é codificada pelo gene *ERG10*, e subsequentemente em HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA) pela enzima HMG-CoA sintase, que é codificada pelo gene *ERG13*. Então, o HMG-CoA é reduzido a MVA (mevalonato) pela enzima HMG-CoA redutase, codificada pelo gene *HMG1*, com gasto de duas moléculas de NADPH. O MVA é fosforilado e descarboxilado para formar o IPP (isopentenil pirofosfato), o qual é isomerizado em DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo) pela ação da enzima sintetizada pelo gene *IDI*. A condensação de duas moléculas de IPP ao DMAPP leva a formação do FPP (farnesil difosfato), o qual recebe mais um IPP para gerar GGPP (geranil geranil difosfato), em reação catalisada pela enzima GGPP sintase, que é codificada pelo gene *GGS1*. Para ser capaz de sintetizar o  $\beta$ -caroteno, a levedura *Y. lipolytica* requer a clonagem de genes heterólogos que codificam enzimas com atividades de fitoeno sintase, fitoeno desaturase e licopeno ciclase (em destaque). Os carotenos gerados são preferencialmente estocados nos corpúsculos lipídios. TCA: ciclo do ácido tricarboxílico. TAG: triacilglicerol (Adaptado de Zhang et al., 2020).

O licopeno é um importante intermediário na via sintética dos carotenoides, com propriedades antioxidantes de grande valor agregado. Matthäus et al. (2014) expressaram genes *crtB* e *crtI* da bactéria *Pantoea ananatis*, sob o controle do promotor constitutivo pTEF, em *Y. lipolytica* H222 nocauteada dos genes *POX1-POX6* e *GUT2* para aumentar a

capacidade de armazenamento de lipídios e licopeno nos corpúsculos. Os transformantes produziram 142  $\mu\text{g}$  de licopeno por g de biomassa seca, após 96 h em cultivo. A superexpressão adicional de *GGS1* e *HMG* levou a um aumento de 10,8 vezes do teor de licopeno, para 1,54  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Em condições de limitação do crescimento, esta cepa recombinante obteve um rendimento final de 16  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Gao et al. (2017) clonaram os genes *carRP* e *carB* do fungo *M. circinelloides* e superexpressaram os genes nativos *GGS1*, *tHMG*, *ERG10* sob a expressão de diferentes promotores constitutivos e com diferentes números de cópias em *Y. lipolytica* Po1f. Enquanto que a cepa inicial, a qual continha apenas os genes exógenos, obteve um rendimento de 0,30  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , a engenharia da via do MVA mostrou que *Y. lipolytica* pôde superar a limitação de tamanho de sua membrana celular para a produção de terpenoides hidrofóbicos por meio do alto fluxo intrínseco de acetil-CoA, redirecionando-o com sucesso para a síntese de  $\beta$ -caroteno. Em condições de limitação de nitrogênio a cepa engenheirada alcançou uma concentração de 4  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno, com rendimento máximo de 33  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  em 264 h.

Larroude et al. (2018a) também desenvolveram uma cepa de *Y. lipolytica* superprodutora de  $\beta$ -caroteno, mas a partir de uma estratégia diferenciada. Os autores empregaram a cepa recombinante JMY3501, conhecida por acumular mais de 40% de sua biomassa seca em lipídios, para a expressão dos genes *carB* e *carRP* de *M. circinelloides*, bem como o *GGS1* e *tHMG*, sob diferentes promotores constitutivos, com o interesse de rastrear a melhor combinação para cada dos genes estudados. A lipogênese intensificada levou a um aumento no fluxo metabólico em direção à via do MVA, e a cepa resultante inicial obteve um rendimento inicial de 17,40  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  em 96 h. Entre os promotores testados, o pTEF mostrou ter maior influência na síntese de  $\beta$ -caroteno. E, em condições otimizadas, a cepa desenvolvida alcançou uma produção máxima de 6,50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  desse caroteno, com rendimento de 89,60  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , durante fermentações em biorreatores de bancada.

Grenfell-lee et al. (2014) demonstraram em modelos de genotoxicidade que o perfil de segurança do  $\beta$ -caroteno produzido por *Y. lipolytica* é o mesmo de outros produtos comerciais, o que facilitaria sua comercialização. Portanto, essa levedura oleaginosa representa um promissor *chassi* biotecnológico para a produção de  $\beta$ -caroteno. Inclusive, empresas como *DuPont* (EUA) e *Microbia* (EUA) patentearam o uso de cepas de *Y. lipolytica* carotenogênicas (SHARPE; YE; ZU, 2014; BAILEY; MADDEN; TRUEHEART, 2012).

Embora com resultados industrialmente relevantes, as linhagens superprodutoras podem ser instáveis para aplicações industriais. Isso porque, estas cepas recombinantes

apresentam muitas cópias de diferentes genes homólogos e/ou heterólogos que são constitutivamente expressos, na maioria dos casos. Em geral, a natureza inerentemente estocástica da maquinaria celular frequentemente leva a erros durante a replicação, e o efeito combinado do estresse celular de fermentações por longas gerações pode produzir instabilidade genética. Particularmente, genes altamente transcritos tendem a acumular mutações em taxas mais altas, e o acúmulo dessas mutações pode diminuir a produtividade (WORLAND et al., 2020a).

Além disso, considerando a variabilidade metabólica entre as linhagens de *Y. lipolytica* isoladas de fontes diversificadas (EGERMEIER et al., 2017), a investigação dos diferentes *backgrounds* genéticos para a biossíntese de  $\beta$ -caroteno foi realizada por poucos estudos (BRUDER et al., 2020; DE SOUZA et al., 2020), assim como o emprego de substratos de baixo custo para o desenvolvimento de bioprocessos competitivos (JACOBSEN; LEDESMA-AMARO; MARTINEZ, 2020; WORLAND et al., 2020b).

### 3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

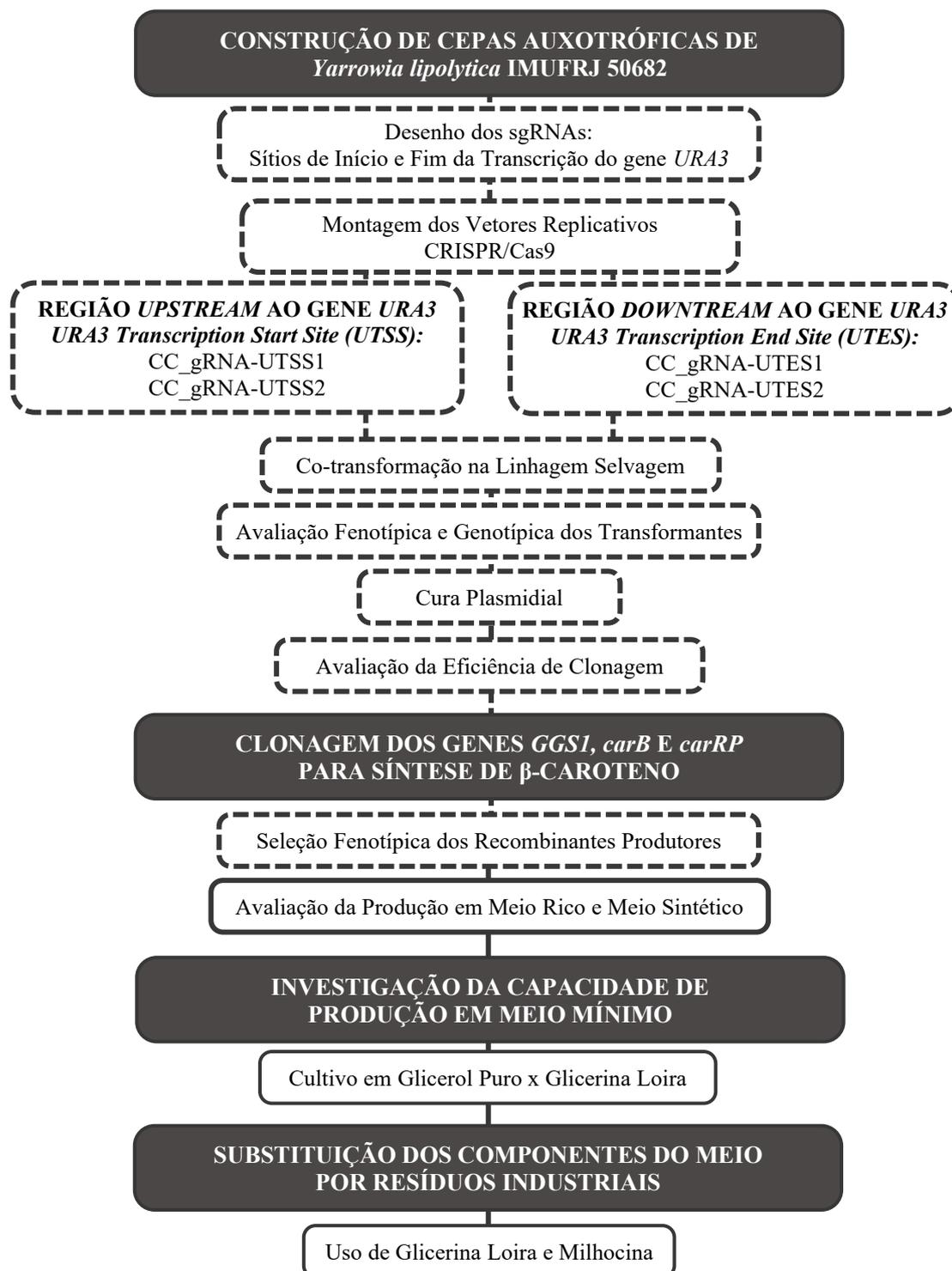
Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- Construir cepas auxotróficas a partir da linhagem selvagem brasileira IMUFRJ 50682 pela deleção do gene *URA3*, através de uma estratégia combinatória de clivagem dupla baseada no sistema CRISPR/Cas9;
- Avaliar a eficiência de clonagem dos mutantes auxotróficos IMUFRJ 50682 desenvolvidos utilizando o gene repórter *RedStarII*;
- Clonar os genes *GGS1*, *carB* e *carRP* nas cepas auxotróficas *ura3 $\Delta$*  e analisar a produção de  $\beta$ -caroteno pelos recombinantes produtores na presença de glicose e glicerol puro como substrato;
- Investigar a capacidade de síntese de  $\beta$ -caroteno pelas cepas recombinantes produtoras, utilizando glicerina loira como única fonte de carbono em diferentes razões C/N;
- Substituir os componentes do meio de cultivo por milhocina e avaliar o impacto deste subproduto na produção de carotenoides totais pelos recombinantes produtores.

### 3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.4.1. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A estratégia experimental empregada na elaboração desta etapa do estudo foi esquematizada no organograma presente na Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Representação esquemática dos experimentos realizados para a biossíntese de carotenoides por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 recombinante. A linha pontilhada destaca as etapas desenvolvidas no INRAE (Jouy-en-Josas, França), sob orientação do Prof. Jean-Marc Nicaud.

## 3.4.2. MICRORGANISMOS, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os microrganismos empregados neste trabalho foram:

- *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981) – linhagem selvagem (WT - *Wild-Type*) usada no desenvolvimento de cepas auxotróficas pela deleção do gene *URA3* e clonagem dos genes de interesse.
- *Escherichia coli* DH5α (*Invitrogen*) – cepa usada para manipulação dos vetores, conforme descrito no item 2.4.2.

Os plasmídeos e os oligonucleotídeos utilizados foram listados na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Lista dos plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados no estudo sobre a síntese de carotenoides por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 recombinante.

| PLASMÍDEOS                          |  |   |
|-------------------------------------|--|---|
| Nome <sup>a</sup>                   | Aplicação / Descrição  | Fonte                                   |
| GGA_NATex_CrisprCas9-y1_RFP (E4470) | Vetor replicativo para expressão da nuclease Cas9 e sgRNAs para a região promotora do gene <i>URA3</i> , sob o controle dos promotores p8UASTEf e pSCR1'-tRNA, respectivamente. Marca de seleção <i>AmpR</i> (bactéria) e <i>NatR</i> (levedura), e o cromóforo RFP para identificação visual dos clones bacterianos positivos.                      | INRAE<br>Larroude et al. (2020)         |
| GGA_HPHex_CrisprCas9-y1_RFP (E4599) | Vetor replicativo para expressão da nuclease Cas9 e sgRNAs para a região terminadora do gene <i>URA3</i> , sob o controle dos promotores p8UASTEf e pSCR1'-tRNA, respectivamente. Marca de seleção <i>AmpR</i> (bactéria) e <i>HygR</i> (levedura), e o cromóforo RFP para identificação visual dos clones bacterianos positivos.                    | INRAE<br>Larroude et al. (2020)         |
| GGVA_RedStarII (GGE0218)            | Vetor integrativo contendo o gene repórter <i>RedStarII</i> para expressão em <i>Y. lipolytica</i> . Marca de seleção <i>AmpR</i> (bactéria) e <i>URA3</i> (levedura), sítios de inserção zeta, restrição <i>NotI</i> .  | INRAE<br>Park et al. (2019)             |
| GGVA_Carotenoid (GGA0012)           | Vetor integrativo contendo o gene <i>GGS1</i> nativo, e os genes <i>carB</i> e <i>carRP</i> de <i>Mucor circinelloides</i> , todos sob o controle do promotor pTEF e o terminador tLip2, para expressão em <i>Y. lipolytica</i> . Marca de seleção <i>AmpR</i> (bactéria) e <i>URA3</i> (levedura), sítios de inserção zeta, restrição <i>SfiI</i> . | INRAE<br>Celińska et al. (2017)         |
| OLIGONUCLEOTÍDEOS                   |  |   |
| Oligonucleotídeos                   | Sequência (5'→3') <sup>b</sup>   | Uso                                     |
| Fw-sgRNA-UTSS1                      | <u>TTCGATTCCGGGTCGGCGCAGGTTGG</u><br>ATACTTCACTGCCCCAGATAGTTTAA  | Clonagem do sgRNA 1 direcionado ao UTSS |
| Rv-sgRNA-UTSS1                      | <u>GCTCTAAAACTATCTGGGGCAGTGAAGTAT</u><br>CCAACCTGCGCCGACCCGGAAT  |   |

| Continuação    |  |   |
|----------------|--|---|
| Fw-sgRNA-UTSS2 | <u>TTCGATTCCGGGTCGGCGCAGGTTGG</u><br><b>ATAGCCGTATAGTCCAGTCTGTTTTA</b> | Clonagem do sgRNA 2<br>direcionado ao UTSS  |
| Rv-sgRNA-UTSS2 | <u>GCTCTAAAACAGACTGGACTATACGGCTAT</u><br><i>CCAACCTGCGCCGACCCGGAAT</i> |   |
| Fw-sgRNA-UTES1 | <u>TTCGATTCCGGGTCGGCGCAGGTTGG</u><br><b>ATATAGAGAGCGTGCAAGTAGTTTTA</b> | Clonagem do sgRNA 1<br>direcionado ao UTES  |
| Rv-sgRNA-UTES1 | <u>GCTCTAAAACAGACTGGACTATACGGCTAT</u><br><i>CCAACCTGCGCCGACCCGGAAT</i> |   |
| Fw-sgRNA-UTES2 | <u>TTCGATTCCGGGTCGGCGCAGGTTGG</u><br><b>ATGGGGCATGTTGTTGTGTTGTTTTA</b> | Clonagem do sgRNA 2<br>direcionado ao UTES  |
| Rv-sgRNA-UTES2 | <u>GCTCTAAAACAACAACAACATGCCCATC</u><br><i>CAACCTGCGCCGACCCGGAAT</i>    |   |
| Fw-UTSS        | GAGCCATTGACGTTCTTTCTAATTTGG  | Verificação da excisão<br>do gene <i>URA3</i><br>T <sub>m</sub> (°C): 60,2 - 57,1<br>Amplicon: 1.221 pb |
| Rv-UTES        | CTGTACCCAGCATCTCCGTATCG  |   |

<sup>a</sup>A nomenclatura em parênteses dos plasmídeos refere-se ao número de depósito no laboratório BIMLip.

<sup>b</sup>As letras em negrito representam as sequências dos sgRNAs, de 20 nucleotídeos. As saliências de 4 nucleotídeos para a montagem dos vetores por *Golden Gate Assembly* estão sublinhadas e a região do tRNA está em itálico.

O estoque das culturas foi realizado em solução de glicerol 20% (m/v) a -80 °C até a realização dos ensaios.

### 3.4.3. MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES

Os meios de cultivo utilizados neste estudo foram o LB, o YPD e o YNB, conforme composição descrita no item 2.4.3. O meio YPD foi suplementado com 500 µg.mL<sup>-1</sup> de nourseotricina (YPD-Nat) (*Werner BioAgents*), 300 µg.mL<sup>-1</sup> de higromicina B (YPD-Hig) (*Corning*) ou ambos os antibióticos (YPD-Nat-Hig) para seleção de co-transformantes e cepas curadas. O meio YNB foi acrescido de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de uracila (YNB-Ura) (*Sigma-Aldrich*) para o crescimento dos mutantes auxotróficos *URA3*<sup>-</sup>. Alternativamente, a glicose do meio YPD foi substituída por glicerol puro (2%; m/v), no meio YPG.

A produção de β-caroteno pelas cepas recombinantes foi avaliada em diferentes meios contendo glicerol ou glicerina como substrato, como disposto na Tabela 3.6. O glicerol puro foi adquirido pela empresa *Labsynth* e a glicerina loira foi gentilmente fornecida pelo CENPES, Petrobras. Esta foi proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel através da reação de transesterificação do óleo de soja com o metanol, via catálise básica por KOH, contendo aproximadamente 83% de pureza, segundo as informações dos fornecedores.

**Tabela 3.6.** Meios empregados no estudo sobre a avaliação da produção de carotenoides por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 geneticamente modificada.

| COMPONENTES<br>(g.L <sup>-1</sup> )                  | MEIOS <sup>a</sup> |       |       |        |       |       |       |
|--|--------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
|  | MGP55              | MGL35 | MGL55 | MGL85  | MM10  | MM20  | MM30  |
| Glicerol Puro  | 55,00              | -     | -     | -      | -     | -     | -     |
| Glicerina Loira                                      | -                  | 42,17 | 66,27 | 102,41 | 42,17 | 42,17 | 42,17 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 3,06               | 3,06  | 3,06  | 3,06   | -     | -     | -     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,00               | 1,00  | 1,00  | 1,00   | -     | -     | -     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 0,16               | 0,16  | 0,16  | 0,16   | -     | -     | -     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 0,70               | 0,70  | 0,70  | 0,70   | -     | -     | -     |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O | 0,40               | 0,40  | 0,40  | 0,40   | -     | -     | -     |
| NaCl   | 0,50               | 0,50  | 0,50  | 0,50   | -     | -     | -     |
| Milhocina  | -                  | -     | -     | -      | 10    | 20    | 30    |
| Razão C/N <sup>b</sup>                               | 35                 | 23    | 37    | 57     | 55    | 30    | 22    |

Adaptado de KOVALCHUK (2005).

<sup>a</sup>A nomenclatura dos meios foi baseada na concentração inicial de glicerol dos meios.

<sup>b</sup>A razão C/N foi calculada em molC.molN<sup>-1</sup>.

As características da glicerina loira foram definidas por análises no *TOC-L Total Organic Carbon Analyzer (Shimadzu)* e no *930 Compact IC Flex (Metrohm)*, cordialmente realizadas no Laboratório de Tratamento de Águas e Reuso de Efluentes da EQ/ UFRJ, e estão detalhadas na Tabela 3.7. As propriedades e composição da milhocina foram determinadas pelo Laboratório Agrônomo S/C Ltda e estão descritas na Tabela 3.8. O pH dos meios de produção foi ajustado para 6,75 com NaOH 10M (*Vetec*).

**Tabela 3.7.** Composição da glicerina loira empregada com substrato alternativo nos meios de produção.

| COMPOSTOS              | CONCENTRAÇÕES*           |
|------------------------|--------------------------|
| Carbono Total          | 342,8 mg.L <sup>-1</sup> |
| Carbono Orgânico Total | 342,2 mg.L <sup>-1</sup> |
| Cloreto                | 33,273 ppm               |
| Nitrato                | 0,194 ppm                |
| Fosfato                | 0,362 ppm                |
| Sulfato                | 0,364 ppm                |
| Sódio                  | 20,315 ppm               |
| Cálcio                 | 0,224 ppm                |

\*Os valores são referentes à solução de 1 g.L<sup>-1</sup> de glicerina loira.

**Tabela 3.8.** Especificação da milhocina utilizada nos meios de produção, de acordo com análise realizada pelo Laboratório Agrônomo S/C Ltda.

| PROPRIEDADES           |                          | COMPOSIÇÃO |                            |             |                             |
|------------------------|--------------------------|------------|----------------------------|-------------|-----------------------------|
|                        |                          | Minerais   |                            | Vitaminas   |                             |
| Carbono                |                          | Nitrogênio | 3,41%                      | Biotina     | 0,30 mg.kg <sup>-1</sup>    |
| Orgânico               | 16,72%                   | Fósforo    | 1,12%                      | Cholina     | 3500,00 mg.kg <sup>-1</sup> |
| Total                  |                          | Potássio   | 2,90%                      | Inositol    | 6000,00 mg.kg <sup>-1</sup> |
| Condutividade Elétrica | 1,52 mS.cm <sup>-1</sup> | Cálcio     | 2,00%                      | Niacina     | 80,00 mg.kg <sup>-1</sup>   |
|                        |                          | Magnésio   | 0,95%                      | Piroxidina  | 9,00 mg.kg <sup>-1</sup>    |
|                        |                          | Enxofre    | 0,25%                      | Riboflavina | 6,00 mg.kg <sup>-1</sup>    |
| Densidade              | 1,15 g.cm <sup>-1</sup>  | Boro       | 0,08%                      | Tiamina     | 3,00 mg.kg <sup>-1</sup>    |
|                        |                          | Sódio      | 0,08%                      | Ácido       | 15,00 mg.kg <sup>-1</sup>   |
| Relação C/N            | 4,90                     | Ferro      | 647,5 mg.kg <sup>-1</sup>  | Pantotênico |                             |
|                        |                          | Manganês   | 7,50 mg.kg <sup>-1</sup>   |             |                             |
| pH                     | 4,00                     | Cobre      | 2,50 mg.kg <sup>-1</sup>   |             |                             |
|                        |                          | Zinco      | 152,20 mg.kg <sup>-1</sup> |             |                             |

Adaptado de LIBERATO, 2017.

Os reagentes usados para biologia molecular foram listados no item 2.4.3. Os demais reagentes utilizados nos ensaios de extração e quantificação dos carotenoides possuíam elevado grau de pureza (> 99%) e serão indicados mais adiante.

### 3.4.4. CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES AUXOTRÓFICOS POR CRISPR/CAS9

#### 3.4.4.1. Design dos sgRNAs

Os sgRNAs foram preditos pela ferramenta *online CRISPOR* (<http://crispor.tefor.net/>) (HAEUSSLER et al., 2016). O *locus URA3* da linhagem W29 (Nº de Acesso: AJ306421.1) foi empregado como sequência de entrada, a estirpe CLIB122 (*CR382127 Genolevures 2008*) foi selecionada como o genoma de interesse e a sequência PAM definida foi a 20bp-NGG-Sp Cas9. As sequências de 20 nt orientadas para as regiões promotoras e terminadoras do gene *URA3* com maiores *scores* de eficiência e especificidade, com baixo número de predições *off-target* e ausência do PAM foram selecionadas. Estas foram desenhadas como oligos complementares, contendo em suas extremidades as saliências para a construção dos vetores CRISPR/Cas9 por GGA (Tabela 3.5). A verificação da formação de estrutura secundária foi realizada nas plataformas *online*, como *RNA Structure* e *RNAfold WEB SERVER*.

#### 3.4.4.2. Montagem dos Vetores CRISPR/Cas9

Os vetores CRISPR/Cas9 foram montados pelo sistema GGA, segundo Larroude et al. (2020). Os oligos complementares foram diluídos a concentração final de 100 μM e 1 μL foi adicionado à microtubos contendo 1 μL de *T4 quinase*, 1 μL do tampão da *T4 ligase* e 6 μL de água livre de nucleases. A reação foi conduzida à 37 °C por 1 h, 95 °C por 10 min e resfriamento até 25 °C, com diminuição de 5 °C.min<sup>-1</sup>. Os sgRNAs fosforilados e anelados foram diluídos (1: 200) e 2 μL foram misturados com 100 ng dos vetores de destino, 10 U de *BsmBI*, 3000 U de *T7 DNA ligase*, 2 μL de tampão da enzima e água livre de nucleases para volume final de até 20 μL. Os sgRNA-UTSS1 e sgRNA-UTSS2 foram adicionados separadamente as reações contendo o GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP, enquanto que os sgRNA-UTES1 e sgRNA-UTES2 foram adicionados na mistura com o GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP. A reação foi submetida ao seguinte ciclo térmico: [55 °C por 5 min, 16 °C por 5 min] x 30, 50 °C por 5 min, 80 °C por 5 min, 15 °C ∞. Ao fim, a mistura reacional foi usada para transformação de células de *E. coli* quimiocompetentes e as colônias resistentes à ampicilina com coloração branca foram rastreadas para verificação da montagem correta dos plasmídeos por digestão com a enzima *BglIII*.

#### 3.4.4.3. Co-Transformação de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682

Os vetores CRISPR/Cas9 replicativos corretamente montados foram submetidos ao processo de co-transformação de *Y. lipolytica*, conforme o item 2.4.4.3. Aproximadamente 300 a 500 ng de cada um dos plasmídeos CC\_sgRNA-UTSS e CC\_sgRNA-UTES foram combinados na mesma reação. As células co-transformadas foram selecionadas em meio YPD-Nat-Hig sólido, após incubação a 28 °C por 2 a 4 dias.

#### 3.4.4.4. Avaliação Fenotípica e Verificação Genotípica dos Co-Transformantes

Os co-transformantes foram cultivados nos meios YNB, YNB-Ura e/ou YPD a 28 °C por até 48 h. As células crescidas apenas nos meios YNB-Ura e/ou YPD foram selecionadas para verificação da excisão do gene *URA3* por PCR da colônia (item 2.3.4.3) usando os oligos Fw-UTSS/Rv-UTES (Tabela 3.5). Os fragmentos amplificados foram purificados e sequenciados. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado pelo algoritmo *MAFFT* (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019).

#### 3.4.4.5. Cura Plasmidial dos Mutantes Auxotróficos

Os mutantes auxotróficos (AM - *Auxotrophic Mutants*) foram cultivados sequencialmente em meio YNB-Ura líquido a 28 °C, 160 rpm por 24 h. Em seguida, as cepas foram repicadas em microplacas de 96 poços contendo os meios YPD-Nat, YPD-Hig e YPD, e incubadas a 28 °C, 180 rpm por 24 h para a verificação da perda da resistência aos antibióticos.

#### 3.4.4.6. Determinação da Eficiência de Clonagem

As estirpes curadas foram transformadas com o plasmídeo GGVA\_RedStarII linearizado com a enzima *NotI* (item 2.4.4.3). As colônias crescidas no meio seletivo YNB foram cultivadas em microplacas de 96 poços contendo meio YPD, a 28 °C sob agitação constante por 24 h. Ao final do período de incubação, a fluorescência da RFP produzida pelos clones foi medida no comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 528 nm (*Synergy MX, Biotek*). A eficiência de clonagem foi determinada como o número de colônias cujo o fenótipo fluorescente foi observado pelo total de colônias testadas.

### 3.4.5. CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE EM *Yarrowia lipolytica*

As linhagens IMUFRJ 50682 auxotróficas foram transformadas com o plasmídeo GGVA\_Carotenoid, previamente linearizado com a enzima *SfiI* (item 2.4.4.3). Os transformantes crescidos no meio YNB com intensa coloração alaranjada foram selecionados para a avaliação da capacidade de produção de carotenoides a partir de diferentes substratos.

### 3.4.6. CULTIVOS PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO

Os recombinantes produtores de carotenoides (CRP - *Carotenoid Recombinant Producers*) foram propagados em meio YPD líquido a 28 °C e 200 rpm *overnight*. Para a determinação do perfil de crescimento celular, as culturas foram lavadas, ajustadas para DO<sub>750nm</sub> inicial de 0,2 e crescidas em microplacas de 96 poços contendo 100  $\mu$ L dos meios YPD e YNB a 28 °C e 500 rpm, durante aproximadamente 10 h (*Incubator LS122, Labstac*), em triplicata. A medida da absorbância foi realizada a cada 30 min no equipamento

*SpectraMax M2e (Molecular Devices)*. Para a avaliação da produção de  $\beta$ -caroteno a partir de glicose como substrato, as culturas foram inoculadas na DO<sub>750nm</sub> inicial de 0,1 em 10 mL dos meios YPD e YNB em erlenmeyers de 50 mL, e incubados a 28 °C, 200 rpm por 96 h (*Innova 42, Eppendorf New Brunswick*). Ao final do período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 *xg*, 4 °C por 10 min (*Sorvall Legend RT Plus, Thermo Scientific*) para a dosagem da biomassa e  $\beta$ -caroteno.

Para produção de carotenoides a partir de glicerol ou glicerina como substrato, as células foram propagadas em meio YPG a 28 °C e 160 rpm por 24 a 72 h, e inoculadas na DO<sub>750nm</sub> inicial de 0,1 nos meios. As fermentações foram realizadas em 25 mL do meio MGP55 em erlenmeyer de 125 mL, a 28 °C, 200 rpm e 120 h, para a triagem dos recombinantes produtores; em 50 mL dos meios MGP55, MGL35, MGL55 e MGL85 em erlenmeyer de 250 mL, e em 10 mL dos meios MM10, MM20 e MM30 em erlenmeyer de 50 mL, durante 96 h, para a investigação do impacto dos subprodutos no bioprocessos. Amostras foram retiradas a cada 24 h para a quantificação da biomassa, glicerol residual, eritritol, manitol e carotenoides totais. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

### 3.4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.4.7.1. Dosagem da Biomassa, Glicerol, Eritritol e Manitol

A quantificação da biomassa foi realizada conforme descrito no item 2.4.6.1. A concentração de glicerol, eritritol e manitol foi determinada a partir do sobrenadante livre de células, de acordo com o item 2.4.6.2.

#### 3.4.7.2. Extração e Quantificação de Carotenoides

A extração do  $\beta$ -caroteno e dos demais carotenoides foi realizada segundo Larroude et al. (2018a), com algumas modificações. Aliquotas de 500  $\mu$ L de células previamente lavadas foram adicionadas a microtubos de 2 mL com aproximadamente 500  $\mu$ L de pérolas de vidro e 1 mL da solução de extração, composta por acetato de etila e 0,01% butil hidroxitolueno (BHT - *Butylated Hydroxytoluene*) (ambos *Sigma-Aldrich*). Os microtubos foram protegidos da luz e submetidos a ciclos de 60 s a 4.000 rpm no disruptor de células (*BeadBug Homogenizer, Benchmark*), e banho de gelo por 120 s até que suspensão celular estivesse totalmente descorada. O extrato de carotenoides foi recuperado a 5.000 *xg* por 3 min e a

absorbância foi analisada no espectrofotômetro a 455 nm (*Thermo Scientific Genesys 10S*). Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em  $\text{mg.L}^{-1}$ , de acordo com a curva analítica previamente realizada com soluções de β-caroteno (*Sigma-Aldrich*) em concentrações conhecidas.

#### 3.4.7.3. Análise da Pureza de β-Caroteno

O β-caroteno extraído foi analisado quanto a sua pureza no HPLC equipado com o Detector de Arranjo Diodos (DAD) (*Shimadzu*) e coluna *C-18 Nova-Pak 60Å*, 4μm e 3,9 x 150 mm (*Waters*). As análises foram realizadas a 455 nm e no modo isocrático, com a fase móvel consistindo de acetonitrila 70% e acetato de etila 30% (v/v) (ambos *Scielab*), em fluxo constante de  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ . A temperatura do forno foi mantida a 30 °C e o volume de injeção foi fixado em 10 μL.

#### 3.4.7.4. Determinação dos Parâmetros do Cultivo

A velocidade máxima específica de crescimento microbiano ( $\mu_{\text{máx}}$ ), os coeficientes de rendimento de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e produto ( $Y_{P/S}$ ), bem como a produtividade volumétrica do produto ( $Q_P$ ) foram calculados pelas Equações 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente.

$$\mu_X = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (3.1)$$

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (3.2)$$

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{-dS} \quad (3.3)$$

$$Q_P = \frac{dP}{dt} \quad (3.4)$$

#### 3.4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism 8.4.3*, com significância para valores de  $p < 0,05$ .

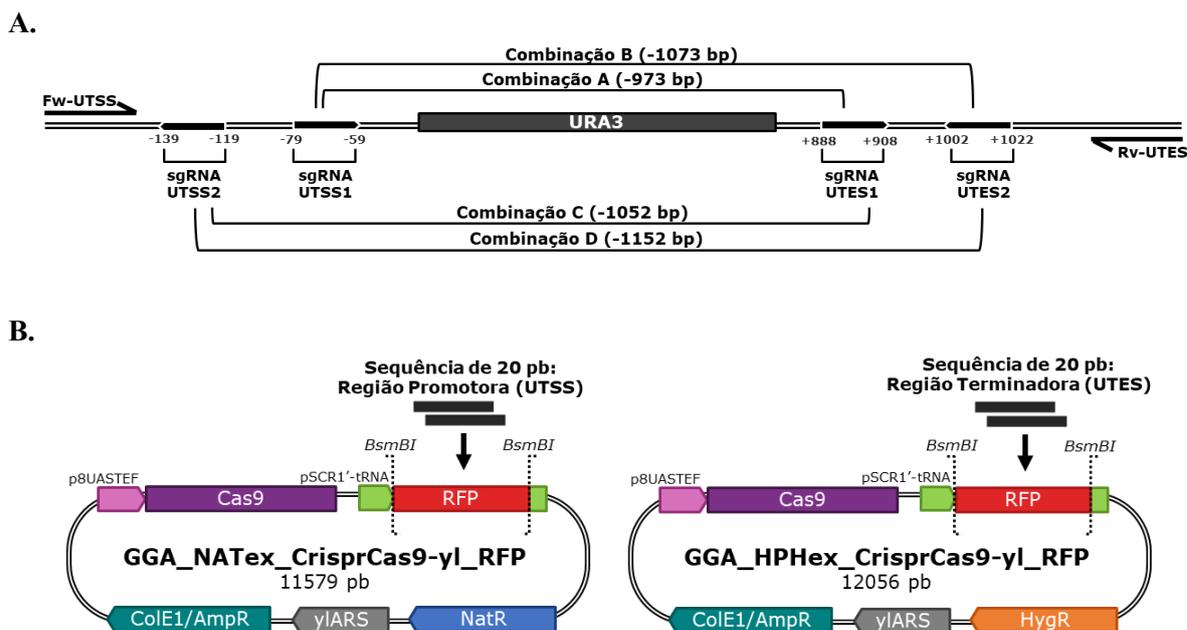
### 3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1. CONSTRUÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 PELA ESTRATÉGIA COMBINATÓRIA DE CLIVAGEM DUPLA BASEADA NO SISTEMA CRISPR/CAS9

A tecnologia CRISPR/Cas9 é uma ferramenta poderosa de edição de genomas e várias técnicas baseados no sistema tipo II foram desenvolvidos recentemente (DARVISHI et al., 2018). A estratégia de clivagem dupla consiste do emprego de dois sgRNAs independentes combinados com a nuclease Cas9 para induzir DSBs em diferentes regiões do DNA genômico, que podem ser reparadas em conjunto pela via NHEJ, levando à perda completa de qualquer sequência localizada entre os sítios alvos (ADIKUSUMA; PFITZNER; THOMAS, 2017). Em vista disso, foi investigado a eficiência desse método na deleção de toda a sequência codificante do gene *URA3* da linhagem selvagem IMUFRJ 50682, cuja informação genômica não está disponível, para a construção de mutantes auxotróficos não-reversivos, a fim de expandir o seu potencial biotecnológico.

O gene *URA3* codifica a orotidina-5'-fosfato descarboxilase, uma enzima que catalisa a conversão da orotidina 5'-monofosfato (OMP - *orotidine 5'-monophosphate*) em uridina 5'-monofosfato (UMP - *uridine 5'-monophosphate*), a última etapa na biossíntese da pirimidina (ALANI; CAO; KLECKNER, 1987). A deleção do *URA3* impede que a levedura cresça em meios deficientes de uracila em sua composição. Este fenótipo de auxotrofia ainda permanece a melhor escolha como marcador seletivo em cepas hospedeiras de *Y. lipolytica* (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004; LARROUDE et al., 2018b). Isso porque, as linhagens dessa espécie são naturalmente resistentes à maioria dos antibióticos e frequentemente geram resistência espontânea, o que limita a escolha de tais marcadores dominantes (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Para nocautear o gene *URA3* da estirpe IMUFRJ 50682, dois pares de sequências alvos de 20 nt localizadas nos sítios de iniciação da transcrição (sgRNA UTSS1: -79 a -59 pb; sgRNA UTSS2: -139 a -119 pb) e regiões de terminação (sgRNA UTES1: +888 a + 908 pb; sgRNA UTES2: +1002 a +1022 pb) foram preditos com base no genoma da linhagem W29, e usados na montagem dos vetores replicativos, os quais foram combinados e empregados em quatro diferentes reações. A combinação A foi realizada com os sgRNAs UTSS1 e UTES1 para excisão de 973 pb, a combinação B com os sgRNAs UTSS1 e UTES2 para deleção de 1.073 pb, a combinação C com os sgRNAs UTSS2 e UTES1 para perda de 1.052 pb, e a combinação D com os sgRNAs UTSS2 e UTES2 para remoção de 1.152 pb (Figura 3.7A).



