

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Mariana Hentz

**Aplicando a tecnologia *arming yeasts* na indústria cervejeira: uso da fusão AGA1-  
AGA2-GFP para detecção da viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae***

Porto Alegre

2021

*Mariana Hentz*

**Aplicando a tecnologia *arming yeasts* na indústria cervejeira: uso da fusão AGA1-AGA2-GFP para detecção da viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharela em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Área de habilitação: Biotecnologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

Porto Alegre

2021

Mariana Hentz

**Aplicando a tecnologia *arming yeasts* na indústria cervejeira: uso da fusão AGA1-AGA2-GFP para detecção da viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharela em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em .....19 / .....05 / .....2021.

BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Diego Bonatto



---

Profa. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva



---

Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao Breno, meu sobrinho e afilhado de apenas 1 ano de idade que mesmo sem saber, me encoraja a querer evoluir constantemente e ser uma pessoa melhor a cada dia. A você Breno, que me orgulha todos os dias com suas pequenas grandes conquistas, espero um dia também te orgulhar.

## AGRADECIMENTOS

Em meio a pandemias, prontos-socorros e cirurgias cardíacas, primeiramente, agradeço à Deus por manter a minha mente sã e permitir que eu esteja hoje aqui, com saúde, escrevendo estas palavras.

Aos meus pais, Dirce e Mário, agradeço pelo apoio incondicional em minhas escolhas e por serem minha fonte incansável de incentivo, mesmo a 500 km de distância. Obrigada por sempre prezarem por minha educação e por terem se esforçado tanto para que eu vivesse as melhores experiências possíveis.

Agradeço a minha irmã Renata, mestre cervejeira que foi a inspiração deste projeto. Por ser meu ombro amigo nos momentos de tempestade, minha conselheira nos momentos de dúvida e minha parceira em todos eles. E por ter me presenteado com o Breno, a quem este trabalho é dedicado.

Ao meu amor, Samuel, agradeço por toda sua paciência e carinho, vivendo ao meu lado os momentos mais difíceis deste processo, me lembrando constantemente que tudo daria certo e que o final da graduação é apenas o início de um novo ciclo.

À Júlia, minha inspiração na Biotecnologia, que acompanhou todos os meus passos dentro da universidade, e fora dela também. Agradeço por ter sido minha âncora em todos estes anos de graduação, me mantendo fiel aos meus sonhos e vivendo muitos deles ao meu lado.

Agradeço aos colegas e amigos que dentro da universidade fiz, em especial à Reykla e ao Igor, amigos que tive o privilégio de conhecer dentro da UFRGS e que têm um lugar especial dentro do meu coração.

E por último, mas tão importante quanto, ao meu orientador, Diego Bonatto. Agradeço imensamente pelas oportunidades. Por permitir que eu desenvolvesse este projeto ao “45 do segundo tempo” e ter me ensinado praticamente tudo que sei sobre microbiologia. Por não ter medido esforços para que esse projeto acontecesse e por sua paixão em transmitir seus conhecimentos, mostrando o que é ser um verdadeiro orientador.

A todos que, de alguma forma contribuíram para minha formação até aqui, meu mais sincero muito obrigada!

"Não importa quantos erros você cometa ou quão devagar é o seu processo, você ainda estará à frente daqueles que não estão tentando."

**Tonny Robbins**

## RESUMO

O reuso da biomassa de leveduras é uma tendência importante dentro da indústria cervejeira, pois as leveduras constituem um dos insumos mais caros dentre aqueles usados para a fabricação de cervejas. Além disso, a biomassa de leveduras é um dos principais efluentes orgânicos poluidores da indústria cervejeira. Desta maneira, o reuso de leveduras é parte da busca do setor cervejeiro por técnicas que reduzam os custos de produção e que gerem um menor impacto ambiental. Porém, o reuso da biomassa depende da análise da viabilidade (definido como a atividade de propagação) e da vitalidade (definida como a atividade fermentativa) das leveduras após um processo fermentativo. É sabido que a fermentação cervejeira constitui uma fonte importante de diferentes estresses fisiológicos, dentre eles o estresse induzido pela alta concentração de etanol, que resulta em uma baixa viabilidade e vitalidade das células e que afetam negativamente o reuso desta biomassa. Para determinar a viabilidade e a vitalidade da biomassa, diferentes técnicas são empregadas, tais como o método de coloração com azul de metileno e os testes de poder de acidificação, respectivamente. Entretanto, estes métodos não permitem acompanhar em tempo real as mudanças fisiológicas que acontecem na biomassa durante a fermentação cervejeira. Além disso, dentro de uma cervejaria, há a necessidade do emprego de técnicas que sejam diretas e rápidas para avaliar a qualidade da biomassa. Dessa maneira, a ideia central deste projeto foi a de empregar a tecnologia de leveduras armadas como um sistema indicador de viabilidade e de vitalidade. A tecnologia de leveduras armadas é uma estratégia baseada na exposição de peptídeos ou proteínas de interesse na superfície celular de leveduras usando genes sintéticos que codificam para a fusão de uma proteína âncora de membrana com uma proteína de interesse a ser exposta. Sendo assim, nesse projeto foram usadas técnicas de biologia sintética para a geração de um sistema de monitoramento da viabilidade e da vitalidade celular em leveduras cervejeiras empregando o complexo heterodimérico Aga1p/Aga2p fusionado à proteína fluorescente verde (GFP). Para tanto, um sistema de expressão induzido por etanol foi inicialmente desenhado *in silico* e posteriormente sintetizado *in vitro*, consistindo em um promotor sintético mínimo derivado do gene *CYC1* de *S. cerevisiae* fusionado à montante com elementos de DNA responsivos à choque

térmico e etanólico derivados do gene *SSA4* também de *S. cerevisiae*. Esta construção contém, à jusante ao promotor sintético, a região codificadora para a fusão Aga2p e GFP, bem como para a subunidade Aga1p, ambas clonadas separadamente em vetores bifuncionais para leveduras e bactérias, usando a tecnologia de concatenação de fragmentos de DNA. Espera-se que estes vetores possam indicar, de uma forma rápida e em tempo real, o estado fisiológico das leveduras cervejeiras para o seu reuso em um novo processo fermentativo cervejeiro.

**Palavras-chave: leveduras cervejeiras; biologia sintética; leveduras armadas; viabilidade; vitalidade.**



## ABSTRACT

The reuse of yeast biomass is an important trend within the brewing industry as yeasts are one of the most expensive components of beers. In addition, the yeast biomass is the main polluting effluent generated by the brewing industry. The reuse of yeast biomass is a central part of the development of new cost-cutting techniques with lower environmental impact. However, the reuse of yeast biomass depends on the analysis of the viability (defined as the propagation activity) and the vitality (defined as the fermentative activity) of the yeasts after a fermentative process. It is known that beer fermentation constitutes an important source of different physiological stresses, among them the stress induced by the high concentration of ethanol, which leads to a low cell viability and vitality, negatively affecting its reuse. To determine the biomass viability and vitality, different techniques are employed, such as the methylene blue staining method and acidification power test, respectively. However, these methods do not allow to monitor the physiological changes that happen in the biomass during beer fermentation in real time. In addition, there is a need to employ techniques that directly and quickly assess the quality of biomass. Thus, the purpose of this project was to employ the armed yeasts technology as a potential indicator of cell viability and vitality. The armed yeast technology is a strategy based on the exposure of peptides or proteins of interest on the yeast cell surface using synthetic genes containing the coding sequence for a fusion between a membrane anchor protein and the protein of interest. In this work synthetic biology techniques were used to generate a monitoring system using the Aga1p-Aga2p heterodimeric complex fused to the green fluorescent protein (GFP). This task was accomplished by the design of an ethanol-induced expression system *in silico* and then synthesized *in vitro*, which consists of a minimal synthetic promoter derived from the *S. cerevisiae* CYC1 gene combined upstream with heat shock and ethanol-responsive DNA sequences derived from *S. cerevisiae* SSA4 gene. In addition, this system also contains downstream the coding region for the Aga2p and GFP fusion, as well as the coding sequence for the Aga1p subunit, both cloned separately in bifunctional vectors for yeasts and bacteria using the DNA fragment concatenation technology. It is expected that these vectors could indicate in real time the physiological state of brewing yeasts for their potential reuse.

**Keywords: brewery yeasts; arming yeasts; viability; vitality.**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Panorama de aplicações da tecnologia *Arming Yeasts* (adaptado de Andreu, 2018).

**Figura 2.** Esquema de organização de fusão das subunidades Aga1 e Aga2 da proteína  $\alpha$ -aglutinina de leveduras.

**Figura 3.** Diagrama esquemático resultante da geração dos plasmídeos pAGA2Y, pAGA1 e pAGA1Y pelo software SnapGene.

**Figura 4.** Mapa de restrição da sequência sintética YSP (HSE::pCYC1::tCYC1).

**Figura 5.** Mapa de restrição da sequência sintética AGA2::GFP (GFP::AGA2::HA).

**Figura 6.** Mapa de restrição do plasmídeo pAGA2Y.

**Figura 7.** Mapa de restrição do plasmídeo pAGA1.

**Figura 8.** Mapa de restrição do plasmídeo pAGA1Y.

**Figura 9.** Validação dos potenciais vetores pAGA2Y.

**Figura 10.** Simulação em gel de agarose 1% (p/v) de análise de restrição de pAGA2Y, pRS306H e pAGA2 com *Pst*I.

**Figura 11.** Validação dos potenciais vetores pAGA1.

**Figura 12.** Simulação em gel de agarose 1% (p/v) do padrão de restrição de pAGA1 e pYSP com *Psp*OMI e *Xba*I.

**Figura 13.** Validação dos potenciais vetores pAGA1Y.

**Figura 14.** Simulação em gel de agarose 1% (p/v) do padrão de restrição de pAGA1Y e pRS306K com *Psp*OMI e *Hae*III.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Partes (*biobricks*) utilizados nas construções dos sistemas pYSP, pAGA1 e pAGA2.

**Tabela 2.** Linhagens de *Escherichia coli* e de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas neste trabalho.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AEC: Antes da Era Comum

GFP: Green Fluorescent Protein

HSE: Heat Shock Element

MCS: Multiple Cloning Site

MW: Molecular Weight

RPM: Rotações Por Minuto

## SUMÁRIO

### 1. Introdução

1.1. A biotecnologia “embebida” na cerveja.....	16
1.2. As leveduras e sua importância na fabricação de cervejas.....	16
1.3. A viabilidade e a vitalidade de leveduras cervejeiras.....	17
1.4. A biologia sintética e a tecnologia de leveduras armadas.....	18

### 2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23

### 3. Materiais e Métodos

3.1. Procedimentos de Bioinformática	
3.1.1. Desenho <i>in silico</i> dos dispositivos de expressão YSP e YSP::AGA2::GFP (AGA2::GFP) .....	24
3.1.2. Desenho <i>in silico</i> dos plasmídeos pAGA1, pAGA1Y e pAGA2Y pelo método de Gibson e geração de oligonucleotídeos com extremidades complementares.....	25
3.2. Procedimentos de microbiologia e de biologia molecular	
3.2.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	27
3.2.2. Soluções e procedimentos básicos de biologia molecular.....	27
3.2.3. Oligonucleotídeos, reações em cadeia da polimerase de alta fidelidade e técnica de clonagem por concatenação de fragmentos de DNA (Gibson Assembly).....	28
3.2.4. Procedimentos para transformação e isolamento de plasmídeos de <i>Escherichia coli</i> .....	29
3.2.5. Procedimentos para isolamento do genoma total de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30

### 4. Resultados e Discussão.....

4.1. Prospecção de Sequências e desenho dos plasmídeos pAGA2Y, pAGA1 e pAGA1Y.....	31
4.2. Amplificação de AGA2::GFP e obtenção de pAGA2Y.....	37
4.3. Amplificação de AGA1 e obtenção de pAGA1.....	41

4.4. Amplificação de HSE::pCYC1::AGA1:: tCYC1 e obtenção de pAGA1Y.....	42
<b>5. Conclusão e Perspectivas.....</b>	<b>44</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>45</b>
<b>7. Anexos</b>	
7.1. Aferição da qualidade das sequências sintetizadas pela GenScript.....	59
7.2. Análise de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) de PCR para amplificação de AGA2::GFP de pAGA2.....	53
7.3. Análise de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) de PCR para amplificação de AGA1 do DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A biotecnologia "embebida" na cerveja

Para uma grande parte da população, a biotecnologia é considerada uma nova área da ciência, que se popularizou durante a pandemia de Covid-19 por sua atuação na realização de testes diagnósticos e desenvolvimento de vacinas (Rezaei, 2020). Porém, poucos sabem que, desde aproximadamente 6.000 Antes da Era Comum (AEC), a biotecnologia já era parte do cotidiano, com papel fundamental em processos fermentativos, como na fabricação de pães e bebidas, tal como a cerveja (Bud, 1994).

A cerveja, como chamamos hoje, foi supostamente produzida acidentalmente. Segundo documentos históricos, os cereais (como trigo e cevada), utilizados na produção de pães, foram usados na produção de bebidas espontaneamente fermentadas e que passaram a desempenhar um importante papel social (Sicard, 2011). Tão logo descobriram-se os prazeres da cerveja, sua manufatura também chamou atenção. A fermentação espontânea dos açúcares dava à cerveja características sensoriais especiais (Hornsey, 2003) e hoje, com a evolução da biotecnologia, a produção da bebida mais famosa do mundo também evoluiu.

Por definição, segundo a Enciclopédia Britânica (2019), a biotecnologia é o uso da biologia e da engenharia para solucionar problemas e criar produtos úteis. Com o crescente aumento de cervejarias no Brasil (Sebrae, 2020), a biotecnologia pode ser o elemento chave na produção de uma bebida de qualidade, e um dos grandes diferenciais pode partir das leveduras cervejeiras.

