

Descoberta de novos genes de xilose isomerase em rúmen de cabras brasileiras

Gabriel de Souza Colombo¹, Ísis Viana Mendes², Betulia de Moraes Souto³,
Nádia Parachin⁴, João Ricardo Almeida⁵, Betania Ferraz Quirino⁶.

Resumo

O etanol de segunda geração é uma das alternativas sustentáveis para a obtenção de combustíveis, sendo produzido a partir da biomassa lignocelulósica. No entanto, parte dessa biomassa não é aproveitada em decorrência da incapacidade de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* de consumir a fração hemicelulósica. A xilose é o açúcar de segunda maior abundância na biomassa (ISIKGOR; BECER, 2015). Algumas bactérias e fungos são capazes de consumir a xilose com a participação de uma enzima chamada xilose isomerase, que realiza a isomerização da D-xilose em D-xilulose, um intermediário da via das pentoses. Por meio de engenharia metabólica, leveduras como *S. cerevisiae* podem ser capazes de expressar a xilose isomerase e realizar a fermentação alcoólica da parte hemicelulósica da biomassa. Com a utilização de uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras adaptadas à caatinga, foram identificados novos genes codificadores de xilose isomerase, uma parte usando metodologia de *screening* baseado na função e outra pelo *screening* baseado na sequência. O *screening* funcional resultou em 12 clones positivos de xilose isomerase e o *screening* baseado na sequência resultou em 8 clones positivos. Os clones obtidos serão posteriormente expressos em *S. cerevisiae*, para a análise do crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono a fim de avaliar a eficiência da expressão e o consumo da xilose pela levedura.

Palavras-chave: xilose. xilose isomerase. levedura. *Saccharomyces cerevisiae*.

Introdução

Modelos mais sustentáveis de produção têm ganhado destaque em diversos setores industriais. Processos e sistemas de produção sustentáveis, comparados à forma de produção convencional, podem potencialmente ser mais lucrativos em virtude da menor geração de resíduos e pelo uso de materiais e energia renováveis (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). Nas biorrefinarias, são integrados e realizados processos de conversão da biomassa para a produção de biocombustíveis, energia, químicos e

¹ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília (UCB), estagiário da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, gabriel.colombo@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestranda em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB), bolsista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, isis.mendes@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Ciências Biológicas, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, betulia.souto@embrapa.br

⁴ Bióloga, doutora em Engenharia Metabólica, professora da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, nadiasp@unb.br

⁵ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, joao.almeida@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Biologia celular e molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, betania.quirino@embrapa.br

outros bioderivados a partir da biomassa (CHERUBINI, 2010). As diversas rotas de conversão da biomassa permitem uma ampla utilização do material lignocelulósico presente nas plantas e a obtenção de vários produtos de interesse (CHERUBINI, 2010).

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda e primeira geração, com mais de 20 bilhões de litros produzidos no ano de 2016, de acordo com a Renewable Fuels Association (RFA). O bioetanol, por ser produzido a partir de biomassa celulósica encontrada em restos agrícolas, representa uma grande oportunidade para suprir a demanda global de etanol de maneira sustentável (SARKAR et al., 2012).

O material lignocelulósico utilizado na produção de etanol de segunda geração é constituído por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes como grupos acetilas, minerais e grupos fenóis substituintes (ISIKGOR; BECER, 2015). Geralmente, a celulose é o componente de maior abundância, constituindo de 35% a 50% da biomassa lignocelulósica, seguida da hemicelulose (de 20% a 35%) e da lignina (de 10% a 25%) (ISIKGOR; BECER, 2015). A celulose é um polímero formado por longas cadeias de celobiose, um dissacarídeo formado por resíduos de glicose, açúcares de 6 carbonos. A lignina é um polímero formado por três unidades diferentes de fenilpropanóides: os monolignóis álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, fornecendo rigidez e resistência aos tecidos vegetais. A hemicelulose é o segundo mais abundante polímero presente na biomassa lignocelulósica (ISIKGOR; BECER, 2015). É composta por heteropolímeros diversos que, por sua vez, são compostos por diferentes monossacarídeos de 5 e 6 carbonos: pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares acetilados (ISIKGOR; BECER, 2015).

Para que os açúcares presentes na biomassa possam ser consumidos, algumas enzimas exercem papel fundamental na catálise de reações que possibilitam que esses açúcares sejam metabolizados. O consumo da xilose por parte de alguns microrganismos é possível pela ação da enzima xilose isomerase, que realiza a isomerização da D-xilose em D-xilulose, tornando-a um intermediário da via das pentoses. Algumas bactérias e fungos anaeróbios que possuem xilose isomerase no seu metabolismo são capazes de metabolizar a xilose presente na hemicelulose e produzir etanol nesse processo. No entanto, em virtude da baixa e ineficiente taxa de produção do etanol pela fermentação alcoólica da xilose por esses organismos, além do excesso de subprodutos gerados nesse processo, eles não são viáveis para a produção industrial de bioetanol (BRAT et al., 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, geralmente utilizada na produção de etanol em processos de fermentação industrial, é incapaz de realizar a fermentação alcoólica de pentoses como a xilose (BRAT et al., 2009). Assim, a fração da hemicelulose não é aproveitada para a produção de bioetanol. Por meio de engenharia genética, a introdução de genes codificantes para xilose isomerases em *S. cerevisiae* pode permitir a utilização da xilose presente na hemicelulose por esses organismos para a produção de bioetanol.