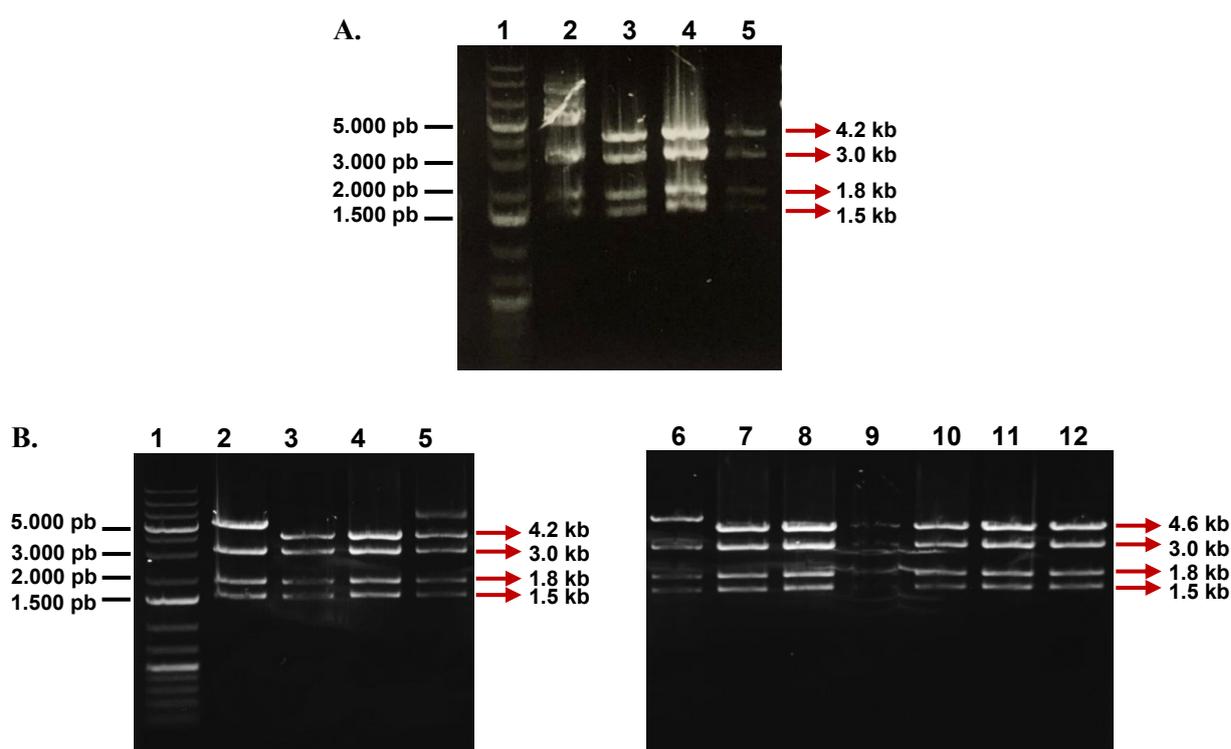
**Figura 3.7.** Deleção do gene *URA3* de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 por estratégia de clivagem dupla baseada no sistema CRISPR/Cas9 para a construção de mutantes auxotróficos. **(A)** Sítios dos sgRNAs (*single guide RNAs*) *upstream* e *downstream* ao gene *URA3* e as combinações realizadas entre os sgRNAs UTSS (*URA3* Transcription Start Site) e sgRNA UTES (*URA3* Transcription End Site). Os números entre parênteses mostram o tamanho do fragmento a ser perdido por meio da dupla quebra da fita dupla. A posição +1 indica *start codon* (ATG) e as localizações dos sgRNAs são apresentadas por sua distância da sequência da sequência codificante (em pares de bases). **(B)** Vetores CRISPR/Cas9 construídos pelo sistema *Golden Gate Assembly*. *GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP* e *GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP*: vetores de destino pré-montados. *p8UASTEF*: promotor composto por oito cópias do UAS1B e pTEF. *Cas9*: gene que codifica a nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes* com os códons otimizados para *Y. lipolytica* e fusionados ao sinal SV40. *pSCR1'-tRNA*: promotor da RNA polimerase III combinado com tRNA glicina. *RFP*: gene que codifica uma proteína fluorescente de coloração vermelha, flanqueado por sítios de restrição *BsmBI*. *NatR*: cassete que confere resistência a noursetricina (levedura). *HygR*: cassete que confere resistência a higromicina B (levedura). *yIARS*: sequências de replicação autônoma. *ColE1/AmpR*: origem de replicação e marca de seleção de resistência ao antibiótico ampicilina (bactéria).

Os sgRNAs UTSS e UTES foram inseridos nos vetores de destino *GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP* e *GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP*, respectivamente (Figura 3.7B). Ambos plasmídeos apresentavam a mesma construção para níveis de expressão similares, diferindo apenas nas sequências alvos e nas marcas de seleção, a fim de permitir a identificação das regiões mais favoráveis para a excisão do gene *URA3*, uma vez que a DSB dupla mediada por CRISPR/Cas9 requer a clivagem sincronizada de ambos os sítios durante o mesmo ciclo celular (GAO et al., 2018).

Os vetores de destino previamente construídos por Larroude et al. (2020) continham: o cassete de expressão do sgRNA dirigido pelo promotor sintético pSCR1'-tRNA e uma sequência poliT para terminação; o gene *Cas9* expresso pelo promotor híbrido constitutivo p8UASTEF e terminador CYC-t, conforme descrito por Schwartz et al. (2016); as sequências

de replicação autônoma isoladas dos cromossomos de *Y. lipolytica* (*ylARS - Autonomously Replicating Sequences*), nas quais as funções centroméricas e replicativas estão co-localizadas; os genes *nat* (GGA\_NATex\_Crispr Cas9-yl\_RFP) e *hph* (GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP) como marcas de seleção para conferir resistência aos antibióticos nourseotricina e higromicina-B, respectivamente; bem como a maquinaria para propagação em *E. coli*. Adicionalmente, os cassetes de expressão dos sgRNAs possuíam o gene *RFP* flanqueado por sítios de restrição da enzima *BsmBI* para facilitar a triagem dos clones bacterianos positivos abrigoando as construções de interesse, uma vez que a clivagem com *BsmBI* libera o *RFP* e permite a inserção das sequências de 20 nt desejadas (Figura 3.7B).

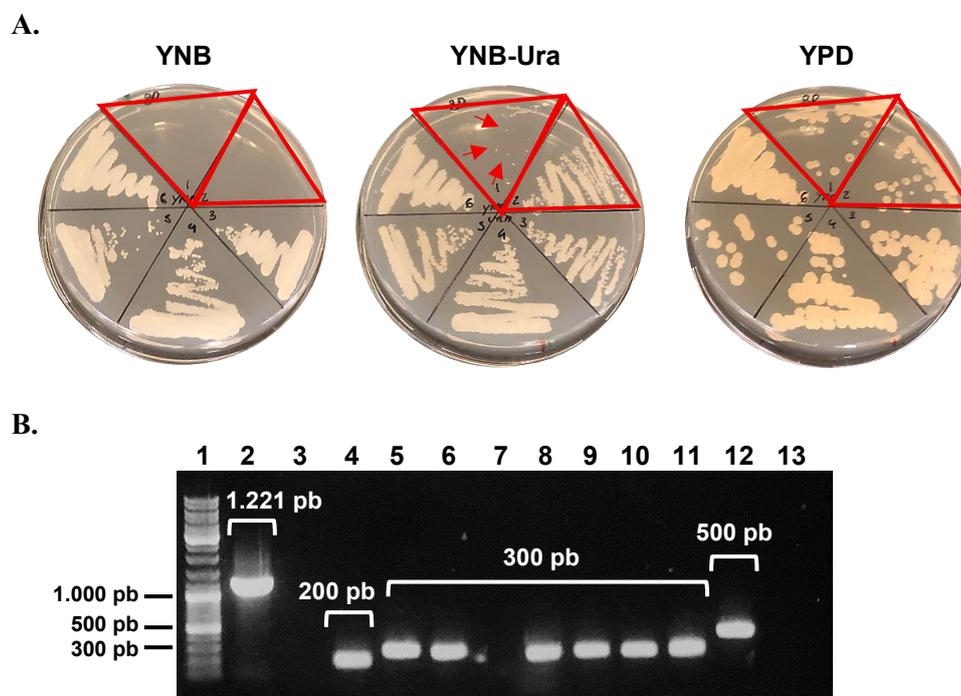
Assim, os vetores CRISPR/Cas9 corretamente montados foram rastreados a partir de colônias brancas crescidas em meio seletivo contendo ampicilina, através da digestão com a enzima *BglIII*, conforme pode ser verificado na Figura 3.8.



**Figura 3.8.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos vetores CRISPR/Cas9 construídos por *Golden Gate* e digeridos pela enzima *BglIII* para a confirmação da montagem correta. **(A)** Vetor CC\_sgRNA-UTSS1. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2: GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP (controle negativo). 3 a 5: plasmídeos rastreados pela inserção do sgRNA UTSS1. **(B)** Vetores CC\_sgRNA-UTSS2, CC\_sgRNA-UTES1 e CC\_sgRNA-UTES2. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*ThermoFisher*). 2: GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP (controle negativo). 3 a 5: plasmídeos rastreados pela presença do sgRNA UTSS2. 6: GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP (controle negativo). 7 a 9: plasmídeos rastreados pela presença do sgRNAs UTES1. 10 a 12: plasmídeos rastreados pela presença do sgRNA UTES2. As setas em vermelho indicam o tamanho esperado dos fragmentos após a digestão.

A análise eletroforética em gel de agarose a 0,8% (m/v) confirmou a inserção dos sgRNAs UTSS e UTES nos vetores de destino, pelo aparecimento de quatro bandas nos tamanhos aproximados de 4.200, 3.000, 1.800 e 1.500 pb e 4.600, 3.000, 1.800 e 1.400 pb, respectivamente (Figura 3.8). Os vetores desenvolvidos foram nomeados de CC\_sgRNA-UTSS1, CC\_sgRNA-UTSS2, CC\_sgRNA-UTES1 e CC\_sgRNA-UTES2, e utilizados no processo de co-transformação da cepa IMUFRJ 50682.

Após 4 dias de incubação, um total de 101 colônias resistentes aos antibióticos higromicina-B e nourseotricina de todas as combinações foram observadas no meio seletivo: A (46 colônias), B (31 colônias), C (2 colônias) e D (22 colônias). O fenótipo auxotrófico para uracila dos co-transformantes foi analisado nos meios YNB, YNB-Ura e YPD (Figura 3.9A). Para a combinação A, 25 colônias foram semeadas nestes meios e 40% (10/25) foram incapazes de crescer em YNB. Para a combinação B, 20 colônias foram testadas e apenas 5% (1/20) não cresceram no meio seletivo. Para as combinações C e D, todos os co-transformantes foram cultivados em YNB, e se mostraram capazes de crescer na ausência e presença de uracila, indicando que o nocaute do gene *URA3* não ocorreu.



**Figura 3.9.** Verificação fenotípica e genotípica dos co-transformantes. **(A)** Triagem dos mutantes auxotróficos nos meios YNB, YNB-Ura e YPD. As setas vermelhas indicam a presença de colônias. **(B)** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) da PCR de colônia dos candidatos incapazes de crescer em meio YNB. 1: Padrão de massa molecular *GeneRuler 1 kb plus* (*New England Biolabs*). 2: IMUFRJ 50682. 3: C01. 4: C02. 5: C07. 6: C08. 7: C09. 8: C10. 9: C13. 10: C23. 11: C59. 12: C60. 13: C62. Fragmentos com  $\leq 500$  pb mostram excisão de *URA3*.

Cada candidato das combinações A (10 colônias - C01, C02, C07, C08, C09, C10, C13, C59, C60 e C62) e B (1 colônia - C23) foram avaliados genotipicamente por PCR de colônia e sequenciamento de DNA com os oligos Fw-UTSS/Rv-UTES. Nenhuma sequência foi amplificada de C01, C09 e C62 e os outros oito candidatos (C02, C07, C08, C10, C13, C23, C59, C60) apresentaram fragmentos de tamanhos  $\leq 500$  pb, confirmando a deleção do *URA3*, visto que a sequência amplificada da cepa selvagem IMUFRJ 50682 com os mesmos oligos tinha comprimento de 1.221 pb, como pode ser observado na Figura 3.9B. Portanto, de todas as combinações de sgRNAs, apenas nas combinações A (UTSS1 e UTES1) e B (UTSS1 e UTES2) foram identificados mutantes auxotróficos *ura3Δ* com eficiência de deleção de 28% (7/25) e 5% (1/20), respectivamente (Tabela 3.9).

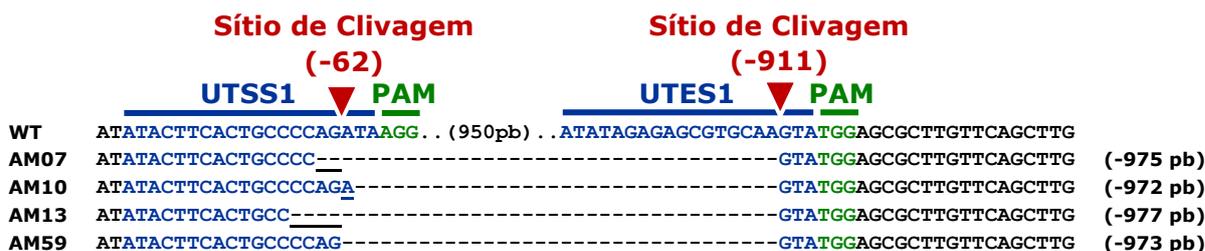
**Tabela 3.9.** Eficiência da deleção do gene *URA3* de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 pela estratégia combinatória de clivagem dupla baseada na tecnologia CRISPR/Cas9.

| Combinações dos sgRNAs | Total de Colônias | Fenótipo de Auxotrofia | Confirmação Genotípica | Eficiência de Deleção (%)* |
|------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| A (UTSS1 + UTES1)      | 46                | 10 (25)                | 7 (10)                 | 28                         |
| B (UTSS1 + UTES2)      | 31                | 1 (20)                 | 1 (1)                  | 5                          |
| C (UTSS2 + UTES1)      | 2                 | 0 (2)                  | -                      | -                          |
| D (UTSS2 + UTES2)      | 22                | 0 (22)                 | -                      | -                          |

\* Os números entre parênteses representam colônias selecionadas de duplicatas biológicas. A eficiência de deleção é apresentada como a porcentagem de colônias positivas na confirmação genotípica pelo total de colônias que apresentaram fenótipo de auxotrofia para uracila.

A escolha de sequências alvos mais próximas à região codificante do gene *URA3* na cepa IMUFRJ 50682 mostrou-se mais favorável para a clivagem do DNA genômico, uma vez que as combinações A e B levaram a excisão de todo o gene. Embora os sgRNAs tenham sido desenhados com base no genoma da cepa W29, todos corresponderam perfeitamente ao sítio de reconhecimento na cepa IMUFRJ 50682 (Apêndice 7), mesmo sem nenhum mutante auxotrófico ter sido gerado a partir das combinações C e D.

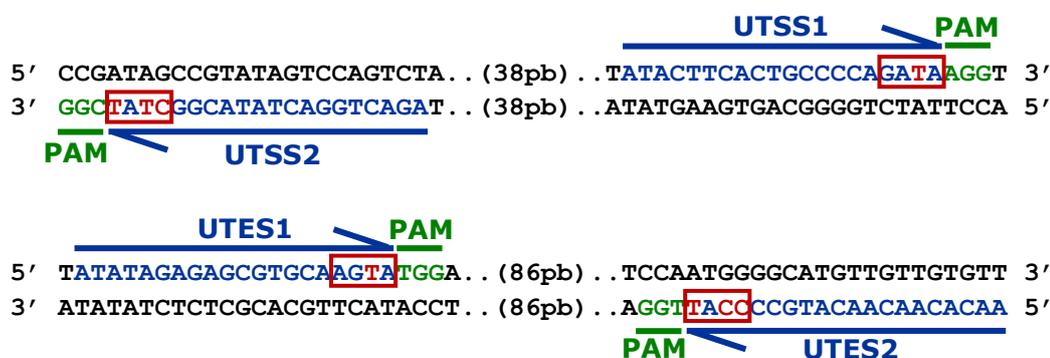
O alinhamento múltiplo entre o *locus URA3* nativo e as sequências amplificadas dos mutantes auxotróficos, agora denominados AM07, AM10, AM13 e AM59, revelou que o reparo via NHEJ foi preciso em AM59, com a perda de 973 pb. Entretanto, este mecanismo é frequentemente sujeito a erros associados a pequenas inserções e deleções no local DSBs (GARNEAU et al., 2010). Nos sítios do UTSS1 de AM07, AM10 e AM13 foram observados tais *indels*: AM07 apresentou deleção de 2 pb, AM10 recebeu adição de 1 pb e AM13 perdeu 4 pb; totalizando uma perda total de 975, 972 e 977 pb, respectivamente (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Alinhamento múltiplo entre sequências amplificadas do gene *URA3* nativo e alguns mutantes auxotróficos. As letras em azul representam os sgRNAs UTSS1 e UTES1, as letras em verde mostram a sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), as setas vermelhas mostram o local de clivagem previsto e os *indels* estão sublinhados.

De acordo com Graf et al. (2019), a especificidade de um sgRNA depende da sequência alvo, e o local de reconhecimento com o conteúdo de GC  $\geq 80\%$  ou  $\leq 35\%$  tem se mostrado pouco eficaz. Alguns sgRNAs não são funcionais, apesar de apresentarem elevados *scores* em algoritmos de predição e atenderem a todos os critérios (SCHWARTZ; WHEELDON, 2018). Além disso, a nuclease Cas9 tem demonstrado ligação preferencial em sgRNAs com G nas quatro bases diretamente *upstream* a sequência PAM, enquanto T e C parecem ser desfavoráveis (WANG et al., 2012; GRAF et al., 2019).

As baixas frequências de deleção do *URA3* no presente trabalho podem ser devido à presença de tais bases adversas na extremidade 3' das sequências alvos dos sgRNAs, uma vez que o conteúdo GC foi de aproximadamente 45%. Os sgRNAs UTSS2 e UTES2 são reversos e possuem as sequências 5'-CTAT-3' e 5'-CCAT-3', respectivamente, as quais são ricas em bases TC. Por outro lado, os sgRNAs UTSS1 e UTES1 possuem as sequências 5'-GATA-3' e 5'-AGTA-3', respectivamente, com apenas uma T e nenhum de C, sugerindo correlação entre a presença de bases pirimídicas próximas a sequência PAM e baixo desempenho de nuclease Cas9 (Figura 3.11).



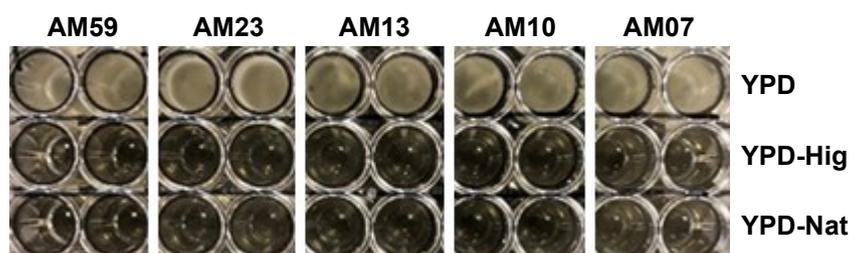
**Figura 3.11.** Bases PAM-proximais localizadas nos sgRNAs UTSS e UTES. As letras em verde representam a sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), as letras em azul indicam as sequências alvos de 20 nucleotídeos dos sgRNAs, as setas azuis mostram a direção de sgRNAs e as letras em vermelho destacam as bases desfavoráveis para a clivagem de Cas9.

O insucesso das combinações C e D pode estar relacionado exclusivamente com as propriedades do sgRNA UTSS2. Isso porque, análises da sequência alvo de 20 nt dos sgRNAs pelas plataformas *RNA Structure* e *RNAfold WEB SERVER* indicou a possibilidade de formação de estrutura secundária em UTSS2, o que impediria o reconhecimento do DNA alvo e, conseqüentemente, sua clivagem. Ademais, segundo Yarrington et al. (2018), uma variação substancial na eficiência das DSBs, de acordo com diferentes alvos genômicos, pode estar relacionada não apenas a qualidade inerente da interação entre o sgRNA e a região alvo de reconhecimento, mas também a acessibilidade geral da cromatina pela nuclease Cas9.

Similarmente, Gao et al. (2018) realizaram o nocaute de seis genes da linhagem Po1f através da clivagem dupla mediada por CRISPR/Cas9, e também obtiveram baixas eficiências de excisão de toda a sequência codificante, variando de 14,3-32,6%. Os autores relataram que o reparo via NHEJ ocorreu com precisão na maioria dos casos e a formação de *indels* foi a principal concorrência para a excisão do gene, pois a clivagem não sincronizada do DNA pode levar a tais *indels* em um único local, evitando futuros cortes e eventos de deleção de genes.

Ainda cabe ressaltar, que a verificação de fragmento com tamanho de aproximadamente 500 pb na PCR de colônia de um mutante auxotrófico (AM60), apontam para efeitos *off-targets*, que são bastante relatados no sistema CRISPR/Cas9 (JIANG; DOUDNA, 2017; WONG et al., 2017; CAI; GAO; ZHOU, 2019). De acordo com Ma et al. (2020), a ocorrência de tal evento em *Y. lipolytica* se deve ao elevado conteúdo GC em seu DNA, podendo predispor a Cas9 errar os alvos genômicos devido à sequência PAM rica em G.

Os mutantes *ura3* $\Delta$  IMUFRJ 50682 foram crescidos no meio YNB-Ura sequencialmente por três rodadas para a cura dos plasmídeos. Em seguida, foram purificados em YPD sólido e posteriormente, cultivados em YPD-Hig e YPD-Nat. As células incapazes de crescer na presença dos antibióticos confirmaram a perda dos vetores CRISPR/Cas9 (Figura 3.12), e então foram submetidas a clonagem da proteína fluorescente vermelha RedStarII para verificação de sua eficiência.



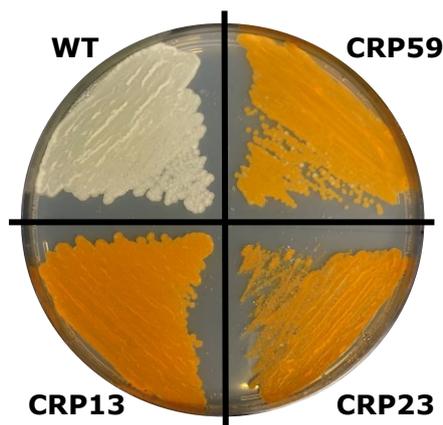
**Figura 3.12.** Cura plasmidial dos mutantes *ura* $\Delta$  IMUFRJ 50682.

O vetor integrativo GGVA-RedStarII possuía o cassete de expressão da proteína fluorescente dirigida pelo pTEF e tLip2, *URA3* como marcador de seleção, e regiões zeta como sítio de inserção (PARK et al., 2019). Mesmo sem a informação genômica da linhagem IMUFRJ 50682, os sítios zeta permitiriam a clonagem do gene de interesse, pelo fato de tais sequências apresentarem a propriedade de induzir eventos de integração no DNA sem a presença de homologia, em cepas da espécie *Y. lipolytica* desprovidas do retrotransposon Ylt1 (NICAUD et al., 2000), fornecendo um processo para transformação não-homóloga. Entretanto, tais eventos aleatórios podem levar a inserções dos cassetes de expressão em regiões inadequadas, promovendo efeitos metabólicos negativos e morte celular (MADZAK; BECKERICH, 2013). Após 2 dias, todas as colônias crescidas foram analisadas quanto ao fenótipo de fluorescência. Embora a eficiência de transformação tenha sido baixa (< 100 transformantes/ $\mu$ g de DNA plasmidial), as taxas de clonagem foram satisfatórias, de 82,6 (19/23), 91,6 (33/36), 100,0 (11/11), 80,0 (4/5) e 89,5% (17/19) para as cepas AM07, AM10, AM13, AM23 e AM59, respectivamente, sugerindo o adequado emprego dos sítios zeta para a clonagem de genes de interesse na linhagem IMUFRJ 50682.

### 3.5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO POR *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682

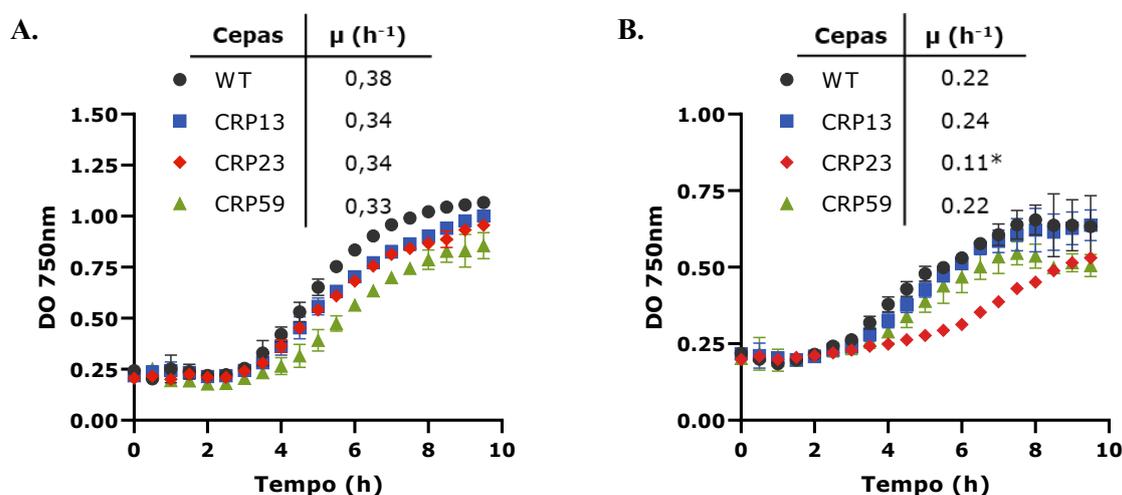
A fim de verificar a aplicabilidade dos mutantes auxotróficos IMUFRJ 50682 como plataforma alternativa de produção de  $\beta$ -caroteno, foi realizada a clonagem dos genes *carB* e *carRP* de *M. circinelloides*, bem como do gene nativo *GGSI*. Os cassetes de expressão foram inseridos no genoma das cepas AM07, AM10, AM13, AM23 e AM59 a partir de um único fragmento, contendo o gene *URA3* como marca de seleção, regiões zeta como sítios de inserção, e o pTEF para expressão constitutiva dos três genes, visto que este promotor levou a maiores rendimentos de produção de  $\beta$ -caroteno em estudos anteriores (LARROUDE et al., 2018a).

Ao total, 22 colônias foram observadas após o processo de transformação, com o vetor desenvolvido previamente por Celińska et al. (2017). Porém, apenas sete destas apresentaram o fenótipo esperado: AM07 (1/6), AM10 (1/2), AM13 (1/9), AM23 (2/2), AM59 (2/3); e 3 com intensa pigmentação alaranjada foram selecionadas para os ensaios de produção de  $\beta$ -caroteno. As cepas produtoras de carotenoides foram nomeadas de CRP13, CRP23 e CRP59, conforme o mutante auxotrófico de origem (cepa parental) (Figura 3.13).



**Figura 3.13.** Cepas IMUFRJ 50682 produtoras de carotenoides em meio YNB.

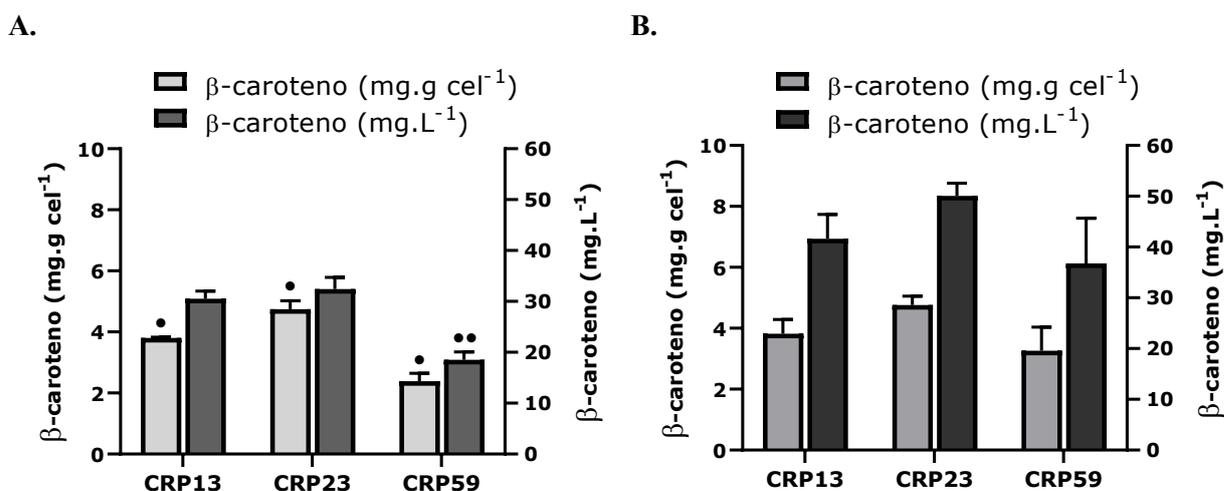
As cepas recombinantes e a linhagem WT foram cultivadas em meio rico (YPD) e meio mínimo (YNB) para a verificação do perfil e taxas específicas de crescimento celular. Ao longo do cultivo em meio YPD, a linhagem WT e os clones CRP13, CRP23 e CRP59 exibiram crescimento muito semelhante, e a análise estatística não indicou diferenças significativas no valor da velocidade máxima específica de crescimento,  $\mu_{\text{máx}}$  ( $p > 0,05$ ). A cepa WT atingiu  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,38 \text{ h}^{-1}$ , enquanto os clones CRP13, CRP23 e CRP59 alcançaram  $0,34$ ,  $0,34$  e  $0,33 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente (Figura 3.14A). Em meio YNB, houve uma diminuição no  $\mu_{\text{máx}}$  de todas as cepas, em comparação com o meio YPD. A cepa WT e os clones CRP13, CRP23 e CRP59 obtiveram  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,22$ ,  $0,24$ ,  $0,11$  e  $0,22 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, e apenas CRP23 diferiu significativamente dos demais ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.14B). Tais diferenças podem estar relacionadas com a disponibilidade de nutrientes nos meios, conforme anteriormente observado por Hackenschmidt et al. (2019).



**Figura 3.14.** Cinética de crescimento celular da linhagem selvagem IMUFRJ 50682 e os recombinantes construídos, durante o cultivo em microplaca a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 500 rpm por 10 h. **(A)** Meio YPD. **(B)** Meio YNB. \*Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para o mesmo intervalo de tempo analisado.

O aumento da carga metabólica pela clonagem dos genes heterólogos não reduziu a capacidade de crescimento das cepas recombinantes, indicando que a introdução de uma nova rota biossintética foi eficientemente adaptada. Embora o clone CRP23 tenha apresentado um crescimento mais lento em microplacas durante o período analisado, é possível observar que em 8 h a sua DO<sub>750nm</sub> foi pouco inferior à das demais. Desse modo, as cepas recombinantes CRPs foram submetidas a ensaios de produção de β-caroteno em frascos agitados.

Em 96 h de cultivo, a cepa CRP23 foi capaz de sintetizar  $32,4 \pm 2,3 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $4,7 \pm 0,3 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) e  $50,1 \pm 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $4,8 \pm 0,3 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) de β-caroteno nos meios YPD e YNB, respectivamente. Por outro lado, as cepas CRP13 e CRP59 produziram  $30,5 \pm 1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $3,8 \pm 0,0 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) e  $18,5 \pm 1,6 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $2,4 \pm 0,3 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) no meio YPD; e  $41,6 \pm 4,8 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $3,8 \pm 0,5 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) e  $36,7 \pm 8,9 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $3,3 \pm 0,8 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) no meio YNB, respectivamente. Em relação ao conteúdo intracelular de β-caroteno, foi verificada diferença significativa entre todas as cepas cultivadas em meio YPD, e sobre a produção volumétrica, somente o clone CRP59 diferiu estatisticamente dos demais ( $p > 0,05$ ). Porém, o mesmo não foi observado nos cultivos em meio YNB ( $p < 0,05$ ), embora a concentração intracelular tenha sido bastante similar ao do meio YPD (Figura 3.15). As divergências na produção volumétrica se deveram ao menor crescimento observado em YPD no cultivo em frascos agitados por 96 h, de cerca de 7-8 g.L<sup>-1</sup>, contra 10-11 g.L<sup>-1</sup> no YNB. Curiosamente, estes resultados de crescimento celular estão em desacordo com os obtidos em microplacas, o que pode estar relacionado com os diferentes sistemas empregados.



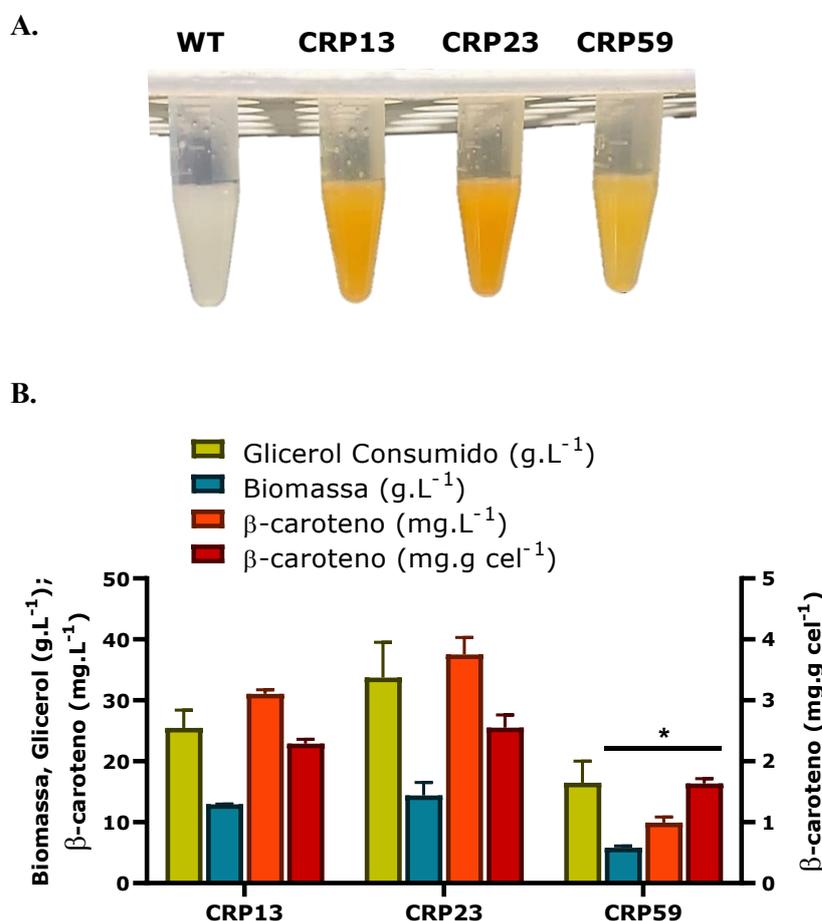
**Figura 3.15.** Concentração e rendimento de β-caroteno obtido pelas cepas recombinantes CRP13, CRP23 e CRP59 durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 200 rpm por 96 h. **(A)** Meio YPD. **(B)** Meio YNB. \*Indica diferença estatística entre os conjuntos de dados para cada meio - *One-Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ).

Sendo assim, as cepas IMUFRJ 50682 carotenogênicas (CRP13 e CRP23) apresentaram resultados promissores, quando comparados com alguns dados da literatura de outras linhagens de *Y. lipolytica* com modificações genéticas similares, como a superexpressão do gene *GGS1* e expressão heteróloga dos genes *carB* e *carRP*, e em condições de cultivos correlatas, como o uso do meio YPD, temperatura de 28 ou 30 °C, e 96 h de produção. Gao et al. (2014) alcançaram uma produção de  $\beta$ -caroteno de 2,2 mg.g cel<sup>-1</sup> com a cepa CIBTS1176, desenvolvida a partir da linhagem parental ATCC 201249. Larroude et al. (2018a) construíram um cassete de expressão onde *GGS1*, *carB* e *carRP* eram controlados pelos promotores pPGM, pGAPDH e pTEF1, respectivamente, e clonaram nas cepas Po1d e JM3501. A integração monocópia no genoma da Po1d levou a uma síntese de 3,4 mg.g cel<sup>-1</sup> e 18,4 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que a JM3501 alcançou 8,9 mg.g cel<sup>-1</sup> e 35,7 mg.L<sup>-1</sup>. Zhang et al. (2020) desenvolveram a cepa XK3 a partir da Po1f, com os genes expressos pelo promotor p8UASTEFL e obtiveram 5,4 mg.g cel<sup>-1</sup> e 40,4 mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno. Esses dados revelam o potencial da cepa IMUFRJ 50682 a ser explorado.

A expectativa em torno da linhagem IMUFRJ 50682 se deve as suas propriedades industrialmente relevantes, principalmente nas áreas de biocatálise, bioconversão e biorremediação. Estudos anteriores do grupo de Engenharia em Sistemas Biológicos (BIOSE – EQ/UFRJ) demonstraram que esta cepa exibe metabolismo robusto e é capaz de degradar substratos alternativos, como glicerina loira, milhocina, pristano, naftalenos, fenantrenos, terpenos tricíclicos e compostos da cadeia de produção de politereftalato de etileno, além de converter alguns deles em produtos de valor agregado, com benefícios adicionais de sustentabilidade e economia dos processos biotecnológicos (DA SILVA et al., 2012; FERREIRA; COELHO; DA ROCHA-LEÃO, 2012; MARTINS et al., 2012; SILVA et al., 2019; DA COSTA et al., 2020). Em vista disso, as cepas recombinantes desenvolvidas foram inicialmente cultivadas no meio mínimo definido, nomeado de MGP55, até a fase de declínio do crescimento celular, para a avaliação da capacidade de produção de  $\beta$ -caroteno em glicerol puro como única fonte de carbono, e a triagem do melhor recombinante carotenogênico para as análises posteriores.