### 1.2. As leveduras e a sua importância na fabricação de cervejas

As leveduras são microrganismos eucarióticos predominantemente unicelulares e pertencentes ao Reino dos Fungos. Estes microrganismos, além de serem protagonistas na produção de diversos alimentos e bebidas fermentadas, também são modelos de estudos moleculares e genéticos de células eucarióticas (Sherman, 2002), o que possibilita que cientistas consigam produzir, por meio delas, diferentes tipos de proteínas, pigmentos, e outras inúmeras moléculas de impacto médico e biotecnológico (Cherf, 2015; Mitsui, 2019).



As leveduras cervejeiras compõem um grupo importantíssimo de microrganismos de aplicabilidade industrial, sendo as responsáveis por grande parte características sensoriais de cada estilo de cerveja produzido (Carrau, 2015). Durante a fermentação, as leveduras agem sobre o mosto cervejeiro, consumindo os diferentes açúcares extraídos do malte e gerando CO<sub>2</sub>, etanol e pequenas moléculas, como ésteres, compostos fenólicos e lactonas, que promovem as características sensoriais únicas encontradas nos diferentes estilos e categorias de cervejas (Carrau, 2015). Além disso, as leveduras atuam na estabilização da espuma da cerveja e na sua cor e turbidez por meio da produção de uma série de glicoproteínas (Blasco, 2011) bem como pela sua capacidade de floculação ao final da fermentação (Vidgren, 2011), respectivamente. Dessa maneira, para a fabricação de uma cerveja de qualidade, com as mais diferentes características aromáticas e sensoriais descritas acima, é necessário o uso de leveduras que possuam a capacidade de se propagar quando em contato com o mosto cervejeiro (viabilidade) e, ao mesmo tempo, apresentem uma alta atividade fermentativa, promovendo uma eficiente conversão dos mono-, di- e trissacarídeos encontrados no mosto cervejeiro em etanol (vitalidade).

### 1.3. A viabilidade e a vitalidade das leveduras cervejeiras

Tanto a viabilidade (definida como a atividade mitótica ou de propagação) quanto a vitalidade (definida como a atividade fermentativa) das leveduras utilizadas na fabricação de cervejas são primordiais para o sucesso do processo fermentativo. Durante a fermentação, fatores como a temperatura, o pH, a disponibilidade de nutrientes e a concentração de oxigênio dissolvido influenciam diretamente na atuação das leveduras (Bleonca, 2013). Logo, quando expostas à diferentes tipos de estresses celulares, tais como térmico, osmótico e variações bruscas de pH, as leveduras ativam a transcrição de diferentes genes de resposta à estresses que, por sua vez, acabam regulando negativamente o ciclo celular e a fermentação (Gibson, 2007; Gasch, 2000). Neste sentido, nosso grupo de pesquisas mostrou que, durante a fermentação cervejeira, ocorre uma perda de comunicação entre alguns compartimentos celulares nas leveduras, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático o que, por sua vez, leva a alterações da proteostasia celular, devido aos efeitos tóxicos e pleiotrópicos do etanol (Telini, 2020). Estes estresses podem ser decisivos quando se considera um possível reuso desta

biomassa. Sendo assim, se as leveduras estiverem estressadas pelo etanol após uma fermentação cervejeira, tanto a sua viabilidade quanto a sua vitalidade serão baixas, resultando no consumo lento de carboidratos do mosto ou mesmo a completa parada da fermentação (também denominado de “fermentação arrastada”) (Carvalho, 2006). Desta maneira, tanto a viabilidade quanto a vitalidade das leveduras cervejeiras requerem o monitoramento constante por parte dos cervejeiros, principalmente no quesito de reuso da levedura (Gibson, 2007).

Ainda que pouco estudado cientificamente, o reuso de leveduras em um novo processo fermentativo cervejeiro vem se tornando uma tendência importante. Isto se deve ao fato de que as leveduras constituem um dos insumos mais caros para a indústria cervejeira, o que leva os cervejeiros a reutilizarem a biomassa de leveduras em diferentes bateladas de cerveja (Bonatto, 2021). Além da questão do seu custo, a biomassa de leveduras constitui um dos principais efluentes orgânicos poluidores da indústria cervejeira. Dessa maneira, o reuso da biomassa é parte da busca do setor por técnicas de produção que reduzam os custos de produção e que gerem um menor impacto ambiental pela diminuição de resíduos orgânicos gerados (Giordano, 2020).

Em razão da importância do reuso da biomassa cervejeira, torna-se necessário avaliar a viabilidade e vitalidade dessa biomassa por meio de diferentes técnicas (Stewart, 2017). As técnicas microbiológicas, como o método de coloração com azul de metileno (EBC, 1962) para análise de viabilidade, os testes de poder de acidificação (Gabriel, 2008) e estimativa do estado fisiológico de leveduras baseado no corante resazurina para análise da vitalidade (Moraes, 2017) são comumente usados. Entretanto, os métodos convencionais para a avaliação da viabilidade e da vitalidade de leveduras não permitem acompanhar em tempo real as mudanças fisiológicas que acontecem na biomassa durante a fermentação cervejeira, bem como há a necessidade de equipamentos laboratoriais e técnicos treinados. Além disso, dentro de uma cervejaria, há a necessidade de empregar técnicas que sejam diretas e rápidas e, por isso, há uma busca constante por maneiras eficientes de classificar a viabilidade e determinar a vitalidade das células.

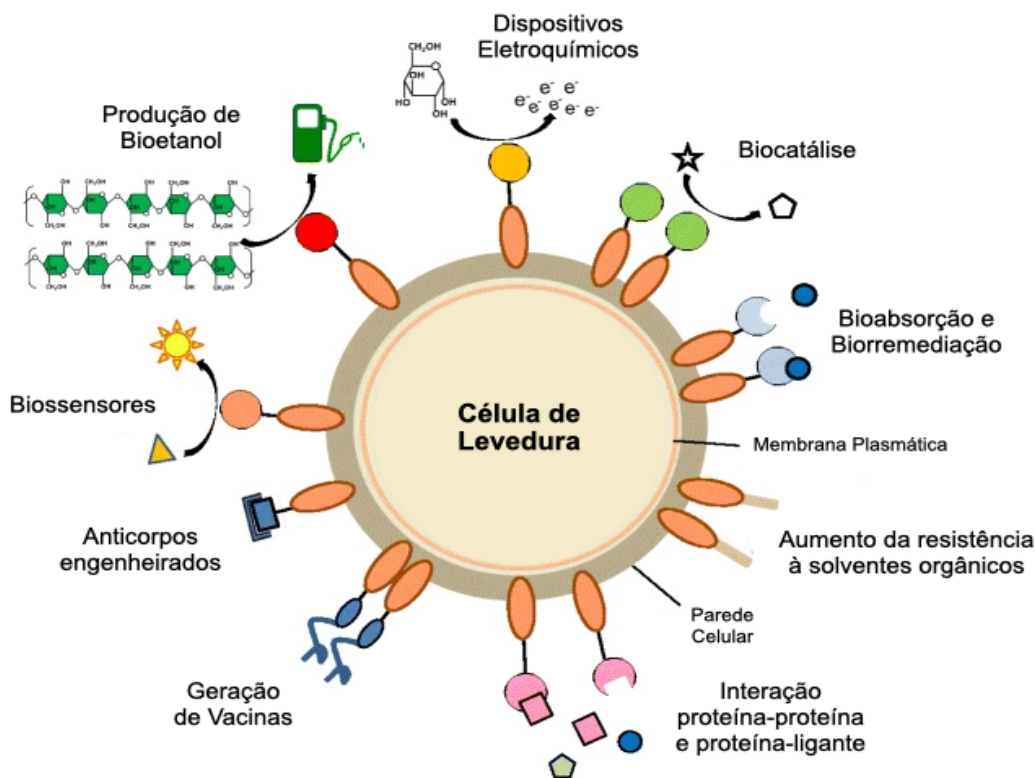
#### 1.4. A biologia sintética e a tecnologia de leveduras armadas

Considerando a busca por soluções para a determinação da viabilidade e da vitalidade da biomassa de leveduras, a biologia sintética pode fornecer as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de novas tecnologias de monitoramento da fisiologia celular durante a fermentação cervejeira.

A biologia sintética é uma área emergente de pesquisas básica e aplicada que utiliza princípios de engenharia, como a abstração e a modularização de componentes (ou “partes”) para o desenho de sistemas biológicos complexos. Em sua essência, cada componente ou “parte” codificado por uma sequência de DNA (como um promotor, um terminador ou um quadro aberto de leitura) pode ser considerado como um elemento individual e passível de modularização, permitindo que essas partes individuais possam ser combinadas em diferentes arranjos para produzir novos “dispositivos” (por exemplo, genes) (Ellis, 2011). A combinação de diferentes dispositivos dá origem a sistemas de expressão mais complexos e que, em condições fisiológicas pré-determinadas, como nos diferentes estresses celulares induzidos pela fermentação cervejeira, gerem respostas previsíveis. Neste sentido, métodos mais eficientes para a combinação de partes e dispositivos de DNA tornam-se necessários, destacando-se dois métodos: Golden Gate e Gibson Assembly. O método Golden Gate (Engler, 2008) permite que partes e dispositivos sejam ligados entre si e em uma ordem pré-determinada utilizando sítios para endonucleases de restrição do tipo IIS (Engler, 2009). Já o método de concatenação de fragmentos de DNA (também chamado de “método de montagem de Gibson” ou, do inglês, “Gibson Assembly”) permite concatenar até 15 partes ou dispositivos com base na identidade de sequências, podemos unir quaisquer fragmentos de DNA com extremidades cegas (coesivas) em uma única reação isotérmica, pela combinação das atividades catalíticas de uma exonuclease, de uma DNA polimerase e de uma DNA ligase, sem gerar nenhuma cicatriz (Gibson, 2009).

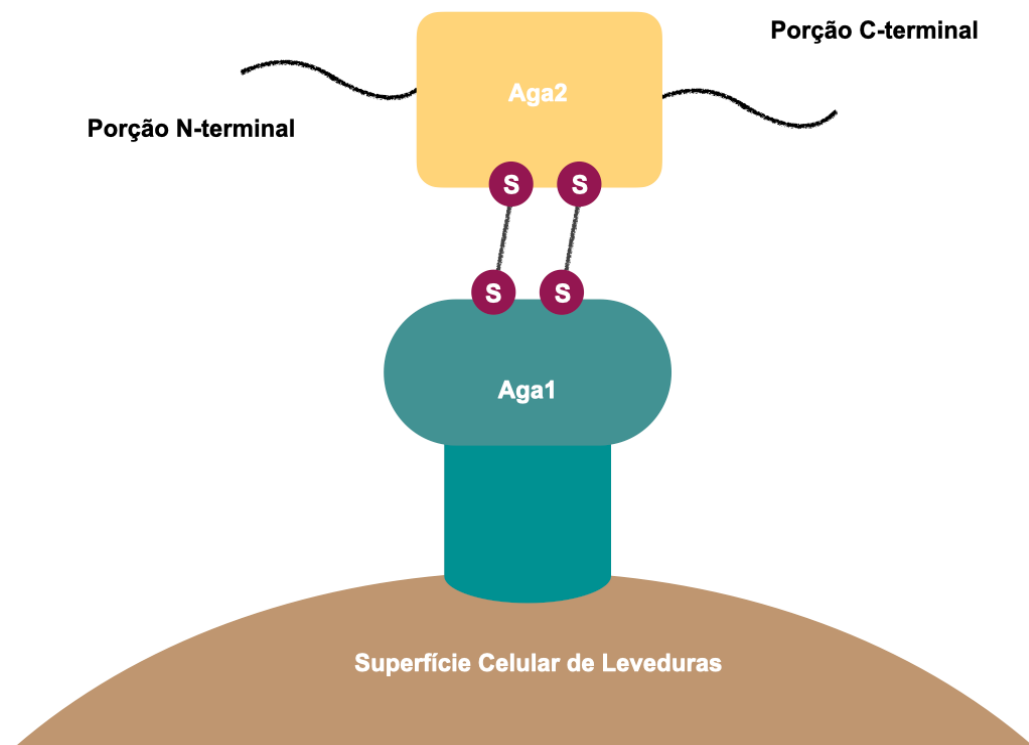
Dessa maneira, por meio de ferramentas computacionais e conceitos de biologia sintética, é possível desenhar sistemas de expressão gênica que, em condições de fermentação cervejeira, possibilitem as linhagens de leveduras expressarem, em sua parede celular, proteínas repórteres do estado fisiológico da célula por meio da tecnologia *arming yeasts* (ou “leveduras armadas” em tradução livre para o português).

A tecnologia de leveduras armadas é uma estratégia baseada na exposição de peptídeos ou proteínas de interesse na superfície celular de leveduras (Andreu, 2018). Desde que os primeiros experimentos usando essa estratégia foram feitos, obteve-se um grande número de aplicações bem-sucedidas (**Figura 1**), todas envolvendo a introdução, nas células, de genes de fusão que continham regiões codificadoras para um peptídeo sinal, uma proteína âncora e a proteína de interesse a ser exposta (Kuroda, 2014). Inúmeras proteínas de ancoramento são utilizadas como sistema de exposição, a maioria podendo ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com o mecanismo de adesão à parede celular: (i) proteínas de ligação ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), onde uma estrutura glicolípídica é incorporada à região hidrofóbica C-terminal dessas proteínas no retículo endoplasmático, como Sed1/Sip1, Cwp2, Sip1 e Aga1/Aga2 (Andreu, 2018) e (ii) proteínas com repetições invertidas (proteínas Pir), covalentemente associadas com a parede celular por meio de resíduos de cisteína e glutamina, como Pir/CCW6 e Pir/CCW5 (Yang, 2014).