Em 120 h, os cultivos das cepas CRP13 e CRP23 exibiram forte pigmentação alaranjada, quando comparados com o da cepa CRP59, como pode ser observado na Figura 3.16A. Consequentemente, os recombinantes CRP13 e CRP23 apresentaram maior crescimento celular, bem como produção específica e concentração intracelular de  $\beta$ -caroteno, de  $31,1 \pm 0,7$  mg.L<sup>-1</sup> ( $2,3 \pm 0,1$  mg.g cel<sup>-1</sup>) e  $37,5 \pm 2,8$  mg.L<sup>-1</sup> ( $2,6 \pm 0,2$  mg.g cel<sup>-1</sup>),

respectivamente, enquanto que o clone CRP59 sintetizou somente  $10,0 \pm 0,9 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $1,6 \pm 0,1 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) de β-caroteno, divergindo estatisticamente dos demais (Figura 3.16B).



**Figura 3.16.** Triagem dos recombinantes carotenogênicos em meio contendo glicerol como substrato. **(A)** Aliquotas retiradas ao final do cultivo. **(B)** Consumo de glicerol e produção de biomassa e β-caroteno pelas cepas recombinantes CRP13, CRP23 e CRP59, durante cultivo em frascos agitados a 28 °C e 200 rpm por 120 h. \* Indica diferença estatisticamente significativa - *One-Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ).

O emprego do meio MGP55 levou a uma redução no acúmulo intracelular de β-caroteno, de uma maneira geral, em comparação com os meios YPD e YNB. Isso pode estar relacionado não apenas com a fonte de carbono em si e a sua concentração, uma vez que o meio MGP55 continha 5,5% de glicerol puro e os meios YPD e YNB possuíam 2,0% de glicose, mas também as suas formulações, as quais diferem consideravelmente em termos de fonte de nitrogênio, sais e outros nutrientes para suprir as demandas da carotenogênese. Mesmo assim, no meio MGP55, as cepas CRP13 e CRP23 apresentaram um crescimento celular considerável ( $\approx 13 \text{ g.L}^{-1}$ ) e concentrações de β-caroteno levemente superiores às aquelas obtidas no meio YPD no mesmo tempo de cultivo. A cepa recombinante CRP23 apresentou

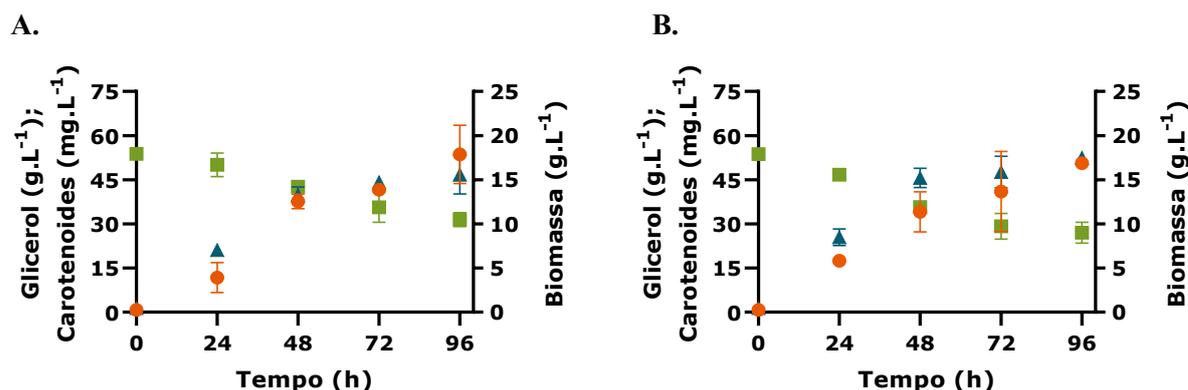
os melhores resultados de produção de biomassa celular e  $\beta$ -caroteno em todos os meios e condições avaliados, e por isso foi selecionada para os cultivos empregando diferentes resíduos industriais.

### 3.5.3. USO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682

O aspecto econômico é geralmente o primeiro parâmetro a ser avaliado na indústria biotecnológica. Por isso, o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis a partir do uso de resíduos orgânicos ou subprodutos industriais de baixo custo como matéria-prima para apoiar a produção de compostos de valor agregado, é uma abordagem crucial nos dias de hoje (DO; THERON; FICKERS, 2019). As leveduras não-convencionais têm demonstrado ser produtoras de carotenoides relevantes para fermentações em larga escala, apresentando capacidade de crescimento em glicerol e diversos resíduos agroindustriais, pelo fato destes fornecerem as fontes de carbono e nitrogênio necessárias, além de outros elementos para o metabolismo microbiano (MA et al., 2019; OTERO et al., 2019). Entretanto, esta abordagem ainda é pouco explorada em fermentações empregando linhagens de *Y. lipolytica* geneticamente modificada (WORLAND et al., 2020b).

Desse modo, a cepa recombinante IMUFRJ 50682 CRP23 foi cultivada no meio MGL55 para investigar a habilidade de produção de carotenoides a partir de glicerina loira como substrato alternativo de baixo custo, em comparação com o meio MGP55, cuja fonte de carbono é o glicerol puro. O meio MGL55 foi formulado para possuir a mesma concentração inicial de glicerol do MGP55 e, portanto, razão C/N semelhante (MGP55 = 35; MGL55 = 37), devido à presença de outros compostos contendo carbono em baixas concentrações na glicerina loira.

Ao longo de 96 h, a cepa recombinante IMUFRJ 50682 CRP23 mostrou o mesmo perfil metabólico em ambos os meios empregados (Figura 3.17). No meio MGP55, a cepa CRP23 atingiu  $15,6 \pm 2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa celular e produziu  $53,6 \pm 9,9 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $3,4 \pm 0,2 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) de carotenos totais, consumindo aproximadamente 40% do glicerol disponível (Figura 3.1A); enquanto que no meio MGL55, o acúmulo de biomassa da cepa CRP23 foi de  $17,5 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$  e a síntese de carotenos alcançou  $50,6 \pm 1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $2,9 \pm 0,2 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ), com o consumo de cerca de 50% do glicerol presente na glicerina loira (Figura 3.17B).



**Figura 3.17.** Produção de carotenos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 a 28 °C e 200 rpm durante 96 h. **(A)** Meio MGP55. **(B)** Meio MGL55. Biomassa (▲). Glicerol (■). Carotenoides (●).

Os parâmetros dos cultivos nos meios MGP55 e MGL55 estão apresentados na Tabela 3.10, e não apontaram diferenças estatisticamente significativas para produção volumétrica e específica de carotenos,  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$ , embora os valores tenham sido ligeiramente superiores em MGP55, sugerindo a viabilidade do emprego da glicerina loira na biossíntese de carotenos pela cepa IMUFRJ 50682 CRP23.

**Tabela 3.10.** Parâmetros dos cultivos de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 em meio definido MGP55 e MGL55.

| Parâmetros                                    | Meios de Produção |              |
|---|-------------------|--------------|
|   | MGP55             | MGL55        |
| <i>Carotenos Totais</i>                       |                   |              |
| Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )            | 53,61 ± 9,92      | 50,58 ± 1,22 |
| Produção específica (mg.g cel <sup>-1</sup> ) | 3,43 ± 0,16       | 2,90 ± 0,15  |
| $Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )                | 0,68 ± 0,02       | 0,64 ± 0,07  |
| $Y_{P/S}$ (mg.g <sup>-1</sup> )               | 2,36 ± 0,19       | 1,89 ± 0,30  |
| $Q_P$ (mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )  | 0,55 ± 0,10       | 0,52 ± 0,01  |
| pH final                                      | 1,78 ± 0,06       | 1,68 ± 0,01  |

\* Indica diferença estatística significativa - *T-test* (p < 0,05).

O pH final de ambas as fermentações mostraram valores baixos (< 2) (Tabela 3.10), em comparação com o valor inicial (≈ 6,75), o que pode estar relacionado com o consumo dos sais do meio e alteração do equilíbrio iônico, uma vez que a produção de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, foi inferior a 1,5 g.L<sup>-1</sup> nos diferentes ensaios. De acordo com Valduga et al. (2009), a biossíntese de carotenoides por microrganismos ocasiona mudanças

no pH como consequência do crescimento celular, decrescendo nas primeiras horas de produção e aumentando durante a fase intensa de carotenogênese. Entretanto, tal fato não foi observado para *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23.

A variação do pH tem influência decisiva no padrão metabólico da levedura *Y. lipolytica* durante processos de bioconversão (TOMASZEWSKA; RYWIŃSKA; GLADKOWSKI, 2012). Em estudo prévio, Egermeier et al. (2017) identificaram acidificação intensa (pH 1,8 - 2,2) ao final dos cultivos de diferentes linhagens selvagens de *Y. lipolytica*, incluindo H222, W29 e CBS6124, em meio definido contendo 5,0% de glicerol puro e pH inicial de 5,5. Os autores detectaram polióis em baixo pH, com uma maior produção de manitol seguido de eritritol, em resposta às condições adversas. Estes dados corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, visto que a cepa IMUFRJ 50682 CRP23 sintetizou  $4,5 \pm 0,8$  e  $2,9 \pm 0,3$  g.L<sup>-1</sup> de manitol e eritritol no meio MGP55, respectivamente; enquanto que no meio MGL55, secretou  $6,6 \pm 0,3$  g.L<sup>-1</sup> de manitol e  $3,0 \pm 0,4$  g.L<sup>-1</sup> de eritritol.

Workman, Holt e Thykaer (2013) também observaram a síntese de polioliol e apenas vestígios de ácido cítrico em fermentações de *Y. lipolytica* IBT 446 utilizando diferentes concentrações iniciais de glicerol (20 e 45 g.L<sup>-1</sup>) em meio mínimo. Nesse estudo, os resultados demonstraram que a formação de polioliol foi iniciada como consequência da limitação de oxigênio. De acordo com os autores, o raciocínio para a produção de polioliol durante esta limitação é que o excesso do cofator NADH que não pode ser oxidado por meio da fosforilação oxidativa, é usado para a biossíntese de manitol para recuperar o NAD<sup>+</sup> (WORKMAN; HOLT; THYKAER, 2013), enquanto que o favorecimento da via das PPP pode levar ao aumento dos substratos para a síntese de eritritol (TOMASZEWSKA et al., 2014)

Múltiplas estratégias moleculares com o intuito de melhorar a produção de  $\beta$ -caroteno e licopeno em *Y. lipolytica* foram descritas na literatura, as quais baseiam-se em aumentar a concentração de acetil-CoA citosólico e o seu direcionamento para a síntese constitutiva dos precursores limitantes, principalmente HMG-CoA e GGPP, bem como a formação e acúmulo de lipídios (MATTHÄUS et al., 2014; GAO et al., 2017; ZHAO et al., 2017; QIANG et al., 2020). Isso porque, maiores quantidades de lipídios estocados em corpúsculos poderiam ser importantes para a solubilização de carotenoides, reduzindo a formação de cristais e problemas de toxicidade que prejudicam a homeostase celular (LARROUDE et al., 2018a; LIU et al., 2020). Desse modo, tem sido proposto que as condições que favorecem o desenvolvimento destes compartimentos, também beneficiam os rendimentos de produção de carotenoides (MILLER; ALPER, 2019).

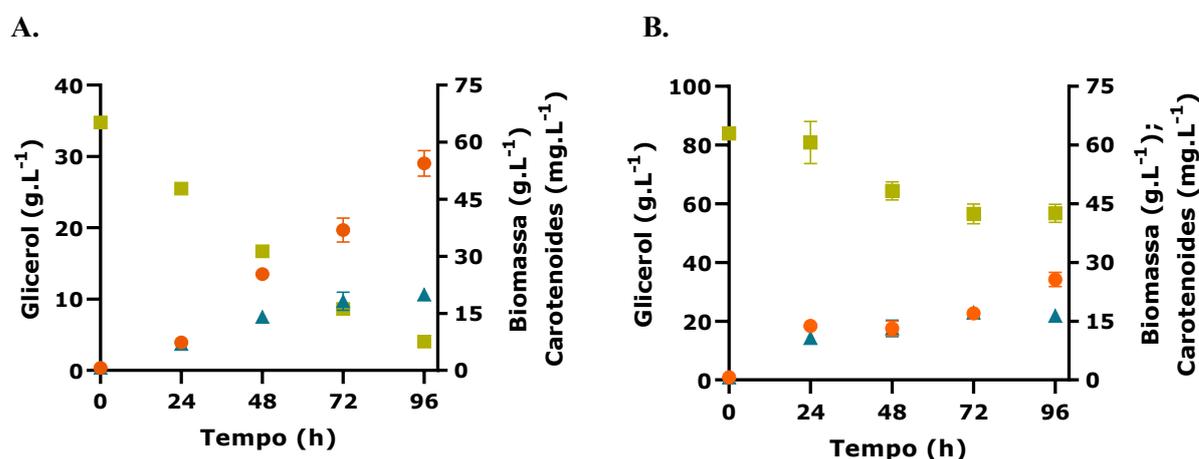
Em leveduras oleaginosas, a limitação de nitrogênio e elevada concentração de carbono é comumente usada para induzir o acúmulo de lipídios intracelulares. Contudo, o excesso de carbono pode levar a síntese de outros metabólitos, como o ácido cítrico, dependendo do pH (BEOPOULOS et al., 2009). Por isso, alguns estudos tem investigado a razão C/N ideal para atender as necessidades lipídicas durante o processo de produção de carotenoides por *Y. lipolytica* geneticamente modificada (GAO et al., 2017; LARROUDE et al., 2018a; JACOBSEN; LEDESMA-AMARO; MARTINEZ, 2020).

Assim, a fim de analisar o efeito da razão C/N do meio de cultivo na produção de carotenos pela cepa IMUFRJ 50682 CRP23, foram empregados os meios MGL35 e MGL85, cuja única alteração em relação ao meio MGL55 foi a quantidade de glicerina loira. Os meios MGL35 e MGL85 foram formulados com cerca de 4,2 e 10,2% deste subproduto para as concentrações iniciais de glicerol de 3,5 e 8,5% e proporções C/N de 23 e 57, respectivamente, visto que em estudo anterior, Das et al. (2017) observaram que a razão C/N de aproximadamente 60, levou ao aumento do acúmulo de lipídios na cepa selvagem IMUFRJ 50682, sem manipulações genéticas.

No geral, ambos os meios permitiram um crescimento celular satisfatório, entretanto, a biossíntese de carotenos foi favorecida na menor concentração inicial de glicerina loira e razão C/N (Figura 3.18). Em 96 h de cultivo no meio MGL35, a cepa IMUFRJ 50682 CRP23 consumiu cerca de 90% do glicerol disponível, obtendo uma produção máxima de  $19,9 \pm 0,3$  g.L<sup>-1</sup> de biomassa celular e  $54,4 \pm 3,4$  mg.L<sup>-1</sup> ( $2,73 \pm 3,4$  mg.g cel<sup>-1</sup>) de carotenos totais (Figura 3.18A). Por outro lado, embora a concentração de glicerol consumida não tenha divergido significativamente no meio MGL85, apenas 30% foi assimilado, o que refletiu em uma menor concentração de biomassa, de  $16,4 \pm 0,7$  mg.L<sup>-1</sup>, e uma drástica redução da síntese de carotenos, de  $25,6 \pm 1,8$  mg.L<sup>-1</sup> ( $1,56 \pm 0,1$  mg.g cel<sup>-1</sup>) (Figura 3.18B).

A comparação dos resultados dos cultivos obtidos para os três meios contendo glicerina loira como substrato estão apresentados na Tabela 3.11, e sugere uma correlação entre a razão C/N e a produção de carotenos por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23. Nos meios com as menores razões C/N (MGL35 = 23 e MGL55 = 37), a concentração, produção específica,  $Y_{P/S}$  e produtividade volumétrica de carotenos foram aproximadamente 2 vezes superiores do que no meio MGL85 (C/N = 57), discordando da hipótese inicial. Tal fato provavelmente está relacionado com a concorrência de diferentes vias pelo mesmo precursor, o acetil-CoA, que tem seu fluxo aumentado em situações distintas. No meio MGL85, a alta concentração de carbono e a diminuição da concentração de nitrogênio durante a proliferação

celular pode ter direcionado o acetil-CoA gerado para a via de síntese *de novo* de lipídios, enquanto que as vias de biossíntese de componentes celulares, como a do ergosterol (um importante contribuinte para a integridade da membrana celular, cujo precursor é o FPP) foram minimizadas, prejudicando a síntese de carotenos e seu acúmulo intracelular.



**Figura 3.18.** Produção de carotenos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 a 28 °C e 200 rpm durante 96 h. (A) Meio MGL35. (B) Meio MGL85. Biomassa (▲). Glicerol (■). Carotenoides (●).

**Tabela 3.11.** Parâmetros dos cultivos de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 nos meios definidos MGL35, MGL55 e MGL85 a partir do uso da glicerina loira como matéria-prima de baixo custo.

| Parâmetros                                    | Meios de Produção*        |                           |                           |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|   | MGL35                     | MGL55                     | MGL85                     |
| Glicerol Consumido (g.L <sup>-1</sup> )       | 30,72 ± 0,16 <sup>a</sup> | 26,70 ± 3,62 <sup>a</sup> | 27,25 ± 3,12 <sup>a</sup> |
| Biomassa Celular (g.L <sup>-1</sup> )         | 19,91 ± 0,32 <sup>a</sup> | 17,47 ± 0,49 <sup>b</sup> | 16,40 ± 0,69 <sup>b</sup> |
| <i>Carotenos Totais</i>                       |                           |                           |                           |
| Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )            | 54,43 ± 3,37 <sup>a</sup> | 50,58 ± 1,22 <sup>a</sup> | 25,64 ± 1,84 <sup>b</sup> |
| Produção Específica (mg.g cel <sup>-1</sup> ) | 2,73 ± 0,13 <sup>a</sup>  | 2,90 ± 0,15 <sup>a</sup>  | 1,56 ± 0,05 <sup>b</sup>  |
| $Y_{XS}$ (g.g <sup>-1</sup> )                 | 0,63 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 0,64 ± 0,07 <sup>a</sup>  | 0,58 ± 0,02 <sup>a</sup>  |
| $Y_{PS}$ (mg.g <sup>-1</sup> )                | 1,75 ± 0,12 <sup>a</sup>  | 1,89 ± 0,30 <sup>a</sup>  | 0,92 ± 0,17 <sup>b</sup>  |
| $Q_P$ (mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )  | 0,56 ± 0,04 <sup>a</sup>  | 0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 0,26 ± 0,02 <sup>b</sup>  |
| pH final                                      | 1,80 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 1,68 ± 0,01 <sup>b</sup>  | 1,76 ± 0,01 <sup>a</sup>  |
| <i>Co-produtos</i>                            |                           |                           |                           |
| Eritritol (g.L <sup>-1</sup> )                | 1,27 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 3,03 ± 0,36 <sup>b</sup>  | 3,90 ± 0,15 <sup>c</sup>  |
| Manitol (g.L <sup>-1</sup> )                  | 5,49 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 6,64 ± 0,28 <sup>b</sup>  | 4,27 ± 0,01 <sup>c</sup>  |

\* Letras diferentes indicam diferença estatística significativa - *One-Way ANOVA* (p < 0,05).

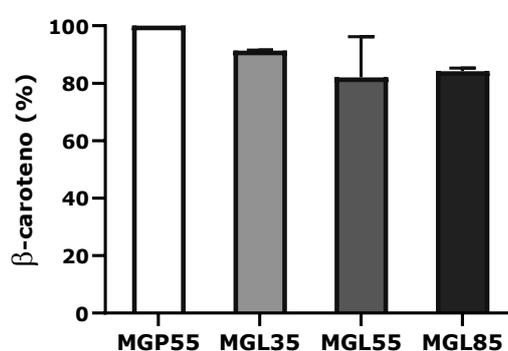
Além disso, o fornecimento do cofator NADPH é crítico para a biossíntese tanto de carotenoides quanto de lipídios. Isso porque, uma molécula de  $\beta$ -caroteno é produzida a partir de seis IPPs e dois DMAPPs, e a síntese de apenas um IPP ou DMAPP através da via do MVA requer dois NADPHs (LI; SWOFFORD; SINSKEY, 2020). Por outro lado, a formação de cadeias acil-CoAs também necessitam de dois NADPHs a cada etapa de alongamento a partir do malonil-CoA (BEOPOULOS et al., 2009). Portanto, o possível direcionamento para a síntese *de novo* de lipídios no meio MGL85 pode ter levado ao suprimento insuficiente de acetil-CoA e NADPH durante a carotenogênese na cepa IMUFRJ 50682 CRP23.

Jacobsen, Ledesma-Amaro e Martinez (2020) verificaram que razões C/N ainda mais baixas ( $< 10$ ) foram favoráveis para a produção de  $\beta$ -caroteno por *Y. lipolytica* ob-CHC<sup>TEF</sup>C<sup>TEF</sup>, em meios mínimos variando a concentração de glicerol puro como fonte de carbono. Similarmente, Somashekar e Joseph (2000) observaram que a produção de carotenoide pela levedura naturalmente produtora *R. gracilis* CRF-1AU foi cerca de 15 vezes maior na menor razão C/N testada (= 10). O aumento da concentração de nitrato de amônio para uma razão C/N de 160 favoreceu a síntese de lipídios, apontando correlação negativa entre tais eventos. Entretanto, alguns estudos indicando uma correlação positiva entre altas razões C/N (50-170) e rendimentos de produção de carotenoides por *R. glutinis* também são descritos na literatura (SAENGE et al. 2011; BRAUNWALD et al., 2013).

Assim como visto anteriormente, o pH ao final dos cultivos em MGL35 e MGL85 apresentou valores baixos ( $< 2$ ), embora a concentração de ácido cítrico tenha sido inferior a 0,5 g.L<sup>-1</sup> nas fermentações. Ademais, também foi observada a presença dos co-produtos manitol e eritritol ao final das 96 h. Curiosamente, a proporção manitol/eritritol encontrada no meio extracelular diminuiu com o aumento da concentração inicial de glicerina loira nos meios MGL35, MGL55 e MGL85 (Tabela 3.11). Isso pode ser referente à presença de sais residuais nesse substrato, principalmente NaCl. Conseqüentemente, na maior concentração de glicerina loira, a maior disponibilidade de NaCl favoreceu a produção de eritritol em relação ao manitol, conforme relatado por Yang et al. (2014).

O uso da glicerina loira a 4,2% no meio definido contendo apenas sais (MGL35), levou a produção de carotenos em concentrações ligeiramente superiores àquelas encontradas nos ensaios prévios utilizando substratos purificados. Desse modo, a fim de identificar se o emprego desse subproduto industrial levou a diminuição da conversão de algum intermediário tetraterpeno a  $\beta$ -caroteno pela ação das enzimas fitoeno desidrogenase e fitoeno sintase/licopeno ciclase, foram realizadas análises cromatográficas dos compostos extraídos (Apêndice 8).

Como pode ser observado na Figura 3.19, o conteúdo de  $\beta$ -caroteno acumulado pela cepa IMUFRJ 50682 CRP23 cultivada nos meios MGL35, MGL55 e MGL85 apresentou  $91,4 \pm 0,2$ ,  $82,1 \pm 14,2$  e  $84,2 \pm 1,1\%$  de pureza, respectivamente, sugerindo que a presença de contaminantes presentes na glicerina loira interferiu na formação de  $\beta$ -caroteno. Contudo, a presença de outros carotenos enriquece as propriedades bioativas do produto gerado. Por exemplo, o licopeno possui propriedades comerciais relevantes, como a atividade antioxidante, a qual é descrita como sendo superior à do  $\beta$ -caroteno (BRITTON, 1995).

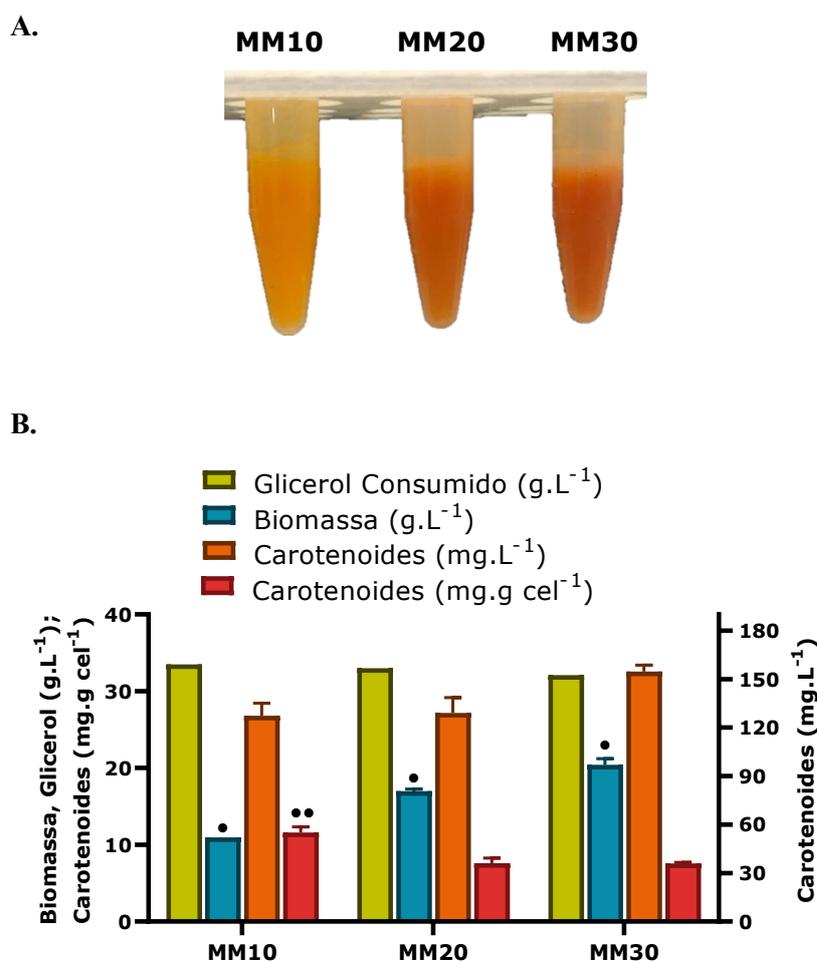


**Figura 3.19.** Pureza do  $\beta$ -caroteno extraído durante o cultivo nos meios MGP55, MGL35, MGL55 e MGL85.

Além da glicerina loira, outro resíduo de interesse para a biotecnologia é a milhocina, devido à sua riqueza nutricional para processos fermentativos. Em estudos anteriores do grupo BIOSE - EQ/UFRJ com a linhagem selvagem IMUFRJ 50682, este subproduto agroindustrial foi eficientemente utilizado como fonte de nitrogênio para bioconversão em biossurfactantes (SANTOS et al., 2018) e em eritritol (SILVA et al., 2019). Por essa razão, a milhocina foi utilizada no presente trabalho para a avaliação do seu efeito na produção de carotenoides.

Uma vez que entre os meios empregados, o meio MGL35 apresentou os maiores valores de produção volumétrica e produtividade de carotenos pela cepa IMUFRJ 50682 CRP23 ( $54,4 \pm 3,4 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,56 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente) com maior taxa de conversão dos intermediários em  $\beta$ -caroteno ( $91,4 \pm 0,2\%$ ), a concentração inicial de glicerina loira foi mantida em 4,2% (3,5% de glicerol) e diferentes concentrações de milhocina foram utilizadas em substituição aos demais componentes do meio. O meio MM10, MM20 e MM30 foram formulados apenas com glicerina loira e 1%, 2% e 3% de milhocina.

Após 96 h de cultivo, a cepa IMUFRJ 50682 CRP23 foi capaz de crescer nos meios MM10, MM20 e MM30 e os cultivos apresentaram forte pigmentação alaranjada (Figura 3.20A). O glicerol disponível nos três meios foi totalmente consumido, embora a produção de biomassa tenha divergido significativamente. A maior concentração de milhocina favoreceu o crescimento celular e a produção volumétrica de carotenos, atingindo  $20,4 \pm 3,4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $154,7 \pm 3,9 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente, no meio MM30. Consequentemente, a produção específica de carotenoides foi menor, de  $7,6 \pm 0,11 \text{ mg.g cel}^{-1}$ , em comparação com os outros meios, e não diferiu estatisticamente para o meio MM20. No meio MM10, o acúmulo intracelular de carotenoides foi significativamente maior em relação ao demais, de  $11,6 \pm 0,7 \text{ mg.g cel}^{-1}$ , por efeito da menor produção de biomassa celular, devido à baixa concentração de milhocina (Figura 3.20B).



**Figura 3.20.** Produção de carotenos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 a partir de 3,5% de glicerina loira e diferentes concentrações de milhocina (MM10 = 1%, MM20 = 2%, MM30 = 3%), durante cultivo em frascos agitados a 28 °C, 200 rpm e 96 h. • Indica diferença estatística entre os dados - *One-Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ).

Assim, os resultados demonstram que a concentração inicial de carbono nos meios empregados teve efeito inverso entre a produção volumétrica e específica de carotenos (Tabela 3.12), corroborando com os dados de Larroude et al. (2018a). Os autores observaram que há uma compensação entre produção volumétrica e específica de β-caroteno, pois a maior concentração (1,50 g.L<sup>-1</sup>) foi obtida no meio YPD60 (6% de glicose), enquanto que o maior acúmulo (0,05 g.g<sup>-1</sup>) foi notado no meio YPD10 (1% de glicose), em cultivos com a cepa superprodutora *Y. lipolytica* ob-CHC<sup>TEF</sup>C<sup>TEF</sup> (LARROUDE et al., 2018a).

**Tabela 3.12.** Parâmetros dos cultivos de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 CRP23 nos meios contendo apenas resíduos industriais MM10, MM20 e MM30.

| Parâmetros  | Meios de Produção          |                            |                            |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|   | MM10                       | MM20                       | MM30                       |
| Biomassa Celular (g.L <sup>-1</sup> )                       | 10,97 ± 0,00 <sup>a</sup>  | 16,98 ± 0,26 <sup>b</sup>  | 20,40 ± 0,80 <sup>c</sup>  |
| <i>Carotenos Totais</i>                                     |                            |                            |                            |
| Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )                          | 127,25 ± 7,84 <sup>a</sup> | 129,10 ± 9,47 <sup>a</sup> | 154,73 ± 3,92 <sup>a</sup> |
| Produção Específica (mg.g cel <sup>-1</sup> )               | 11,60 ± 0,72 <sup>a</sup>  | 7,61 ± 0,67 <sup>b</sup>   | 7,59 ± 0,11 <sup>b</sup>   |
| <i>Y<sub>X/S</sub></i> (mg.g <sup>-1</sup> )                | 0,30 ± 0,00 <sup>a</sup>   | 0,49 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 0,61 ± 0,03 <sup>c</sup>   |
| <i>Y<sub>P/S</sub></i> (mg.L <sup>-1</sup> )                | 3,78 ± 0,23 <sup>a</sup>   | 3,89 ± 0,29 <sup>a,b</sup> | 4,80 ± 0,12 <sup>b</sup>   |
| <i>Q<sub>P</sub></i> (mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | 1,32 ± 0,08 <sup>a</sup>   | 1,34 ± 0,10 <sup>a</sup>   | 1,61 ± 0,04 <sup>a</sup>   |
| pH final  | 3,06 ± 0,07 <sup>a</sup>   | 4,87 ± 0,16 <sup>b</sup>   | 8,54 ± 0,00 <sup>c</sup>   |

\* Letras diferentes indicam diferença estatística significativa - *One-Way ANOVA* (p < 0,05).

Ao final dos cultivos, o pH variou de acordo com a concentração de milhocina. Em MM10 e MM20, o pH do se tornou ácido (< 5) e foi observado a produção de 2,6 ± 0,2 g.L<sup>-1</sup> de manitol e 3,0 ± 0,4 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, enquanto que em MM20 foi verificada apenas a produção de 1,2 ± 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico. Contrariamente, em MM30, o pH se tornou básico (> 8) e nenhum co-produto foi identificado nos sobrenadantes, conforme observado nos cultivos da cepa IMUFRJ 50682 CRP23 em MGL35, MGL55 e MGL85, o que pode estar relacionado ao re-consumo dos compostos gerados após o esgotamento do glicerol dos meios (EGERMEIER et al., 2017). Silva et al. (2012) e Otero et al. (2019) verificaram comportamento semelhante em outras espécies naturalmente carotenogênicas, como *S. parvoseus*, *R. mucilaginoso*, *Pichia fermentis* e *Phaffia rhodozyma*, onde durante a biossíntese de carotenoides as oscilações no pH do meio de cultura ocorreram como consequência da proliferação celular, liberação de compostos na fase de adaptação e re-assimilação dos metabólitos sintetizados.

A substituição dos sais por milhocina nos meios MM10, MM20 e MM30 elevaram a concentração final de carotenos em mais de 2,3 vezes, em comparação com o meio definido MGL35 ( $54,4 \pm 3,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ao passo que a produção específica ( $2,73 \pm 3,4 \text{ mg.g}^{-1}$ ) foi melhorada em 4,3 vezes durante o cultivo em MM10, e 2,8 vezes em MM20 e MM30. Isso pode estar relacionado com a composição da milhocina, a qual é rica em diversos minerais e vitaminas, incluindo biotina, riboflavina, ácido pantotênico e tiamina, que são importantes para o metabolismo celular, especialmente para a biossíntese de ácidos graxos, precursor de cofatores e proteínas envolvidas no transporte de elétrons, precursor da coenzima A e reações de  $\alpha$ -descarboxilação, respectivamente (MANDIGAN; MARTINO; PARKER, 2010).

De acordo com Machado e Burket (2015), a prática de substituir total ou parcialmente um meio comercial complexo por subprodutos é interessante, uma vez que a presença de microelementos pode potencializar a bioprodução desejada. Ao comparar os resultados dos meios contendo apenas os resíduos industriais com os obtidos para os meios YPD e YNB, a produção volumétrica de carotenos foi aumentada em mais de 3,9 e 2,5 vezes, respectivamente, enquanto que a produção específica foi 2,5 vezes maior no meio MM10, e 1,6 vezes superior nos demais (MM20 e MM30), evidenciando a aplicabilidade concomitante da glicerina loira e milhocina como substrato alternativo. Paralelamente ao desenvolvimento do presente estudo, Tomaszewska-Hetman, Rymowicz e Rywińska (2020) otimizaram as concentrações destes resíduos industriais para produção de eritritol por *Y. lipolytica* A-6 em biorreatores de bancada. Em meio contendo exclusivamente milhocina ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ) e glicerol bruto derivado da produção de biodiesel ( $220 \text{ g.L}^{-1}$ ), a cepa A-6 foi capaz de secretar altas concentrações de eritritol ( $> 100 \text{ g.L}^{-1}$ ), o que segundo os autores comprova que a milhocina pode substituir com sucesso fontes tradicionais de nitrogênio e outros nutrientes sem comprometer as atividades enzimáticas necessárias para a síntese do composto de interesse.

A glicerina bruta, milhocina e outros resíduos industriais têm sido extensivamente explorados em bioprocessos de produção de carotenoides por leveduras naturalmente carotenogênicas (MATA-GÓMEZ et al., 2014). Urnau et al. (2019) analisaram a produção de tais compostos a partir da levedura *P. rhodozyma* Y-17268 em fermentações em biorreator, utilizando glicerina bruta ( $100 \text{ g.L}^{-1}$ ), milhocina ( $100 \text{ g.L}^{-1}$ ) e águas residuárias do processo de parboilização do arroz ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) como substrato. A recuperação total de carotenoides foi  $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $0,6 \text{ mg.g cel}^{-1}$ ) após 60 h, onde 95% dos carotenoides foi identificado como  $\beta$ -caroteno. Rodrigues et al. (2019) avaliaram a produção de carotenoides pela cepa *R. mucilaginosa* CCT 768 em fermentações em batelada alimentada, usando melaço ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e

milhocina (6,5 g.L<sup>-1</sup>) como matéria-prima de baixo custo. A produção de carotenoides totais alcançou 3,7 mg.L<sup>-1</sup>, com um aumento de aproximadamente 400% em comparação com o processo em batelada. Da Silva et al. (2020) investigaram o uso da glicerina loira (30 g.L<sup>-1</sup>) na produção de carotenoides por *R. minuta* URM669. A produção volumétrica máxima foi de 17,2 mg.L<sup>-1</sup> às 48 h, e a cepa produziu 1,02 mg.L<sup>-1</sup> de β-caroteno. Estes estudos revelam o potencial da cepa IMUFRJ 50682 CRP23 para a produção de carotenoides a ser explorado.

A Tabela 3.13 reúne alguns trabalhos recentes da literatura, onde linhagens da espécie *Y. lipolytica* foram engenheiradas para a síntese de carotenoides, em especial o β-caroteno, destacando as modificações genéticas empregadas, produção volumétrica, produtividade e substratos utilizados, para comparação com os resultados obtidos no presente estudo.

**Tabela 3.13.** Estratégia gênica, produção volumétrica, produtividade e substrato empregado para produção de carotenos por *Yarrowia lipolytica* recombinante em cultivo em frascos agitados.

| Linhagem <sup>a</sup> | Estratégia Genética <sup>b</sup>   | Carotenos (mg.L <sup>-1</sup> ) | Q <sub>Caroteno</sub> (mg.L.h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup> | Substrato                                      | Referência              |
|-----------------------|--|---------------------------------|--|--|-------------------------|
| IMUFRJ 50682 CRP23    | <i>carB(1), carRP(1), GGS1(1)</i>  | 154,7 ± 3,9                     | 1,6  | Glicerina loira (3,5%) e milhocina (3%)        | Este trabalho           |
| CIBTS 1626            | <i>Δku70, carB(1), carRP(2), ↑GGS1(1), ↑tHMGR(3),</i>  | 137,0 ± 14,0                    | 1,4  | Glicose (2%)<br>Peptona (2%)<br>EL (1%)        | Gao et al. (2017)       |
| ob-CHC                | <i>↑DGA2(1); ↑GPD1(1), ΔPOXI-6, ΔTGL4, carB(2), carRP(2), ↑GGS1(2), ↑tHMG1(1)</i>                                      | 175,6                           | 1,8  | Glicose (1%)<br>Peptona (1%)<br>EL (1%)        | Larroude et al. (2018a) |
| S94026                | <i>carB(1), carRP(1), GGS1(1)</i>  | 68,8 ± 10,8                     | 0,7  | Glicose (2%)<br>YNB (0,17%)                    | Bruder et al. (2020)    |
| CLIB138               | <i>carB(1), carRP(1), ↑ACAT(1), NphT7(1), ↑MPD(1), ↑MK(1), ↑tHMG(1), ↑HMGS(1), ↑PMK(1), IPI(1), ↑FPPS(1), ↑GGS1(1)</i> | 121,0 ± 13,0                    | 1,7  | Óleo de Canola (2%)<br>Peptona (2%)<br>EL (1%) | Worland et al. (2020)   |

---

**Continuação**


---

|     |   |             |     |   |                        |
|-----|---|-------------|-----|---|------------------------|
| XK7 | <i>carB</i> (2), <i>carRP</i> (3),<br>↑ <i>GGSI</i> (1), ↑ <i>HMG</i> (1),<br><i>POX2-3Δ</i> , <i>MFEΔ</i> ,<br><i>APXΔ</i> | 128,1 ± 2,6 | 1,3 | Glicose (2%)<br>Peptona (2%)<br>EL (1%) | Zhang et al.<br>(2020) |
|-----|---|-------------|-----|---|------------------------|

---

<sup>a</sup>CIBTS 1626, ob-CHC e XK7 são cepas intermediárias e sofreram modificações genéticas adicionais para os rendimentos finais descritos nos respectivos estudos.

<sup>b</sup>Os genes utilizados nas estratégias codificam para as enzimas: *carB*-fitoeno desidrogenase (*M. circinelloides*); *carRP*-fitoeno sintase/licopeno ciclase (*M. circinelloides*); *GGSI*-geranylgeranyl difosfato sintase; (*t*)*HMG*-HGM-CoA redutase (*t*=truncada para segmentação citosólica); *HMG*S-HGM-CoA sintase; *FPPS*-farnesil pirofosfato sintase; *ACAT*-acetil-CoA tiolase; *ERG10*-acetoacetil-CoA tiolase; *MK*-mevalonato quinase; *PMK*-fosfomevalonato quinase; *MPD*-mevalonato pirofosfato descarboxilase quinase; *DGA2*-aciltransferase; *GPD1*-glycerol-3-fosfato desidrogenase; *TGL4*-lipase intracelular; *POX1-6*-acil-CoA oxidases 1-6; *ku70*-helicase dependente de ATP; *IPI*-IPP isomerase (*Haemotoccus pluvisialis*); *NphT7*-acetoacetil-CoA (*Streptomyces* sp.). Os números entre parênteses indicam a quantidade de cópias de cada gene, ↑ assinala os genes homólogos superexpressos e Δ aponta os genes nocauteados.

<sup>c</sup>Valores calculados de acordo com as informações fornecidas nos trabalhos. *EL*: extrato de levedura.

Embora a linhagem brasileira IMUFRJ 50682 tenha sido engenheirada para a biossíntese de β-caroteno através da clonagem de apenas dois genes heterólogos (*carB* e *carRP*) e superexpressão de um gene homólogo (*GGSI*), a produção volumétrica e a produtividade do bioprocesso em meio simples composto somente de glicerina loira e milhocina, foi bastante similar aos valores observados em alguns estudos prévios com cepas de *Y. lipolytica* contendo uma série de modificações genéticas, na maioria dos casos, tais como: múltiplas cópias dos genes que codificam as enzimas chave para a carotenogênese e para o aumento do fluxo dos intermediários (principalmente, HMG-CoA, IPPs, DMAPPs e GGPP); bem como o nocaute de genes endógenos para evitar o consumo excessivo dos precursores em vias concorrentes e favorecer o acúmulo de lipídios em corpúsculos para o estoque de carotenoides sem efeitos citotóxicos. Além disso, os resultados descritos para as cepas CIBTS 1626, ob-CHC, S94026, CLIB138 e XK7 são relativos à cultivos em meios dispendiosos, pouco atrativos para o escalonamento industrial (Tabela 3.13).

Assim, a cepa IMUFRJ 50682 CRP23 se mostrou promissora para a produção de carotenoides a partir de resíduos industriais. Contudo, ainda existem grandes desafios no uso de leveduras não-convencionais para a biossíntese de β-caroteno. A compreensão metabólica detalhada é necessária para realizar a engenharia racional de linhagens, mas lacunas de conhecimento ainda existem no que tange o metabolismo de *Y. lipolytica* carotenogênica, principalmente em relação ao uso de subprodutos industriais.

### 3.6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- A estratégia combinatória de clivagem dupla empregando a tecnologia CRISPR/Cas9 levou a excisão de toda sequência codificante do gene do *URA3* da cepa selvagem brasileira *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, mesmo sem sua informação genética, com eficiência de 5 - 28%;
- As características dos sgRNAs relacionadas com bases proximais ao PAM ricas em pirimidinas e possibilidades de formação de estruturas secundárias podem afetar o reconhecimento do DNA alvo e atividade nucleásica da proteína Cas9;
- Os mutantes *ura3 $\Delta$*  IMUFRJ 50682 foram transformados a partir de cassetes de expressão contendo sítios de inserção zeta, com eficiência de clonagem do gene *RedStarII* de 80 – 100%. Entretanto, a clonagem de fragmentos maiores contendo três cassetes de expressão dos genes *carB*, *carRP* e *GGS1*, para a síntese de  $\beta$ -caroteno, levou a um menor número de clones positivos;
- As cepas recombinantes IMUFRJ 50682 CRP foram capazes de sintetizar de 18,5 a 50,1 mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno, com a produção específica variando de 2,4 a 4,8 mg.g cel<sup>-1</sup> em meio rico e mínimo, contendo glicose como fonte de carbono;
- O emprego da glicerina loira em meio definido permitiu a síntese de 50,6 mg.L<sup>-1</sup> (2,9 mg.g cel<sup>-1</sup>) de carotenos pela cepa recombinante IMUFRJ 50682 CRP23, e a redução da razão C/N levou a produção de 54,4 mg.L<sup>-1</sup> (2,7 mg.g cel<sup>-1</sup>), com conteúdo de 91% de  $\beta$ -caroteno;
- A substituição dos componentes do meio por milhocina teve efeito positivo na síntese de carotenoides pela cepa IMUFRJ 50682 CRP23. Em meio composto de 4,2% de glicerina loira e 1% de milhocina, a produção de carotenos atingiu 127,2 mg.L<sup>-1</sup> (11,6 mg.g cel<sup>-1</sup>) e produtividade de 4,8 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. O aumento da concentração de milhocina para 3% levou a uma produção de 154,7 mg.L<sup>-1</sup> (7,6 mg.g cel<sup>-1</sup>) e produtividade de 4,8 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, revelando o potencial dessa cepa a ser explorado.

## CONCLUSÃO GERAL

---

O presente trabalho explorou o potencial biotecnológico da levedura não-convencional *Y. lipolytica* para a produção de diferentes metabólitos de interesse industrial utilizando substratos alternativos. De maneira geral, foram empregadas diversas técnicas de biologia sintética eficientemente, visando o desenvolvimento de cepas recombinantes capazes de produzir MEL e  $\beta$ -caroteno. Enquanto que a construção de uma plataforma alternativa para a produção de MEL empregou cepas laboratoriais derivadas da linhagem W29, com as características genéticas e metabólicas bem estabelecidas, a produção de  $\beta$ -caroteno foi alcançada pela cepa selvagem brasileira IMUFRJ 50682 que, embora venha sendo extensivamente estudada para um maior conhecimento sobre o seu potencial fisiológico intrínseco, pouco se sabe sobre suas peculiaridades genéticas. Contudo, a recente tecnologia CRISPR/Cas9 permitiu a edição do genoma da cepa selvagem IMUFRJ 50682 para a construção de mutantes auxotróficos pacíficos de outras modificações genéticas por ferramentas mais extensivamente empregadas, configurando, desse modo, o início de uma ampla gama de possibilidades.

# PERSPECTIVAS FUTURAS

---

As principais perspectivas futuras do trabalho envolvem:

- Avaliação da atividade das enzimas Mac1 e Mac2 com segmentação citosólica e peroxissomal pelo fornecimento de ácidos graxos nos meios de cultivo. Portanto serão necessários a construção de novos vetores para a reinserção do PTS1 nas aciltransferases e desenvolvimento de novos recombinantes a partir da cepa JME<sup>-</sup>;
- Estabelecimento de um método de detecção e quantificação direta de MELs do sobrenadante, mesmo em baixas concentrações, a partir de substratos de natureza hidrofílica e hidrofóbica;
- Investigação de matérias-primas alternativas para emprego como fonte de carbono e energia de baixo custo para as cepas produtoras de MELs;
- Superexpressão de genes da via do MVA para aumentar o aporte de precursores de isoprenos na cepa IMUFRJ 50682 CRP23, a fim de aumentar o rendimento de produção de  $\beta$ -caroteno;
- Otimização da produção de  $\beta$ -caroteno em biorreatores de bancada a partir dos resíduos industriais glicerina loira e milhocina como meio de fermentação.
- Verificação da atividade catalítica do peptídeo F2A em *Y. lipolytica* utilizando os genes *carB*, *carRP*, *GGS1* e/ou *tHGM*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; MARKHAM, K. A.; PALMER, C. M.; LIU, N.; STEPHANOPOULOS, G.; ALPER, H. S. Metabolig engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, v. 50, p 192-208, 2018.
- ABDUL RAMAN, A. A.; TAN, H. W.; BUTHIYAPPAN, A. Two-step purification of glycerol as a value added by product from the biodiesel production process. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. 774, 2019.
- ABBOTT. **Ensure®**. Disponível em: <https://www.ensure.abbott/br>. Acesso em: jun. de 2020.
- ABBOTT. **Pivot®**. Disponível em: [https://abbottnutrition.com/pivot-1\\_5-cal.html](https://abbottnutrition.com/pivot-1_5-cal.html). Acesso em: jun. de 2020.
- ADIKUSUMA, F.; PFITZNER, C.; THOMAS, P. Q. Versatile single-step-assembly CRISPR/Cas9 vectors for dual gRNA expression. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1-11, 2017.
- ALANI, E.; CAO, L.; KLECKNER, N. A Method for gene disruption that allows repeated use of. **Genetics**, v. 116, n. 1972, p. 541-545, 1987.
- ALCAÍÑO, J.; BAEZA, M.; CIFUENTES, V. Carotenoid distribution in nature. In: Stange C. (eds) **Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry**, v. 79. Springer, Cham. 2016.
- ÁLVAREZ, R.; VAZ, B.; GRONEMEYER, H.; DE LERA, R. A. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 1-125, 2014.
- AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894-1898, 2006a.
- AMARAL, P. F. F.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A. M. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; COELHO, M. A. Z.; COUTINHO, J. A. P. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. **Yeast**, v. 23, n. 12, p. 867-77, 2006b.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. de A. C. e S.; FARO, Z. P. De. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, 2006.
- ANDRADE, C. J. De; ANDRADE, L. M. De; ROCCO, S. A.; SFORÇA, M. L.; PASTORE, G. M.; JAUREGI, P. A novel approach for the production and purification of mannosylerythritol lipids (MEL) by *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater as substrate. **Separation and Purification Technology**, v. 180, p. 157-167, 2017.
- ARUTCHELVI, J. I.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Mannosylerythritol lipids: A review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1559-1570, 2008.
- ATKINS, J. F.; WILLS, N. M.; LOUGHRAN, G.; WU, C. Y.; PARSAWAR, K.; RYAN, M. D.; WANG, C. H.; NELSON, C. C. A case for “StopGo”: Reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go). **RNA**, v. 13, n. 6, p. 803-810, 2007.
- BACK, A.; ROSSIGNOL, T.; KRIER, F.; NICAUD, J. M.; DHULSTER, P. High-throughput fermentation screening for the yeast *Yarrowia lipolytica* with real-time monitoring of biomass and lipid production. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2016.
- BAGHBAN, R.; FARAJNIA, S.; RAJABIBAZL, M.; GHASEMI, Y.; MAFI, A. A.; HOSEINPOOR, R.; RAHBARNIA, L.; ARIA, M. Yeast expression systems: overview and recent advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365-384, 2019.
- BAGY, M. M. K.; ABD-ALLA, M. H.; NAFADY, N. A.; MORSY, F. M.; MAHMOUD, G. A. E. Bioconversion of plant wastes to  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula glutinis* KU550702. **European Journal of Biological Research**, v. 6, n. 4, p. 226-241, 2016.

- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 234-244, 2014.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.
- BASF. **Betatene® Natural Beta-Carotene**. Disponível em: <https://nutrition.basf.com/global/en/human-nutrition/products/betatene-naturalbeta-carotene.html>. Acesso em: jun. de 2020.
- BECK, A.; HAITZ, F.; GRUNWALD, S.; PREUSS, L.; RUPP, S.; ZIBEK, S. Influence of microorganism and plant oils on the structure of mannosylerythritol lipid (MEL) biosurfactants revealed by a novel thin layer chromatography mass spectrometry method. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 8, p. 1191-1204, 2019.
- BECK, A.; WERNER, N.; ZIBEK, S. Mannosylerythritol Lipids: Biosynthesis, Genetics, and Production Strategies. In: Hayes D.; Solaiman D.; Ashby R. (eds) **Biobased Surfactants**, v. 1, p. 121-167, 2019.
- BECKERICH, J. M.; BOISRAMÉ-BAUDEVIN, A.; GAILLARDIN, C. *Yarrowia lipolytica*: A model organism for protein secretion studies. **International Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 123-130, 1998.
- BEOPOULOS, A.; VERBEKE, J.; BORDES, F.; GUICHERD, M.; BRESSY, M.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 251-262, 2014.
- BEOPOULOS, A.; NEUVE, C.; AGRO-INDUSTRIELLE, C. D. B.; TECHNOLOGY, M. The hydrocarbon-degrading oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Timmis, K. N.; McGenity, T. J.; Van der Meer, J. R.; de Lorenzo, V. (Eds.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, v. 1, p. 2111-2121, 2011.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 375-387, 2009.
- BEOPOULOS, Athanasios; NICAUD, J. M. Yeast: A new oil producer? **OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2012.
- BLAZECK, J.; HILL, A.; LIU, L.; KNIGHT, R.; MILLER, J.; PAN, A.; OTOUPAL, P.; ALPER, H. S. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-10, 2014.
- BOGACZ-RADOMSKA, L.; HARASYM, J.  $\beta$ -Carotene-properties and production methods. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 2, p. 69-74, 2018.
- BOGACZ-RADOMSKA, L.; HARASYM, J.; PIWOWAR, A. Commercialization aspects of carotenoids. **Carotenoids: Properties, Processing and Applications**. Academic Press, p. 327-357, 2020.
- BORDES, F.; FUDALEJ, F.; DOSSAT, V.; NICAUD, J. M.; MARTY, A. A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 3, p. 493-502, 2007.
- BRAUNWALD, T.; SCHWEMMLEIN, L.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; HOLMES, W. E.; CLAUPEIN, W. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6581-6588, 2013.

- BREDEWEG, E. L.; POMRANING, K. R.; DAI, Z.; NIELSEN, J.; KERKHOVEN, E. J.; BAKER, S. E. A molecular genetic toolbox for *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-22, 2017.
- BRÍGIDA, A.; AMARAL, P.; GONÇALVES, L.; DA ROCHA-LEÃO, M. H.; COELHO, M. *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682: Lipase Production in a Multiphase Bioreactor. **Current Biochemical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 65-74, 2014.
- BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.
- BROWN, A. D. Microbial water stress. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 4, p. 803, 1976.
- BRUDER, S.; MELCHER, F. A.; ZOLL, T.; HACKENSCHMIDT, S.; KABISCH, J. Evaluation of a *Yarrowia lipolytica* Strain collection for its lipid and carotenoid production capabilities. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 1, p. 1900172, 2020.
- BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; DA SILVA, S. S. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.
- CAI, P.; GAO, J.; ZHOU, Y. CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2019.
- CARDOSO, L. A. C.; KARP, S. G.; VENDRUSCOLO, F.; KANNO, K. Y. F.; ZOZ, L. I. C.; CARVALHO, J. C. Biotechnological production of carotenoids and their applications in food and pharmaceutical products. In: **Carotenoids**. InTech Open, 2017. p. 125.
- CARLY, F.; STEELS, S.; TELEK, S.; VANDERMIES, M.; NICAUD, J. M.; FICKERS, P. Identification and characterization of EYD1, encoding an erythritol dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its application to bioconvert erythritol into erythrulose. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 963-969, 2018.
- CARLY, F.; VANDERMIES, M.; TELEK, S.; STEELS, S.; THOMAS, S.; NICAUD, J. M.; FICKERS, P. Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 42, n. 1, p. 19-24, 2017.
- CASAREGOLA, S.; NEUVÉGLISE, C.; LÉPINGLE, A.; BON, E.; FEYNEROL, C.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; GAILLARDIN, C. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. **FEBS Letters**, v. 487, n. 1, p. 95-100, 2000.
- CAVALLO, E.; NOBILE, M.; CERRUTTI, P.; FORESTI, M. L. Exploring the production of citric acid with *Yarrowia lipolytica* using corn wet milling products as alternative low-cost fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 155, p. 107463, 2020.
- CBD - SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. **Synthetic Biology. Part I: Potential Impacts of Synthetic Biology on Biological Diversity. Part II: Gaps and Overlaps with the Provisions of the Convention and Other Agreements**. 2015. Disponível em: <https://reviverestore.org/wp-content/uploads/2015/04/CBD-Technical-Series-No.-82-Synthetic-Biology-Web.pdf>. Acesso em: mar. de 2020.
- CELIŃSKA, E.; KUBIAK, P.; BIAŁAS, W.; DZIADAS, M.; GRAJEK, W. *Yarrowia lipolytica*: The novel and promising 2-phenylethanol producer. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3-4, p. 389-392, 2013.
- CELIŃSKA, Ewelina; LEDESMA-AMARO, R.; LARROUDE, M.; ROSSIGNOL, T.; PAUTHENIER, C.; NICAUD, J. M. Golden Gate Assembly system dedicated to complex pathway manipulation in *Yarrowia lipolytica*. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 450-455, 2017.
- CHAO, R.; YUAN, Y.; ZHAO, H. Recent advances in DNA assembly technologies. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.
- CHEN, D. C.; BECKERICH, J. M.; GAILLARDIN, C. One-step transformation of the dimorphic

- yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 232-235, 1997.
- CHI, Z.; WANG, F.; WANG, L.; LI, J.; WANG, X. Selection of *Yarrowia lipolytica* strains with high protein content from yeasts isolated from different marine environments. **Journal of Ocean University of China**, v. 6, n. 4, p. 360-364, 2007.
- CHO, K. S.; SHIN, M.; KIM, S.; LEE, S. B. Recent advances in studies on the therapeutic potential of dietary carotenoids in neurodegenerative diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.
- CHUANG, L. Te; CHEN, D. C.; NICAUD, J. M.; MADZAK, C.; CHEN, Y. H.; HUANG, Y. S. Co-expression of heterologous desaturase genes in *Yarrowia lipolytica*. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 277-282, 2010.
- COELHO, M. a Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica* : an industrial workhorse. **Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 930-944, 2010.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two Bacillus species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- CZAJKA, J. J.; NATHENSON, J. A.; BENITES, V. T.; BAIDOO, E. E. K.; CHENG, Q.; WANG, Y.; TANG, Y. J. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce the aroma compound  $\beta$ -ionone. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 136, 2018.
- CZAJKA, J.; WANG, Q.; WANG, Y.; TANG, Y. J. Synthetic biology for manufacturing chemicals: constraints drive the use of non-conventional microbial platforms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 20, p. 7427-7434, 2017.
- DA COSTA, A. M.; DE OLIVEIRA LOPES, V. R.; VIDAL, L.; NICAUD, J. M.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z. Poly(ethylene terephthalate) (PET) degradation by *Yarrowia lipolytica*: Investigations on cell growth, enzyme production and monomers consumption. **Process Biochemistry**, 2020.
- DA S. PEREIRA, A.; FONTES-SANT'ANA, G. C.; AMARAL, P. F. F. Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. **Food and Bioproducts Processing**, v. 115, p. 68-77, 2019.
- DA SILVA, J. R.; DE SOUZA, C. E. C.; VALONI, E.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; RIBEIRO, B. D.; HENRIQUES, C. A.; LANGONE, M. A. P. Biocatalytic esterification of fatty acids using a low-cost fermented solid from solid-state fermentation with *Yarrowia lipolytica*. **3 Biotech**, v. 9, n. 2, 2019.
- DA SILVA, L. V.; COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; FICKERS, P. A novel osmotic pressure strategy to improve erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 12, p. 1883-1886, 2018.
- DA SILVA, L. V.; COELHO, M. A. Z.; DA SILVA, M. R. S.; AMARAL, P. F. F. Investigation of mitochondrial protein expression profiles of *Yarrowia lipolytica* in response to citric acid production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 1, p. 1-13, 2020.
- DA SILVA, L. V.; TAVARES, C. B.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* in different crude glycerol concentrations and in different nitrogen sources. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 199-204, 2012.
- DA SILVA, S. R. S.; STAMFORD, T. C. M.; ALBUQUERQUE, W. W. C.; VIDAL, E. E.; STAMFORD, T. L. M. Reutilization of residual glycerin for the produce  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula minuta*. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 3, p. 437-443, 2020.
- DARVISHI, F.; ARIANA, M.; MARELLA, E. R.; BORODINA, I. Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5925-5938, 2018.
- DARVISHI, F.; DESTAIN, J.; NAHVI, I.; THONART, P.; ZARKESH-ESFAHANI, H. Effect of

- additives on freeze-drying and storage of *Yarrowia lipolytica* lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1101-1107, 2012.
- DARVISHI, F.; MORADI, M.; MADZAK, C.; JOLIVALT, C. Production of Laccase by Recombinant *Yarrowia lipolytica* from Molasses: Bioprocess Development Using Statistical Modeling and Increase Productivity in Shake-Flask and Bioreactor Cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 3, p. 1228-1239, 2017.
- DAS, S.; ZARUR COELHO, M. A.; AMARAL, P. F. F.; SIL, J. Development of nutrient media to increase the accumulation of lipids without genetic modification of a lipogenic microorganism. **RSC Advances**, v. 7, n. 61, p. 38149–38154, 2017.
- DASGUPTA, A.; KLEIN, K. **Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of Disease**. Academic Press, 2014.
- DE AMORIM ARAÚJO, J.; FERREIRA, T. C.; RUBINI, M. R.; DURAN, A. G. G.; DE MARCO, J. L.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Coexpression of cellulases in *Pichia pastoris* as a self-processing protein fusion. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.
- DE CARVALHO, C. C. C. R.; CARAMUJO, M. J. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 93, 2017.
- DE SOUZA, C. P.; RIBEIRO, B. D.; ZARUR COELHO, M. A.; ALMEIDA, R. V.; NICAUD, J. M. Construction of wild-type *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 auxotrophic mutants using dual CRISPR/Cas9 strategy for novel biotechnological approaches. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 140, n. 109621, 2020.
- DE SOUZA, C. E. C.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Characterization and Application of *Yarrowia lipolytica* Lipase Obtained by Solid-State Fermentation in the Synthesis of Different Esters Used in the Food Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 3, p. 933-959, 2019.
- DEAK, T.; CHEN, J.; BEUCHAT, L. R. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4340-4344, 2000.
- DEINZER, H. T.; LINNE, U.; XIE, X.; BÖLKER, M.; SANDROCK, B. Elucidation of substrate specificities of decorating enzymes involved in mannosylerythritol lipid production by cross-species complementation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 130, p. 91-97, 2019.
- DEVILLERS, H.; BRUNEL, F.; POLOMSKA, X.; SARILAR, V.; LAZAR, Z.; ROBAK, M.; NEUVÉGLISE, C. Draft genome sequence of *Yarrowia lipolytica* strain A-101 isolated from polluted soil in Poland. **Genome Announcements**, v. 4, n.5, 2016.
- DEVILLERS, H.; NEUVÉGLISE, C. Genome Sequence of the Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* H222. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 4, 2019.
- DO, D. T. H.; THERON, C. W.; FICKERS, P. Organic wastes as feedstocks for non-conventional yeast-based bioprocesses. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 229, 2019.
- DONNELLY, M. L. L.; HUGHES, L. E.; LUKE, G.; MENDOZA, H.; TEN DAM, E.; GANI, D.; RYAN, M. D. The “cleavage” activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring “2A-like” sequences. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 5, p. 1027-1041, 2001.
- DONNELLY, M. L. L.; LUKE, G.; MEHROTRA, A.; LI, X.; HUGHES, L. E.; GANI, D.; RYAN, M. D. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein “cleavage” mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal “skip”. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 5, p. 1013–1025, 2001.
- DSM. **Betanat®**. Disponível em: <https://www.dsm.com/markets/human-nutrition/en/products/carotenoids.html>. Acesso em: jun. de 2020.

- DSM. **CaroCare®**. Disponível em: <https://www.dsm.com/markets/human-nutrition/en/products/carotenoids.htm>. Acesso em: jun. de 2020.
- DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005.
- DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGELA, S.; LAFENTAINÉ, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUVÉGLISE, C.; TALLA, E.; GOFFARD, N.; FRANGEUL, L.; ALGIE, M.; ANTHOUARD, V.; BABOUR, A.; BARBE, V.; BARNAY, S.; BLANCHIN, S.; BECKERICH, J. M.; BEYNE, E.; BLEYKASTEN, C.; BOISRAMÉ, A.; BOYER, J.; CATTOLICO, L.; CONFANIOLERI, F.; DE DARUVAR, A.; DESPONS, L.; FABRE, E.; FAIRHEAD, C.; FERRY-DUMAZET, H.; GROUPI, A.; HANTRAYE, F.; HENNEQUIN, C.; JAUNIAUX, N.; JOYOT, P.; KACHOURI, R.; KERREST, A.; KOSZUL, R.; LEMAIRE, M.; LESUR, I.; MA, L.; MULLER, H.; NICAUD, J. M.; NIKOLSKI, M.; OZTAS, S.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; PELLENZ, S.; POTTER, S.; RICHARD, G. F.; STRAUB, M. L.; SULEAU, A.; SWENNEN, D.; TEKAI, F.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M.; WESTHOF, E.; WIRTH, B.; ZENIOU-MEYER, M.; ZIVANOVIC, I.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; THIERRY, A.; BOUCHTER, C.; CAUDRON, B.; SCARPELLI, C.; GAILLARDIN, C.; WEISSEBACH, J.; WINCKER, P.; SOUCIET, J. L. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35–44, 2004.
- ECLAE. **Eclae - Prodige de l'algue rose**. Disponível em: <https://www.eclae.com/en/>. Acesso em: jun. de 2020.
- EGERMEIER, M.; RUSSMAYER, H.; SAUER, M.; MARX, H. Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2017.
- EGERMEIER, M.; SAUER, M.; MARX, H. Golden Gate-based metabolic engineering strategy for wild-type strains of *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 4, , 2019.
- EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D.; ROHDICH, F. C Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 12, p. 1401-1426, 2004.
- EL AMRANI, A.; BARAKATE, A.; ASKARI, B. M.; LI, X.; ROBERTS, A. G.; RYAN, M. D.; HALPIN, C. Coordinate expression and independent subcellular targeting of multiple proteins from a single transgene. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 16–24, 2004.
- ENCINAS, J. P.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; OTERO, A.; MORENO, B. Yeast populations on Spanish fermented sausages. **Meat Science**, v. 54, n. 3, p. 203-208, 2000.
- ENGLER, C.; KANDZIA, R.; MARILLONNET, S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, , 2008.
- FARIA, N. T.; MARQUES, S.; FONSECA, C.; FERREIRA, F. C. Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048T. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, n. 2015, p. 58–65, 2015.
- FARIA, N. T.; SANTOS, M.; FERREIRA, C.; MARQUES, S.; FERREIRA, F. C.; FONSECA, C. Conversion of cellulosic materials into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* spp. under SHF and SSF processes. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2014.
- FERREIRA, T. F.; COELHO, M. A. Z.; DA ROCHA-LEÃO, M. H. M. Factors influencing crude oil biodegradation by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 785-791, 2012.
- FICKERS, P.; BENETTI, P. H.; WACHÉ, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M. S.; NICAUD, J. M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 6-7, p. 527-543, 2005.
- FICKERS, P.; LE DALL, M. T.; GAILLARDIN, C.; THONART, P.; NICAUD, J. M. New disruption

- cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of microbiological methods**, v. 55, n. 3, p. 727-737, 2003.
- FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.
- FOURNIER, P.; GAILLARDIN, C.; PERSUY, M. A.; KLOOTWIJK, J.; HEERIKHUIZEN, H. Van. Heterogeneity in the ribosomal family of the yeast *Yarrowia lipolytica*: genomic organization and segregation studies. **Gene**, v. 42, n. 3, p. 273-282, 1986.
- FREITAG, J.; AST, J.; LINNE, U.; STEHLIK, T.; MARTORANA, D.; BÖLKER, M.; SANDROCK, B. Peroxisomes contribute to biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 24-36, 2014.
- FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 3, p. 555-560, 2008.
- FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Characterization of new glycolipid biosurfactants, tri-acylated mannosylerythritol lipids, produced by *Pseudozyma* yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 7, p. 1111-1118, 2007.
- FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; SAKAI, H.; KITAMOTO, D. Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma antarctica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 801-810, 2007.
- FUKUOKA, T.; SHINOZAKI, Y.; TSUCHIYA, W.; SUZUKI, K.; WATANABE, T.; YAMAZAKI, T.; KITAMOTO, D.; KITAMOTO, H. Control of enzymatic degradation of biodegradable polymers by treatment with biosurfactants, mannosylerythritol lipids, derived from *Pseudozyma* spp. yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1733-1741, 2016.
- FUKUOKA, T.; YANAGIHARA, T.; IMURA, T.; MORITA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Enzymatic synthesis of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid-D and its aqueous phase behavior. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 2, p. 266-271, 2011.
- GAILLARDIN, C.; MEKOUAR, M.; NEUVÉGLISE, C. Comparative genomics of *Yarrowia lipolytica*. In: *Yarrowia lipolytica*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 1-30.
- GÁLVEZ-LÓPEZ, D.; CHÁVEZ-MELÉNDEZ, B.; VÁZQUEZ-OVANDO, A.; ROSAS-QUIJANO, R. The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 23-31, 2019.
- GAMBOA-MELENDÉZ, H.; LARROUDE, M.; PARK, Y. K.; TRÉBULLE, P.; NICAUD, J.-M.; LEDESMA-AMARO, R. Synthetic Biology to Improve the Production of Lipases and Esterases (Review) Heber. **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols**, v. 1835, , 2018.
- GAO, C.; QI, Q.; MADZAK, C.; LIN, C. S. K. Exploring medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production in the engineered yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 9, p. 1255-1262, 2015.
- GAO, D.; SMITH, S.; SPAGNUOLO, M.; RODRIGUEZ, G.; BLENNER, M. Dual CRISPR-Cas9 Cleavage Mediated Gene Excision and Targeted Integration in *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1700590, 2018.
- GAO, S.; HAN, L.; ZHU, L.; GE, M.; YANG, S.; JIANG, Y.; CHEN, D. One-step integration of multiple genes into the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 12, p. 2523-2528, 2014.

- GAO, S.; TONG, Y.; ZHU, L.; GE, M.; ZHANG, Y.; CHEN, D.; JIANG, Y.; YANG, S. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous  $\beta$ -carotene production. **Metabolic Engineering**, v. 41, p. 192-201, 2017.
- GAO, X. D.; DEAN, N. Distinct proteins domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 23, p. 17718–17727, 2000.
- GARCIA-RUIZ, E.; HAMEDIRAD, M.; ZHAO, H. Pathway design, engineering, and optimization. In: **Synthetic Biology–Metabolic Engineering**. Springer, Cham, 2016. p. 77-116.
- GARDINI, F.; SUZZI, G.; LOMBARDI, A.; GALGANO, F.; CRUDELE, M. A.; ANDRIGHETTO, C.; SCHIRONE, M.; TOFALO, R. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. **FEMS yeast research**, v. 1, n. 2, p. 161-167, 2001.
- GARNEAU, J. E.; DUPUIS, M. È.; VILLION, M.; ROMERO, D. A.; BARRANGOU, R.; BOYAVAL, P.; FREMAUX, C.; HORVATH, P.; MAGADÁN, A. H.; MOINEAU, S. The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. **Nature**, v. 468, n. 7320, p. 67–71, 2010.
- GLEDITZSCH, D.; PAUSCH, P.; MÜLLER-ESPARZA, H.; ÖZCAN, A.; GUO, X.; BANGE, G.; RANDAU, L. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. **RNA biology**, v. 16, n. 4, p. 504-517, 2019.
- GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. **The Scientific World Journal**, v. 2014, , 2014.
- GOODWIN, T. W. Biosynthesis of carotenoids. In: **The biochemistry of the carotenoids**. Springer, Dordrecht, 1980. p. 33-76.
- GOOSSENS, E.; WIJNANTS, M.; PACKET, D.; LEMIÈRE, F. Enhanced separation and analysis procedure reveals production of tri-acylated mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma aphidis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 11, p. 1537–1550, 2016.
- GRAF, R.; LI, X.; CHU, V. T.; RAJEWSKY, K. sgRNA Sequence Motifs Blocking Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. **Cell Reports**, v. 26, n. 5, p. 1098-1103.e3, 2019.
- GRAND VIEW REPORT. **Beta-Carotene Market Analysis By Source (Algae, Fruits & Vegetables, & Synthetic), By Application (Food & Beverages, Dietary Supplements, Cosmetics, & Animal Feed) and Segment Forecasts to 2024**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/beta-carotene-market>. Acesso em: jul. 2020.
- GRENFELL-LEE, D.; ZELLER, S.; CARDOSO, R.; PUCAJ, K. The safety of  $\beta$ -carotene from *Yarrowia lipolytica*. **Food and chemical toxicology**, v. 65, p. 1-11, 2014.
- GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, 1946.
- GRIFFITHS, K.; AGGARWAL, B.; SINGH, R.; BUTTAR, H.; WILSON, D.; DE MEESTER, F. Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. **Diseases**, v. 4, n. 3, p. 28, 2016.
- GROENEWALD, M.; BOEKOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; VAN DIJCK, P. W. M.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 187–206, 2014.
- GRUNE, T.; LIETZ, G.; PALOU, A.; ROSS, A. C.; STAHL, W.; TANG, G.; THURNHAM, D.; YIN, S. A.; BIESALSKI, H. K.  $\beta$ -Carotene is an important vitamin A source for humans. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2268S-2285S, 2010.
- GUL, K.; TAK, A.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; YOUSUF, B.; WANI, A. A. Chemistry, encapsulation, and health benefits of  $\beta$ -carotene-A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1018696, 2015.

- GUO, Y. et al. **Draft genomic DNA sequence of *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06, a strain for high production of alpha-ketoglutarate.** 2014 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/240972>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- HACKENSCHMIDT, S.; BRACHARZ, F.; DANIEL, R.; THÜRMER, A.; BRUDER, S.; KABISCH, J. Effects of a high-cultivation temperature on the physiology of three different *Yarrowia lipolytica* strains. **FEMS yeast research**, v. 19, n. 7, p. foz068, 2019.
- HADLINGTON, J. L.; DENECKE, J. Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 6, p. 461-468, 2000
- HAEUSSLER, M.; SCHÖNIG, K.; ECKERT, H.; ESCHSTRUTH, A.; MIANNÉ, J.; RENAUD, J. B.; SCHNEIDER-MAUNOURY, S.; SHKUMATAVA, A.; TBOUL, L.; KENT, J.; JOLY, J. S.; CONCORDET, J. P. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 148,2016.
- HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of rio de janeiro, Brazil. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 1, p. 173-8, 1981.
- HANKO, E. K. R.; DENBY, C. M.; SÀNCHEZ I NOGUÉ, V.; LIN, W.; RAMIREZ, K. J.; SINGER, C. A.; BECKHAM, G. T.; KEASLING, J. D. Engineering  $\beta$ -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. **Metabolic engineering**, v. 48, p. 52-62, 2018.
- HARRISON, F. C. A systematic study of some torulae. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, p. 341-379, 1928.
- HARZEVILI, F. D. *Yarrowia lipolytica* in biotechnological applications. In: **Biotechnological applications of the yeast *Yarrowia lipolytica***. Springer, Cham, 2014. p. 17-74.
- HASKINS, R. H.; THORN, J. A.; BOOTHROYD, B. Biochemistry of the Ustilaginales. XI. Metabolic products of *Ustilago zae* in submerged culture. **Canadian journal of microbiology**, v. 1, n. 9, p. 749-756, 1955.
- HASSANSHAHIAN, M.; TEBYANIAN, H.; CAPPELLO, S. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 7, p. 1386-1391, 2012.
- HERMANN, A. T. V.; GONÇALVES, A. L.; VELASCO, J.; OLIVA, B.; DA SILVA LIMA, A.; FRANÇA, B. A.; FERREIRA, G.; MULINARI, E. J.; DE OLIVEIRA NOGUEIRA, C. F.; SEGATO, F. The Use of Synthetic Biology Tools in Biorefineries to Increase the Building Blocks Diversification. In: **Advances in Sugarcane Biorefinery**. Elsevier, 2018. p. 41-72.
- HERMAWAN, J.; MASITHAH, E. D.; TJAHHANINGSIH, W.; ABDILLAH, A. A. Increasing  $\beta$ -carotene content of phytoplankton *Dunaliella salina* using different salinity media. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. 2018. p. 012034.
- HERRERO, A. B.; LÓPEZ, M. C.; FERNÁNDEZ-LAGO, L.; DOMÍNGUEZ, A. *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica* as alternative models for analysing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p. 2727-2737, 1999.
- HEWALD, S.; JOSEPHS, K.; BÖLKER, M. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3033-3040, 2005.
- HEWALD, S.; LINNE, U.; SCHERER, M.; MARAHIEL, M. A.; KÄMPER, J.; BÖLKER, M. Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5469-5477, 2006.
- HOLLANDS, K.; BARON, C. M.; GIBSON, K. J.; KELLY, K. J.; KRASLEY, E. A.; LAFFEND, L. A.; LAUCHLI, R. M.; MAGGIO-HALL, L. A.; NELSON, M. J.; PRASAD, J. C.; REN, Y.; RICE, B. A.; RICE, G. H.; ROTHMAN, S. C. Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose. **Metabolic Engineering**, v. 52, p. 232-242, 2019.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262-1278, 2014.