**Figura 1.** Panorama de aplicações para a tecnologia *arming yeasts* (adaptado de Andreu, 2018).

Dentre as diferentes proteínas e complexos utilizados na tecnologia de leveduras armadas, aquelas que empregam a proteína alfa-aglutinina estão entre as mais flexíveis quanto à forma de exposição da proteína heteróloga na superfície da célula. A  $\alpha$ -aglutinina é uma glicoproteína de parede celular que atua na adesão celular em leveduras e é composta por duas subunidades chamadas de Aga1p, a subunidade de ancoramento à parede celular, e Aga2p, a subunidade de elemento de adesão (Cappellaro, 1994). Ambas as subunidades se mantêm ligadas por duas pontes dissulfeto internas, o que permite que tanto a porção N-terminal como a porção C-terminal de Aga2 possam servir de plataforma para a expressão e exposição de proteínas heterólogas de interesse na superfície das células (Cappellaro, 1994), conforme mostrado na **Figura 2**.



**Figura 2.** Esquema de organização de fusão das subunidades Aga1 e Aga2 da proteína  $\alpha$ -aglutinina de leveduras.

Desta maneira, a ideia central desse projeto foi a de empregar técnicas de biologia sintética para a geração de um sistema de monitoramento da viabilidade e da vitalidade

celular de leveduras cervejeiras empregando o complexo heterodimérico Aga1/Aga2 fusionado à proteína fluorescente verde (GFP). Para tanto, um sistema de expressão induzido por etanol (denominado de YSP) foi inicialmente desenhado *in silico* e posteriormente sintetizado *in vitro*, consistindo em um promotor sintético mínimo derivado do gene *CYC1*, da própria *S. cerevisiae*, fusionado à montante com elementos de DNA responsivos à choque térmico e etanólico derivados do gene *SSA4* de *S. cerevisiae* (Boorstein, 1990). Esta construção, por sua vez, contém à jusante ao promotor sintético a região codificadora para a fusão Aga2 e GFP, bem como para a subunidade Aga1, ambas clonadas separadamente em vetores bifuncionais para leveduras e bactérias.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Obter uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* que, em condições de estresse fermentativo cervejeiro, seja capaz de expressar uma proteína fluorescente na sua superfície e, de forma visual, indicar a sua viabilidade e vitalidade para um potencial reuso na fabricação de cervejas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Desenhar *in silico* e, por meio de síntese comercial de DNA, obter os plasmídeos pYSP, o qual contém o promotor sintético responsivo a estresse etanólico YSP ( $HSE_{SSA4}::P_{CYC1}::T_{CYC1}$ ) e pAGA2, contendo a sequência codificadora para a fusão AGA2::GFP sob regulação transcricional do promotor YSP.
- Amplificar, por reação em cadeia da polimerase de alta fidelidade, a sequência codificadora para AGA1 do genoma de *S. cerevisiae* e clonar em pYSP para a obtenção do plasmídeo pAGA1.
- Obter os vetores bifuncionais para leveduras e bactérias pAGA1Y e pAGA2Y para expressão dos sistemas YSP::AGA1 e YSP::AGA2::GFP em levedura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Procedimentos de bioinformática

##### 3.1.1. Desenho *in silico* dos dispositivos de expressão YSP e YSP::AGA2::GFP (AGA2::GFP)

As sequências de DNA correspondentes às diferentes partes dos dispositivos HSE::P<sub>CYC1</sub>::T<sub>CYC1</sub> (aqui designado de YSP ou *Yeast stress promoter*) e AGA2::GFP (**Tabela 1**) foram obtidas do banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (<https://www.yeastgenome.org>) e iGEM Parts - Yeast (<http://parts.igem.org/Yeast>).

**Tabela 1.** Partes (*biobricks*) utilizados nas construções dos sistemas pYSP, pAGA1 e pAGA2.

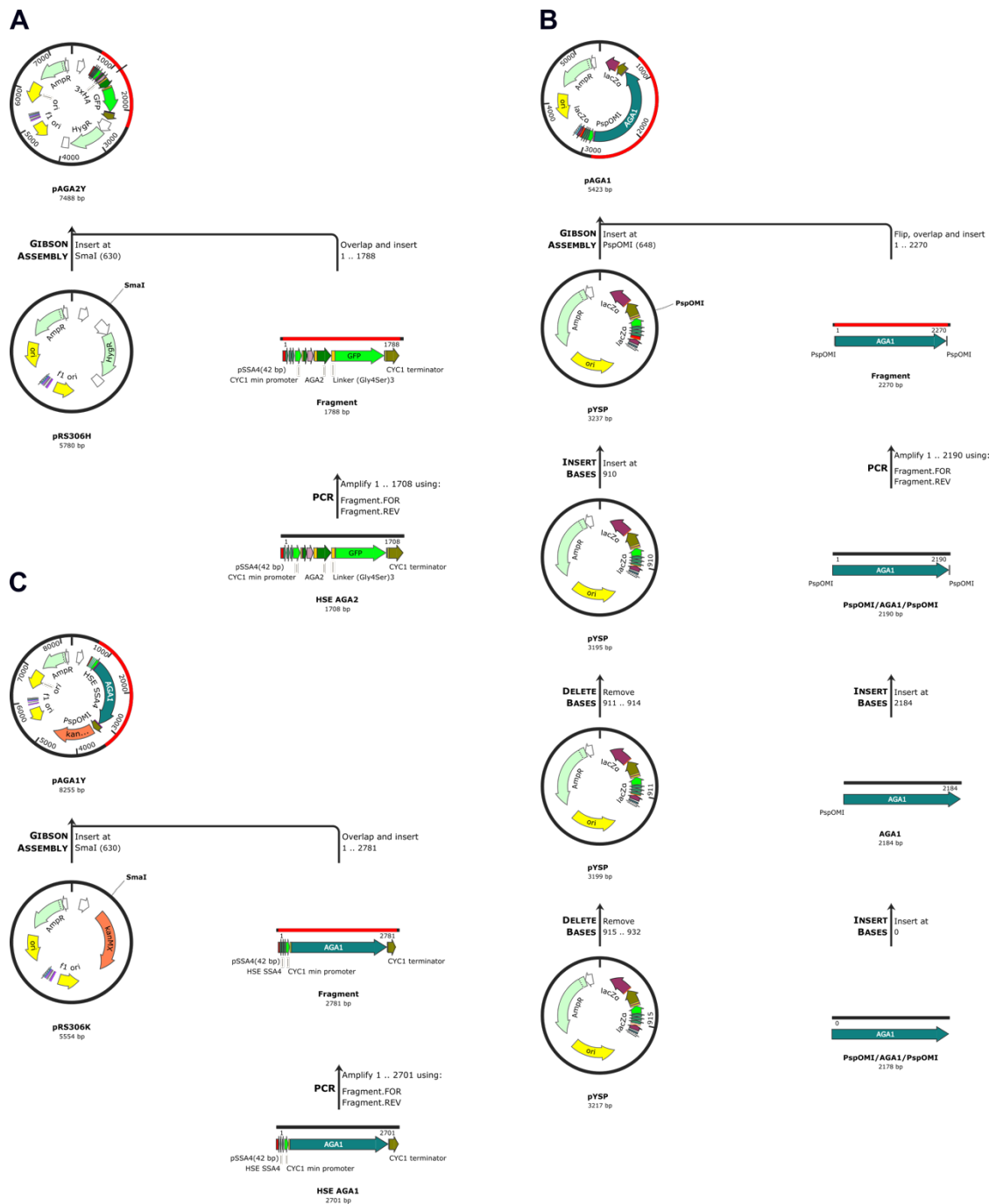
Partes de DNA	Descrição	Origem e número de acesso
HSE <sub>SSA4</sub>	Elemento de choque térmico da proteína SSA4 de <i>S. cerevisiae</i>	SGD ( <a href="#">S000000905</a> )
P <sub>CYC1</sub>	Promotor mínimo derivado do gene P <sub>CYC1</sub>	iGEM ( <a href="#">BBa_K105027</a> )
T <sub>CYC1</sub>	Terminador mínimo derivado do gene T <sub>CYC1</sub>	iGEM ( <a href="#">BBa_K2637017</a> )
AGA1	Subunidade de ancoragem de $\alpha$ -aglutinina	SDG ( <a href="#">S000005327</a> )
AGA2	Subunidade de adesão de $\alpha$ -aglutinina	SDG ( <a href="#">S000003000</a> )
Linker (Gly4Ser) <sub>3</sub>	Conector para fusão de proteínas	iGEM ( <a href="#">BBa_K416001</a> )
3xHA	Sequência de reconhecimento para o anticorpo anti-HA	iGEM ( <a href="#">BBa_K3002017</a> )
GFP	Proteína fluorescente verde	iGEM ( <a href="#">BBa_K1486034</a> )

Estas partes de DNA foram, por sua vez, combinadas *in silico* para a formação dos dispositivos YSP e AGA2::GFP usando o programa SnapGene (<https://www.snapgene.com>), seguindo os parâmetros padrão do próprio *software*. Uma vez gerados os dispositivos, foram desenhados os vetores pYSP (pUC57-*simple* contendo o dispositivo YSP) e pAGA2 (pUC57-*simple* contendo o dispositivo AGA2::GFP). Posteriormente, ambos vetores foram obtidos da empresa GenScript Corporation (Piscataway, USA) e a qualidade das sequências sintetizadas foi aferida pela própria empresa (Anexo 1).



3.1.2. Desenho *in silico* dos plasmídeos pAGA1, pAGA1Y e pAGA2Y pelo método de Gibson e geração de oligonucleotídeos com extremidades complementares

O desenho dos plasmídeos pAGA1, pAGA1Y e pAGA2Y (**Figuras 3A a C**) foi feito *in silico* usando o procedimento de concatenação de fragmentos de DNA ou método de Gibson implementado no software SnapGene (<https://www.snapgene.com>). Para o desenho do plasmídeo pAGA2Y (**Figura 3A**), o dispositivo AGA2::GFP, derivado de pAGA2, foi inserido no plasmídeo pRS306H clivado com a endonuclease de restrição *Sma*I. Seguiu-se então para a clonagem da sequência codificadora para a proteína Aga1 no plasmídeo pYSP clivado com *Psp*OMI, gerando o plasmídeo pAGA1 (**Figura 3B**). Em sequência, procedeu-se com a clonagem do fragmento HSE::P<sub>CYC1</sub>::AGA1::T<sub>CYC1</sub> de pAGA1 no plasmídeo pRS306K clivado com *Sma*I, gerando o plasmídeo pAGA1Y (**Figura 3C**). Para todos os plasmídeos obtidos *in silico* pelo método de Gibson foram gerados oligonucleotídeos com sobreposição de extremidades (**Tabela 3**) que, posteriormente, foram sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* na concentração de 100 nM e purificação padrão.



**Figura 3.** Diagrama esquemático resultante da geração dos plasmídeos pAGA2Y, pAGA1 e pAGA1Y pelo software SnapGene. (A) O dispositivo AGA2::GFP de pYSP, aqui mostrado como o fragmento YSP::AGA2::GFP de 1788pb, após amplificação por PCR, inserido em pRS306H clivado pela endonuclease de restrição *Sma*I, gerando o plasmídeo pAGA2Y. (B) O fragmento AGA1, após amplificação por PCR, de 2193pb, inserido em pUC57-simple clivado pela endonuclease de restrição *Psp*OMI, gerando o plasmídeo pAGA1. (C) O

fragmento HSE::P<sub>CYC1</sub>::AGA1::T<sub>CYC1</sub> de pAGA1, de 2781pb, após amplificação por PCR, inserido em pRS306K clivado pela endonuclease de restrição *SmaI*, gerando o plasmídeo pAGA1Y.

### 3.2. Procedimentos de microbiologia e de biologia molecular

#### 3.2.1. Microrganismos e condições de cultivo

As linhagens de *S. cerevisiae* (**Tabela 2**) foram cultivadas em meio completo YEPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de bacto-peptona e 20 g/L de glicose), e para o meio sólido foram adicionados 20 g/L de bacto-ágar. Já a linhagem de *E. coli* (**Tabela 2**) foi cultivada em meio líquido LB (10 g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl) e para o meio sólido foram adicionados 15 g/L de bacto-ágar. Os meios LB líquido e sólido foram acrescidos de ampicilina na concentração de 100 µg/L quando usados para a seleção e crescimento de células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos listados na **Tabela 3**.

**Tabela 2.** Linhagens de *Escherichia coli* e de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas neste trabalho.

Linhagem	Espécie	Genótipo	Referência
BY4742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>lys2</i> $\Delta$ 0 ; <i>ura3</i> $\Delta$ 0	Brachmann, 1998
W303	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>can1-100</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; [phi+]	Matheson, 2017
NEB <sup>®</sup> 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	<i>Escherichia coli</i>	<i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs (catálogo número C2987H)

#### 3.2.2. Soluções e procedimentos básicos de biologia molecular

Os procedimentos básicos para a manipulação de ácidos nucleicos (digestão com enzimas de restrição, análise e isolamento de fragmentos de DNA em géis de agarose, formulação de tampões, entre outros foram realizados de acordo com os protocolos

descritos no *Current Protocols in Molecular Biology* (<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/journal/19343647>).

3.2.3. Oligonucleotídeos, reações em cadeia da polimerase de alta fidelidade e técnica de clonagem por concatenação de fragmentos de DNA (*Gibson Assembly*)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) de alta fidelidade foi feita utilizando o kit Q5<sup>®</sup> High-Fidelity 2× Master Mix (New England Biolabs, catálogo número M0492S) seguindo o protocolo: 12,5 µL de Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 µM (Integrated DNA Technologies) e quantidades variáveis de DNA menores que 1000 ng. As reações finais foram de 25 µL completadas com água livre de nucleases (New England Biolabs) e acrescidas de 1,25 µL de DMSO 100 % (New England Biolabs). As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação do DNA a 94 °C por 30 s, seguido de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 94 °C por 10 s, um passo de anelamento a temperaturas variadas por 30 s, um passo de extensão à 72 °C por 1 min e 45 s, seguido por um passo de extensão final à 72 °C por 2 min. Para amplificação de *Aga1* a partir do genoma das linhagens de *S. cerevisiae* W303 e BY4742 (**Tabela 2**) e do dispositivo AGA2::GFP de pAGA2Y foi utilizado uma temperatura de anelamento de 60 °C. Para amplificação do dispositivo AGA2::GFP de pAGA2 e de HSE::P<sub>CYC1</sub>::AGA1::T<sub>CYC1</sub> de pAGA1 foi utilizado uma temperatura de anelamento de 65 °C. A amplificação de AGA2::GFP exigiu uma reação anterior pela endonuclease de restrição *EcoRV* para obtenção do amplicon.