HURTADO, C. A. R.; RACHUBINSKI, R. A. Isolation and characterization of YIBEM1, a gene required for cell polarization and differentiation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 4, p. 526-537, 2002

IMATOUKENE, N.; VERBEKE, J.; BEOPOULOS, A.; IDRISSE TAGHKI, A.; THOMASSET, B.; SARDE, C. O.; NONUS, M.; NICAUD, J. M. A metabolic engineering strategy for producing conjugated linoleic acids using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 11, p. 4605-4616, 2017.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATURA, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.

JACOBSEN, I. H.; LEDESMA-AMARO, R.; MARTINEZ, J. L. Recombinant  $\beta$ -Carotene Production by *Yarrowia lipolytica*—Assessing the Potential of Micro-Scale Fermentation Analysis in Cell Factory Design and Bioreaction Optimization. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 29, 2020.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 505-529, 2017.

JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 209-228, 2015.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

JINEK, M.; JIANG, F.; TAYLOR, D. W.; STERNBERG, S. H.; KAYA, E.; MA, E.; ANDERS, C.; HAUER, M.; ZHOU, K.; LIN, S.; KAPLAN, M.; IAVARONE, A. T.; CHARPENTIER, E.; NOGALES, E.; DOUDNA, J. A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science**, v. 343, n. 6176, 2014.

JING, K.; HE, S.; CHEN, T.; LU, Y.; NG, I. S. Enhancing beta-carotene biosynthesis and gene transcriptional regulation in *Blakeslea trispora* with sodium acetate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 10-17, 2016.

JURETZEK, T.; LE DALL, M.-T.; MAUERSBERGER, S.; GAILLARDIN, C.; BARTH, G.; NICAUD, J.-M. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, v. 18, n. 2, p. 97-113, 2001.

KÄMPER, J.; KAHMANN, R.; BÖLKER, M.; MA, L. J.; BREFORT, T.; SAVILLE, B. J.; BANUETT, F.; KRONSTAD, J. W.; GOLD, S. E.; MÜLLER, O.; PERLIN, M. H.; WÖSTEN, H. A. B.; DE VRIES, R.; RUIZ-HERRERA, J.; REYNAGA-PEÑA, C. G.; SNETSSELAAR, K.; MCCANN, M.; PÉREZ-MARTÍN, J.; FELDBRÜGGE, M.; BASSE, C. W.; STEINBERG, G.; IBEAS, J. I.; HOLLOMAN, W.; GUZMAN, P.; FARMAN, M.; STAJICH, J. E.; SENTANDREU, R.; GONZÁLEZ-PRieto, J. M.; KENNEL, J. C.; MOLINA, L.; SCHIRAWSKI, J.; MENDOZA-MENDOZA, A.; GREILINGER, D.; MÜNCH, K.; RÖSSEL, N.; SCHERER, M.; VRANĚS, M.; LADENDORF, O.; VINCON, V.; FUCHS, U.; SANDROCK, B.; MENG, S.; HO, E. C. H.; CAHILL, M. J.; BOYCE, K. J.; KLOSE, J.; KLOSTERMAN, S. J.; DEELSTRA, H. J.; ORTIZ-CASTELLANOS, L.; LI, W.; SANCHEZ-ALONSO, P.; SCHREIER, P. H.; HÄUSER-HAHN, I.; VAUPEL, M.; KOOPMANN, E.; FRIEDRICH, G.; VOSS, H.; SCHLÜTER, T.; MARGOLIS, J.; PLATT, D.; SWIMMER, C.; GNIRKE, A.; CHEN, F.; VYSOTSKAIA, V.; MANNHAUPT, G.; GÜLDENER, U.; MÜNSTERKÖTTER, M.; HAASE, D.; OESTERHELD, M.; MEWES, H. W.; MAUCELI, E. W.; DECAPRIO, D.; WADE, C. M.; BUTLER, J.; YOUNG, S.; JAFFE, D. B.; CALVO, S.; NUSBAUM, C.; GALAGAN, J.; BIRREN, B. W. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**, v. 444, n. 7115, p. 97-101, 2006.

- KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G.; AURICH, A.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N. V.; STOTTMEISTER, U.; FINOGENOVA, T. V. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 113-122, 2005.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.
- KAUR, P.; GHOSHAL, G.; JAIN, A. Bio-utilization of fruits and vegetables waste to produce  $\beta$ -carotene in solid-state fermentation: Characterization and antioxidant activity. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 155-164, 2019.
- KILDEGAARD, K. R.; ADIEGO-PÉREZ, B.; DOMÉNECH BELDA, D.; KHANGURA, J. K.; HOLKENBRINK, C.; BORODINA, I. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 287-294, 2017.
- KIM, J. H.; LEE, S. R.; LI, L. H.; PARK, H. J.; PARK, J. H.; LEE, K. Y.; KIM, M. K.; SHIN, B. A.; CHOI, S. Y. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18556, 2011.
- KITAMOTO, D.; HANEISHI, K.; NAKAHARA, T.; TABUCHI, T. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 37-40, 1990.
- KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, G. T.; SASAKI, A.; TAKEYAMA, Y. I.; IDEMOTO, Y.; KOURA, N.; YANAGISHITA, H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 20, p. 1709-1714, 2001.
- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants. from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.
- KITAMOTO, D.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 315-328, 2009.
- KITAMOTO, D.; NAKANE, T.; NAKAO, N.; NAKAHARA, T.; TABUCHI, T. Intracellular accumulation of mannosylerythritol lipids as storage materials by *Candida antarctica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 31-36, 1992.
- KITAMOTO, Daï; YANAGISHITA, H.; HARAYA, K.; KITAMOTO, H. K. Contribution of a chain-shortening pathway to the biosynthesis of the fatty acids of mannosylerythritol lipid (biosurfactant) in the yeast *Candida antarctica*: Effect of  $\beta$ -oxidation inhibitors on biosurfactant synthesis. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 9, p. 813-818, 1998.
- KLÄUI, H.; BAUERNFEIND, J. C. Carotenoids as food colors. **Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors**. Academic Press, New York, p. 1-45, 1981.
- KONISHI, M.; HATADA, Y.; HORIUCHI, J. I. Draft genome sequence of the basidiomycetous yeast-like fungus *Pseudozyma hubeiensis* SY62, which produces an abundant amount of the biosurfactant mannosylerythritol lipids. **Genome announcements**, v. 1, n. 4, 2013.
- KONISHI, M.; MAKINO, M. Selective production of deacetylated mannosylerythritol lipid, MEL-D, by acetyltransferase disruption mutant of *Pseudozyma hubeiensis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 1, p. 105-110, 2018.
- KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**, Elsevier, 2011.
- LAMERS, P. P.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. **Journal of**

**Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 21-27, 2012.

LAMERS, P. P.; VAN DE LAAK, C. C. W.; KAASENBROOD, P. S.; LORIER, J.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioengineering**, . 106, n. 4, p. 638-648, 2010.

LARROUDE, M.; ROSSIGNOL, T.; NICAUD, J. M.; LEDESMA-AMARO, R. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2150–2164, 2018b.

LARROUDE, M.; CELINSKA, E.; BACK, A.; THOMAS, S.; NICAUD, J. M.; LEDESMA-AMARO, R. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of  $\beta$ -carotene. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 2, p. 464–472, 2018a.

LARROUDE, M.; PARK, Y. K.; SOUDIER, P.; KUBIAK, M.; NICAUD, J. M.; ROSSIGNOL, T. A modular Golden Gate toolkit for *Yarrowia lipolytica* synthetic biology. **Microbial Biotechnology**, n. 720824, , 2019.

LARROUDE, Macarena; TRABELSI, H.; NICAUD, J.-M.; ROSSIGNOL, T. A set of *Yarrowia lipolytica* CRISPR/Cas9 vectors for exploiting wild-type strain diversity. **Biotechnology Letters**, v. 4, 2020.

LARSON, M. H.; GILBERT, L. A.; WANG, X.; LIM, W. A.; WEISSMAN, J. S.; QI, L. S. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2180-2196, 2013.

LAZAR, Z.; LIU, N.; STEPHANOPOULOS, G. Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1157-1170, 2018.

LEE, D. S.; LEE, K. H.; JUNG, S.; JO, E. J.; HAN, K. H.; BAE, H. J. Synergistic effects of 2A-mediated polyproteins on the production of lignocellulose degradation enzymes in tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4797-810, 2012.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749-756, 2008.

LIBERATO, V. S. S. **Minimização do meio de cultivo para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina bruta por *Clostridium butyricum***. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

LIU, H. H.; JI, X. J.; HUANG, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1522–1546, 2015.

LIU, L.; ALPER, H. S. Draft genome sequence of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f, a commonly used metabolic engineering host. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, 2014.

LIU, X.; WANG, X.; XU, J.; XIA, J.; LV, J.; ZHANG, T.; WU, Z.; DENG, Y.; HE, J. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 154-160, 2015.

LIU, Y.; KOH, C. M. J.; JI, L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3927–3933, 2011.

LOPES, V. R. O.; FARIAS, M. A.; BELO, I. M. P.; COELHO, M. A. Z. Nitrogen sources on TPOMW valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 261-270, 2016.

LORENZ, S.; GUENTHER, M.; GRUMAZ, C.; RUPP, S.; ZIBEK, S.; SOHN, K. Genome sequence of the basidiomycetous fungus *Pseudozyma aphidis* DSM70725, an efficient producer of biosurfactant mannosylerythritol lipids. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, 2014.

LUBUTA, P.; WORKMAN, M.; KERKHOVEN, E. J.; WORKMAN, C. T. Investigating the

- influence of glycerol on the utilization of glucose in *Yarrowia lipolytica* using RNA-Seq-based transcriptomics. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 12, p. 4059-4071, 2019.
- LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558-566, 2016.
- LYCORED. **BetaBeads®**. Disponível em: <https://www.lycored.com/betabeads-15.html>. Acesso em: jun. de 2020.
- LYCORED. **Lyc-O-Beta®**. Disponível em: <https://www.lycored.com/lyc-o-beta-20-vb.html>. Acesso em: jun. de 2020.
- MA, C. W.; ZHOU, L. B.; ZENG, A. P. Engineering biomolecular switches for dynamic metabolic control. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Springer, Cham, p. 45-76, 2016.
- MA, Y. R.; WANG, K. F.; WANG, W. J.; DING, Y.; SHI, T. Q.; HUANG, H.; JI, X. J. Advances in the metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for the production of terpenoids. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 449-456, 2019.
- MADZAK, C. Engineering *Yarrowia lipolytica* for Use in Biotechnological Applications: A Review of Major Achievements and Recent Innovations. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 8, p. 621-635, 2018.
- MADZAK, C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4559-4577, 2015.
- MADZAK, C.; BECKERICH, J.-M. Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. In: **Yarrowia lipolytica**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-76, 2013.
- MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J. M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. **Journal of Biotechnology**, v. 109, n. 1-2, p. 63-81, 2004.
- MADZAK, C.; NICAUD, J.-M.; GAILLARDIN, C. *Yarrowia lipolytica*. **Production of Recombinant Proteins**. 2005.
- MADZAK, C.; TRÉTON, B.; BLANCHIN-ROLAND, S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 207-216, 2000.
- MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p.337-340, 2010.
- MAGNAN, C.; YU, J.; CHANG, I.; JAHN, E.; KANOMATA, Y.; WU, J.; ZELLER, M.; OAKES, M.; BALDI, P.; SANDMEYER, S. Sequence assembly of *Yarrowia lipolytica* strain W29/CLIB89 shows transposable element diversity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.
- MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; ACHATZ, B. Effect of oxygen transfer rate on  $\beta$ -carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in shake flask culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 7, p. 687-694, 2005.
- MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of Natural Medicines**, p. 1-16, 2020.
- MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A.; CERTIK, M.; DVORAKOVA, T.; HARONIKOVA, A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p. S338-S342, 2012.
- MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 55-61, 2015.
- MARTINEZ-VAZQUEZ, A.; GONZALEZ-HERNANDEZ, A.; DOMÍNGUEZ, Á.; RACHUBINSKI,

- R.; RIQUELME, M.; CUELLAR-MATA, P.; GUZMAN, J. C. T. Identification of the Transcription Factor Znc1p, which Regulates the Yeast-to-Hypha Transition in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, , 2013.
- MARTINS, F. F.; FERREIRA, T. F.; AZEVEDO, D. A.; COELHO, M. A. Z. Evaluation of crude oil degradation by *Yarrowia lipolytica*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 223–228, 2012.
- MATA-GÓMEZ, L. C.; MONTAÑEZ, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C. N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2014.
- MATTHÄUS, F.; KETELHOT, M.; GATTER, M.; BARTH, G. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1660–1669, 2014.
- MEKOUAR, M.; BLANC-LENFLE, I.; OZANNE, C.; DA SILVA, C.; CRUAUD, C.; WINCKER, P.; GAILLARDIN, C.; NEUVÉGLISE, C. Detection and analysis of alternative splicing in *Yarrowia lipolytica* reveal structural constraints facilitating nonsense-mediated decay of intron-retaining transcripts. **Genome Biology**, 2010.
- MILLER, K. K.; ALPER, H. S. *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 23-24, p. 9251-9262, 2019.
- MIROŃCZUK, A. M.; RAKICKA, M.; BIEGALSKA, A.; RYMOWICZ, W.; DOBROWOLSKI, A. A two-stage fermentation process of erythritol production by yeast *Yarrowia lipolytica* from molasses and glycerol. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 445-455, 2015.
- MIROŃCZUK, A. M.; RZETCHONEK, D. A.; BIEGALSKA, A.; RAKICKA, M.; DOBROWOLSKI, A. A novel strain of *Yarrowia lipolytica* as a platform for value-added product synthesis from glycerol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.
- MIZIORKO, H. M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 505, n. 2, p. 131-143, 2011.
- MLÍČKOVÁ, K.; ROUX, E.; ATHENSTAEDT, K.; D'ANDREA, S.; DAUM, G.; CHARDOT, T.; NICAUD, J. M. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3918-3924, 2004.
- MOON, S. B.; KIM, D. Y.; KO, J. H.; KIM, Y. S. Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. **Experimental & molecular medicine**, v. 51, n. 11, p. 1-11, 2019.
- MOON, H. J.; JEYA, M.; KIM, I. W.; LEE, J. K. Biotechnological production of erythritol and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1017-1025, 2010.
- MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Formation of the two novel glycolipid biosurfactants, mannosylribitol lipid and mannosylarabitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* JCM 11752T. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 931–938, 2012.
- MORITA, T.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Mannosylerythritol lipids: Production and applications. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 2, p. 133–141, 2015.
- MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; YAMAMOTO, S.; KITAGAWA, M.; SOGABE, A.; KITAMOTO, D. Production of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylmannitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* and its interfacial properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 1017–1025, 2009.
- MORITA, T.; ISHIBASHI, Y.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, using sucrose by fungal and yeast strains, and their interfacial properties. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 10, p. 2352–2355, 2009.
- MORITA, T.; KOIKE, H.; KOYAMA, Y.; HAGIWARA, H.; ITO, E.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; MACHIDA, M.; KITAMOTO, D. Genome sequence of the basidiomycetous yeast *Pseudozyma*

- antarctica* T-34, a producer of the glycolipid biosurfactants mannosylerythritol lipids. **Genome Announcements**, v. 1, n. 2, 2013.
- MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Discovery of *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 2, p. 305–313, 2006.
- MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 78–81, 2007a.
- MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Physiological differences in the formation of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, between *Pseudozyma antarctica* and *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 307–315, 2007b.
- MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, H. K.; KITAMOTO, D. Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 2, p. 286–292, 2007.
- MORITA, T.; OGURA, Y.; TAKASHIMA, M.; HIROSE, N.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KONDO, Y.; KITAMOTO, D. Isolation of *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 137–144, 2011.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. Da; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.639-648, 2009.
- MÜNTJES, K.; PHILIPP, M.; HÜSEMANN, L.; HEUCKEN, N.; WEIDTKAMP-PETERS, S.; SCHIPPER, K.; ZURBRIGGEN, M. D.; FELDBRÜGGE, M. Establishing Polycistronic Expression in the Model Microorganism *Ustilago maydis*. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p. 1384, 2020.
- NANOU, K.; ROUKAS, T.; PAPADAKIS, E.; KOTZEKIDOU, P. Carotene production from waste cooking oil by *Blakeslea trispora* in a bubble column reactor: The role of oxidative stress. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 7, p. 775-780, 2017.
- NASRABADI, M. R. N.; RAZAVI, S. H. Optimization of  $\beta$ -carotene production by a mutant of the lactosepositive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. **Food Science and Biotechnology**, v.20, n. 2, p. 445-454, 2011.
- NEUVÉGLISE, C.; CHALVET, F.; WINCKER, P.; GAILLARDIN, C.; CASAREGOLA, S. Mutator-like element in the yeast *Yarrowia lipolytica* displays multiple alternative splicings. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 3, p. 615-624, 2005.
- NICAUD J. M.; GAILLARDIN C.; SEMAN M.; PIGNEDE G. **Procédé de transformation non-homologue de Yarrowia lipolytica**. French Patent Application FR2782733 (A1), 2000.
- NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, v. 29, n. 10, p. 409-418, 2012.
- NICAUD, J. M.; MADZAK, C.; VAN DEN BROEK, P.; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P.; GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 371–379, 2002.
- NIU, Y.; FAN, L.; GU, D.; WU, J.; CHEN, Q. Characterization, enhancement and modelling of mannosylerythritol lipid production by fungal endophyte *Ceriporia lacerate* CHZJU. **Food Chemistry**, v. 228, p. 610–617, 2017.
- NORDMANN, A. Synthetic biology at the limits of science. In: **Synthetic Biology**. Springer, Cham, p. 31-58, 2015.
- OLIVEIRA, J. S. e.; ANTONIASSI, R.; DE FREITAS, S. C.; MÜLLER, M. D. Chemical composition

- of glycerin produced by biodiesel plants in Brazil and potential utilization in animal feeding. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 509-512, 2013.
- ONGHENA, M.; GEENS, T.; GOOSSENS, E.; WIJNANTS, M.; PICO, Y.; NEELS, H.; COVACI, A.; LEMIERE, F. Analytical characterization of mannosylerythritol lipid biosurfactants produced by biosynthesis based on feedstock sources from the agrofood industry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1263–1275, 2011.
- OSBORN, M. J.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; MCELMURRY, R. T.; BELL, S. K.; VIGNALI, D. A. A.; RYAN, M. D.; WILBER, A. C.; MCIVOR, R. S.; TOLAR, J.; BLAZAR, B. R. A picornaviral 2A-like sequence-based tricistronic vector allowing for high-level therapeutic gene expression coupled to a dual-reporter system. **Molecular Therapy**, v. 12, n. 3, p. 569-574, 2005.
- OTERO, D. M.; BULSING, B. A.; DA M HUERTA, K.; ROSA, C. A.; ZAMBIAZI, R. C.; BURKERT, C. A. V.; DE M BURKERT, J. F. Carotenoid-producing yeasts in the brazilian biodiversity: Isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.36, n. 1, p. 117-129, 2019.
- PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-54, 2011.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 43-49, 2002.
- PARK, Y. K.; DULERMO, T.; LEDESMA-AMARO, R.; NICAUD, J. M. Optimization of odd chain fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.
- PARK, Y. K.; KORPYS, P.; KUBIAK, M.; CELINSKA, E.; SOUDIER, P.; TRÉBULLE, P.; LARROUDE, M.; ROSSIGNOL, T.; NICAUD, J. M. Engineering the architecture of erythritol-inducible promoters for regulated and enhanced gene expression in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 1, 2019.
- PARK, Y. K.; VANDERMIES, M.; SOUDIER, P.; TELEK, S.; THOMAS, S.; NICAUD, J. M.; FICKERS, P. Efficient expression vectors and host strain for the production of recombinant proteins by *Yarrowia lipolytica* in process conditions. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 167, 2019.
- PETERS, I. I.; NELSON, F. E. Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. **Journal of bacteriology**, v. 55, n. 5, p. 581, 1948.
- PIGNEDE, G.; WANG, H. J.; FUDALEJ, F.; SEMAN, M.; GAILLARDIN, C.; NICAUD, J. M. Autocloning and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3283-3289, 2000.
- POLAKOWSKI, T.; STAHL, U.; LANG, C. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 66-71, 1998.
- PRONK J.T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095-100, 2002. 2002.
- QIANG, S.; WANG, J.; XIONG, X. C.; QU, Y. L.; LIU, L.; HU, C. Y.; MENG, Y. H. Promoting the Synthesis of precursor substances by overexpressing hexokinase (Hxk) and hydroxymethylglutaryl-coa synthase (Erg13) to elevate  $\beta$ -carotene production in engineered *Yarrowia lipolytica*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1346, 2020.
- QUISTGAARD, E. M.; LÖW, C.; GUETTOU, F.; NORDLUND, P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 123, 2016.
- RAKICKA, M.; LAZAR, Z.; DULERMO, T.; FICKERS, P.; NICAUD, J. M. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions.

**Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

RAKICKA, M.; RYWIŃSKA, A.; CYBULSKI, K.; RYMOWICZ, W. Enhanced production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* in media containing surfactants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 417–423, 2016.

RASALA, B. A.; LEE, P. A.; SHEN, Z.; BRIGGS, S. P.; MENDEZ, M.; MAYFIELD, S. P. Robust expression and secretion of xylanase I in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43349, 2012.

RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 1-52, 2002. .

RAU, U.; NGUYEN, L. A.; SCHULZ, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; ROEPER, H.; KOCH, H.; LANG, S. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, p. 551–559, 2005.

Rau, U., Lang, S., Nguyen, L.A., Röper, H.W.W. Process for producing and recovering mannosylerythritol lipids from culture medium containing the same. Patent WO2004/020647A1, 2004.

RAU, U.; LANG, A. N.; ROEPER, H.; KOCH, H.; LANG, S. Downstream processing of mannosylerythritol lipids produced by *Pseudozyma aphidis*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 6, p. 373–380, 2005.

RESEARCH AND MARKETS. **Surface Active Agents - Global Market Trajectory & Analytics**. Disponível em: [https://www.researchandmarkets.com/reports/338637/surface\\_active\\_agents\\_global\\_market\\_trajectory](https://www.researchandmarkets.com/reports/338637/surface_active_agents_global_market_trajectory). Acesso em: jun 2020.

REYES, L. H.; GOMEZ, J. M.; KAO, K. C. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. **Metabolic Engineering**, v. 21, p. 26-33, 2014.

RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Technological aspects of  $\beta$ -carotene production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 693-701, 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington: ILSI press, 2001.

RODRIGUES, T.; AMORE, T. D.; TEIXEIRA, E. C.; DE MEDEIROS BURKERT, J. F. Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial byproducts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 388, 2019.

ROELANTS, S. L. K. W.; DE MAESENEIRE, S. L.; CIESIELSKA, K.; VAN BOGAERT, I. N. A.; SOETAERT, W. Biosurfactant gene clusters in eukaryotes: Regulation and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3449–3461, 2014.

RYAN, M. D.; KING, A. M. Q.; THOMAS, G. P. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 11, p. 2727–2732, 1991.

RYAN, Martin D.; BELSHAM, G. J.; KING, A. M. Q. Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. **Virology**, v. 173, n. 1, p. 35-45, 1989.

RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A.; MARCINKIEWICZ, M. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 3, p. 377–380, 2009.

RYWIŃSKA, A.; JUSZCZYK, P.; WOJTATOWICZ, M.; ROBAK, M.; LAZAR, Z.; TOMASZEWSKA, L.; RYMOWICZ, W. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 148–166, 2013.

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGUE, T. T.; BOURTOOM, T. Efficient concomitant

- production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 1, p. 23-33, 2011.
- SAIKA, A.; KOIKE, H.; FUKUOKA, T.; MORITA, T. Tailor-made mannosylerythritol lipids: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 16, p. 6877-6884, 2018.
- SAIKA, A.; KOIKE, H.; FUKUOKA, T.; YAMAMOTO, S.; KISHIMOTO, T.; MORITA, T. A gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids consisted of 4-O- $\beta$ -D-Mannopyranosyl-(2R,3S)-Erythritol as the sugar moiety in a basidiomycetous yeast *Pseudozyma tsukubaensis*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-16, 2016.
- SAIKA, A.; UTASHIMA, Y.; KOIKE, H.; YAMAMOTO, S.; KISHIMOTO, T.; FUKUOKA, T.; MORITA, T. Biosynthesis of mono-acylated mannosylerythritol lipid in an acyltransferase gene-disrupted mutant of *Pseudozyma tsukubaensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1759-1767, 2018.
- SAJNA, K. V.; SUKUMARAN, R. K.; JAYAMURTHY, H.; REDDY, K. K.; KANJILAL, S.; PRASAD, R. B. N.; PANDEY, A. Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 85-92, 2013.
- SALES, J. C. S.; DE CASTRO, A. M.; RIBEIRO, B. D.; MARIA, M. A. Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation and their potential use as biocatalysts in poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization reactions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 6, p. 457-468, 2020.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition. **Molecular Cloning: a laboratory a manual**, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 891-898, 2014.
- SANTOS, F. F.; FREITAS, K. M. L.; DA COSTA NETO, J. J. G.; FONTES-SANT'ANA, G.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, P. F. F. Tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk byproduct and corn steep liquor for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 65, p. 331-336, 2018.
- SANZ, C.; VELAYOS, A.; ÁLVAREZ, M. I.; BENITO, E. P.; ESLAVA, A. P. Functional analysis of the phycomyces carRA gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase. **PLoS ONE**, v.6, n. 8, p. 23102, 2011.
- SARA, M.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* grown on biodiesel-derived crude glycerol: Optimization of growth parameters and their effects on the fermentation efficiency. **RSC Advances**, v. 6, n. 93, p. 90547-90558, 2016.
- SATHASIVAM, R.; KI, J. S. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. **Marine drugs**, v. 16, n. 1, p. 26, 2018.
- SCHMID-BERGER, N.; SCHMID, B.; BARTH, G. Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 9, p. 2477-2482, 1994
- SCHWARTZ, C.; CHENG, J. F.; EVANS, R.; SCHWARTZ, C. A.; WAGNER, J. M.; ANGLIN, S.; BEITZ, A.; PAN, W.; LONARDI, S.; BLENNER, M.; ALPER, H. S.; YOSHIKUNI, Y.; WHEELDON, I. Validating genome-wide CRISPR-Cas9 function improves screening in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, v. 55, p. 102-110, 2019.
- SCHWARTZ, C.; FROGUE, K.; MISA, J.; WHEELDON, I. Host and pathway engineering for enhanced lycopene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1-11, 2017.

- SCHWARTZ, C. M.; HUSSAIN, M. S.; BLENNER, M.; WHEELDON, I. Synthetic RNA Polymerase III Promoters Facilitate High-Efficiency CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Yarrowia lipolytica*. **ACS Synthetic Biology**, v. 5, n. 4, p. 356–359, 2016.
- SCHWARTZ, C.; WHEELDON, I. CRISPR-Cas9-Mediated genome editing and transcriptional control in *Yarrowia lipolytica*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1772, p. 327–345, 2018.
- SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY (CBD). **Synthetic Biology. Part I: Potential Impacts of Synthetic Biology on Biological Diversity. Part II: Gaps and Overlaps with the Provisions of the Convention and Other Agreements.**, 2015.
- SHARMA, S.; KAUR, R.; SINGH, A. Recent advances in CRISPR/Cas mediated genome editing for crop improvement. **Plant Biotechnology Reports**, v. 11, n. 4, p. 193-207, 2017.
- SHENG, J.; JI, X. F.; WANG, F.; SUN, M. Engineering of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip8p by circular permutation to alter substrate and temperature characteristics. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 5, p. 757-762, 2014.
- SHI, T. Q.; HUANG, H.; KERKHOVEN, E. J.; JI, X. J. Advancing metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* using the CRISPR/Cas system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 22, p. 9541–9548, 2018. a.
- SIBIRNY, A.; MADZAK, C.; FICKERS, P. Genetic engineering of nonconventional yeasts for the production of valuable compounds. **Microbial Biotechnology**, 2014. .
- SIEIRO, C.; POZA, M.; DE MIGUEL, T.; VILLA, T. G. Genetic basis of microbial carotenogenesis. **International Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2003.
- SILVA, L. V. Da; COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; FICKERS, P. Utilização de resíduo milhocina como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico na produção de eritritol por *Yarrowia lipolytica*. **Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde 2.**, 2019. .
- SIMEONOV, D. R.; GOWEN, B. G.; BOONTANRART, M.; ROTH, T. L.; GAGNON, J. D.; MUMBACH, M. R.; SATPATHY, A. T.; LEE, Y.; BRAY, N. L.; CHAN, A. Y.; LITUIEV, D. S.; NGUYEN, M. L.; GATE, R. E.; SUBRAMANIAM, M.; LI, Z.; WOO, J. M.; MITROS, T.; RAY, G. J.; CURIE, G. L.; NADDAF, N.; CHU, J. S.; MA, H.; BOYER, E.; VAN GOOL, F.; HUANG, H.; LIU, R.; TOBIN, V. R.; SCHUMANN, K.; DALY, M. J.; FARH, K. K.; ANSEL, K. M.; YE, C. J.; GREENLEAF, W. J.; ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A.; CHANG, H. Y.; CORN, J. E.; MARSON, A. Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with CRISPR activation. **Nature**, v. 549, n. 7670, p. 111-115, 2017.
- SINGH, V. An introduction to genome editing CRISPR-Cas systems. In: **Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System**. Academic Press, p. 1-13, 2020.
- SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: Timmis K.N. **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 3706-3721, 2010.
- SMYTH, Thomas J. P.; RUDDEN, M.; TSAOUSI, K.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Protocols for the detection and chemical characterisation of microbial glycolipids. In: **Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 29-60, 2014
- SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 491-493, 2000.
- SONG, B.; SPRINGER, J. Determination of Interfacial Tension from the Profile of a Pendant Drop Using Computer-Aided Image Processing2. Experimental. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 184, n. 1, p. 77-91, 1996.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; NAVARRETE, C.; CHEN, X.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R.; FURLAN, M.; NIELSEN, J.; KRIVORUCHKO, A. Screening of 2A peptides for polycistronic gene

- expression in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 5, 2018.
- SOUZA, Carlos E.C.; FARIAS, M. A.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Adding Value to Agro-industrial Co-products from Canola and Soybean Oil Extraction Through Lipase Production Using *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 4, p. 1163-1176, 2017.
- SOUZA, F. A. S. D.; SALGUEIRO, A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 61–67, 2012.
- SOUZA, K. S. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 497–506, 2014.
- SPENCER, J. F. T. Yeasts: Characteristics and identification. **Food Microbiology**, 1984.
- SPOECKNER, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; LANG, S. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 33–39, 1999.
- STAHL, W.; SIES, H.  $\beta$ -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 5, p. 1179S-1184S, 2012.
- STECKEL, A.; SCHLOSSER, G. An organic chemist's guide to electrospray mass spectrometric structure elucidation. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 611, 2019.
- SUN, L.; ATKINSON, C. A.; LEE, Y. G.; JIN, Y. S. High-level  $\beta$ -carotene production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without overexpression of a truncated HMG1 (tHMG1). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 11, p. 3522-3532, 2020.
- SUN, M. L.; MADZAK, C.; LIU, H. H.; SONG, P.; REN, L. J.; HUANG, H.; JI, X. J. Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient  $\gamma$ -linolenic acid production. **Biochemical engineering journal**, v. 117, p. 172-180, 2017.
- SURPILI, M. J.; MÜLLER-RÖBER, B.; WILLMTZER, L. A yeast-based model system for cloning secreted and membrane proteins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 4, p. 599-608, 2002.
- TAKAICHI, S. Tetraterpenes: Carotenoids. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M. (eds). **Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes**. Heidelberg, Germany: Springer, 2013.
- TAN, J. P.; JAHIM, J. M.; WU, T. Y.; HARUN, S.; MUMTAZ, T. Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2016. p. 012058.
- THEERACHAT, M.; EMOND, S.; CAMBON, E.; BORDES, F.; MARTY, A.; NICAUD, J. M.; CHULALAKSANANUKUL, W.; GUIEYSSE, D.; REMAUD-SIMÉON, M.; MOREL, S. Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 267–274, 2012.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, n. 2, p. 261-265, 2006.
- TOMASZEWSKA-HETMAN, L.; RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A. Waste conversion into a sweetener-development of an innovative strategy for erythritol production by *Yarrowia lipolytica*. **Sustainability**, v. 12, n. 17, p. 7122, 2020.
- TOMASZEWSKA, L. Peptone as a nitrogen source for erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast. **Challenges of Modern Technology**, v. 3, n. 4, p. 49–52, 2012.
- TOMASZEWSKA, Ludwika; RAKICKA, M.; RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A. A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. **FEMS**

**Yeast Research**, v. 14, n. 6, p. 966–976, 2014.

TOMASZEWSKA, Ludwika; RYWIŃSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 9, p. 1333–1343, 2012.

TORRISSEN, O. J.; CHRISTIANSEN, R. Requirements for carotenoids in fish diets. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 11, n. 3-4, p. 225-230, 1995.

TRUMP, B. D.; CUMMINGS, C. L.; GALAITSI, S. E.; KUZMA, J.; LINKOV, I. Synthetic biology: perspectives on risk analysis, governance, communication, and ELSI. In: **Synthetic Biology 2020: Frontiers in Risk Analysis and Governance**. Springer, Cham, 2020. p. 1-18.

VACHALI, P.; BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial carotenoids. In: **Microbial carotenoids from fungi**. Humana Press, Totowa, NJ., p. 41-59, , 2012

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; FÚRIGO, Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VAN DER WALT, J. P.; VON ARX, J. A. A. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 46, n. 6, p. 517-521, 1980.

VAN KERREBROECK, S.; PETIT, H.; BEAUPREZ, J.; VAN BOGAERT, I. N. A.; SOETAERT, W. The development of a detection method discriminating for mannosylerythritol lipids and acylglycerols. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v. 25, n. 5, p. 468–470, 2012.

VANDERMIES, M.; FICKERS, P. Bioreactor-scale strategies for the production of recombinant protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 40, 2019.

VASDINYEI, R.; DEÁK, T. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 123-130, 2003.

VAYSSE, L.; BONFILS, F.; SAINTE-BEUVE, J.; CARTAULT, M. Natural Rubber. SETHURAJ, M. R.; MATHEW, N. T. (eds.). **Natural rubber: Biology, cultivation and technology**. Elsevier, 2012.

VELYCHKO, S.; KANG, K.; KIM, S. M.; KWAK, T. H.; KIM, K. P.; PARK, C.; HONG, K.; CHUNG, C. H.; HYUN, J. K.; MACCARTHY, C. M.; WU, G.; SCHÖLER, H. R.; HAN, D. W. Fusion of reprogramming factors alters the trajectory of somatic lineage conversion. **Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 30-39. e4, 2019.

WANG, H.; GAO, S.; LI, C.; ONG, K. L.; LI, X.; LIN, C. S. K.; YANG, X. Bio-Feedstocks. In: **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon Press, 2019. p. 167-173.

WANG, T.; WEI, J. J.; SABATINI, D. M.; LANDER, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 80-84, 2012.

WASYLENKO, T. M.; AHN, W. S.; STEPHANOPOULOS, G. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 27-39, 2015.

WHALLANS, R. C. M.; JANAINA, F. de M. B. Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 4, p. 209-219, 2015.

WICHUK, K.; BRYNJÓLFSSON, S.; FU, W. Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae. **Bioengineered**, 2014.

WIJAYAWARDENE, N. N.; HYDE, K. D.; LUMBSCH, H. T.; LIU, J. K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; EKANAYAKA, A. H.; TIAN, Q.; PHOOKAMSAK, R. Outline of Ascomycota: 2017. **Fungal Diversity**, 2018.

WONG, L.; ENGEL, J.; JIN, E.; HOLDRIDGE, B.; XU, P. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for

- streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 5, n. September, p. 68–77, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2017.09.001>
- WORKMAN, M.; HOLT, P.; THYKAER, J. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.
- WORLAND, A. M.; CZAJKA, J. J.; LI, Y.; WANG, Y.; TANG, Y. J.; SU, W. W. Biosynthesis of terpene compounds using the non-model yeast *Yarrowia lipolytica*: grand challenges and a few perspectives. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 64, p. 134-140, 2020a.
- WORLAND, A. M.; CZAJKA, J. J.; XING, Y.; HARPER, W. F.; MOORE, A.; XIAO, Z.; HAN, Z.; WANG, Y.; SU, W. W.; TANG, Y. J. Analysis of *Yarrowia lipolytica* growth, catabolism, and terpenoid biosynthesis during utilization of lipid-derived feedstock. **Metabolic Engineering Communications**, v. 11, 2020b.
- WU, T.; YE, L.; ZHAO, D.; LI, S.; LI, Q.; ZHANG, B.; BI, C.; ZHANG, X. Membrane engineering—A novel strategy to enhance the production and accumulation of  $\beta$ -carotene in *Escherichia coli*. **Metabolic engineering**, v. 43, p. 85-91, 2017.
- XI, Y. L.; CHEN, K. Q.; DAI, W. Y.; MA, J. F.; ZHANG, M.; JIANG, M.; WEI, P.; OUYANG, P. K. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. **Bioresource technology**, v. 136, p. 775-779, 2013.
- XIAOYAN, L.; YU, X.; LV, J.; XU, J.; XIA, J.; WU, Z.; ZHANG, T.; DENG, Y. A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 103, p. 86-94, 2017.
- XU, P.; QIAO, K.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 7, p. 1521–1530, 2017.
- XUE, Z.; SHARPE, P. L.; HONG, S. P.; YADAV, N. S.; XIE, D.; SHORT, D. R.; DAMUDE, H. G.; RUPERT, R. A.; SEIP, J. E.; WANG, J.; POLLAK, D. W.; BOSTICK, M. W.; BOSAK, M. D.; MACCOOL, D. J.; HOLLERBACH, D. H.; ZHANG, H.; ARCILLA, D. M.; BLEDSOE, S. A.; CROKER, K.; MCCORD, E. F.; TYREUS, B. D.; JACKSON, E. N.; ZHU, Q. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 734-740, 2013.
- YAMANE, T.; SAKAI, H.; NAGAHAMA, K.; OGAWA, T.; MATSUOKA, M. Dissection of centromeric DNA from yeast *Yarrowia lipolytica* and identification of protein-binding site required for plasmid transmission. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 6, p. 571-578, 2008.
- YAN, J.; GUI, X.; WANG, G.; XU, L.; YAN, Y.; PAN, D.; ZHA, G.; JIAO, L.; HAN, B.; MADZAK, C.; WANG, Y. Engineering *Yarrowia lipolytica* to simultaneously produce lipase and single cell protein from agro-industrial wastes for feed. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- YANG, L. B.; ZHAN, X. B.; ZHENG, Z. Y.; WU, J. R.; GAO, M. J.; LIN, C. C. A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 120–127, 2014.
- YARRINGTON, R. M.; VERMA, S.; SCHWARTZ, S.; TRAUTMAN, J. K.; CARROLL, D. Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 38, p. 9351-9358, 2018.
- YOVKOVA, V.; OTTO, C.; AURICH, A.; MAUERSBERGER, S.; BARTH, G. Engineering the  $\alpha$ -ketoglutarate overproduction from raw glycerol by overexpression of the genes encoding NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 2003-2013, 2014.
- YU, L. P.; WU, F. Q.; CHEN, G. Q. Next-Generation Industrial Biotechnology-Transforming the

- Current Industrial Biotechnology into Competitive Processes. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1800437, 2019.
- YU, M.; LIU, Z.; ZENG, G.; ZHONG, H.; LIU, Y.; JIANG, Y.; LI, M.; HE, X.; HE, Y. Characteristics of mannosylerythritol lipids and their environmental potential. **Carbohydrate Research**, v. 407, p. 63–72, 2015.
- ZHANG, C. Biosynthesis of Carotenoids and Apocarotenoids by Microorganisms and Their Industrial Potential. **Progress in Carotenoid Research**. p. 85-105, 2018.
- ZHANG, J. lai; PENG, Y. Z.; LIU, D.; LIU, H.; CAO, Y. X.; LI, B. Z.; LI, C.; YUAN, Y. J. Gene repression via multiplex gRNA strategy in *Yarrowia lipolytica*. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2018.
- ZHANG, S.; GUO, F.; YAN, W.; DAI, Z.; DONG, W.; ZHOU, J.; ZHANG, W.; XIN, F.; JIANG, M. Recent advances of CRISPR-Cas9-based genetic engineering in industrial biology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 459, 2019.
- ZHANG, X. K.; WANG, D. N.; CHEN, J.; LIU, Z. J.; WEI, L. J.; HUA, Q. Metabolic engineering of  $\beta$ -carotene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, p. 1-12, 2020.
- ZHANG, Y.; NAVARRO, E.; CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J. T.; ALMAGRO, L.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; ZHANG, H.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; CHEN, W.; GARRE, V. A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate  $\beta$ -carotene over-producing strains by genetic engineering. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 99, 2016.
- ZHAO, C.; GAO, Q.; CHEN, J.; WEI, L.; IMANAKA, T.; HUA, Q. Metabolomic changes and metabolic responses to expression of heterologous biosynthetic genes for lycopene production in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biotechnology**, v. 251, p. 174-185, 2017.
- ZHAO, H. **Synthetic biology: tools and applications**. Academic Press, 2013.
- ZHAO, J.; LI, Q.; SUN, T.; ZHU, X.; XU, H.; TANG, J.; ZHANG, X.; MA, Y. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving B-carotene production. **Metabolic Engineering**, v. 17, p. 42-50, 2013.
- ZHENG, Y.; ZHENG, M.; MA, Z.; XIN, B.; GUO, R.; XU, X. Sugar Fatty Acid Esters. In: AHMAD, M. U.; XU, X. (eds.). **Polar lipids: biology, chemistry, and technology**. Elsevier, 2015.
- ZHU, Q.; JACKSON, E. N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 36, p. 65–72, 2015.

## APÊNDICES

**Apêndice 1** – Sequências sintetizadas com os códons otimizados pela empresa *GenScript*. **(A)** Inseto *emt1-F2A-mac1PTS1Δ-F2A-mac2PTS1Δ*. As letras em rosa representam o gene *emt1*, em verde o peptídeo autocatalítico F2A, em azul o gene *mac1PTS1Δ*, em roxo o gene *mac2PTS1Δ*. Em destaque sublinhado e itálico estão os sítios de restrição para *XbaI* e *MfeI*, respectivamente. **(B)** Gene *mmfl*.

### A.

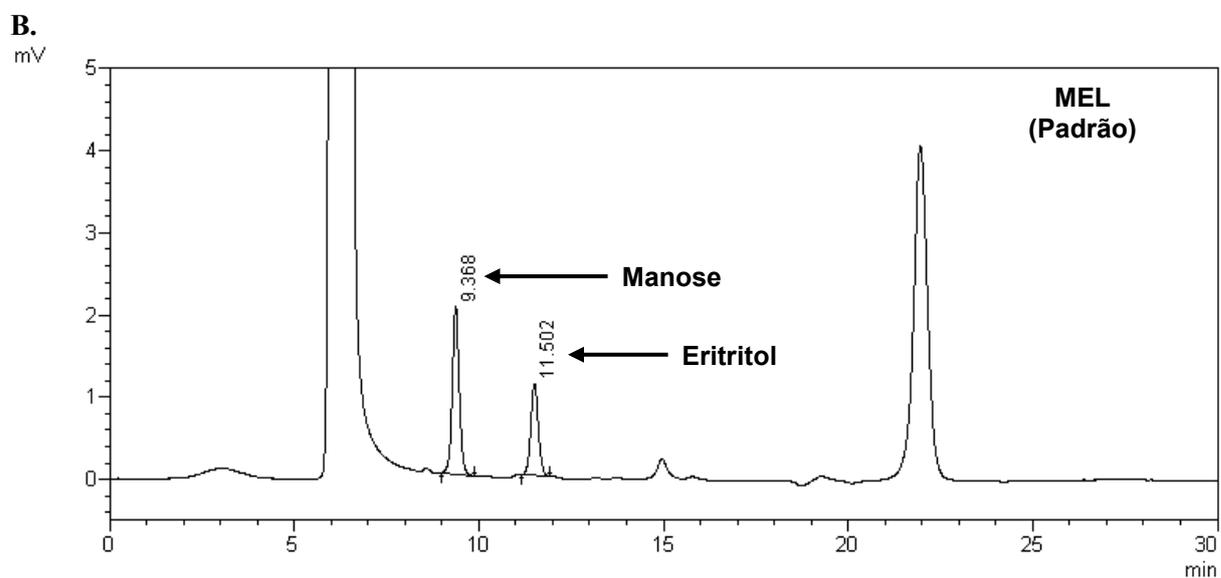
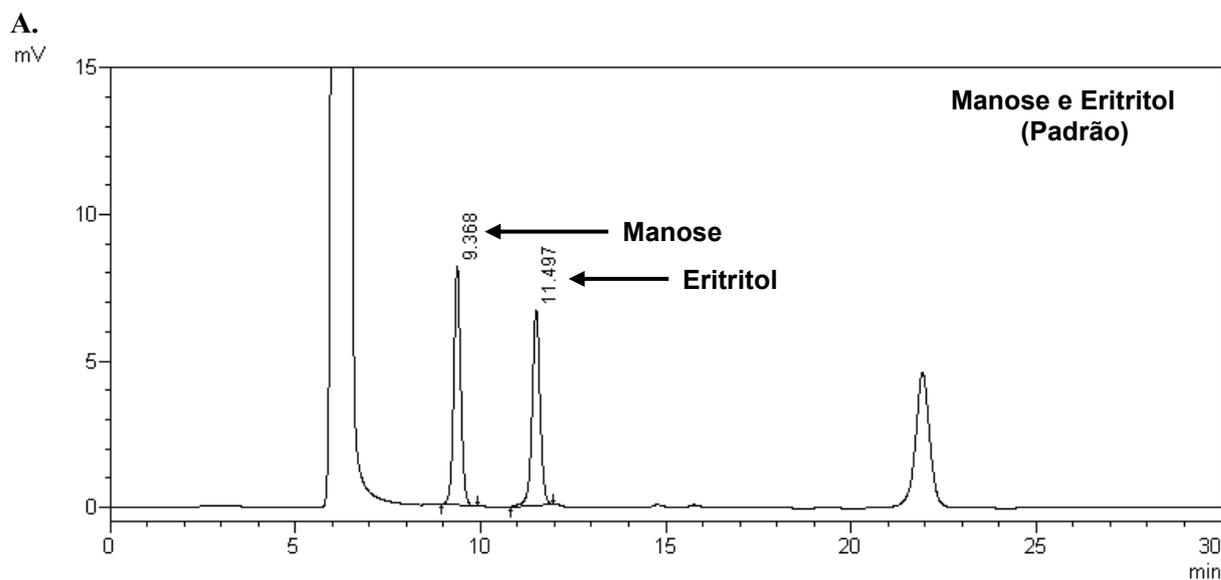
ATGAAGGTGGCCCTGCTGGCTAACCCCTGCCCGAGGCGAGATTAACGTGCTGCTGGCTACCGCTTACGAGCTGATC  
 CGACTGGGACATGACGTACCTTCCTGACCGGTTCCCTCTTTTCGCCAACGCTATCGCCGAGTTCCGATCCGAGCAG  
 AACGACCCCATTTCTCGCCGCTCGAATCCACTTCTCTGACCTGGGAAACGCTCGAGCCGTGGAGGACTTACCCGA  
 GGCATGCAGTCCCACCTCAAGGGTCTGCGAAAGCCTCCCGGAGACTACTCTCTATGGAGATCTGCCAGATTGTC  
 GCCCTGGTGACCGAGCAGGAGTCCGAGACGCCGCTACCATGGTCCGAGATCGACTGCTCGAGATTGAGCCCGAC  
 ATGATCGCCGCTCGACGCTCTCTCTCCCAACCTGGTGACCGGTTGCCGAATGACCGGACTGCCCTGGATGTTACCC  
 GTGCCCTGTTCTCCTTCCCTCACCGCTACCCGAAAGTCTCTCTTCGACCCCCACCCTATGGGACGACGACGACAG  
 CGAACCCCTCATGTCTGCCCTGGAGAACCTGAAGCTCACCTTCATCGAGACTTACCGAAACGCTACCAAGAAGGAC  
 CTCTACGCCCGACGAGCTCTGCTCAAGAACGAGTTCGGTCTGAACTCTATGGGATTCAACGGCGACTCTGCCATC  
 GTCCCTCCCCGTGTGGAAGGACCGAAACTGCGTGGGCGGTATCCACTTCAACACCCCCGGACTGACCGACTCCATT  
 CGACAGCCCCACCAGATCCACTTCGTGCGGTGCCGGAGTGACCTCTGACCCCCGAGAACCACGACACCCCCGTCTTC  
 GAGGCCGCTTCTTTCCCTCAAGCAGCTGTCCCCCTCCTCTTCCACCACCTTCAAGCCCCCTCTTCCCTCCCCTGTCC  
 AAGACCGGTCGAGATCTGGACGTCGAGTGGATGGACGAGGCTTACGCTGCTGGACAGCTCGTCTGTACCTGAAC  
 ATGGGTCCATGTTCCGTGGACCGACGCCGAGGTGCGATCTTGTCTCCGAGCTTTCGAGCGACTGTACGAGCAG  
 TCTGGAGGCAAGATTAAGCTGCTCTTCAAGCTGAACAAGCCCAAGCGAACCCCCAACACACCCGGTGTCTTACC  
 CCTACCGCTCCTATCTCTTCCCTGACTTCGAGGAGAAGCAGCAGAACCGTTCATGGGCTCTGCTCGACCCGTCGGT  
 GCCTCTAACCTCGTGTCCGAGAAGCTGGCTGACGCCATCAAGAACGTGACCCCTCGACGAAAGACCGACGCCGAC  
 AAGGGTTACTCCCAGTTCACCCCTCTCTGAGTTCGAGGGACTGGAGTACGTCGATTACCCGATGGGTGCACGAC  
 CAGCGATCCATCTACAAGCACCCCTGCTCTGCGAGTCTGTATCCACCACGGTGGAGGCAACTCCTTCAACGAGGCT  
 GTCCACTACGCCCTCCCCCAGATGATTCTGTCTCAGTGGTTCGACACCCACGAGTACGCCATTCTCGCTGAGCGA  
 TTCGGCATCGGTCTGCGATCTAAGCACGCCCCCAAGATCGACGAGAACGACCTGGTCAACACCATGACCCGACTG  
 CTCCAGGGTCCCGAGGCTGAGAAGATTCGACGAAACGCCAAGGTCTGGTCTATCCGATCCCGAAACGCCGGTGA  
 GCTCCTGCTGCTGCTCGACTCATTGAGGCTCAGGCCATGCTGTTCAACCAGCAGAAGCAGCTGGAGCTCGCTGCC  
 TCTGAGGTCCGAGCTGCTGTGGACACCCCTCTCCGAAAGTCTTCCGTGCTGACCTGGAGTCTGAGACTGCCTTC  
 ACCCCCAACATGCTGTCTGGAGCTGCTTCCACCGTGGGATCTGACGAGGCTCGACACAAGCAGAAGATCGTCTGCT  
 CCCGTGAAGCAGACCCCTCAACTTCGACCTGCTCAAGCTCGCTGGCGACGTGGAGTCCAACCCTGGTCCCTCTAGA  
 ATGATTAACAACGCCCTCCGAACCCTGATCTCTTCCGCTACCGAGCAGTCCCTCGACGACGTCCTGGAGCACGAG  
 TTCCGAACCGCCGTGCAGCTGCAGCAGATGGACCAGTTCGAGTGGCACACGAGTTCGAGGCTGACCTCTGGAAGCGA  
 ACCTGCCCTGGGACACGAGGCTTCTGCCTCCTTCAACCAGAACATCGCCCACGGCCACACCGAGCTGTCCCTCATG  
 ACCTCTTGGCGAGTGCACCAGCCCTCTTCCCTCTCGAATTACCGGATCTGAGCTCGAGCTGGACCAGCTGGTGGCC  
 CGAGTCCGACAGGCTTGGATTCAGGCTCGATACCTCCGACCCGAAGTGGGTGTGGAGCTCGACACCCACACCGAC  
 CCTACCGTGGCTCAGACCATGTGCTACCAGTCTCCGAGACGAGGAGTCCATCCAGGAGTGGCTCGACGAGACT  
 TTCGTCGTGAAGCGACTGGGTGACCCCGAGTGGCTACCCCGCTGAGCTCTGTGCCTACACCTACAACCCGACCC  
 CTGGCTACCAAGGGCAAGAAGTCCATGCTGTACCTCATTCTGCCTCGACTGGACGACGACGACGACGACCCGCTAC  
 ACCATCTGGAACGTCTCTCACGCTGTGACCGACGGCGGTTCCCTCGCTGAGGTCTTCAACACCCTGTTCCAGTGT  
 GTGATTGACGCCACCCCTCCGAGCCCTACGACTCTATCTACACCCCTCCGCTTTTCGAGCTCAACGTCCTGCCC  
 CGAATGCCCGATCCGTCGTGATGGCCTACCGACAGCAGTACCAGCCCAAGCCGAGGAGATTGCTAAGGCCAC  
 AAGGTCGCCGAGGTGAACATGCGAATGATCACCGAGAAGATGGGAGAGTCTCTCGCTCTGATGCCCTCTACCTCC  
 TGGCCCGAGCGAAAGCACGAGACTGTGTGCCCTCTGTGAGAGCTGGAGGCCAACGAGGTCCGAGAGCTGCTCAAG  
 TTCGCTAAGCAGGTGCACCTCCGGCATTACCTACCTCGCTCTGCTGCCACCATCCTGTCCGCTGCCGAGACTTTC  
 CCCGAGCGAAAGGCTTCCCTTAAGGGCGCCCTGGTCCGTATGGTGCGAAACGCTCGACGATGGATTTCTGCTACC  
 CCTCTGGACGCTTCCCTGGGTGCCCTTACCCCTCTGGGATCTGACGCCGTCTTCCCTGTGGGTGCCCATCGACACC  
 CACAAGACCCCTCGAGCCCTCTTTCTCCCGAATGCAGGAGCTGGTACCACCGCCCGACACATTCGACACGAGCTC  
 GACAAGCACCTGACCACCCCTCACTGCATCTCCTCTTACCCCTACGTCGCTGAGTCTCTATTTCAGGGCCTGAAC  
 CAGCAGTGGTCCCAGATCAAGGCCGTGCAGTCCCCCTCCTCTTCCCTTCCCGAAGGAGATTGCTGGCATCATT  
 GGTGCTCAGGCCCCCGGCTTCTCTTCCGTCCGTATGATGCGAATCCGACCCCGATTTCGAGCCCGTGTCTGCTAAC  
 CCCCAGCTTCTGGCCTCTGGCTGGAGCGAACCGACTTACCCACACCCGGTTCGACAGATTAACGCCTCCCCCTGG

ATCTCTATGTTCAACGTCGACGGACGAATTAAGCTCCAGCTGGGCTTCGACACCAAGTTCACGAGGTGGAGAAG  
 ATGAACCAGTGGCTCGACCGAACCCTCGTGTGGATGCGAATCTGTGCTGCCGCTGCCGCTACCACCTCTACCTCC  
 GTCTCTTCTACCTCTGTGGACGCTACCCTCCTGTCTTCAATTGGAGGCCGACACAAGCAGAAGATTGTGGCC  
 CCTGTCAAGCAGACTCTGAACCTTTGACCTGCTGAAGCTGGCCGGTGACGTCGAGTCTAACCCCGGACCCCTCTAGA  
 ATGCAGGCTGACAAGCACGCTTGAAGGAAGTCTCCCCTAACCTCGCTCAGCGACCCCTGGTGGGTGTGGAGAAG  
 CTGCTCAACTACGCTGAGTACTACCAGAACCGAAACTTCCAGCTGTCTGCCGCTATCCACCTGGAGACTAACCTG  
 ACCACCGAGAAGCTCCAGCAGCGATTCCGCTGGCCGCTGGAACGTGCGATGCCTGCTCCCCGAGATTGGCACC  
 TGGACCGTGGGAACCACCGGCGACGCTGCTGTGGACCTGGACAACGCTACCTTACCAGCCATCCAGACCGTGGAG  
 GAAGCCCAGAAGTGGATTGACGAGACTGCTGTCATCGTTCAGGACGGCACCACCGCTGAGGAGCTCACCATTCTG  
 ACCACCAACCACACCATCGAGCCCGCGAAAGCAGTTCGAGTCTACCTGGTGACCAACGCTCGACAGGGCTCC  
 CCCGCTATCATTGTCAACGCTCCACGCTCTCTGGTACCAGATTGCCGCTCAGCTGTGTACCATCGTCCAG  
 GCTCTCGTTGACGCTCGACTGGTGTCCCTGCTGCAGGCTGAGCCTGACCCCGAGCCGCTCTCCGATCTATCTTC  
 GTGCCCGAGAACCCTCGCCCGACTGATTGGCAAGCTGCCATCTCCCTGAACACCGCTTACCACAAGCGATTCAAC  
 CCCACCGAGGGCGACCTGGAGAACGGCTTCGAGAAGCTCTCTGAGCGACTGGCCAACCTCCGCTCTCCCTCTATC  
 GGTATTCCCTCGACTGTCTTCTCCCGCTACCAACCCTGAGTACTCCCTCGGAACCGTCAACGGCGAGGCTATGACC  
 ATATGAACCTGCGACGAACCATCGGATCCAACGAGTACCGACTGCTCATTGACGCCCACAAGAAGCTGGGCATC  
 ACCGTCCCTCTGTGATCTACGCTTGCATTGTGAACCTATCGACCGACGATGCAAGTCCAACACCGCTCAGGAC  
 GCTGAGACTCCTGGTGCCAACCTCGCTTACTCTGCTCAGCTAAGCGATGGCTGCCTGACGAGACTTTCATGACC  
 CGATCTCCCGTCAACATGGCTATTGTGCTGGTTCGGCTACGCTCTCTCCGACGAGCTCCGATCTAAGCAGCAC  
 GGATGTGACCTGCCATTGACGAGTCTCAGGCTCGGCAAGACCATCCGAGCTAAGCAGGACGCTACCCTCGAC  
 ACCCTCACATCATTTCGGCTATGGAGCAGGTCCGGACGAGGTTGCTGCCATGATTGCTGACACCGCATCAAG  
 CAGCGACAGGCTGGCACCAGCCCTACGTCGCTCTGTTTCGAGAACTCCCCGCTATTTGCCCTCCACCCCTCACC  
 TCTCAGGGCGACATCGCCTTCAAGCGACTGTACACCGCTCAGGGAGGCTCCTGGGACCCTGAGCCTGCTGTGGCT  
 GCTGGAGAGTACGTGTACATCGGTCCTTGGAACTCCGGACGAACCACCGACGCTTCTGTCTGTTTCGCCCTG  
 GTGGGTTTCTCCGGAGAGCTCCGACTGACCTCTACTTTCGACTCTCGATTCTTCGACGCCAAGCTCATCGAGTCT  
 ATTCTGGACGACGCTCCTCTTAACCTCCGAATGATTGCCACTACTGTTCTGTTGACGCCCTGAGCAATTGTAA

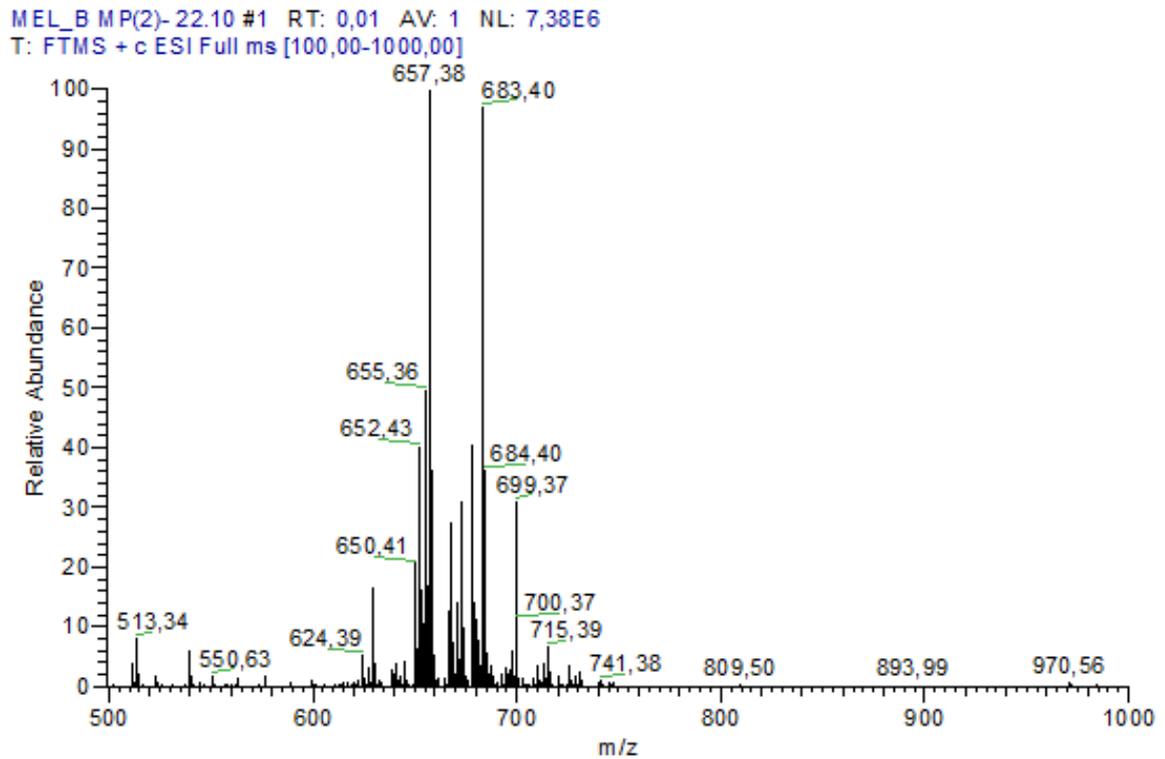
**B.**

ATGGCCGACGAGAAGCGAACCTCCATCGAGGAGCCCGAAACCCCATGTCTTACTCTACCGCTGCTTCCCTGAG  
 CTGCTCTCCTCTTCCAACAACGCTCTGCTCTCCCGCTTACCCTCTTCCCAGACCAAGCAGGACAAGGAGTCT  
 CTGTCTCACGACCAGGCCGTCGAGTGGAGCCTGAGTCTTCCACCCCTCTGACCGACTCTGTGAGGACAACGAG  
 TCCGGCGCCAAGGTGAAGAAGGACCTGCACTTCTGGATCATTCTTCCGCTCTGATGCTCATTGCCTTCGTCGCC  
 GCTCTGGACATGACCATGATTTCTACCGCTCTGCCTGCTATCACCGCTAACCTGCCTCCCTCTACCATCGCCGCT  
 AACTGGATTACCTCCGCTTTCTGCTCCCCATGGTGGCTCTCAGCCCATCTTCGGCGGTCTGTCTTGTCTCCATC  
 GGACGAAAGTGGTCTATTAACCTCCGCCCTGGTCACTTCTCCTCGTGGGCTCCGTGGTGTGTGCTACCGCTAAGACC  
 TTCTGGTCTCTGATCGGTCGAGGAATTCAGGGCTGGGAGGCGGTGGAATTAACCTCTATGTGCGAGATCATT  
 ATGTCTGACCTGACCACCTCCGAGAGCGAGGCTGTTCTTCGGTGTATCGCTCTCGTCTTCGCCGTTGCTGGA  
 TTCGCTGCTCCTGTCTGGGCGGTGTGTTCTCTGAGCACTCCTGGCCCTGGATCTTCTGGATTAACCTGCCATC  
 GGTGCCATTTCTCTGCTCCTGCTCATCATTCTTCCCTGAACATCCGAGTGGCCCTGCTCACCAGAAAGGAGAAGTGG  
 CAGAAGCTGGACCTCGTCGAAACGCTGTGCTCTTCGGCTCCGTCACCGCTATCCTGATTGCCGTGACCGAGGGA  
 GGCATTAAGTACCGATGGTCTGCCTGGCAGATTTGGGTCCCTCTGGTGGTGGGCTGCTCGGAATTATGCTGTTT  
 CTCGTCATCGAGTGGGTGCCCAACCGAATTGCTCCTAAGCCTGTGTTCCCTCTGGACCTCTTCCGAAACCGAAC  
 GCTTCCGTCGCTACGTGCAGACCTTCGTCACGGCGTGATCTTCTACGGCGTCATCTACATGGTGCCCATCTAC  
 TTCCAGGCCATTAAGGACCGAACCCCTCTGCAGTCTGCTATCTGGTCTTCCCTCTGTCTGCTCCCTCCTTCCCT  
 TTCGCTATGGGTGCTGGTGTCTCATCTCTATTACCGCAAGTACAAGCTGCTCATTCTGTGGTTGGATGCTG  
 ATGGCCGCTGGAATCGGCTGGATGACCCACTGGCACGTCGGTACCTCTAAGTTCGAGTGGGCTTCTCCCAGGTC  
 ATCCTGGGCGCTGACTCGGCATCATGTTCCCATTAACCTGCCTCCCATCCAGGCTGCTCTGCCTGCTTCTCGA  
 CTCGAGTCCGCTACCGCCGCTTACGCTTACCCGAACCTTCGGAGCCGTTGGGGCATTACCAGCCGCTACCACC  
 ATCTTCTTACCCAGGCCGCTAAGAACCCTCCGACCTACTACGACCAGCTGAACCCCTGGGCTCTCTGACTTC  
 ACCGTGCTGGCCTTCTCCGAGCAGCTGCGAAACCTCCCCAGCCATTACGGGTGTGCTGAAGGGAGTCTACGCC  
 GACGCTATCTCTGACTCCTACTGGCTGTTCGTGCCCTCGCTATCATTGGTTTCTTACCACCTTCGGAATGAAG  
 GAGCTGCCCTCCCGACTTCAATCAAGTCCGAGGCCAAGCTCGAGCAGAAGCAGGACGTCACCCCGCTCTGAAG  
 TCTTCCGCCGCTCACGCCGTCGTGAACGTCAGACCGAGGTGCCCTCTACCCTGCCCTAA

**Apêndice 2** – Cromatogramas dos padrões submetidos à hidrólise com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M à 100 °C durante 4 h, obtidos por *High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index Detector*. **(A)** Padrão de manose e eritritol (*Sigma-Aldrich*) ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). **(B)** Padrão de manosileritritol lipídios (*Toyobo*) ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). As setas indicam os tempos de retenção para a manose e o eritritol.

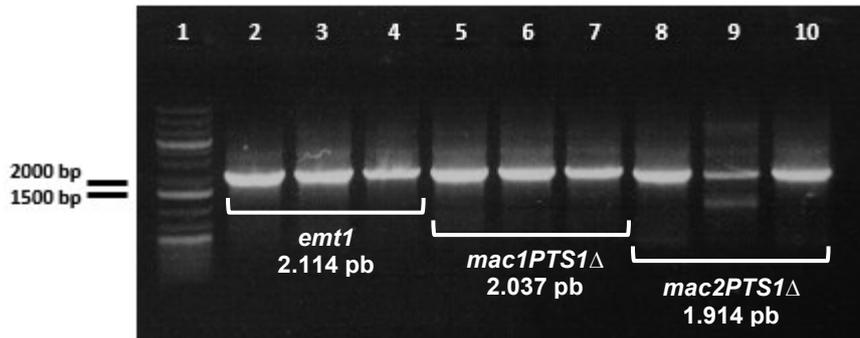


**Apêndice 3** – Espectro de massas do padrão de manosileritritol lipídios no modo *full scan*, obtido por *Electrospray Ionization - Mass Spectrometry*. Os pesos moleculares dos íons  $[M+Na]$  mais intensos foram considerados para o cálculo do fator de conversão de manose e eritritol em MELs, após a hidrólise ácida.

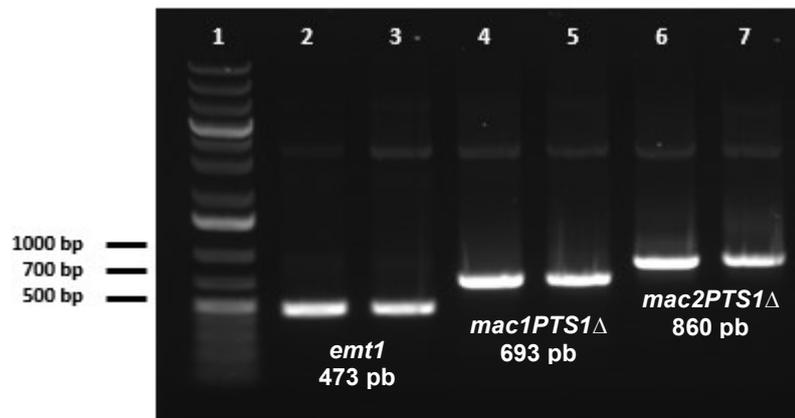


**Apêndice 4** – Eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) dos plasmídeos GGV-TOPO-*emt1*, GGV-TOPO-*mac1* e GGV-TOPO-*mac2* para a montagem do vetor de expressão por *Golden Gate Assembly*: **(A)** Produtos da PCR com os oligonucleotídeos inespecíficos M13fw/M13rv (fornecidos pela *Invitrogen*). **(B)** Produtos da PCR com os oligonucleotídeos específicos (Fw-*emt1*/Rv-*emt1*, Fw-*mac1*/Rv-*mac1* e Fw-*mac2*/Rv-*mac2*, respectivamente). **(C)** Reação de digestão com a enzima *BsaI*.

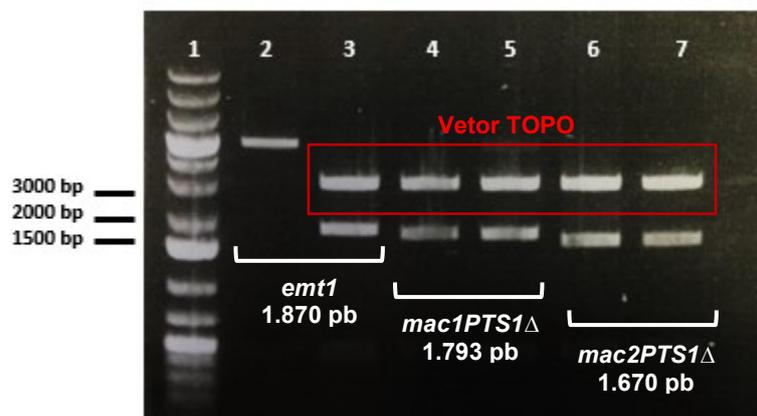
A.



B.

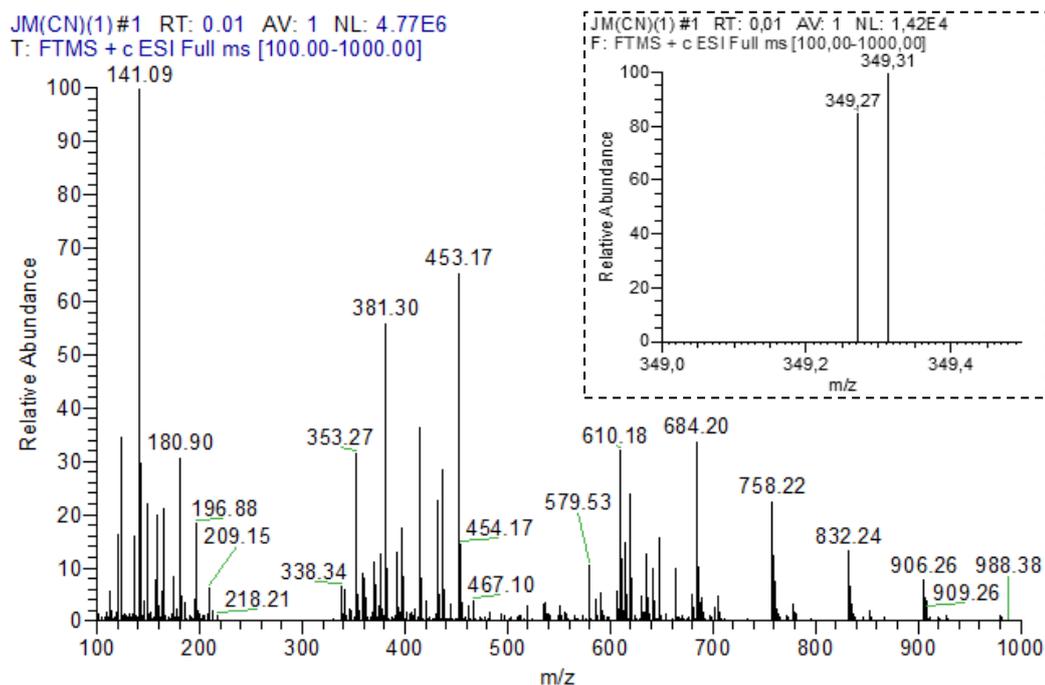


C.

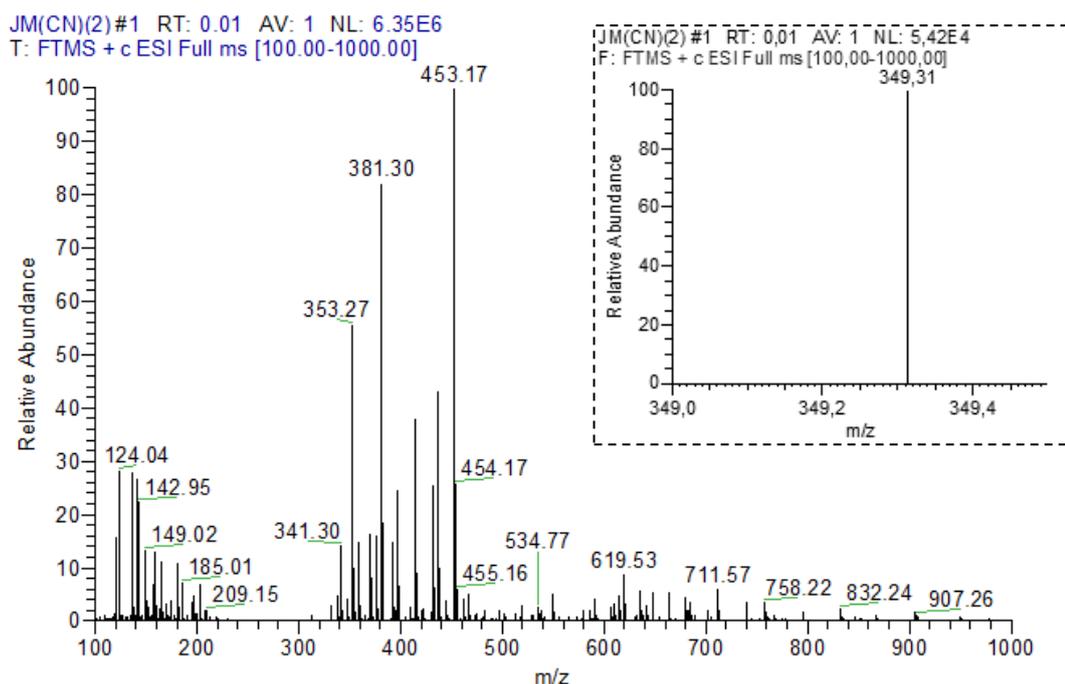


**Apêndice 5** – Espectro de massas dos extratos brutos das fermentações em YNBE1%M1%(1) e YNBE1%M2%(2) no modo *full scan*, obtido por *Electrospray Ionization - Mass Spectrometry*. **(A)** EB<sub>CN</sub> (1). **(B)** EB<sub>CN</sub> (2). **(C)** EB<sub>E+EMM</sub> (1). **(D)** EB<sub>E+EMM</sub> (2). **(E)** EB<sub>E-EMM</sub> (1). **(F)** EB<sub>E-EMM</sub> (2). **(G)** EB<sub>E+EMMM</sub> (1). **(H)** EB<sub>E+EMMM</sub> (2). **(I)** EB<sub>E-EMMM</sub> (1). **(J)** EB<sub>E-EMMM</sub> (2). A imagem destacada pela linha pontilhada refere-se à ampliação do espectro. Os íons em destaque mostram o [M+Na] dos MELs produzidos.