Por sua vez, as reações de concatenação de fragmentos de DNA (Gibson, 2009) foram feitas utilizando o kit Gibson Assembly<sup>®</sup> Cloning Kit (New England Biolabs, catálogo número E5510S) seguindo o protocolo como descrito: 10 µL de Gibson Assembly Master Mix 2×, 3,5 µL (aproximadamente 0,25 pmol) do vetor de interesse previamente clivado (pYSP, pRS306H e pRS306K) e 6,5 µL (aproximadamente 0,5 pmol) do fragmento de interesse a ser clonado (*Aga1*, AGA2::GFP e HSE::P<sub>CYC1</sub>::AGA1::T<sub>CYC1</sub>) previamente amplificado como descrito acima.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos usados neste trabalho.

Nome	Descrição	Sequência (5'→3')	Referência
pUC57_AGA1_F	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA1 com sobreposição de extremidade de ligação ao pYSP no sentido 5'→ 3'	TAAATTACTATACTTCTATTTCGGCGTTGA CCTGGAACGGGGGGCCCATGACATTAT CTTTCGC	Este trabalho
pUC57_AGA1_R	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA1 com extremidades de ligação ao pUC57- <i>simple</i> no sentido 3'→ 5'	CTTTTCGGTTAGAGCGGATGGATTCCAC GATACCCTGCAGGGGCCCTTAACTGAAA ATTACATTGCA	Este trabalho
pUC57_AGA2_F	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA2 com sobreposição de extremidade de ligação ao pYSP no sentido 5'→ 3'	TAAATTACTATACTTCTATTTCGGCGTTGA CCTGGAACGGGGGGCCCATGCAGTTAC TTCG	Este trabalho
pUC57_AGA2_R	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA2 com extremidades de ligação ao pUC57- <i>simple</i> no sentido 3'→ 5'	CTTTTCGGTTAGAGCGGATGGATTCCAC GATACCCTGCAGGGGCCCTAGTCGCAC CTAT	Este trabalho
pRS306K_AGA1_F	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA1 com extremidades de ligação ao pRS306K no sentido 5'→ 3'	TGGATCTGAAGCTTCGTACGCTGCAGGT CGACGGATCCCTATCTTTTGCCCGGTG AGTTGTTACTT	Este trabalho
pRS306K_AGA1_R	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA1 com extremidades de ligação ao pRS306K no sentido 3'→ 5'	CGAGGCAAGCTAAACAGATCTGGCGCG CCTTAATTAACCCCTTCGAGCGTCCCAA AACCT	Este trabalho
pRS306H_AGA2_F	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA2 com extremidades de ligação ao pRS306H no sentido 5'→ 3'	TGGATCTGAAGCTTCGTACGCTGCAGGT CGACGGATCCCTATCTTTTGCCCGGTG AGTTGTTACTT	Este trabalho
pRS306H_AGA2_R	Oligonucleotídeo empregado para a amplificação de AGA2 com extremidades de ligação ao pRS306H no sentido 3'→ 5'	CGAGGCAAGCTAAACAGATCTGGCGCG CCTTAATTAACCCCTTCGAGCGTCCCAA AACCT	Este trabalho

### 3.2.4. Procedimentos para transformação e isolamento de plasmídeos de *Escherichia coli*

Os plasmídeos pYSP, pAGA2 e pAGA1 foram transformados na linhagem NEB<sup>®</sup> 5-alpha Competent *E. coli* (Tabelas 2 e 3) pelo método de choque térmico (<https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>). Os potenciais transformantes foram semeados em placas de Petri contendo meio LBA sólido e as placas foram incubadas à 37 °C por 18 h. As colônias resultantes de *E. coli* foram, então, inoculadas em meio líquido LBA e crescidas à 37 °C por 18 h em incubadoras de temperatura controlada e com agitação à 200 RPM para posterior isolamento dos plasmídeos. O kit Monarch Plasmid Miniprep (New England Biolabs, catálogo número T1010S) foi utilizado para o isolamento de plasmídeos em pequena escala a partir de cinco mL de cultura líquida das linhagens transformadas de *E. coli*, conforme as instruções do

fabricante. Por sua vez, o kit ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep (Zymo Research, catálogo número D4200) foi utilizado para o isolamento de plasmídeos a partir de culturas de 50 mL das linhagens de *E. coli* transformadas, também conforme as instruções do fabricante. A qualidade das mini e midi-preparações plasmídeais foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1× por 60 min a 50 V. Os plasmídeos foram, então, quantificados por espectrofotometria usando absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) e a presença de contaminação proteica foi avaliada por absorvância a 280 nm ( $A_{280}$ ). Os plasmídeos foram armazenados à -20 °C para posterior uso.

### 3.2.5. Procedimentos para isolamento do genoma total de *Saccharomyces cerevisiae*

O genoma total das linhagens de *S. cerevisiae* BY4742 e W303 (**Tabela 2**) foram extraídos utilizando o kit YeaStar™ Genomic DNA (Zymo Research, catálogo número D2002). Para tanto, as linhagens foram recuperadas do armazenamento à -80 °C e semeadas em placas de Petri contendo meio YEPD, seguido de incubação à 28 °C por 72 h. As colônias resultantes de *S. cerevisiae* foram inoculadas em 50 mL meio líquido YEPD e crescidas à 28 °C por 48 h em incubadoras de temperatura controlada e com agitação a 200 RPM. A partir de 3 mL de cultura líquida de cada linhagem, as extrações de genoma total foram realizadas conforme as instruções do fabricante. A concentração de R-Zymoliase utilizada foi de 1 mg/mL. A quantidade de DNA total extraído foi aferido por espectrometria usando absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ).

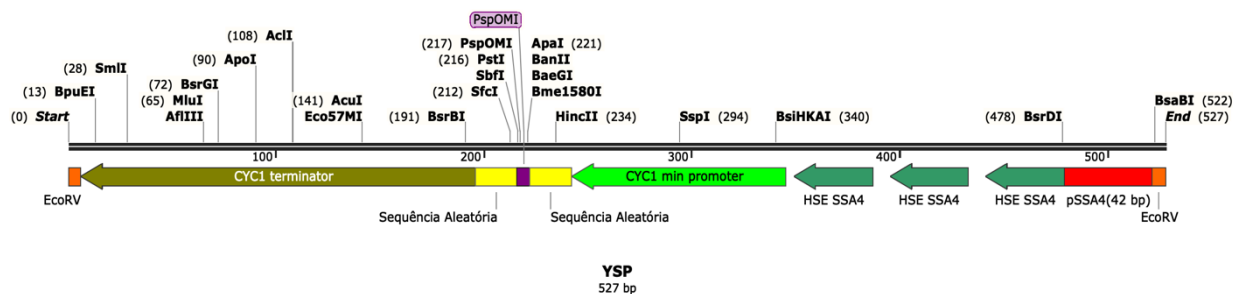
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção compreende duas partes principais: a primeira parte (item 4.1), que corresponde aos procedimentos *in silico* usados para a geração de oligonucleotídeos, dispositivos e dos sistemas de DNA, e a segunda parte (item 4.2 ao item 4.4), que corresponde aos procedimentos de biologia molecular realizados com base nas simulações *in silico*.

##### 4.1. Prospecção de sequências e desenho dos plasmídeos pAGA2Y, pAGA1 e pAGA1Y

A partir das diferentes partes de DNA prospectadas neste trabalho (**Tabela 1**), iniciou-se com o desenho de um dispositivo padrão para a expressão de sequências por meio de estresse fermentativo, denominado de *Yeast Stress Promoter* ou YSP (HSE::P<sub>CYC1</sub>::T<sub>CYC1</sub>). O dispositivo YSP é composto pelo promotor e terminador mínimo derivados do gene *CYC1* de *Saccharomyces cerevisiae*, três HSEs derivados do gene *SSA4* de *Saccharomyces cerevisiae* à montante do promotor, e duas sequências de DNA aleatórias entre o promotor e o terminador (**Figura 4**). O promotor *CYC1* (P<sub>CYC1</sub>) é um promotor constitutivo de 103 pares de bases (pb) que pode ser modulado por diferentes combinações de sequências de ligação para fatores transcricionais ativadores e repressores o que o torna uma sequência regulatória que pode ser facilmente modularizada e integrada com outras partes de DNA de interesse (Redden, 2015). Nesse trabalho, buscou-se modular a expressão do P<sub>CYC1</sub> por meio da adição de os HSEs derivados do gene *SSA4*, cujo gene é altamente induzido em termos transcricionais após a exposição das células de leveduras à estresse térmico e etanólico. É importante ressaltar que as sequências HSEs de *SSA4* encontram-se molecularmente bem caracterizados e foram previamente utilizados para modular a atividade de P<sub>CYC1</sub> (Boorstein, 1990; Young, 1993). Para garantir uma maior sensibilidade e responsividade do promotor frente a um potencial estresse fermentativo cervejeiro, foram adicionadas três sequências HSEs de *SSA4* a montante ao P<sub>CYC1</sub> (**Figura 4**). Além disso, adicionou-se uma sequência de 42 pb do promotor de *SSA4* à montante do primeiro HSE de *SSA4* para fins de desenho dos oligonucleotídeos empregados para a geração de amplicons por PCR de alta fidelidade. Por fim, adicionou-se o terminador *CYC1* (T<sub>CYC1</sub>) de *S. cerevisiae*.

Para garantir a modularidade das diferentes partes de DNA componentes dos dispositivos YSP, AGA1 e AGA2::GFP, adicionaram-se sítios de restrição para a endonuclease *EcoRV* nas extremidades da construção (**Figura 4**), e um sítio de restrição para *PspOMI* entre as sequências aleatórias (**Figura 4**), o que possibilita a inserção de fragmentos de DNA de interesse para expressão heteróloga de diferentes sequências codificantes de interesse sem retirar nenhuma ORF de fase de leitura. Por fim, a construção foi inserida dentro do vetor pUC57-*simple*, gerando o vetor aqui chamado de pYSP.



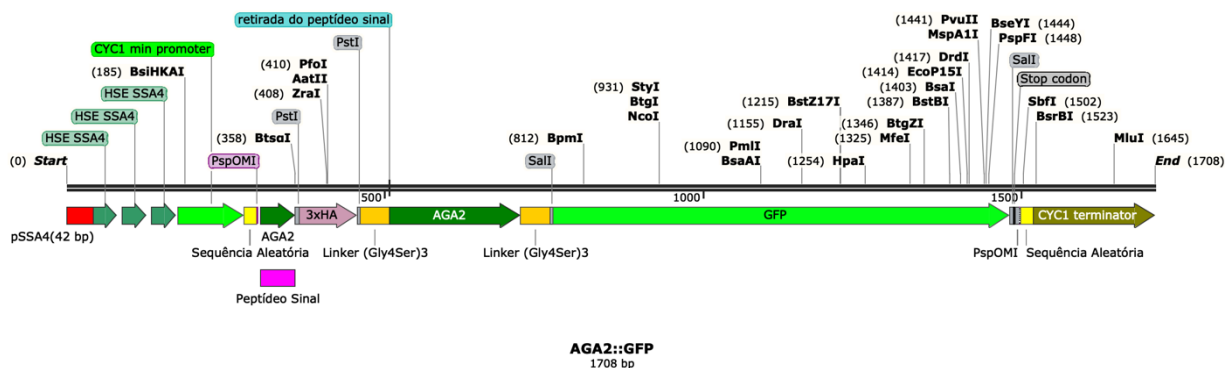
**Figura 4.** Mapa de restrição da sequência sintética YSP (HSE::P<sub>CYC1</sub>::T<sub>CYC1</sub>).

Os sítios únicos para endonucleases de restrição estão indicados no mapa em negrito. O sítio para a endonuclease de restrição *PspOMI*, que possibilita a inserção de fragmentos de DNA de interesse para expressão heteróloga, está indicada por uma caixa roxa no mapa. Duas sequências aleatórias de DNA, que permitem o seu uso para técnicas de clonagem livres de DNA ligase ou por concatenação de fragmentos (técnica de clonagem de concatenação de fragmentos de DNA), foram inseridas flanqueando o sítio para a endonuclease de restrição *PspOMI*. Por fim, as sequências promotoras e terminadoras do gene *CYC1*, as sequências para a ligação de fatores transcricionais modulados por choque térmico do gene *SSA4* (HSE *SSA4*), assim como um pequeno fragmento de DNA oriundo do promotor *SSA4* (*P<sub>SSA4</sub>*) de *Saccharomyces cerevisiae* para fins de desenho dos oligonucleotídeos empregados para a geração de amplicons por PCR de alta fidelidade, estão indicados no mapa.

Após o desenho do dispositivos YSP (**Figura 4**), passou-se ao desenho da construção da aqui chamada AGA2::GFP (GFP::AGA2::HA) (**Figura 5**). O dispositivo



AGA2::GFP contém uma fusão das sequências codificadoras para as proteínas AGA2 de *S. cerevisiae* para a proteína de fluorescência verde GFP, além de uma sequência codificadora para o epítipo 3×HA, entre as sequências aleatórias da construção YSP (Figura 5). A proteína AGA2, sendo um *dual display* (Lim, 2017), permite a utilização das porções N-terminal e C-terminal para a expressão de proteínas e peptídeos de interesse. Além disso, foram utilizados *linkers* de  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$  para garantir uma menor probabilidade de impedimentos estéricos. Para garantir a modularidade do dispositivo AGA2::GFP, inseriam-se sítios para endonucleases de restrição capazes de clivar cada parte do dispositivo, tais como *PstI*, para a modularização de 3×HA e *SallI*, para a modularização de GFP. O dispositivo AGA2::GFP foi inserido em um vetor pUC57-*simple*, gerando o vetor aqui chamado de pAGA2.



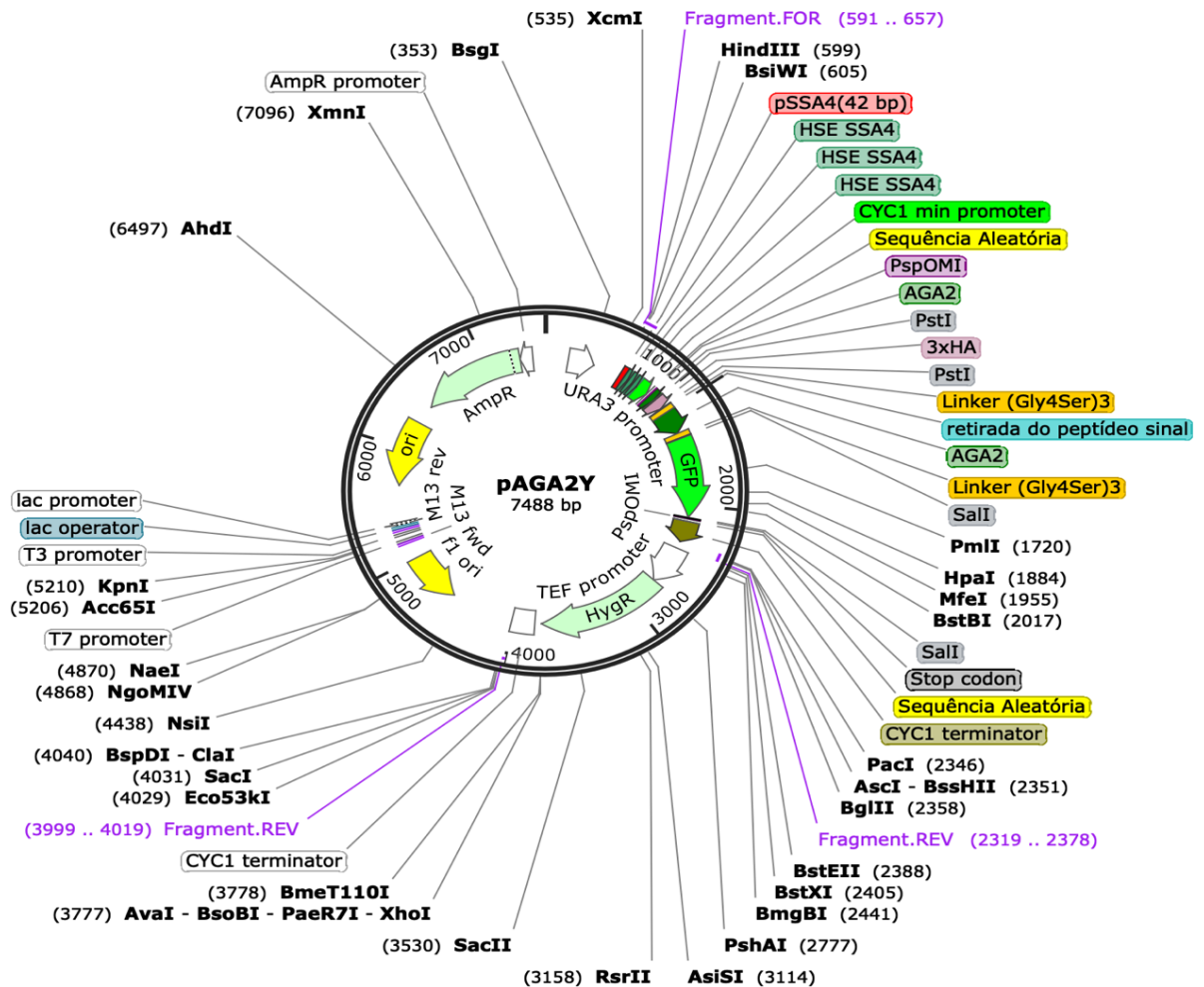
**Figura 5.** Mapa de restrição da sequência sintética AGA2::GFP (GFP::AGA2::HA).

Os sítios únicos para endonucleases de restrição estão indicados no mapa em negrito. O gene codificador da proteína AGA2 aparece indicado no mapa, flanqueado por linkers de  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$  que garantem possíveis impedimentos estéricos. Uma etiqueta do tipo 3xHA para uso em ensaios de imunofluorescência aparece à montante de AGA2, bem como a sequência codificadora para a proteína GFP, aparece à jusante de AGA2. O peptídeo sinal de AGA2 aparece indicado à montante de 3xHA. O sítio para a endonuclease de restrição *PspOMI*, que possibilita a inserção de partes de DNA de interesse para expressão heteróloga, está indicada por uma caixa rosa no mapa. As sequências promotoras e terminadoras do gene *CYC1*, bem como as sequências para a ligação de fatores transcricionais modulados por choque térmico do gene *SSA4* (HSE SSA4) e um pequeno

fragmento de DNA oriundo do promotor SSA4 ( $P_{SSA4}$ ) de *Saccharomyces cerevisiae* estão indicados no mapa.

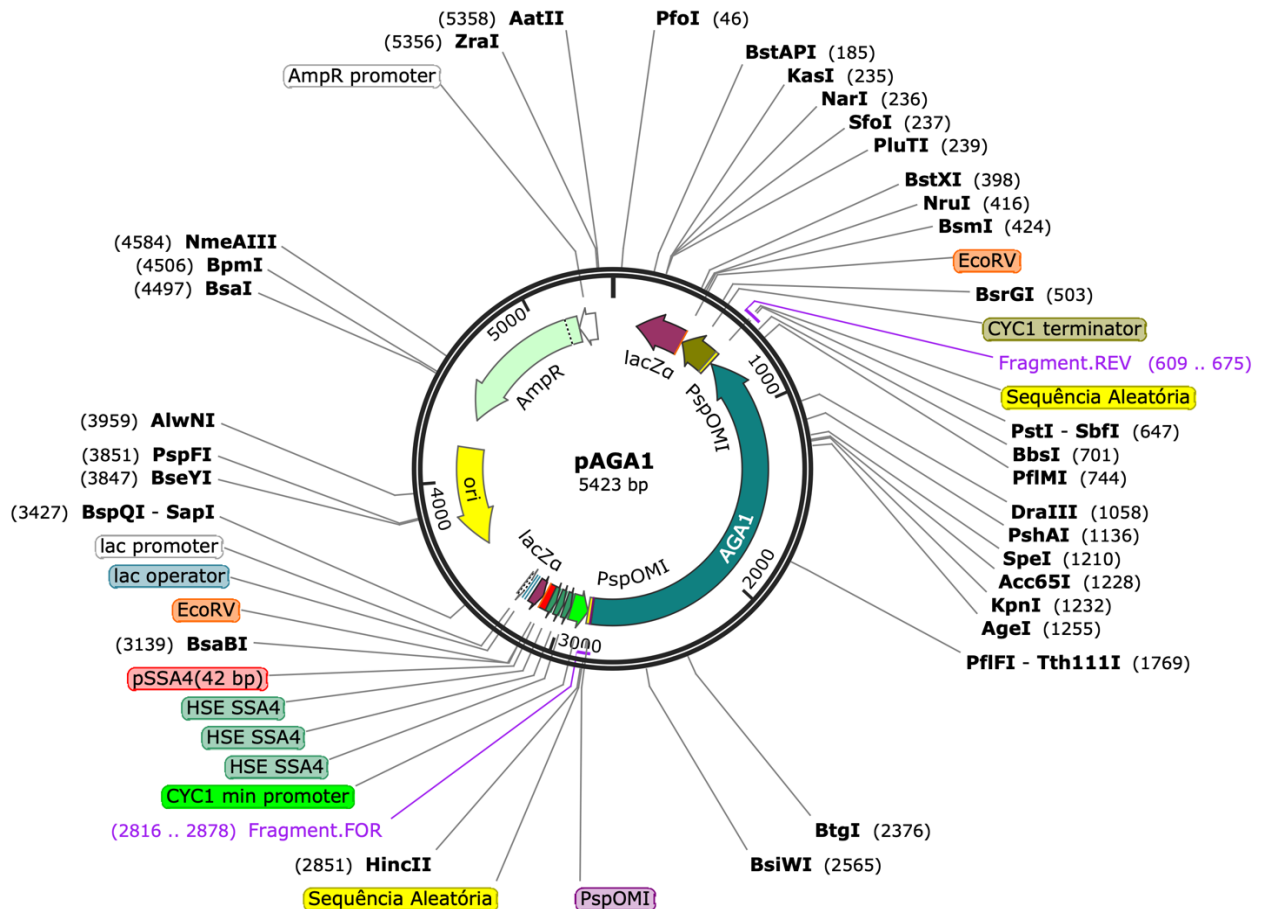
A partir das construções acima apresentadas, deu-se início às simulações *in silico* de clonagem por concatenação de fragmentos de DNA (técnica de Gibson), (ver item 3.2.3 da seção “Materiais e Métodos”). Estas simulações possibilitam avaliar a organização dos diferentes dispositivos de DNA, bem como gerar os oligonucleotídeos necessários para a realização da técnica de Gibson.

A primeira simulação foi realizada com a clonagem *in silico* do fragmento HSE::P<sub>CYC1</sub>::HA::AGA2::GFP::T<sub>CYC1</sub> de pAGA2 no plasmídeo pRS306H (Taxis, 2006), gerando o plasmídeo pAGA2Y (**Figura 6**). O plasmídeo resultante pAGA2Y é um vetor bifuncional de levedura e bactéria e que promove a resistência à ampicilina (bactérias) e à higromicina (leveduras).



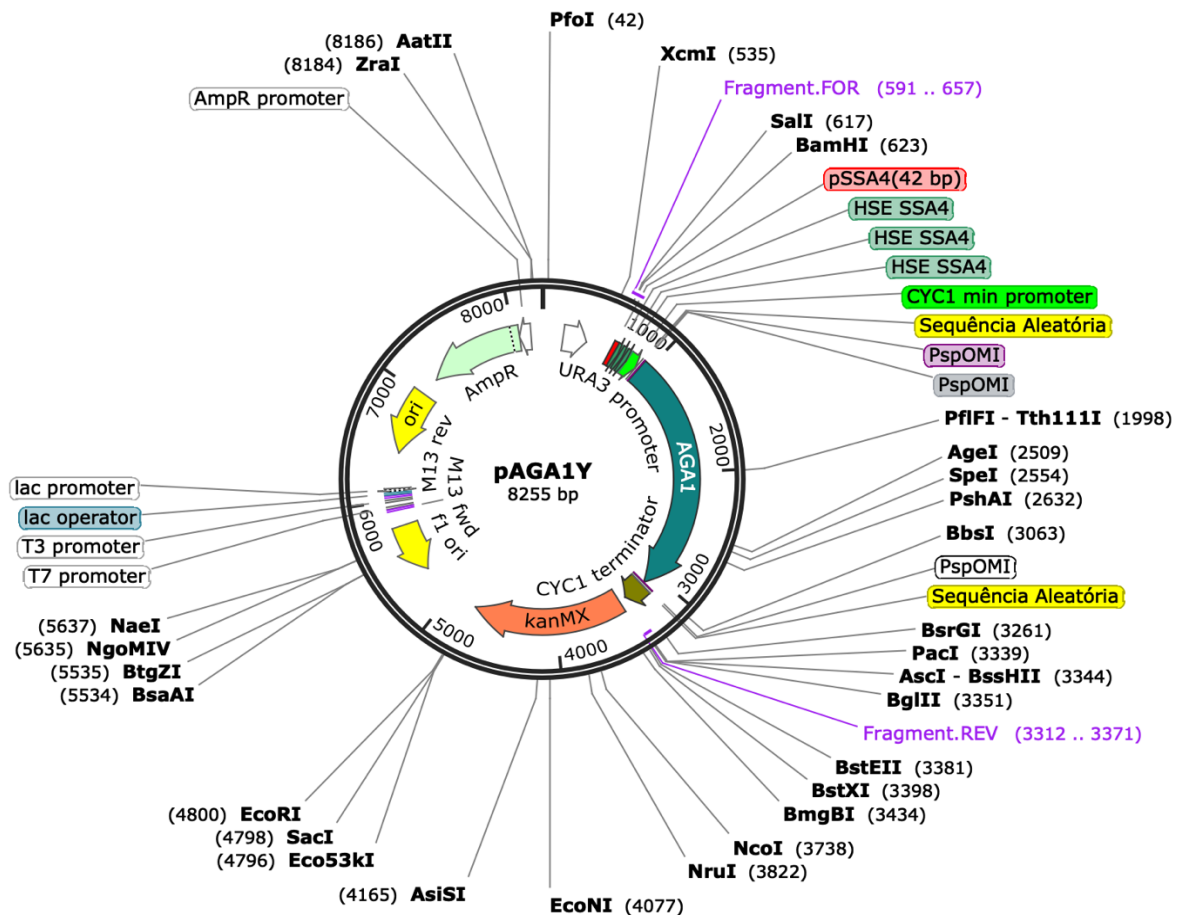
**Figura 6.** Mapa de restrição do plasmídeo pAGA2Y. Os sítios únicos para endonucleases de restrição estão indicados no mapa em negrito. O plasmídeo pAGA2Y é um plasmídeo recombinante gerado a partir da clonagem do dispositivo HSE::P<sub>CYC1</sub>::HA::AGA2::GFP::T<sub>CYC1</sub> no plasmídeo bifuncional pRS306H. Os oligonucleotídeos gerados a partir da técnica de Gibson *in silico* estão indicados no mapa do plasmídeo (“Fragment.FOR” e “Fragment.REV”).