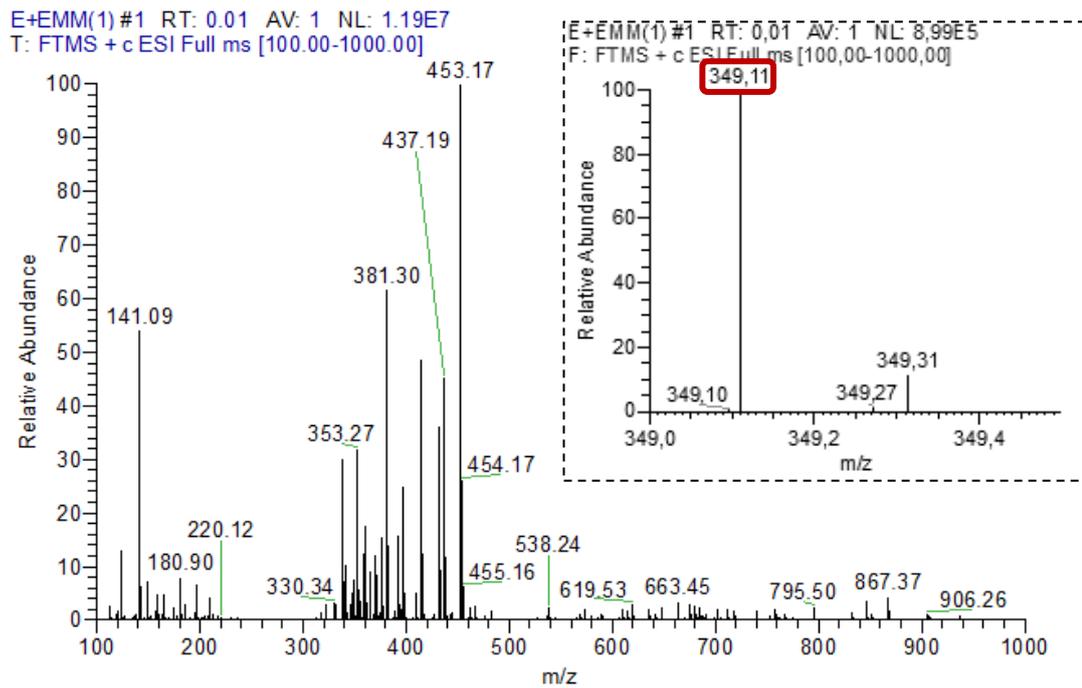
**A.**



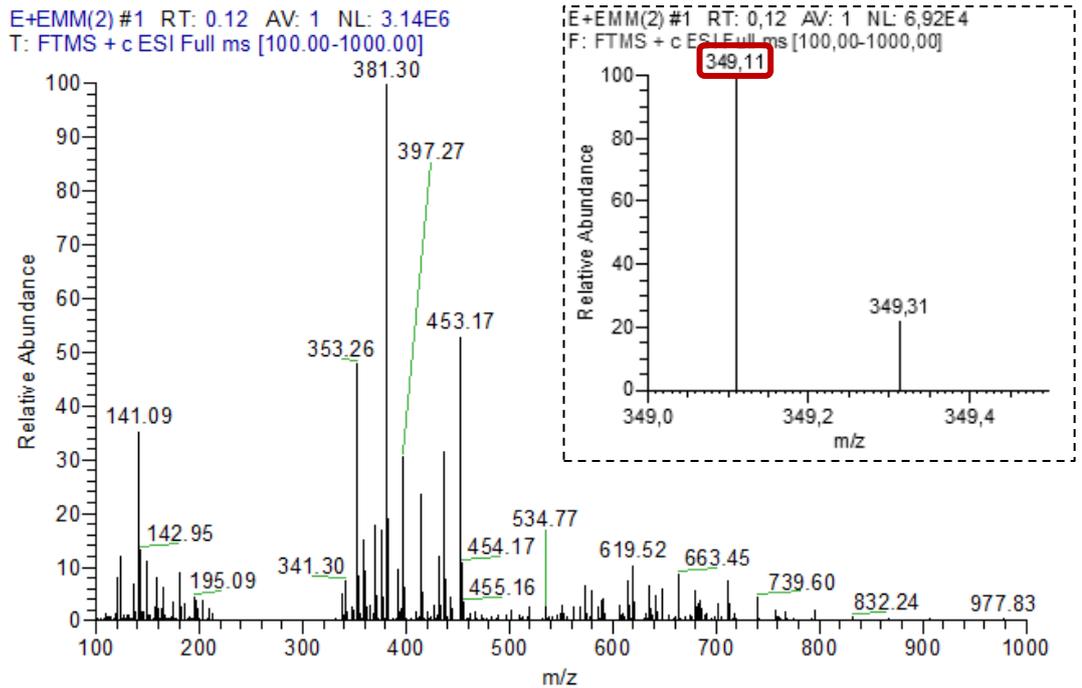
**B.**



C.

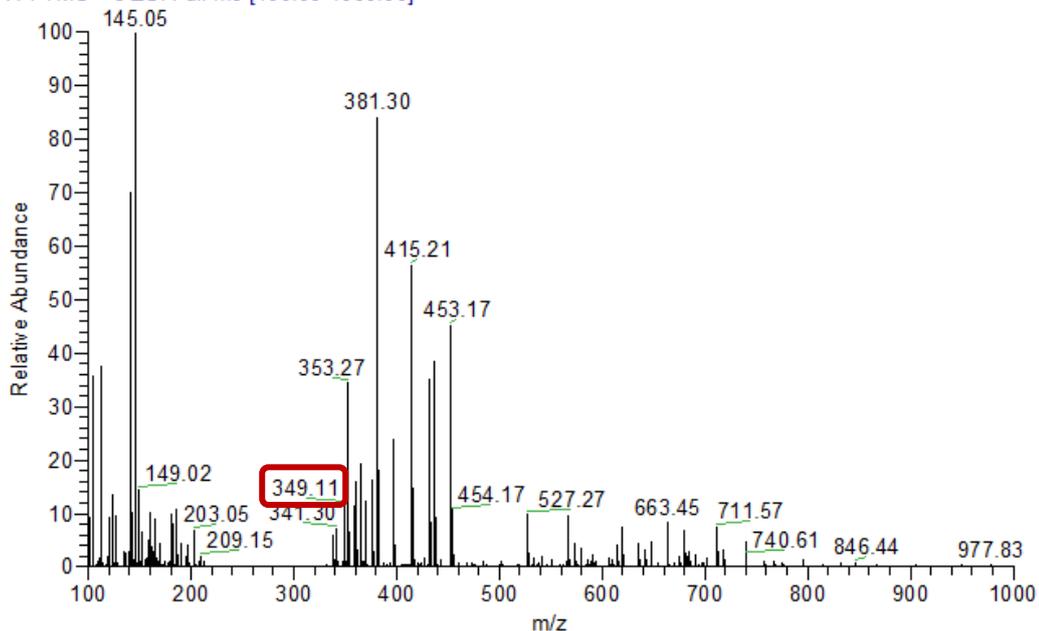


D.



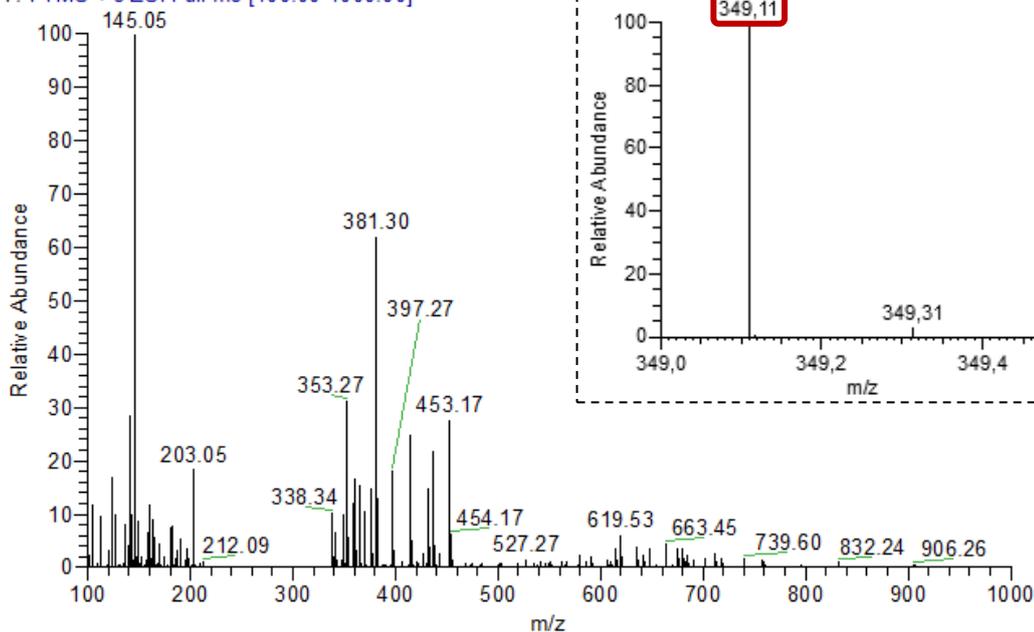
E.

E-EMM(1) #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.73E6  
T: FTMS + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

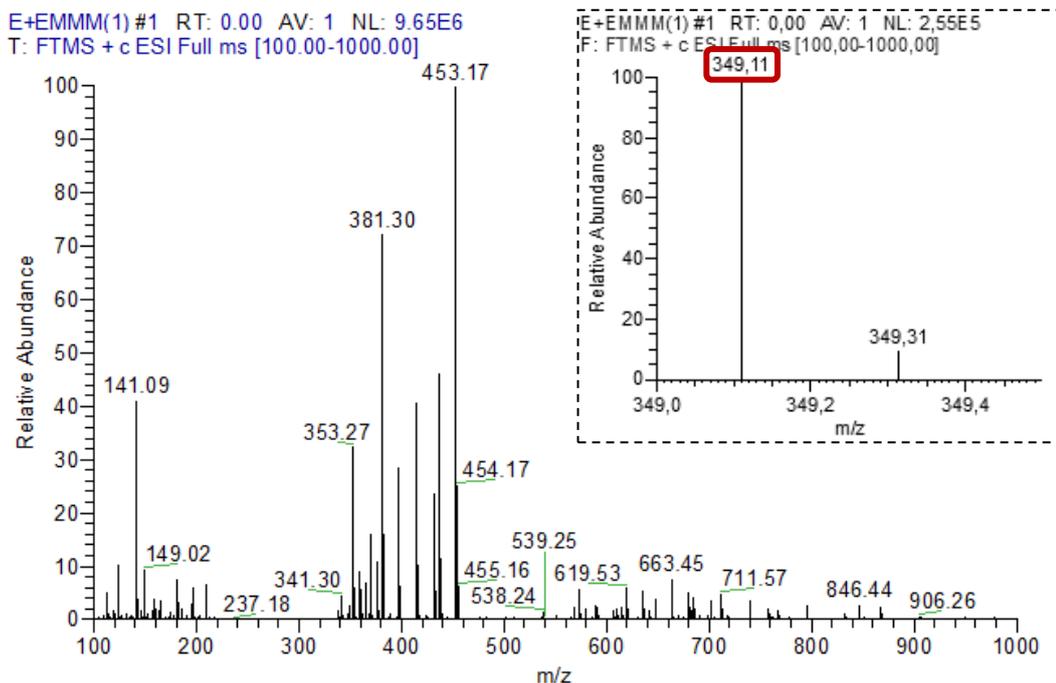


F.

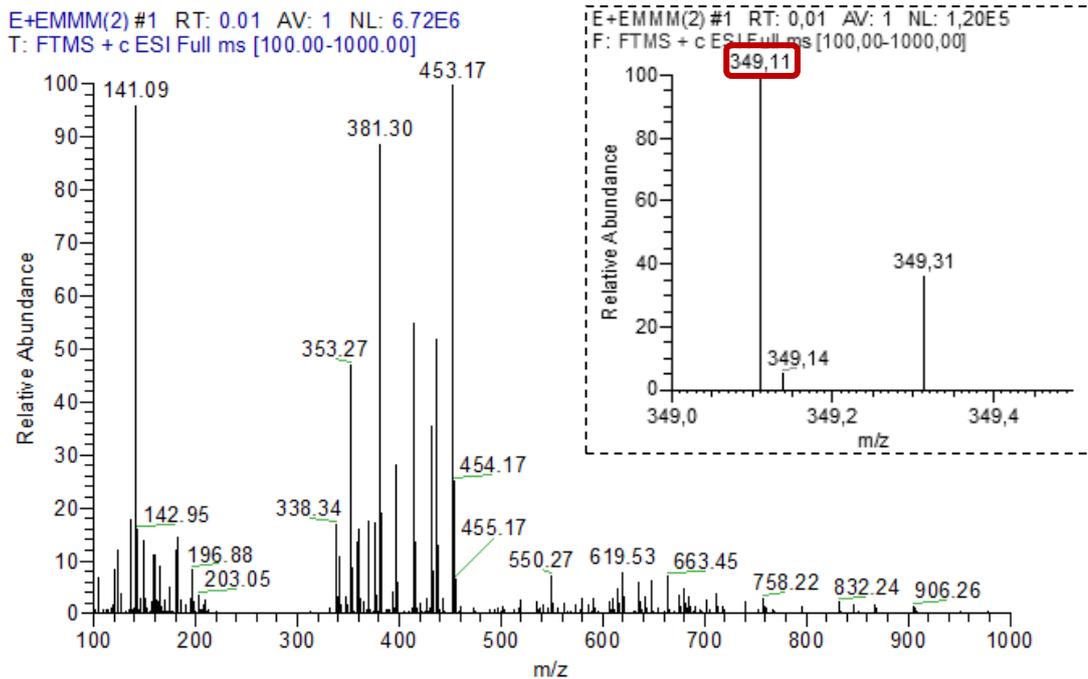
E-EMM(2) #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 9.90E6  
T: FTMS + c ESI Full ms [100.00-1000.00]



**G.**

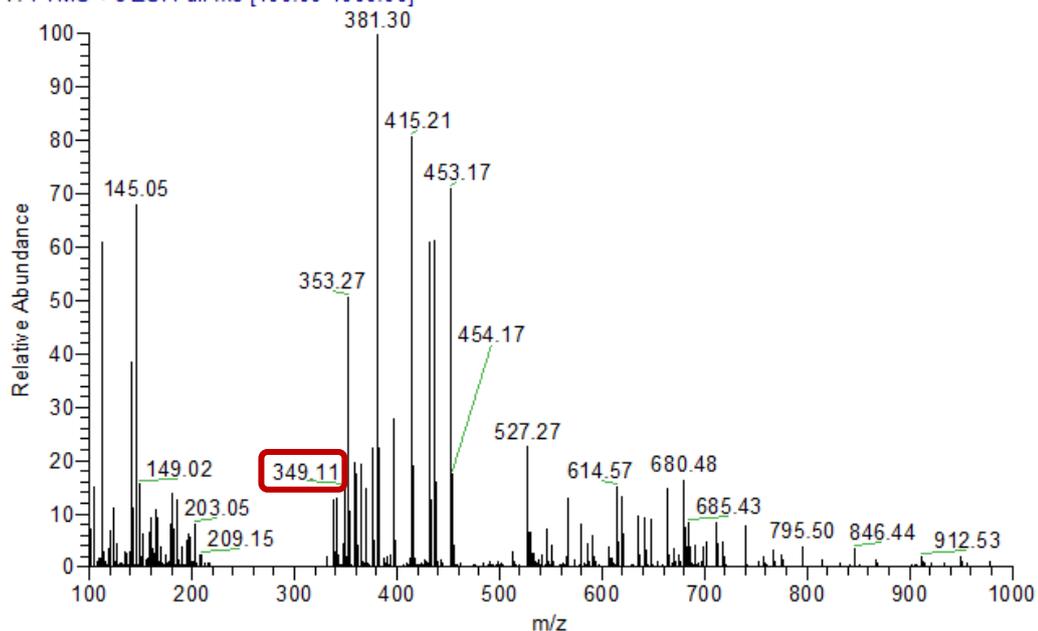


**H.**



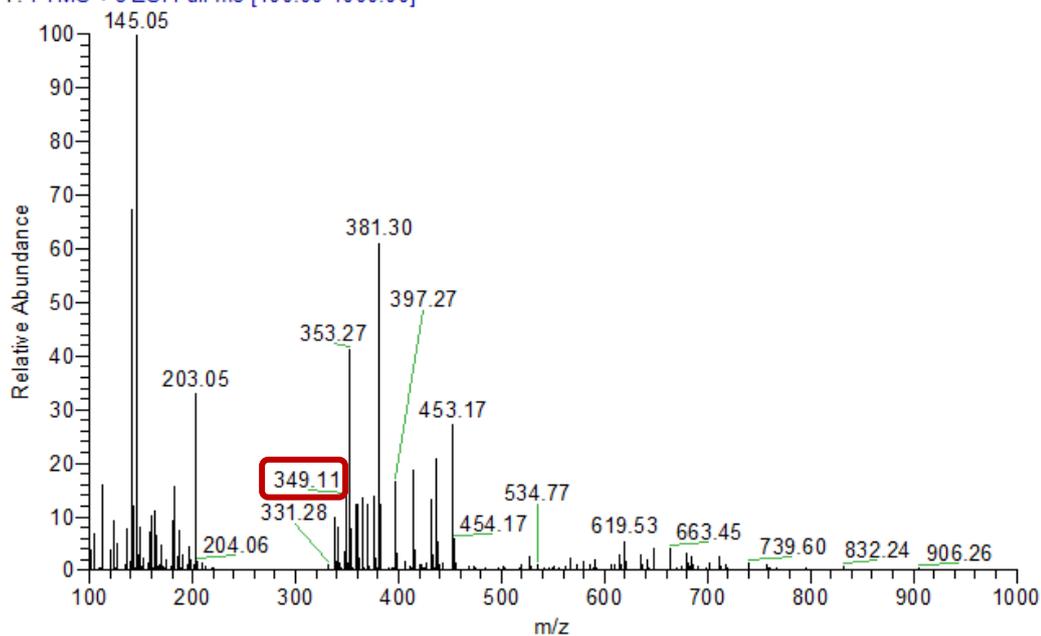
I.

E-EMMM(1) #1 RT: 0.12 AV: 1 NL: 2.00E6  
 T: FTMS + c ESI Full ms [100.00-1000.00]



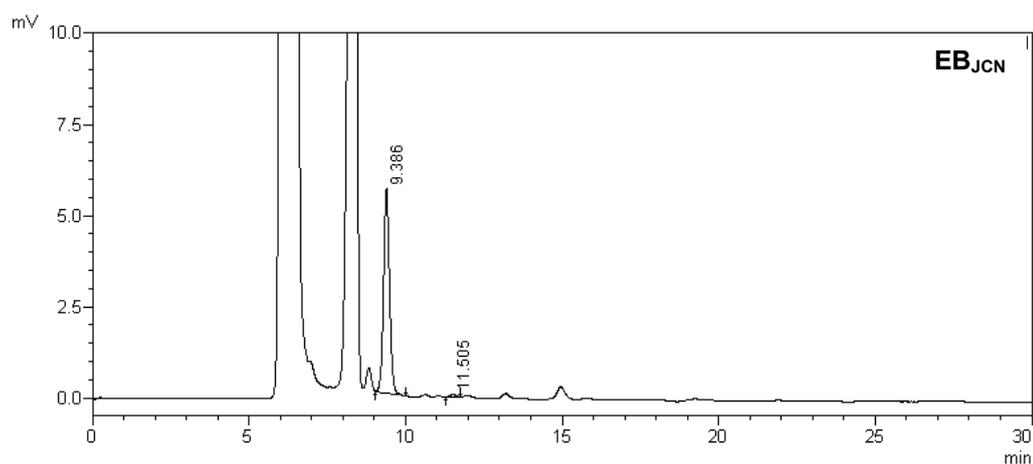
J.

E-EMMM(2) #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 8.75E6  
 T: FTMS + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

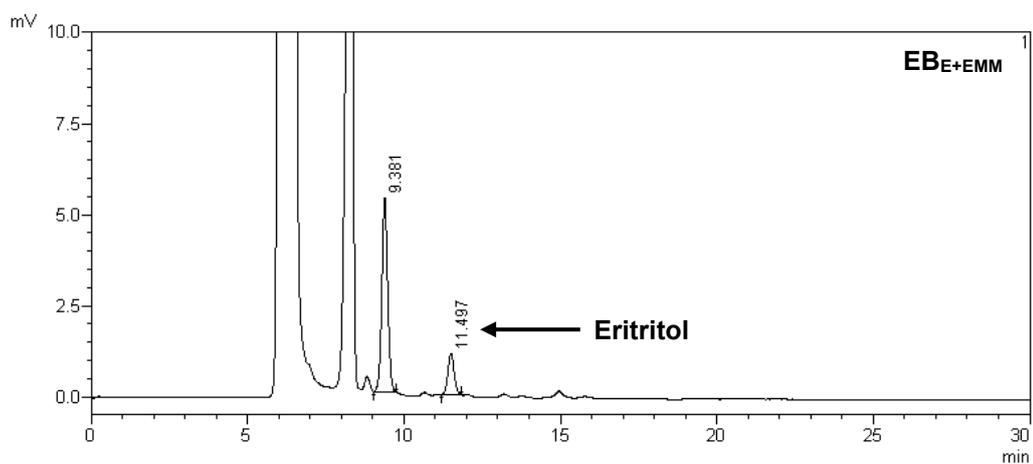


**Apêndice 6** – Cromatogramas dos extratos brutos das fermentações em YNBE1%M1% após à hidrólise ácida, obtidos por *High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index Detector*. **(A)** Extrato bruto JM-CN. **(B)** Extrato bruto JME<sup>+</sup>EMM. **(C)** Extrato bruto JME<sup>+</sup>EMMM. **(D)** Extrato bruto JME<sup>-</sup>EMM. **(E)** Extrato bruto JME<sup>-</sup>EMMM. As setas indicam o tempo de retenção do eritritol.

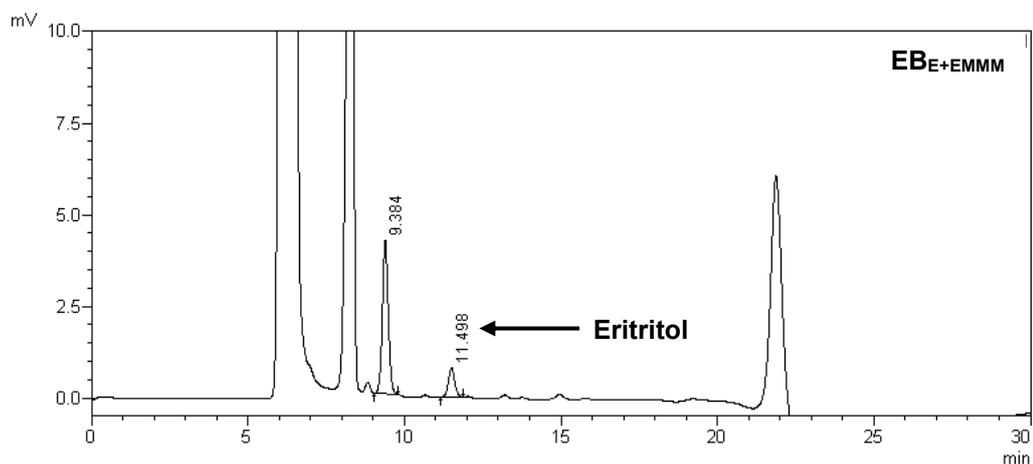
**A.**



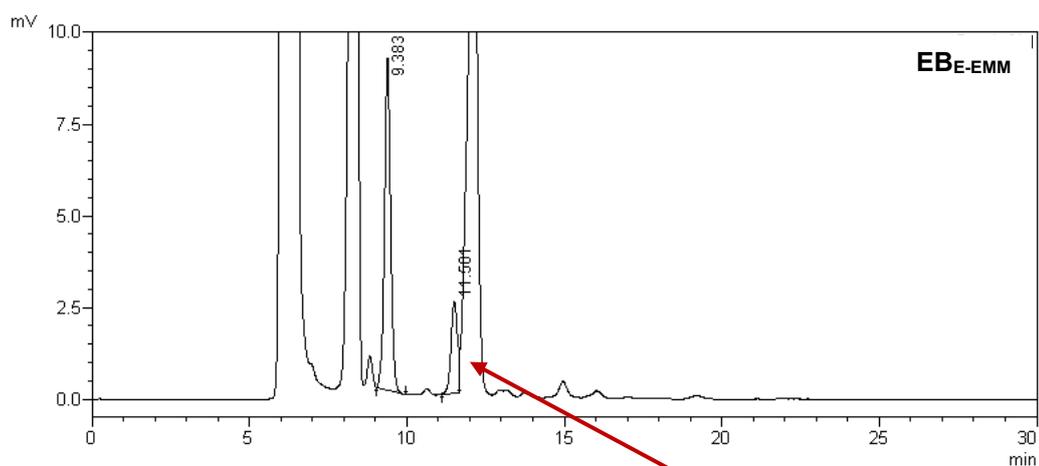
**B.**



**C.**

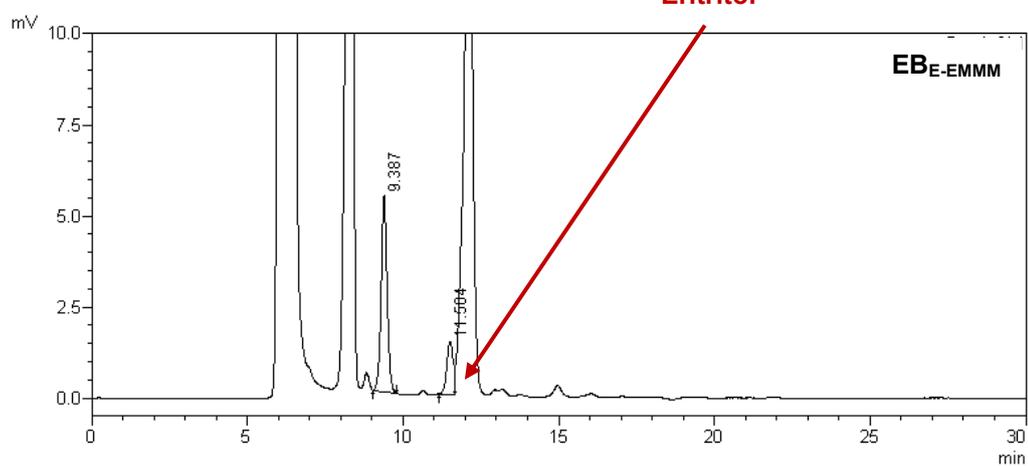


**D.**



**Co-eluição do Eritritol**

**E.**



**Apêndice 7** – Alinhamento das regiões promotoras e terminadoras do gene *URA3* das linhagens de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e W29 (Nº de Acesso: AJ306421.1). As sequências destacadas em vermelho indicam os sítios de início (*URA3* Transcription Start Site - UTSS) e de terminação da transcrição (*URA3* Transcription End Site - UTES).

**URA3 Transcriptional Start Site**

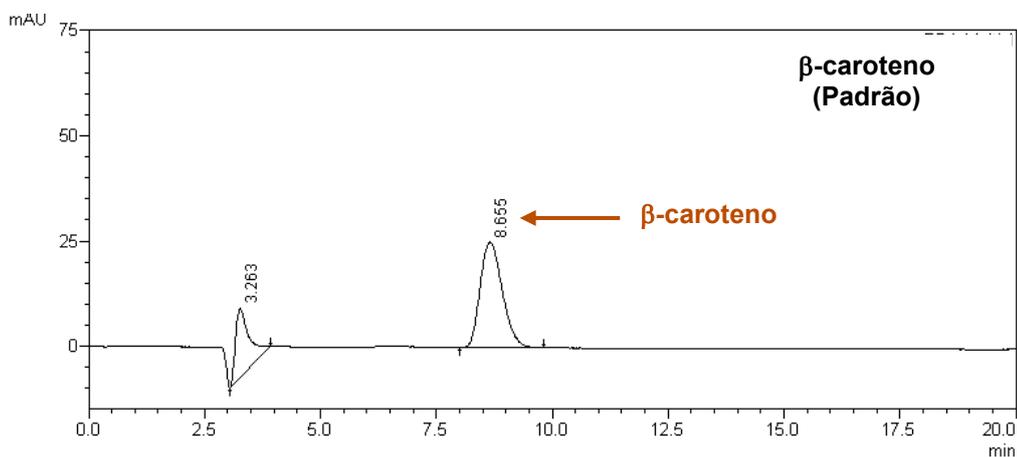
|        |                      |  |                    |
|--------|----------------------|--|--------------------|
|        | <b>UTSS2</b>         |  | <b>UTSS1</b>       |
| W29    | ATAGCCGTATAGTCCAGTCT | ATCTATAAGTTCACCTAAGTTCGTAAGTCTA-----TTACCATAACAT | ATAGTTCAGTCCAGGATG |
| IMUFRJ | ATAGCCGTATAGTCCAGTCT | ATCTATAAGTTCACCTAAGTTCGTAAGTCTACAGTATTACCTTACAT  | ATAGTTCAGTCCAGGATG |

**URA3 Transcriptional End Site**

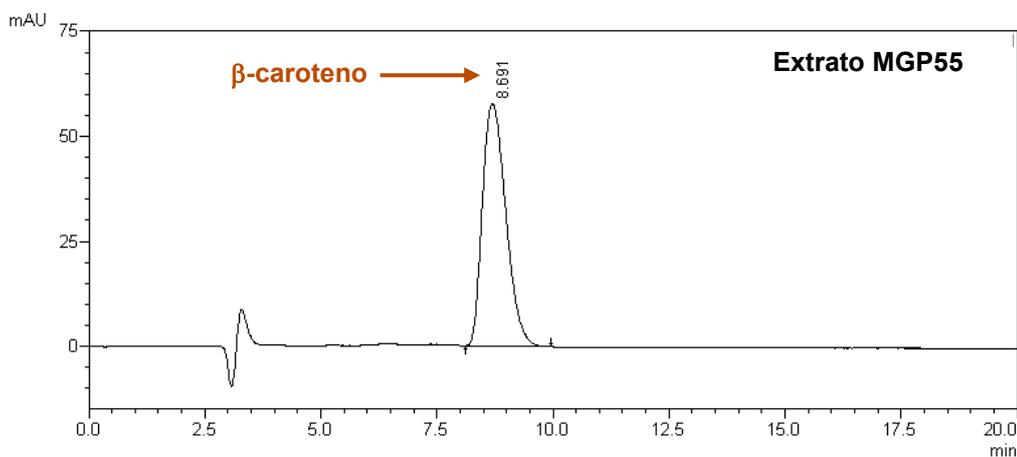
|        |                      |   |                      |
|--------|----------------------|---|----------------------|
|        | <b>UTSE1</b>         |   | <b>UTSE2</b>         |
| W29    | ATATAGAGAGCGTGCAGTAT | TGGAGCGCTTGTTCAAGCTTGATGATGGTCAGACGACCTGTCTGATCGAGTATGT | ATGATACTGCACACCTGTGT |
| IMUFRJ | ATATAGAGAGCGTGCAGTAT | TGGAGCGCTTGTTCAAGCTTGATGATGGTCAGACGACCTGTCTGATCGAGTATGT | ATGATACTGCACACCTGTGT |

**Apêndice 8** – Cromatogramas dos carotenos extraídos dos cultivos obtidos por *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector (HPLC-DAD)*. **(A)** Padrão de  $\beta$ -caroteno (*Sigma-Aldrich*). **(B)** Extrato de carotenos da cepa cultivada no meio MGP55. **(C)** Extrato de carotenos da cepa cultivada no meio MGL55.

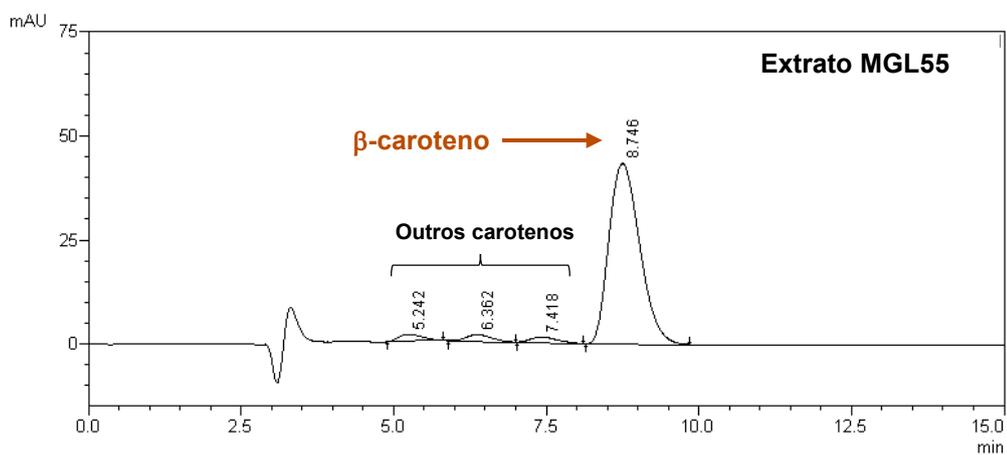
**A.**



**B.**



**C.**



**Apêndice 9** – Manuscrito publicado na *Enzyme and Microbial Technology Journal*



# Construction of wild-type *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 auxotrophic mutants using dual CRISPR/Cas9 strategy for novel biotechnological approaches

Camilla Pires de Souza<sup>a,b</sup>, Bernardo Dias Ribeiro<sup>b</sup>, Maria Alice Zarur Coelho<sup>b,\*\*</sup>, Rodrigo Volcan Almeida<sup>a,\*</sup>, Jean-Marc Nicaud<sup>c,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-909, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Biochemical Engineering Department, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-909, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

## ARTICLE INFO

### Keywords:

*Yarrowia lipolytica* Brazilian strain  
*URA3* gene disruption  
 Dual cleavage CRISPR/Cas9-mediated  
 Biotransformation  
 Metabolic engineering  
 Carotenoid production

## ABSTRACT

*Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 is a Brazilian wild-type strain with potential application in bioconversion processes which can be improved through synthetic biology. In this study, we focused on a combinatorial dual cleavage CRISPR/Cas9-mediated for construction of irreversible auxotrophic mutants IMUFRJ 50682, which genomic information is not available, thought paired sgRNAs targeting upstream and downstream sites of *URA3* gene. The disruption efficiency ranged from 5 to 28 % for sgRNAs combinations closer to *URA3*'s start and stop codon and the auxotrophic mutants lost about 970 bp containing all coding sequence, validating this method for genomic edition of wild-type strains. In addition, we introduced a fluorescent phenotype and achieved cloning rates varying from 80 to 100 %. The *ura3Δ* strains IMUFRJ 50682 were also engineered for  $\beta$ -carotene synthesis as proof of concept. Carotenoid-producing strains exhibited a similar growth profile compared to the wild-type strain and were able to synthesized 30.54–50.06 mg/L (up to 4.8 mg/g DCW) of  $\beta$ -carotene in YPD and YNB flask cultures, indicating a promisor future of the auxotrophic mutants IMUFRJ 50682 as a chassis for production of novel value-added chemicals.

## 1. Introduction

*Yarrowia lipolytica* is one of the most widely studied non-conventional oleaginous yeasts due to its valuable and diverse biosynthetic potential among different wild-type strains of industrial relevance [1]. It has emerged as an excellent cell factory for safe and high-level production of enzymes [2], unusual fatty acids [3], organic acids [4], polyalcohols [5], aromas [6], carotenoids [7] and bioemulsifiers [8] from different sources. Over the years, this yeast became a model in research on fungal dimorphic transition [9], recombinant protein secretion [10], microbial oil accumulation [11] and hydrophobic substrates degradation [12]. All these features have boosted the development of novel and efficient synthetic biology tools such as modular cloning systems [13,14] and CRISPR/Cas9 technology that facilitate the manipulation of *Y. lipolytica* genome [15,16].

In the CRISPR/Cas9 method, a single-guide RNA (sgRNA) complexed with a Cas9 nuclease can recognize a precise DNA sequence and generate a double-strand break (DSB) which is repaired by homologous recombination (HR) or non-homologous end-joining (NHEJ) mechanism [17]. The repair introduces small indels resulting in frameshift mutations that can cause disturbance of gene function, incorporation of an exogenous DNA or restoration of the original allele [18]. To date, several strategies CRISPR/Cas9-based have been developed for genetic improvement of microbial cell factories, since industrial biotechnology needs to meet the growing demands and expand the diversity of molecules that can be produced by non-model microorganisms [19]. Some wild-type strains with great advantage for specific bioproduction processes, such as *Ashbya gossypii* [20], *Kluyveromyces marxianus* [21], *Aspergillus niger* [22] and also *Y. lipolytica* have already been accurately engineered through CRISPR/Cas9 systems without limitations related

\* Corresponding author at: Federal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, 541, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\*\* Corresponding author at: Federal University of Rio de Janeiro, Biochemical Engineering Department, School of Chemistry, 106, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\*\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [alice@eq.ufrj.br](mailto:alice@eq.ufrj.br) (M.A. Zarur Coelho), [volcan@iq.ufrj.br](mailto:volcan@iq.ufrj.br) (R.V. Almeida), [jean-marc.nicaud@inrae.fr](mailto:jean-marc.nicaud@inrae.fr) (J.-M. Nicaud).