Por sua vez, a clonagem da sequência codificadora para a proteína Aga1 em pYSP clivado com *PspOMI* é indicado na **Figura 7**, gerando o plasmídeo de *E. coli* pAGA1.



**Figura 7.** Mapa de restrição do plasmídeo pAGA1. Os sítios únicos para endonucleases de restrição estão indicados no mapa em negrito. O plasmídeo pAGA1 é um plasmídeo recombinante gerado a partir da clonagem da sequência codificadora para a proteína Aga1 (AGA1) no vetor pYSP. A sequência AGA1 aparece indicada no mapa. Os oligonucleotídeos gerados a partir da técnica de Gibson *in silico* estão indicados no mapa do plasmídeo (“Fragment.FOR” e “Fragment.REV”).

Em seguida, o fragmento HSE::P<sub>CYC1</sub>::AGA1::T<sub>CYC1</sub> de pAGA1 foi transferido para o plasmídeo pRS306K (Taxis, 2006) clivado com *Sma*I, gerando o plasmídeo bifuncional pAGA1Y (**Figura 8**) e que confere resistência à ampicilina (bactérias) e à geneticina (leveduras).

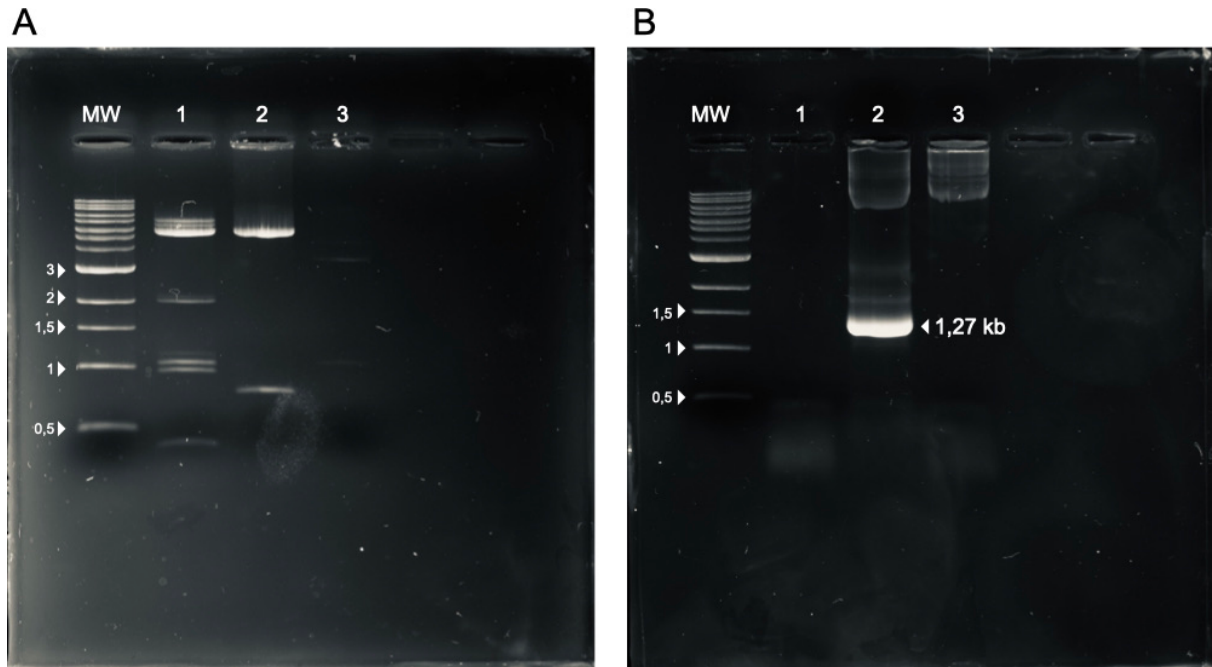


**Figura 8.** Mapa de restrição do plasmídeo pAGA1Y. Os sítios únicos para endonucleases de restrição estão indicados no mapa em negrito. O plasmídeo pAGA1Y é um plasmídeo recombinante gerado a partir da clonagem do dispositivo HSE::P<sub>CYC1</sub>::AGA1::T<sub>CYC1</sub> de pAGA1 no vetor bifuncional pRS306K. Os oligonucleotídeos gerados a partir da técnica de Gibson *in silico* estão indicados no mapa do plasmídeo (“Fragment.FOR” e “Fragment.REV”).

#### 4.2. Amplificação de AGA2::GFP e obtenção de pAGA2Y

Uma vez recebido o vetor pAGA2, procedeu-se com a construção do plasmídeo pAGA2Y, conforme descrito no item 3 do item “Materiais e Métodos”. Sendo assim, o dispositivo AGA2::GFP foi inicialmente amplificado por PCR de alta fidelidade a partir de pAGA2 usando os oligonucleotídeos pUC57\_AGA2\_F e pUC57\_AGA2\_R (Tabela 3), resultando em um amplicon com extremidades coesivas à pRS306H (Figura A1 em

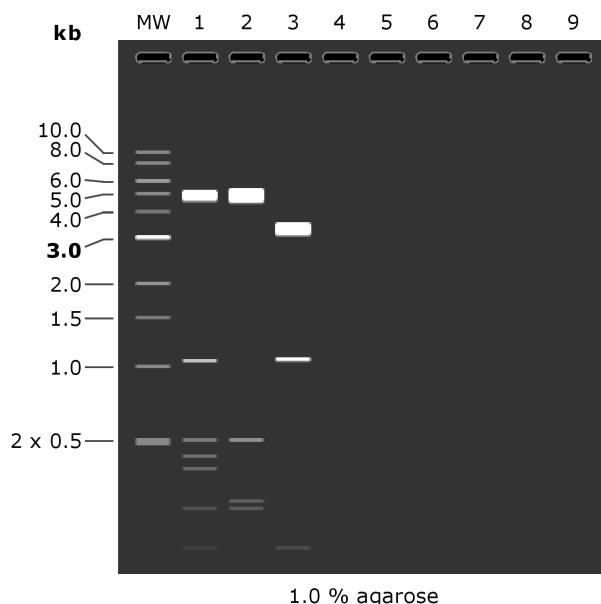
“Anexos”), seguido pela clonagem do amplicon no vetor receptor pRS306H pela técnica de Gibson e gerando o plasmídeo bifuncional pAGA2Y. Os potenciais vetores pAGA2Y, assim gerados experimentalmente, foram validados por meio de análise de restrição de fragmentos de DNA (**Figura 9A**) e PCR convencional (**Figura 9B**), também usando os oligonucleotídeos pUC57\_AGA2\_F e pUC57\_AGA2\_R (**Tabela 3**).



**Figura 9.** Validação dos potenciais vetores pAGA2Y. Em (A) análise em eletroforese de gel de agarose 1% (p/v) do padrão de fragmentos de restrição dos plasmídeos pAGA2Y (canaleta 1), pRS306H (canaleta 2) e pAGA2 (canaleta 3) submetidos à digestão com a endonuclease *Pst*I. Em (B) análise do amplicon AGA2 em eletroforese de gel de agarose 1 % (p/v) dos vetores pAGA2Y (canaleta 2) e pRS306H (canaleta 3). A canaleta 1 corresponde ao controle negativo do PCR. O amplicon de AGA2 possui um tamanho de 1277 pb (1,27 kb). Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

A análise de restrição de pAGA2Y pela clivagem com a endonuclease de restrição *Pst*I mostra a clara diferença entre o padrão de bandas de pAGA2Y, do plasmídeo vazio pRS306H e do plasmídeo de origem do fragmento pAGA2 (**Figura 9A**). Entretanto, o padrão de bandas de pAGA2Y a partir da sua digestão com *Pst*I não se mostrou no tamanho esperado. O padrão de bandas esperado para as três análises de restrição

(Figura 10), quando comparado ao obtido (Figura 9A) é muito similar, porém as bandas de pAGA2Y estão em alturas diferentes. Nossas hipóteses giram em torno de problemas com a própria endonuclease de restrição, *Pst*I, que provavelmente está digerindo parcialmente o plasmídeo pAGA2Y. Para confirmar de fato que o dispositivo AGA2::GFP foi clonado em pRS306H, foi realizada uma análise por PCR dos plasmídeos candidatos para AGA2 (Figura 9B), indicando que, efetivamente, o plasmídeo bifuncional pAGA2Y foi obtido.

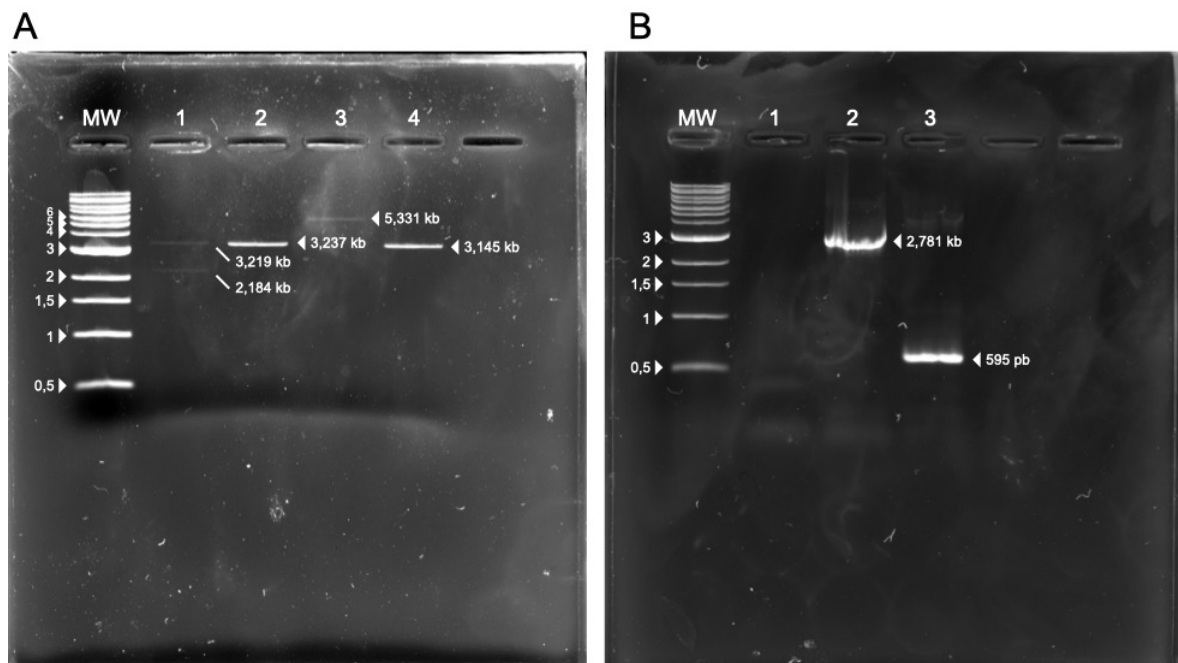


**Figura 10.** Simulação em gel de agarose 1% (p/v) do padrão de restrição de pAGA2Y (canaleta 1), pRS306H (canaleta 2) e pAGA2 (canaleta 3) quando submetidas à *Pst*I. Os fragmentos esperados a partir de pAGA2Y clivado com *Pst*I são 4790 pb, 1041 pb, 515 pb, 440 pb, 380 pb, 226pb e 96pb. Os fragmentos esperados a partir de pRS306H clivado com *Pst*I são 4790 pb, 515 pb, 249 pb e 226 pb. Os fragmentos esperados a partir de pAGA2 clivado com *Pst*I são 3293 pb, 1041 pb e 96 pb. Legenda: marcados de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

#### 4.3. Amplificação de AGA1 e obtenção de pAGA1

A partir do DNA genômico extraído das linhagens BY4742 e W303 de *S. cerevisiae* (item 3, seção “Materiais e Métodos”), procedeu-se para obtenção do plasmídeo pAGA1, primeiramente com a amplificação por PCR de alta fidelidade de AGA1 do DNA genômico

da duas linhagens com extremidades coesivas à pYSP por meio dos oligonucleotídeos pUC57\_AGA1\_F e pUC57\_AGA1\_R (Tabela 3 e Figura A2, “Anexos”), seguido pela clonagem do amplicon AGA1 no vetor pYSP e, assim, gerando pAGA1 (item 3, seção “Materiais e Métodos”). Os potenciais vetores pAGA1 gerados experimentalmente foram validados por meio de análise de restrição de fragmentos de DNA (Figura 11A) e PCR convencional (Figura 11B) usando os oligonucleotídeos pRS306K\_AGA1\_F e pRS306K\_AGA1\_R (Tabela 3).

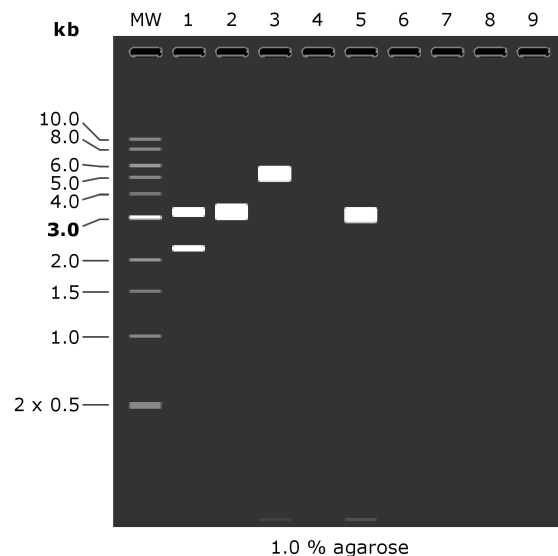


**Figura 11.** Validação experimental dos potenciais vetores pAGA1. Em (A) análise em eletroforese de gel de agarose 1 % (p/v) do padrão de fragmentos de restrição dos plasmídeos pAGA1 (canaleta 1) e pYSP (canaleta 2) submetidos à digestão com a endonuclease *Psp*OMI, e pAGA1 (canaleta 3) e pYSP (canaleta 4) submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *Xba*I. Os fragmentos de DNA correspondentes a pAGA1 possuem tamanhos de 3,239 kb e 2,184 kb quando clivado com *Psp*OMI e 5,331 kb e 46 pb quando clivado com *Xba*I. Os fragmentos de DNA correspondentes a pYSP possuem tamanhos de 3,237 kb quando clivado com *Psp*OMI e 3,145 kb e 46 pb quando clivado com *Xba*I. Em (B) análise em eletroforese de gel de agarose 1% (p/v) do produto de PCR dos vetores pAGA1 (canaleta 2) e pYSP (canaleta 3). A canaleta 1 corresponde ao controle negativo do PCR. O amplicon de pAGA1 possui um tamanho de 2,781 kb e o amplicon de



pYSP possui um tamanho de 595 pb. Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

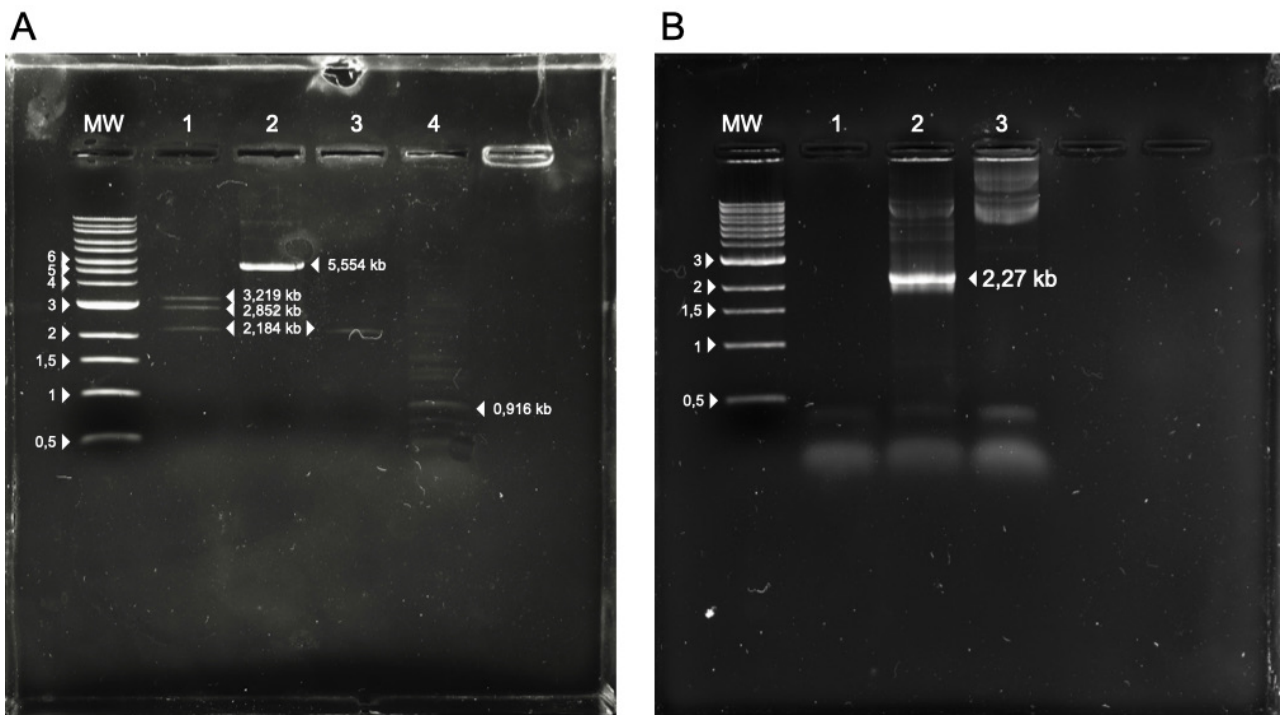
Como se pode ver nas **Figuras 11A e 11B**, o padrão de bandas entre pAGA1 e pYSP, tanto em análise com endonucleases de restrição quanto por PCR, é diferente e apresentou-se conforme o simulado *in silico* (**Figura 12**). A partir dos experimentos mostrados acima, foi confirmada a clonagem do fragmento AGA1 em pYSP, gerando o plasmídeo pAGA1.



**Figura 12.** Simulação em gel de agarose 1 % (p/v) do padrão de restrição de pAGA1 (canaleta 1) e pYSP (canaleta 2) submetidos à digestão com a endonuclease *PspOMI*, e pAGA1 (canaleta 3) e pYSP (canaleta 4) submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *XbaI*. Os fragmentos esperados de DNA correspondentes a pAGA1 possuem tamanhos de 3,239 kb e 2,184 kb quando clivado com *PspOMI* e 5,331 kb e 46 pb quando clivado com *XbaI*. Os fragmentos de DNA correspondentes a pYSP possuem tamanhos de 3,237 kb quando clivado com *PspOMI* e 3,145 kb e 46 pb quando clivado com *XbaI*. Os fragmentos de DNA correspondentes a pYSP possuem tamanhos de 3,237 kb quando clivado com *PspOMI* e 3,145 kb e 46 pb quando clivado com *XbaI*. Legenda: marcados de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

#### 4.4. Amplificação de HSE::pCYC1::AGA1:: tCYC1 e obtenção de pAGA1Y

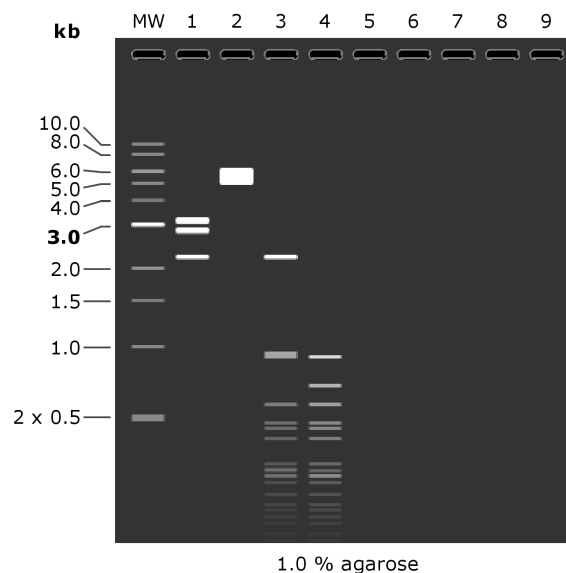
Uma vez obtido o plasmídeo pAGA1, procedeu-se com a construção do vetor pAGA1Y (item 3, seção “Materiais e Métodos”). Para tanto, amplificou-se por meio de PCR de alta fidelidade o fragmento HSE::P<sub>CYC1</sub>::AGA1:: T<sub>CYC1</sub> de pAGA1 com extremidades coesivas à pRS306K (**Figura 11B**) usando os oligonucleotídeos pRS306K\_AGA1\_F e pRS306K\_AGA1\_R (**Tabela 3**), seguido pela clonagem do fragmento no vetor pRS306K (Taxis, 2006) pela técnica de Gibson, gerando o plasmídeo pAGA1Y. Os potenciais plasmídeos pAGA1Y foram validados por meio de análise de restrição de fragmentos de DNA (**Figura 13A**) e PCR convencional (**Figura 13B**) usando os oligonucleotídeos pUC57\_AGA1\_F e pUC57\_AGA1\_R (**Tabela 3**).



**Figura 13.** Validação dos potenciais plasmídeos pAGA1Y. Em (A) análise em eletroforese de gel de agarose 1 % (p/v) do padrão de fragmentos de restrição dos plasmídeos pAGA1Y (canaleta 1) e pRS306K (canaleta 2) submetidos à digestão com a endonuclease *Psp*OMI, e pAGA1Y (canaleta 3) e pRS306K (canaleta 4) submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *Hae*III. Os fragmentos de DNA correspondentes a pAGA1Y possuem tamanhos de 3,219 kb, 2,852 kb e 2,184 kb quando clivado com *Psp*OMI e 2,184 kb quando clivado com *Hae*III. Os fragmentos de DNA correspondentes a pRS306K possuem tamanhos de 5,554 kb quando clivado com *Psp*OMI e 21 fragmentos que variam

entre 916 pb e 11 pb quando clivado com *Xba*I. Em (B) análise em eletroforese de gel de agarose 1% (p/v) do produto de PCR dos vetores pAGA1Y (canaleta 2) e pRS306K (canaleta 3). A canaleta 1 corresponde ao controle negativo do PCR. O amplicon de pAGA1Y possui um tamanho de 2,27 kb. Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

Mais uma vez, a análise por endonucleases de restrição e o PCR, tanto para pAGA1Y como para pRS306K, mostrados nas **Figuras 13A e 13B**, apresentam padrões de bandas completamente distintos entre si, confirmando o esperado pelas simulações *in silico* (**Figura 14**). A partir destas evidências, confirmou-se o plasmídeo pAGA1Y.



**Figura 14.** Simulação em gel de agarose 1 % (p/v) do padrão de fragmentos de restrição dos plasmídeos pAGA1Y (canaleta 1) e pRS306K (canaleta 2) submetidos à digestão com a endonuclease *Psp*OMI, e pAGA1Y (canaleta 3) e pRS306K (canaleta 4) submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *Hae*III. Os fragmentos de DNA correspondentes a pAGA1Y possuem tamanhos de 3,219 kb, 2,852 kb e 2,184 kb quando clivado com *Psp*OMI e 2,184 kb quando clivado com *Hae*III. Os fragmentos de DNA correspondentes a pRS306K possuem tamanhos de 5,554 kb quando clivado com *Psp*OMI e 21 fragmentos que variam entre 916 pb e 11 pb quando clivado com *Xba*I. Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até o momento possibilitaram gerar um conjunto de ferramentas moleculares que, potencialmente, quando transformados em linhagens leveduras cervejeiras, poderão expressar em condições de estresse fermentativo cervejeiro uma proteína fluorescente na sua superfície e, de forma visual, indicar a sua viabilidade e vitalidade para um reuso na fabricação de cervejas. É importante ressaltar que devido à pandemia de SARS-CoV-2, alguns experimentos que até então estavam objetivados no pré-projeto deste trabalho de conclusão de curso não puderam ser cumpridos. Frente a isto, e pensando no seguimento desse projeto, temos como perspectivas a transformação de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* com ambos os plasmídeos bifuncionais pAGA1Y e pAGA2Y, seguido da análise da expressão dos dispositivos HSE::AGA1 e HSE::AGA2::GFP por meio da quantificação da fluorescência de GFP por citometria de fluxo, ensaios de estresse fermentativo e térmico e ensaios de viabilidade e vitalidade celulares por unidades formadoras de colônia e coloração com azul de metileno em tampão alcalino .

## 6. REFERÊNCIAS

ANDREU, Cecilia; DEL OLMO, Marcel Lí. Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2543–2561, 2018.

Beer and eco-innovations. **Euro News - Living**, 2019 Disponível em: <<https://www.euronews.com/living/2019/01/02/beer-and-eco-innovations>>. Acesso em: 7 abr. 2021.

Biotechnology | Definition, Examples, & Applications. **Encyclopedia Britannica**, 2019. Disponível em: <<https://www.britannica.com/technology/biotechnology>>. Acesso em: 1 mar. 2021.

BLASCO, Lucía; VIÑAS, Miquel. Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. **International Microbiology**, n. 14, p. 61–76, 2011.

BLEOANCA, Lulia; BAHRIM, Gabriela. Overview on Brewing Yeast Stress Factors. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 5, p. 14, 2013.

BRACHMANN, C. B.; DAVIES, A.; COST, G. J.; *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast (Chichester, England)**, v. 14, n. 2, p. 115–132, 1998.

BOORSTEIN, W. R.; CRAIG, E. A. Structure and regulation of the SSA4 HSP70 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 31, p. 18912–18921, 1990.

BOULTON, Christopher; QUAIN, David. **Brewing Yeast and Fermentation**. [s.l.]: John Wiley & Sons, 2008.

BUD, R. The Uses of Life: A History of Biotechnology. **Cambridge University Press**, 1994. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=DVF11wX-sAC>>.

BUDRONI, Marilena; ZARA, Giacomo; CIANI, Maurizio; *et al.* Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts. **Brewing Technology**, 2017. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/brewing-technology/saccharomyces-and-non-saccharomyces-starter-yeasts>>. Acesso em: 16 mar. 2021.

CAPPELLARO, C.; BALDERMANN, C.; RACHEL, R.; *et al.* Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. **The EMBO journal**, v. 13, n. 20, p. 4737–4744, 1994.

CARRAU, Francisco; GAGGERO, Carina; AGUILAR, Pablo S. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 148–154, 2015.

CARVALHO, Giovani; BENTO, Camila; ALMEIDA e SILVA, João. Elementos Biotecnológicos Fundamentais ao Processo Cervejeiro: 1º Parte – As Leveduras. **Acta Analytica**, v.25, p. 36-42, 2006.

CHAN, Weng-Tat; VERMA, Chandra S.; LANE, David P.; *et al.* A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, p. e00086, 2013.

CHEN, Fuwang; JIANG, Jie; OUYANG, Hongsheng; *et al.* Markerless Deletion System for *Escherichia coli* Using Short Homologous Sequences and Positive-Negative Selectable Cassette. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1472–1481, 2015.

CHERF, Gerald M.; COCHRAN, Jennifer R. Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1319, p. 155–175, 2015.

Current Protocols in Molecular Biology. **Current Protocols**. Disponível em: <<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/journal/19343647>>. Acesso em: 21 abr. 2021.

EBC - European Brewery Convention: Yeast Group. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 68, n. 1, p. 14–20, 1962.

ELLIS, Tom; ADIE, Tom; BALDWIN, Geoff S. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. **Integrative Biology**, v. 3, n. 2, p. 109–118, 2011.

ENGLER, Carola; GRUETZNER, Ramona; KANDZIA, Romy; *et al.* Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 2009.

ENGLER, Carola; KANDZIA, Romy; MARILLONNET, Sylvestre. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. **PLOS ONE**, v. 3, n. 11, p. e3647, 2008.