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109621>

Received 28 November 2019; Received in revised form 23 May 2020; Accepted 7 June 2020

Available online 12 June 2020

0141-0229/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

to selection markers [23].

*Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 is a Brazilian wild-type strain isolated from an estuary in Guanabara Bay of Rio de Janeiro [24] with noticeable application in bioconversion and bioremediation [25]. This strain displayed peculiar surface characteristics related to the hydrophobic cell wall and high adhesion to non-polar solvents [26]. *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 is also able to secrete a particular bioemulsifier, a lipid-carbohydrate-protein complex, in the presence of glucose, glycerol, n-alkanes and oils [27,28]. Recently, IMUFRJ 50682 strain showed ability to consume isoprenoids and aromatic hydrocarbons as the group of naphthalenes and phenanthrene [29] and to be used as a low-cost biocatalyst for esterification reactions of fatty acids present in acid raw materials for biodiesel synthesis [30] and generation of commercial esters [31]. Although the industrial value of the IMUFRJ 50682 strain is remarkable, it has been little explored due to the lack of information about its genome.

Hence, we employed a combinatorial CRISPR/Cas9-mediated cleavage strategy for construction of a non-inverting auxotrophic mutants *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 through co-transformation of dual vectors harboring Cas9 nuclease and distinct combinations of sgRNAs targeting upstream and downstream sites of *URA3* gene. Further, we determined the cloning efficiency of the auxotrophic derivatives with a fluorescent phenotype, introduced  $\beta$ -carotene biosynthetic pathway, compared the growth profile of the carotenoid recombinant producers and wild-type strain in both rich and synthetic media as well as quantified its production. Future applications of the auxotrophic mutants IMUFRJ 50682 were also discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism and culture conditions

*Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 was cultivated at 28 °C in rich YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose; w/v) for growth and synthetic YNB medium (0.17 % yeast nitrogen base without amino acids, 0.5 % NH<sub>4</sub>Cl, 2% glucose; w/v and 50 mM phosphate buffer pH 6.8) for screening of transformants. Alternatively, YPD medium was supplemented with 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  hygromycin B (YPD-Hyg) (Corning), 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  nourseothricin (YPD-Nat) (Werner BioAgents) or both antibiotics (YPD-Hyg-Nat) for selection of co-transformants and cured strains. Auxotrophic derivatives were tested in YNB medium added of 0.1 % uracil (w/v; YNB-Ura) (Sigma-Aldrich). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  were grown at 37 °C in LB medium (1% tryptone, 0.5 % yeast extract and 1% NaCl; w/v) supplied with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ampicillin (Sigma-Aldrich) for cloning and propagation of recombinant plasmids. When required, solid media were prepared by adding 1.5 % agar (w/v) to liquid media. All cultures were maintained at - 80 °C in glycerol stock.

### 2.2. Assembly of CRISPR-Cas9 vectors

Target sequences for *URA3* deletion were predicted by the CRISPOR tool (<http://crispor.tefor.net/>) [32] based on *Y. lipolytica* W29 (Accession No. AJ306421.1). Two highest scoring 20 bp sequences targeting *URA3* transcriptional start site (UTSS) and transcriptional end site (UTES) with low number of predicted off-target and without protospacer adjacent motif (PAM) sequence were selected. sgRNAs were designed as complementary oligonucleotides, flanked by overhangs for plasmid assembly. All oligos were supplied by Eurofins Genomics and were listed in Supplementary File (Table S1).

CRISPR-Cas9 vectors were constructed by Golden Gate Assembly (GGA) [33]. The backbone plasmids were developed prior works [23]. Phosphorylated and annealed sgRNAs were diluted (ratio of 1:200) and then 2  $\mu\text{L}$  was mixed in one-step reaction with 100 ng of acceptor plasmids, 10 U of BsmBI, 3000 U of T7 DNA ligase, 2  $\mu\text{L}$  of DNA ligase buffer and ddH<sub>2</sub>O up to 20  $\mu\text{L}$ . sgRNA-UTSS1 and sgRNA-UTSS2 were separately added to the GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP reaction,

whereas sgRNA-UTES1 and sgRNA-UTES2 were added in the GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP mix. Thermal cycles were applied as follows: [55 °C for 5 min, 16 °C for 5 min] x 30, 50 °C for 5 min, 80 °C for 5 min, 15 °C  $\infty$ . The reaction mixture was used for chemically competent *E. coli* cells transformation and some ampicillin-resistant white colonies were screened for verification of assembled plasmids through BglII digestion. Restriction enzymes, ligases and kinases were obtained from New England Biolabs and performed in accordance with manufacturer's instructions. All plasmids used or constructed in this study were listed in Table S2.

### 2.3. Construction of *Y. lipolytica* strains

Correct CRISPR/Cas9 vectors were directly used to transform *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 by adapted lithium acetate method [34]. Briefly, about 500 ng of each CRISPR-Cas9 vectors were cotransformed. CC\_sgRNA-UTSS and CC\_sgRNA-UTES plasmids were combined in the same transformation reaction for *URA3* excision. The mixture was plated and incubated for 2–4 days. All transformations were performed in duplicate. Genotype verification of *URA3* gene disruption were performed by colony PCR (GoTaq<sup>®</sup> Master Mix, Promega) using Fw-UTSS/Rv-UTES oligos (Table S1). PCR products were purified (NucleoSpin<sup>®</sup> PCR Clean-up kit, Macherey-Nagel) and then subjected to sequencing (Eurofins Genomics). Multiple alignment of the nucleotide sequences was performed by MAFFT online service (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) [35].

Auxotrophic derivatives were transformed with NotI linearized GGVA-RedStarII plasmid [36] and SfiI digested GGVA-Carotenoid vector [33]. All colonies grown on YNB plate from the transformation with GGVA-RedStarII were cultivated in 96-well microplates containing YPD medium for 24 h in constant shaking and fluorescence was measured with excitation at 485 nm and emission at 528 nm (BioTek Synergy<sup>™</sup> Mx). The cloning efficiency was determined as the total colonies in which a fluorescent phenotype was observed by all colonies grown after transformation.

### 2.4. Determination of growth profile

Orange colonies from the transformation with GGVA-Carotenoid were grown in YPD medium at 200 rpm overnight. Cultures were washed, adjusted to an initial OD<sub>750nm</sub> of 0.2 in 96-well microplates containing fresh YPD and YNB medium and cultivated at 500 rpm in a microplate shaker (Labstac LS122) for approximately 10 h. Growth was measured as absorbance at 750 nm every 30 min (SpectraMax<sup>®</sup> M2e). All cultivations were done in duplicate and the maximal specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ) were analyzed with one-way ANOVA.

### 2.5. Extraction and quantification of $\beta$ -carotene

Intracellular  $\beta$ -carotene produced by recombinant IMUFRJ 50682 strains was extracted and measured photometrically at 455 nm (Thermo Scientific Genesys 10S) as published previously [7]. Then, cultures were inoculated with OD<sub>750nm</sub> of 0.1 in 50 mL flasks containing 10 mL of YPD and YNB media. After grown at 200 rpm for 96 h, 500  $\mu\text{L}$  of cultures were washed with ddH<sub>2</sub>O and 500  $\mu\text{L}$  of glass beads and 1 mL of extraction solution (ethyl acetate and 0.01 % butyl hydroxyl toluene) were added. Cells were disrupted in a BeadBug cell homogenizer (Benchmark Scientific) using a program consisting in 4 cycles of 60 s at 4.000 rpm in the dark, altering with ice incubation until the mixture were colorless. The extract was centrifuged, measured and then converted into concentrations through a standard curve using  $\beta$ -carotene (Sigma-Aldrich) as standard. For determination of dry cell weight (DCW), cells from a known volume were washed and dried at 100 °C. All cultures were performed in duplicate.

### 3. Results and discussion

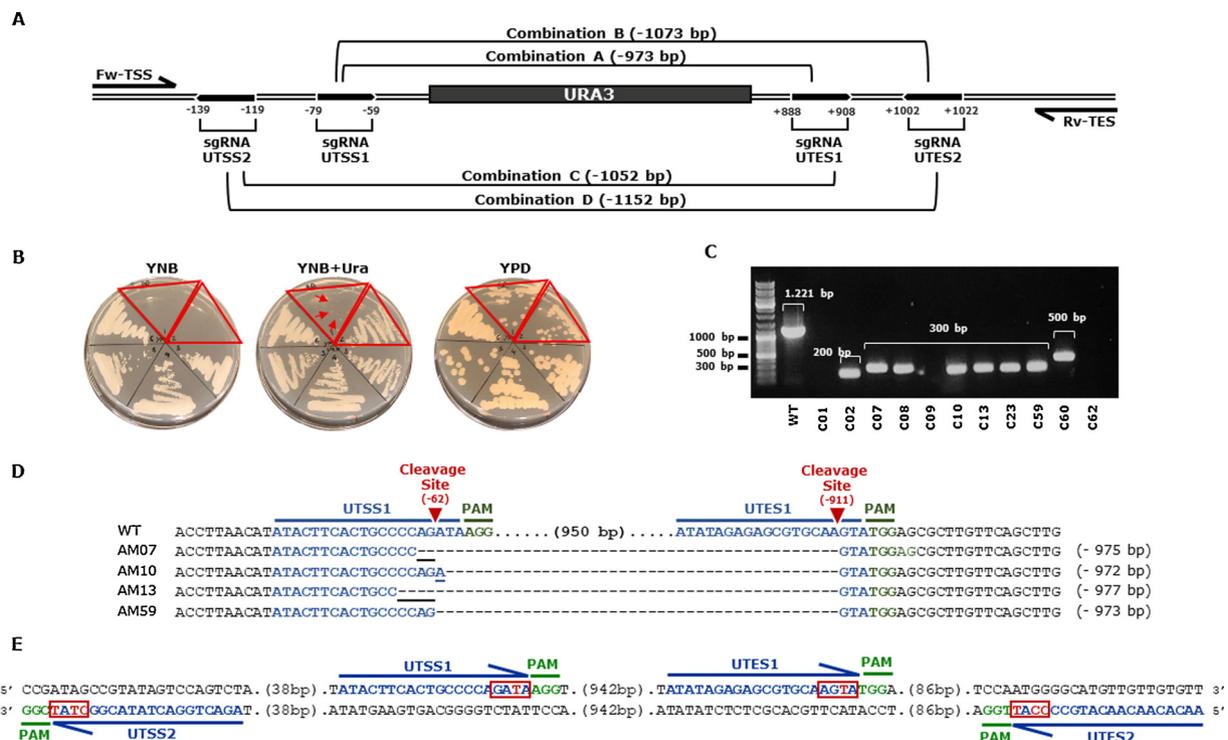
CRISPR/Cas9 technology is a powerful genome-editing tool and several methods based on Type II System have been developed recently [37]. In dual cleavage strategy, two independent sgRNAs, combined with Cas9 nuclease, induce DNA DSB in different regions which are repaired together by the NHEJ pathway, leading to complete loss of any sequence between target sites [38]. Thus, the present work investigated the efficiency of this strategy in removing all *URA3* coding sequence in a promising wild-type strain, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50p@ssw0rd

682, to construct auxotrophic derivatives. *URA3* gene encodes orotidine 5'-phosphate decarboxylase, an enzyme that catalyzes the conversion of orotidine 5'-monophosphate (OMP) to uridine 5'-monophosphate (UMP), the last step in pyrimidine biosynthesis [39]. *URA3* deletion prevents yeast cells from growing in the absence of uracil and this auxotrophy phenotype still remains the best choice for a selective marker in recipient *Y. lipolytica* strains used in synthetic biology [40,41].

To knock out native *URA3*, two pairs of 20 bp target sequences located in transcriptional initiation sites (sgRNA UTSS1: -79 to -59 bp; sgRNA UTSS2: -139 to -119 bp) and termination regions (sgRNA UTSS1: +888 to +908 bp; sgRNA UTSS2: +1002 to +1022 bp) were predicted (Fig. 1A). Each target sequence was used in the construction of four CRISPR/Cas9 replicative vectors through GGA method. Acceptor plasmids GGA\_NATex\_CrisprCas9-yl\_RFP and GGA\_HPHex\_CrisprCas9-yl\_RFP owned same construction (Fig. S1) with differences only in the target sequence and selection markers to allow us to identify which regions are more favorable for *URA3* gene editing in *Y. lipolytica*

IMUFRJ 50682, since gene excision through dual DSB CRISPR/Cas9-mediated requires synchronized cleavage of both sites during the same cell cycle [42]. CC\_sgRNA-UTSS and CC\_sgRNA-UTES constructed plasmids were mixed and co-transformed in IMUFRJ 50682 cells. Combination A was done with CC\_sgRNA-UTSS1 and CC\_sgRNA-UTES1 for excision of 973 bp. Combination B was performed with CC\_sgRNA-UTSS1 and CC\_sgRNA-UTES2 for deletion of 1.073 bp. Combination C was between CC\_sgRNA-UTSS2 and CC\_sgRNA-UTES1 for loss of 1.052 bp. Combination D was accomplished with CC\_sgRNA-UTSS2 and CC\_sgRNA-UTES1 for disruption of 1.152 bp (Fig. 1A).

After 4 days, a total of 101 hygromycin-B and nourseothricin-resistant colonies were observed in all combinations from biological duplicate: A (46 colonies), B (31 colonies), C (2 colonies) and D (22 colonies). Uracil auxotroph phenotype of the co-transformants was tested in YNB, YNB-Ura and YPD media (Fig. 1B). For combination A, 25 colonies were streaked on these media and 40 % (10/25) was unable to grow on YNB. For combination B, 20 colonies were tested and only 5% (1/20) failed to grow in the selective medium. All co-transformants from combinations C and D were cultivated in YNB and were able to grow and, therefore, *URA3* knock out did not occur. Each candidate from combinations A (10 colonies – C01, C02, C07, C08, C09, C10, C13, C59, C60 and C62) and B (1 colony – C23) was taken for verification by colony PCR and confirmation via DNA sequencing. No sequence was amplified from C01, C09 and C62 and the other eight candidates (C02, C07, C08, C10, C13, C23, C59, C60) showed amplified sequence  $\leq$  500 bp confirming *URA3* deletion, since amplified sequence from wild-type IMUFRJ 50682 had 1.221 bp length (Fig. 1C). From all sgRNA combinations, only in combinations A (UTSS1 and UTES1) and B (UTSS1 and



**Fig. 1.** *URA3* deletion of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 by dual cleavage strategy. (A) Schematic representation of paired sgRNA combinations. Numbers in parentheses show fragment size to be lost through dual double-strand break. The position +1 indicate the start codon (ATG) and sgRNA locations are presented by their distance of coding sequence (in base pairs). (B) Screening of auxotrophic mutants IMUFRJ 50682 in YNB, YNB-Ura and YPD plates. Red arrows indicate presence of colonies. (C) Colony PCR of candidates unable to grow on synthetic YNB medium. Fragments with  $\leq$  500bp indicate *URA3* excision. (D) Multiple alignment between amplified sequences (5'→3') of native *URA3* and some auxotrophic mutants from combination A showing gene deletion. Letters in blue represent *URA3* transcriptional start site 1 (UTSS1) and *URA3* transcriptional end site 1 (UTES1), letters in green exhibit protospacer adjacent motif (PAM) sequence, red arrowheads show predicted cleavage site and indels are underlined. WT: wild-type. C01-62: candidates 01-62. AM07-59: auxotrophic mutants 07-59. (E) PAM-proximal bases located in sgRNAs. Letters in green represent PAM sequence, letters in blue indicate sgRNAs sequence, blue arrowheads show sgRNAs direction and letters in red highlight unfavorable bases for Cas9 cleavage (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

**Table 1**

Efficiency of *URA3* gene deletion by dual cleavage strategy using different sgRNA combinations. Numbers in parentheses represent screened colonies from biological duplicate. Deletion efficiency is presented as the percentage of positive colonies in genotypic confirmation by the total of uracil auxotrophy phenotypic colonies.

| Combinations of sgRNAs | Total colonies | Phenotype of auxotrophy | Genotype confirmation | Deletion efficiency (%) |
|------------------------|----------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| A (UTSS1 + UTES1)      | 46             | 10 (25)                 | 7 (10)                | 28                      |
| B (UTSS1 + UTES2)      | 31             | 1 (20)                  | 1 (1)                 | 5                       |
| C (UTSS2 + UTES1)      | 2              | 0 (2)                   | –                     | –                       |
| D (UTSS2 + UTES2)      | 22             | 0 (22)                  | –                     | –                       |

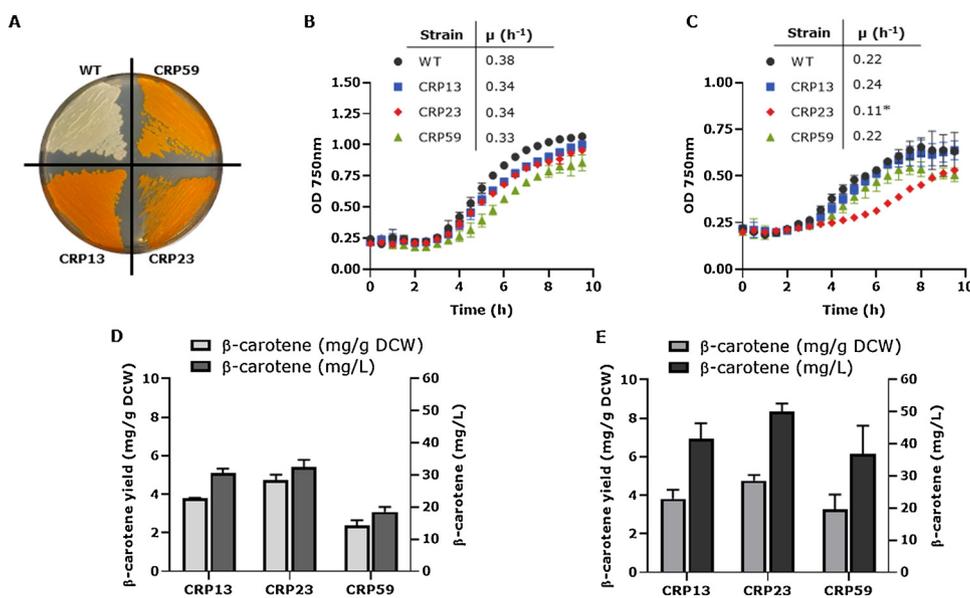
UTES2) were identified *ura3Δ* mutants IMUFRJ 50682 with deletion efficiency of 28 % (7/25) and 5% (1/20), respectively (Table 1). Multiple alignment between amplified sequences of native *URA3* gene and some auxotrophic mutants from combination A, now named AM07, AM10, AM13 and AM59, showed precise NHEJ repair only in AM59. NHEJ is an error-prone process often associated with small insertions and deletions at the DSB site which regularly occurs 3–4 bp upstream of the PAM sequence [43]. In the UTSS1 regions of AM07, AM10 and AM13 sequences were observed indels: AM07 had deletion of 2 bp, AM10 received addition of 1 bp and AM13 lost 4 bp; totaling a loss of 975, 972 and 977 bp, respectively (Fig. 1D).

The choice of target sequences closer to *URA3* start (-59 bp) and stop (+888 bp) codon proved to be more favorable for DNA cutting in IMUFRJ 50682 strain, since combinations A and B led to the excision of all gene. Although sgRNAs were designed based on W29 strain, all of them perfectly matched the recognition site in IMUFRJ 50682 strain (Fig. S2), even no auxotrophic mutants have been generated from combinations C and D. According to Graf and colleagues [44], the specificity of a sgRNA depends on its target sequence and recognition site with  $\geq 80\%$  or  $\leq 35\%$  of guanine-cytosine (GC) content has been shown poorly effective. Overall, Cas9 nuclease has demonstrated preferential binding in sgRNAs with G in the 4 bp directly upstream to the PAM sequence, while thymine (T) and C were unfavorable [45,46]. The low *URA3* deletion frequencies in our study may be due to the presence of such adverse bases in short sequence motifs at the 3' end of sgRNAs. The UTSS2 and UTES2 are reverse sgRNAs and possess 5'-CTAT-3' and 5'-CCAT-3' sequences, respectively, which are rich in TC bases. The UTSS1 and UTES1 sgRNAs have 5'-GATA-3' and 5'-AGTA-3' sequences, respectively, with only one T, suggesting correlation between

pyrimidine bases near the PAM sequence and Cas9 nuclease performance (Fig. 1E). In addition, analysis in the sgRNA sequences by RNA Structure and RNAfold WEB SERVER platforms indicated the possibility of secondary structure formation in UTSS2, which would prevent the recognition of the target DNA and its cleavage. A substantial variation in the cleavage efficiency in accordance with different genomic targets may be related not only to the inherent quality of the interaction between the sgRNA and the target sequence, but also to the general chromatin accessibility by the Cas9 nuclease, even within the same cell type [47]. The combinatorial CRISPR/Cas9-mediated cleavage strategy has proven to be effective for engineering strains without genetic information.

The *ura3Δ* mutants IMUFRJ 50682 were sequentially cultivated in YNB-Ura medium by three rounds for plasmid curing, purified in YPD plates and verified in YPD-Hyg and YPD-Nat media. Then, AM07, AM10, AM13, AM23 and AM59 auxotrophic mutants were transformed with GGVA-RedStarII plasmid, which contains *RedStarII* expression cassette driven by pTEF and *URA3* gene as selective marker [48], to constitutively express the red fluorescent protein as a gene reporter for verification of cloning efficiency. After 2 days, grown colonies were analyzed by fluorescence phenotype. The cloning rates were satisfactory of 82.6 (19/23), 91.6 (33/36), 100.0 (11/11), 80.0 (4/5) and 89.5 % (17/19) for AM07, AM10, AM13, AM23 and AM59 mutants, respectively, and motivated us to investigate the biotechnological potential of this strain.

In order to verify the applicability of *ura3Δ* mutants IMUFRJ 50,682 as a chassis for production of non-native value-added compounds, auxotrophic mutants AM07, AM10, AM13, AM23 and AM59 were engineered for  $\beta$ -carotene synthesis. GGVA-Carotenoid plasmid contains the heterologous genes *carB* and *carRP* from *Mucor circinelloides* and native gene *GGS1* under the control of constitutive promoter pTEF, for expression of phytoene dehydrogenase, phytoene synthase and geranylgeranyl diphosphate synthase, respectively, and *URA3* gene as auxotrophic marker [33]. Three carotenoid recombinant producers, CRP13, CRP23 and CRP59, were selected according to intense orange colour-associated phenotype (Fig. 2A) and growth profile and specific growth rates of them were compared with Brazilian wild-type strain in rich and synthetic media. Throughout cultivation in rich medium, wild-type strain and CRP13, CRP23 and CRP59 recombinants displayed a very similar growth pattern and statistical analysis indicated no significant differences in the  $\mu_{max}$  ( $p > 0.05$ ). The IMUFRJ 50682 strain was capable of growing with a  $\mu_{max}$  of  $0.38\text{ h}^{-1}$ , whereas CRP13, CRP23 and CRP59 recombinants achieved a  $\mu_{max}$  of 0.34, 0.34 and 0.33,



**Fig. 2.** *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 engineering for  $\beta$ -carotene synthesis. (A) Carotenoid recombinant producers CRP13, CRP23 and CRP59 showed orange colour during cultivation in liquid media. (B) Growth profile and specific growth rates of wild-type and auxotrophic mutants in rich YPD and (C) synthetic YNB media. (D)  $\beta$ -carotene production in YPD and (E) YNB shake-flask cultures. Data are average of two independent cultivations.

\*Indicate significant differences between specific growth rates of wild-type and carotenoid producers ( $p > 0.05$ ). WT: wild-type

respectively (Fig. 2B). In synthetic medium, the  $\mu_{\max}$  of wild-type strain and CRP13, CRP23 and CRP59 recombinants decreased slightly to 0.22, 0.24, 0.11 and 0.22 h<sup>-1</sup>, respectively, and differed significantly between CRP23 and the other strains ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2C). The increased metabolic load by overexpression of *GGS1* gene and heterologous expression of *carB* and *carRP* genes did not reduced growth capacity of CRP13 and CRP59 recombinants, indicating that the introduction of a new metabolic pathway was efficiently adapted by mutants IMUFRJ 50682.

Interestingly, CRP23 strain was able to synthesized 32.4 (4.7 mg/g DCW) and 50.1 mg/L (4.8 mg/ DCW) of  $\beta$ -carotene in YPD and YNB shake-flask cultures, respectively, while the final  $\beta$ -carotene titer of the CRP13 and CRP59 strains reached 30.5 and 41.6 mg/L (3.8 mg/g DCW) and 18.5 (2.4 mg/g DCW) and 36.8 mg/L (3.3 mg/ g DCW) in both media, respectively (Fig. 2D and E). The use of mutants IMUFRJ 50682 as a parental strain led to a higher  $\beta$ -carotene production than other backgrounds, such as Po1d (3.4 mg/g DCW) [23] and CIBTS1176 (2.22 mg/g DCW) [49] strains which were engineered with the same genes and cultivated in similar conditions. These data reveal the metabolic potential of IMUFRJ 50682 strain to be explored.

As *Y. lipolytica* displays heterogeneity inter wild-type strains related to different genetics and metabolic patterns, the construction of auxotrophic derivatives from IMUFRJ 50682 will expand the range of applications for this promising strain. The expectation around *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 is due to its industrially relevant potential in the fields of biocatalysis, bioconversion and bioremediation. Previous studies from our group have demonstrated that this strain exhibits robust metabolism and it is able to degrade alternative substrates, such as compounds from poly(ethylene terephthalate) (PET) production chain, and convert some of them into value-added products with additional sustainability benefits and biotechnological processes economics [50]. As soon, we developed for the first time non-reverting auxotrophic mutants from *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 and evidenced their ability to produce new compounds of biotechnological interest.

#### 4. Conclusion

The combinatorial dual CRISPR/Cas9 cleavage strategy proved to be useful and efficient for whole *URA3* gene excision in wild-type strain *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Auxotrophic mutants demonstrated high cloning frequency by introduction of fluorescent phenotype and were able to synthesize  $\beta$ -carotene efficiently through the expression of homologous and heterologous genes with a similar growth profile compared with the wild-type which motivates us to explore its genetic and physiology in future research.

#### Author agreement

I, the Corresponding Author, declare that this manuscript contains original, unpublished results and confirm that it has been read and approved by all the authors.

I understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process and is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs.

#### Funding information

This work was financed by grants from Brazilian Federal Agency CAPES (Proc. 88881.188542/2018-01) and French Nacional Agency INRAE.

#### CRedit authorship contribution statement

**Camilla Pires de Souza:** Conceptualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Bernardo Dias Ribeiro:**

Writing - review & editing, Supervision. **Maria Alice Zarur Coelho:** Writing - review & editing, Resources, Supervision. **Rodrigo Volcan Almeida:** Writing - review & editing, Resources, Supervision, Funding acquisition. **Jean Marc Nicaud:** Writing - review & editing, Resources, Supervision, Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

We are grateful for the National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) and Higher Education Improvement Coordination (CAPES).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2020.109621>.

#### References

- [1] M. Egermeier, H. Russmayer, M. Sauer, H. Marx, Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00049>.
- [2] R. Dulermo, F. Brunel, T. Dulermo, R. Ledesma-Amaro, J. Vion, M. Trassaert, S. Thomas, J.M. Nicaud, C. Leplat, Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica*, *Microb. Cell Fact.* 16 (2017) 1–11, <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0647-3>.
- [3] Y.K. Park, T. Dulermo, R. Ledesma-Amaro, J.M. Nicaud, Optimization of odd chain fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnol. Biofuels* 11 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1154-4>.
- [4] A. Rysińska, W. Rymowicz, High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37 (2010) 431–435, <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0687-8>.
- [5] F. Carly, M. Vandermies, S. Telek, S. Steels, S. Thomas, J.M. Nicaud, P. Fickers, Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering, *Metab. Eng.* 42 (2017) 19–24, <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2017.05.002>.
- [6] E. Celińska, P. Kubiak, W. Białas, M. Dziadas, W. Grajek, *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40 (2013) 389–392, <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1240-3>.
- [7] M. Larroude, E. Celinska, A. Back, S. Thomas, J.M. Nicaud, R. Ledesma-Amaro, A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of  $\beta$ -carotene, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 464–472, <https://doi.org/10.1002/bit.26473>.
- [8] F.A.S.D. Souza, A.A. Salgueiro, C.D.C. Albuquerque, Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source, *Brazilian J. Chem. Eng.* 29 (2012) 61–67, <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000100007>.
- [9] A. Martinez-Vazquez, A. Gonzalez-Hernandez, Á. Domínguez, R. Rachubinski, M. Riquelme, P. Cuellar-Mata, J.C.T. Guzman, Identification of the transcription factor Znc1p, which regulates the yeast-to-Hypha transition in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*, *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066790>.
- [10] J.M. Nicaud, C. Madzak, P. Van Den Broeck, C. Gysler, P. Duboc, P. Niederberger, C. Gaillardin, Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res.* 2 (2002) 371–379, [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00082-X).
- [11] A. Beopoulos, J. Cescut, R. Haddouche, J.L. Uribealdea, C. Molina-Jouve, J.M. Nicaud, *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production, *Prog. Lipid Res.* 48 (2009) 375–387, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>.
- [12] J.S. Sabirova, R. Haddouche, I.N. Van Bogaert, F. Mulaa, W. Verstraete, K.N. Timmis, C. Schmidt-Dannert, J.M. Nicaud, W. Soetaert, The “LipoYeasts” project: Using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipids, fats and oils into high-value products, *Microb. Biotechnol.* 4 (2011) 47–54, <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00187.x>.
- [13] L. Wong, J. Engel, E. Jin, B. Holdridge, P. Xu, YaliBricks, A versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*, *Metab. Eng. Commun.* 5 (2017) 68–77, <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2017.09.001>.
- [14] M. Egermeier, M. Sauer, H. Marx, Golden Gate-based metabolic engineering strategy for wild-type strains of *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Lett.* 366 (2019), <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz022>.
- [15] C. Schwartz, M. Shabbir-Hussain, K. Frogue, M. Blenner, I. Wheeldon, Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*, *ACS Synth. Biol.* 6 (2017) 402–409, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00285>.

- [16] C. Holkenbrink, M.I. Dam, K.R. Kildegaard, J. Beder, J. Dahlin, D. Doménech Belda, I. Borodina, EasyCloneYALI: CRISPR/Cas9-based synthetic toolbox for engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnol. J.* 13 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.1002/biot.201700543>.
- [17] S. Gao, Y. Tong, Z. Wen, L. Zhu, M. Ge, D. Chen, Y. Jiang, S. Yang, Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43 (2016) 1085–1093, <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1789-8>.
- [18] M. Kosicki, S.S. Rajan, F.C. Lorenzetti, H.H. Wandall, Y. Narimatsu, E. Metzakopian, E.P. Bennett, Dynamics of indel profiles induced by various CRISPR/Cas9 delivery methods, Elsevier Inc. (2017), <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.09.003>.
- [19] P.D. Donohoue, R. Barrangou, A.P. May, Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems, *Trends Biotechnol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.07.007>.
- [20] A. Jiménez, G. Muñoz-Fernández, R. Ledesma-Amaro, R.M. Buey, J.L. Revuelta, One-vector CRISPR/Cas9 genome engineering of the industrial fungus *Ashbya gossypii*, *Microb. Biotechnol.* 12 (2019) 1293–1301, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13425>.
- [21] P. Cernak, R. Estrela, S. Poddar, J.M. Skerker, Y.F. Cheng, A.K. Carlson, B. Chen, V.M. Glynn, M. Furlan, O.W. Ryan, M.K. Donnelly, A.P. Arkin, J.W. Taylor, J.H.D. Cate, Engineering *Kluyveromyces marxianus* a robust synthetic biology platform host, *MBio.* (2018), <https://doi.org/10.1128/mBio.01410-18>.
- [22] C.S. Nødvig, J.B. Nielsen, M.E. Kogle, U.H. Mortensen, A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi, *PLoS One* (2015), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>.
- [23] M. Larroude, H. Trabelsi, J.-M. Nicaud, T. Rossignol, A set of *Yarrowia lipolytica* CRISPR/Cas9 vectors for exploiting wild-type strain diversity, *Biotechnol. Lett.* 4 (2020), <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02805-4>.
- [24] A.N. Hagler, L.C. Mendonça-Hagler, Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of rio de janeiro, Brazil., *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 173–178 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16345683%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC243658>.
- [25] M.A.Z. Coelho, P.F.F. Amaral, I. Belo, *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse, *Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* (2010) 930–944.
- [26] P.F.F. Amaral, M. Lehocky, A.M.V. Barros-Timmons, M.H.M. Rocha-Leão, M.A.Z. Coelho, J.A.P. Coutinho, Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, *Yeast.* (2006), <https://doi.org/10.1002/yea.1405>.
- [27] P.F.F. Amaral, J.M. da Silva, M. Lehocky, A.M.V. Barros-Timmons, M.A.Z. Coelho, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochem.* 41 (2006) 1894–1898, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.029>.
- [28] M.A. Zarur Coelho, G.C. Fontes, P.F. Fonseca Amaral, M. Nele, Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010), <https://doi.org/10.1155/2010/821306>.
- [29] F.F. Martins, T.F. Ferreira, D.A. Azevedo, M.A.Z. Coelho, Evaluation of crude oil degradation by *Yarrowia lipolytica*, *Chem. Eng. Trans.* 27 (2012) 223–228, <https://doi.org/10.3303/CET1227038>.
- [30] J.R. da Silva, C.E.C. de Souza, E. Valoni, A.M. de Castro, M.A.Z. Coelho, B.D. Ribeiro, C.A. Henriques, M.A.P. Langone, Biocatalytic esterification of fatty acids using a low-cost fermented solid from solid-state fermentation with *Yarrowia lipolytica*, *3 Biotech* 9 (2019) 0, <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1550-2>.
- [31] C.E.C. de Souza, B.D. Ribeiro, M.A.Z. Coelho, Characterization and application of *Yarrowia lipolytica* lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2019), <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03047-5>.
- [32] M. Haeussler, K. Schöning, H. Eckert, A. Eschstruth, J. Mianné, J.B. Renaud, S. Schneider-Maunoury, A. Shkumatava, L. Teboul, J. Kent, J.S. Joly, J.P. Concordet, Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR, *Genome Biol.* (2016), <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>.
- [33] E. Celińska, R. Ledesma-Amaro, M. Larroude, T. Rossignol, C. Pauthenier, J.M. Nicaud, Golden Gate Assembly system dedicated to complex pathway manipulation in *Yarrowia lipolytica*, *Microb. Biotechnol.* 10 (2017) 450–455, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12605>.
- [34] D.C. Chen, J.M. Beckerich, C. Gaillardin, One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1997), <https://doi.org/10.1007/s002530051043>.
- [35] K. Katoh, J. Rozewicki, K.D. Yamada, MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, *Brief. Bioinform.* (2019), <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
- [36] Y.K. Park, P. Korpys, M. Kubiak, E. Celinska, P. Soudier, P. Trébulle, M. Larroude, T. Rossignol, J.M. Nicaud, Engineering the architecture of erythritol-inducible promoters for regulated and enhanced gene expression in *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res.* (2019), <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy105>.
- [37] F. Darvishi, M. Ariana, E.R. Marella, I. Borodina, Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 5925–5938, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9099-x>.
- [38] F. Adikusuma, C. Pfützner, P.Q. Thomas, Versatile single-step-assembly CRISPR/Cas9 vectors for dual gRNA expression, *PLoS One* 12 (2017) 1–11, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187236>.
- [39] E. Alani, L. Cao, N. Kleckner, A method for gene disruption that allows repeated use of, *Genetics.* 116 (1987) 541–545.
- [40] C. Madzak, C. Gaillardin, J.M. Beckerich, Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review, *J. Biotechnol.* 109 (2004) 63–81, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.027>.
- [41] M. Larroude, T. Rossignol, J.M. Nicaud, R. Ledesma-Amaro, Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 2150–2164, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.004>.
- [42] D. Gao, S. Smith, M. Spagnuolo, G. Rodriguez, M. Blenner, Dual CRISPR-Cas9 cleavage mediated gene excision and targeted integration in *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnol. J.* (2018), <https://doi.org/10.1002/biot.201700590>.
- [43] J.E. Garneau, M.É. Dupuis, M. Villion, D.A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A.H. Magadán, S. Moineau, The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA, *Nature.* 468 (2010) 67–71, <https://doi.org/10.1038/nature09523>.
- [44] R. Graf, X. Li, V.T. Chu, K. Rajewsky, sgRNA sequence motifs blocking efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing, *Cell Rep.* 26 (2019) 1098–1103, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.024> e3.
- [45] T. Wang, J.J. Wei, D.M. Sabatini, E.S. Lander, Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system, *BMJ Support. Palliat. Care* (2012), <https://doi.org/10.1136/bmjspcare-2011-000063>.
- [46] J.G. Doench, E. Hartenian, D.B. Graham, Z. Tothova, M. Hegde, I. Smith, M. Sullender, B.L. Ebert, R.J. Xavier, D.E. Root, Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, *Nat. Biotechnol.* (2014), <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>.
- [47] R.M. Yarrington, S. Verma, S. Schwartz, J.K. Trautman, D. Carroll, Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2018), <https://doi.org/10.1073/pnas.1810062115>.
- [48] M. Larroude, Y.K. Park, P. Soudier, M. Kubiak, J.M. Nicaud, T. Rossignol, A modular Golden Gate toolkit for *Yarrowia lipolytica* synthetic biology, *Microb. Biotechnol.* (2019), <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13427>.
- [49] S. Gao, L. Han, L. Zhu, M. Ge, S. Yang, Y. Jiang, D. Chen, One-step integration of multiple genes into the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnol. Lett.* (2014), <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1634-y>.