GABRIEL, P.; DIENSTBIER, M.; MATOULKOVÁ, D.; *et al.* Optimised Acidification Power Test of Yeast Vitality and its Use in Brewing Practice. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 3, p. 270–276, 2008.

GASCH, Audrey P.; SPELLMAN, Paul T.; KAO, Camilla M.; *et al.* Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 12, p. 4241–4257, 2000.

GIBSON, Brian R.; LAWRENCE, Stephen J.; LECLAIRE, Jessica P. R.; *et al.* Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 5, p. 535–569, 2007.

GIBSON, Daniel G.; YOUNG, Lei; CHUANG, Ray-Yuan; *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009.

HORNSEY, Ian S. A History of Beer and Brewing. **The Royal Society of Chemistry – RSC Paperbacks**, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/9781847550026>>.

KARA, BV; SIMPOSON, WJ; HAMMOND, JRM. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing. Institute of Brewing (Great Britain)**, v. 94, n. 3, p. 153–158, 1988.

KURODA, Kouichi; UEDA, Mitsuyoshi. Generation of arming yeasts with active proteins and peptides via cell surface display system: cell surface engineering, bio-arming technology. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1152, p. 137–155, 2014.

LIM, Sungwon; GLASGOW, Jeff E.; FILSINGER INTERRANTE, Maria; *et al.* Dual display of proteins on the yeast cell surface simplifies quantification of binding interactions and enzymatic bioconjugation reactions. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 5, 2017.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, n. 1, p. 631–677, 1988.

MATHESON, Kinnari; PARSONS, Lance; GAMMIE, Alison. Whole-Genome Sequence and Variant Analysis of W303, a Widely-Used Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **G3: Genes|Genomes|Genetics**, v. 7, n. 7, p. 2219–2226, 2017.

MITSUI, Ryosuke; YAMADA, Ryosuke; OGINO, Hiroyasu. CRISPR system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its application in the bioproduction of useful chemicals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 111, 2019.

MORAES, Julia da Costa. Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro, 2017. **Lume UFRGS**. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/198679>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

One Shot™ INV110 Chemically Competent *E. coli*. **Invitrogen Corp.** Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C717103>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

REDDEN, Heidi; ALPER, Hal S. The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7810, 2015.

REZAEI, Nima. COVID-19 and Medical Biotechnology. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 139, 2020.

SAAVEDRA, C.; TUNG, K. S.; AMBERG, D. C.; *et al.* Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes & Development**, v. 10, n. 13, p. 1608–1620, 1996.

SAITO, Youhei; NAKAGAWA, Takanobu; KAKIHANA, Ayana; *et al.* Yeast Two-Hybrid and One-Hybrid Screenings Identify Regulators of hsp70 Gene Expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 9, p. 2109–2117, 2016.

SAMI, Manabu; IKEDA, Mitsuo; YABUUCHI, Seizo. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 3, p. 212–216, 1994.

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

SHETTY, Reshma P.; ENDY, Drew; KNIGHT, Thomas F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, v. 2, n. 1, p. 5, 2008.

SICARD, Delphine; LEGRAS, Jean-Luc. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 229–236, 2011.

STEWART, Graham G. Yeast Viability and Vitality. *In: Brewing and Distilling Yeasts*. Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 147–165. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8_8)>.

TAXIS, Christof; KNOP, Michael. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques*, v. 40, n. 1, p. 73–78, 2006.

TELINI, Bianca de Paula; MENONCIN, Marcelo; BONATTO, Diego. Does Inter-Organellar Proteostasis Impact Yeast Quality and Performance During Beer Fermentation? **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 2, 2020.

Tudo que você precisa saber sobre o mercado cervejeiro no Brasil. **Sebrae**, 2020. Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/tudo-que-voce-precisa-saber-sobre-o-mercado-cervejeiro-no-brasil,a7dc01dda12df610VgnVCM1000004c00210aRCRD>>. Acesso em: 2 mar. 2021.

VIDGREN, Virve; LONDESBOROUGH, John. 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 4, p. 475–487, 2011.

YOUNG, M R; CRAIG, E A. *Saccharomyces cerevisiae* HSP70 heat shock elements are functionally distinct. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 9, p. 5637–5646, 1993.

YANG, Na; YU, Zefen; JIA, Dongchen; *et al.* The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 7, p. 2897–2905, 2014.



## 7. ANEXOS

### 7.1. Aferição da qualidade das sequências sintetizadas pela GenScript.



# Certificate of Analysis

**Project ID:** U534UFJ290-2  
**Construct Information:**  
**Gene Name:** pYSP\_pUC57-Simple  
**Clone ID:** I26331 **Gene Length:** 527 bp  
**Cloning Vector:** pUC57-Simple **Cloning Strategy:** EcoRV/EcoRV

QC Items	Specifications	Results	
<b>Sequencing Alignment</b>	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	Pass	Consistent
<b>Vector Sequence</b>	The flanking sequences of the cloning site are correct.	Pass	Correct Shown in the SQD file
<b>Restriction Digests</b>	The size of inserted fragment is correct and free of unexpected bands.	Pass	Correct Shown in attachment 1
<b>DNA Quality</b>	Miniprep: 4 µg OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination	Pass	≥ 4 µg OD260/280=1.88 Pure
<b>Quality Grade</b>	Research Grade	Pass	Research Grade
<b>Appearance</b>	Clear and free of foreign particles.	Pass	Clear Free of foreign particles
<b>Additional Test</b>	N/A	N/A	

**NOTE**

Shipping at	Plasmid Storing at	Bacstab Storing at	Glycerol Stock Storing at
Room Temperature	-20 °C	4 °C	-20 °C/-80 °C

**Certified by:** *Morgan Wu* **Date:** 11/09/2020

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at [web@genscript.com](mailto:web@genscript.com).

For research use only

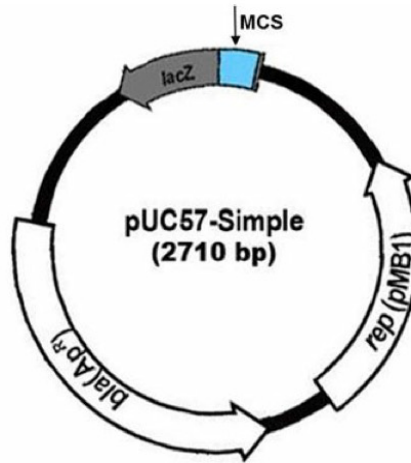
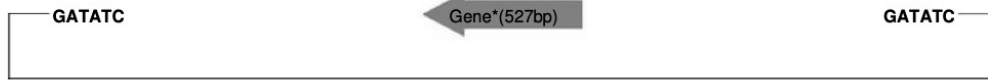
860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com) Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)

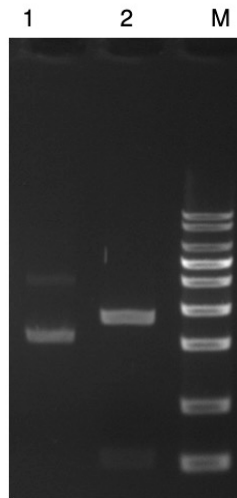
Attachment 1

Plasmid Construct Map

The gene was cloned in pUC57-Simple by EcoRV/EcoRV .

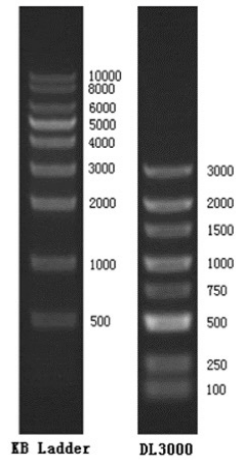


Enzyme Digestion



Lane M: KB Ladder  
Lane 1: U534UFJ290-2 plasmid  
Lane 2: U534UFJ290-2 plasmid digested by EcoRV

**Digestion Conditions:**  
About 300ng plasmid digested  
Digestion in water-bath, 37°C for 40 minutes  
1% Agarose Gel



For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com)

Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)

# Certificate of Analysis

**Project ID:** U534UFJ290-4  
**Construct Information:**  
**Gene Name:** pAGA2\_pUC57-Simple  
**Clone ID:** I26363A **Gene Length:** 1720 bp  
**Cloning Vector:** pUC57-Simple **Cloning Strategy:** EcoRV/EcoRV

QC Items	Specifications	Results	
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	Pass	Consistent
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	Pass	Correct Shown in the SQD file
Restriction Digests	The size of inserted fragment is correct and free of unexpected bands.	Pass	Correct Shown in attachment 1
DNA Quality	Miniprep: 4 µg OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination	Pass	≥ 4 µg OD260/280= 1.90 Pure
Quality Grade	Research Grade	Pass	Research Grade
Appearance	Clear and free of foreign particles.	Pass	Clear Free of foreign particles
Additional Test	N/A	N/A	

**NOTE**

Shipping at	Plasmid Storing at	Bacstab Storing at	Glycerol Stock Storing at
Room Temperature	-20°C	4°C	-20°C/-80°C

**Certified by:** *Morgan Wu* **Date:** 11/11/2020

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at [web@genscript.com](mailto:web@genscript.com).

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

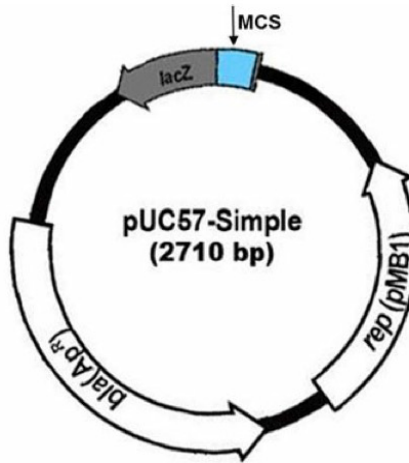
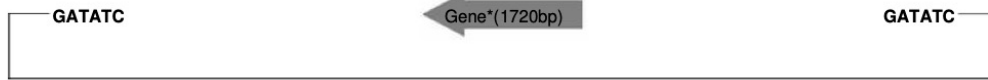
 Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com)

 Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)

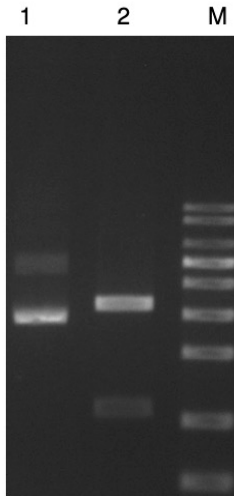
Attachment 1

Plasmid Construct Map

The gene was cloned in pUC57-Simple by EcoRV/EcoRV .

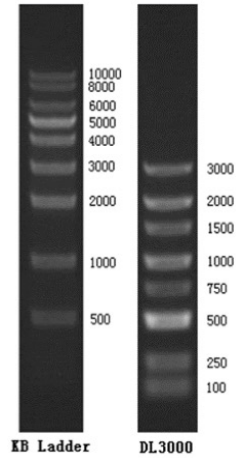


Enzyme Digestion



Lane M: KB Ladder  
Lane 1: U534UFJ290-4 plasmid  
Lane 2: U534UFJ290-4 plasmid digested by BglI

**Digestion Conditions:**  
About 300ng plasmid digested  
Digestion in water-bath, 37°C for 40 minutes  
1% Agarose Gel



For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com)

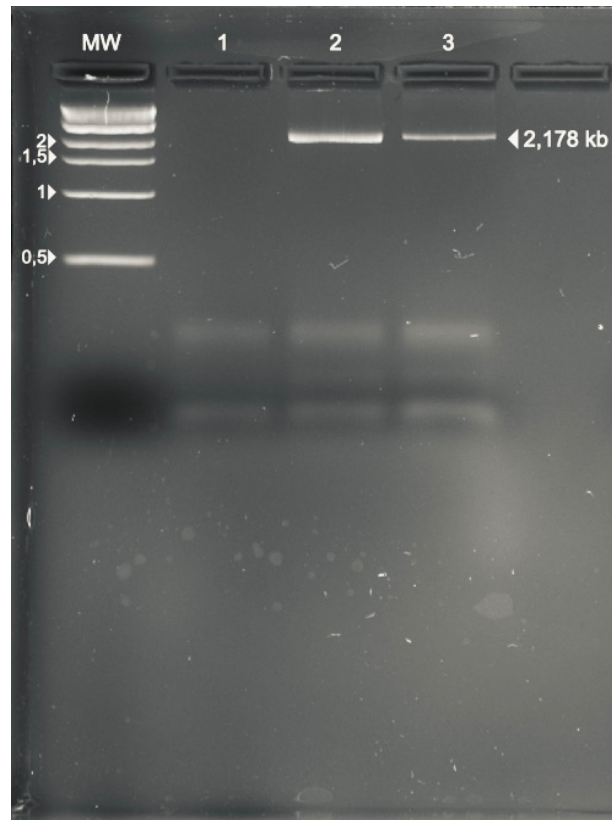
Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)

7.2. Análise de eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) de PCR para amplificação de AGA2::GFP de pAGA2.



**Figura A1.** Análise de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) de PCR para amplificação de AGA2::GFP de pAGA2. A canaleta 1 corresponde ao controle negativo do PCR. As demais canaletas, 2, 3 e 4, correspondem a pAGA2 amplificado com diferentes concentrações de DMSO 100 %: sem DMSO, com 2,5 % de DMSO 100 % e com 5 % de DMSO 100 %, respectivamente. O amplicon AGA2::GFP tem o tamanho de 1714 pb (ou 1,714 kb). Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).

7.3. Análise de eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) de PCR para amplificação de AGA1 do DNA genômico de *S. cerevisiae*.



**Figura A2.** Análise de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) de PCR para amplificação de AGA1 do DNA genômico das linhagens BY4742 (canaleta 2) e W303 (canaleta 3) de *S. cerevisiae*. A canaleta 1 corresponde ao controle negativo do PCR. O amplicon AGA1 tem o tamanho de 2178 pb (ou 2,178 kb). Legenda: marcador de tamanho molecular (MW), em kilobases (kb).