Uma abordagem metagenômica, em que o material genético total de uma comunidade microbiana é analisado a partir de uma amostra natural, pode ser usada para a identificação de novos genes codificantes para xilose isomerases para a expressão em levedura. Kuyper et al. (2003) conseguiram a expressão de xilose isomerase por *S. cerevisiae* a partir de genes do fungo *Piromyces* spp., e Parachin e

Gorwa-Grauslund (2011), usando uma abordagem metagenômica, expressaram dois genes de xilose isomerase (*Xym1* e *Xym2*) provenientes de uma comunidade microbiana de solo de jardim em *Escherichia coli*. Os métodos de triagem foram baseados em similaridade de sequências proteicas e na atividade enzimática observada a partir de colônias transformadas que cresceram em meio suplementado com xilose.

Mendes (2016) realizou uma abordagem semelhante à de Parachin e Gorwa-Grausland (2011), usando uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras adaptadas à caatinga. Ao final do seu trabalho, foram estocados possíveis clones positivos que necessitavam de confirmação de suas identidades. Este trabalho deu continuidade ao trabalho de Mendes (2016). Os clones obtidos pela triagem baseada na sequência foram confirmados e pertencem a diferentes espécies de bactérias. Os possíveis clones positivos obtidos pelo *screening* funcional da biblioteca metagenômica de rúmen caprino descritos neste artigo serão posteriormente sequenciados e analisados por meio de ferramentas de bioinformática e finalmente esses genes serão expressos em *S. cerevisiae* para avaliar a atividade das enzimas encontradas.

Materiais e métodos

Foram utilizadas duas metodologias para a triagem da biblioteca metagenômica de rúmen caprino para xilose isomerase. Uma baseada na função e outra baseada na sequência. Na metodologia de *screening* baseada na função, os possíveis clones de xilose isomerase (*Xy*) que se encontravam em estoque foram transformados em novas células HB101. Para avaliar a viabilidade dessas células, estas foram plaqueadas em 3 placas contendo meio LB sólido com antibióticos diferentes. Uma placa continha tetraciclina, uma continha ampicilina e uma não apresentava antibiótico. Após alguns dias foi avaliado o crescimento de colônias nas placas. Foram transformados 12 clones, denominados *Xy XXX*, *Xy XXI*, *Xy XXIX*, *Xy XXV*, *Xy XXIV*, *Xy XVIII*, *Xy VII*, *Xy XXVIII*, *Xy XXVII*, *Xy VI*, *Xy IX*, *Xy XIX*, além de um controle positivo (*Xy 2G*) e um controle negativo contendo a célula apresentando o vetor pCF430 sem inserto. Os transformantes foram plaqueados em meio SM3 com tetraciclina e xilose como fonte de carbono, espalhados nas placas com uma alça esterilizada e, posteriormente, incubados na estufa a 37 °C, juntamente com o controle negativo. Na metodologia de *screening* baseada na sequência, foram montados contigs de clones distintos aos descritos na metodologia baseada na função. Esses clones foram previamente enviados para sequenciamento por Mendes (2016), que resultou em 10 fragmentos de 750 pb de xilose isomerase. Com esses fragmentos sequenciados, foram montados contigs no programa Geneious R6 6.0.6. As sequências consenso foram analisadas no banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando a ferramenta blastx.

Resultados e Discussão

As células HB101 utilizadas na metodologia de *screening* baseada na função apresentaram-se viáveis para transformação. Foi observado crescimento de colônias somente nas placas sem antibiótico (Figura 1), indicando a ausência de vetor nas células. Todas as placas contendo os clones transformados apresentaram um bom

crescimento de colônias em meio SM3 com xilose como única fonte de carbono (Figura 2), evidenciando a expressão de possíveis genes para xilose isomerase. O controle negativo não apresentou crescimento de colônias, como esperado.

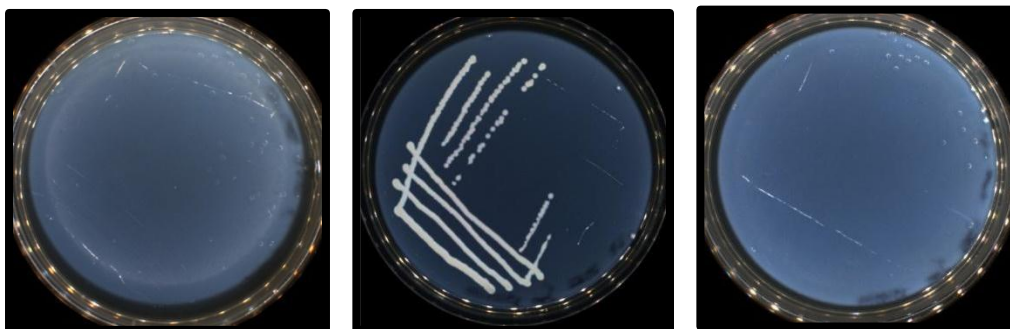


Figura 1. Confirmação da viabilidade da célula HB101 para transformação com possíveis clones positivos de xilose isomerase. Da esquerda para direita: HB101 em meio LB mais tetraciclina; HB101 em meio LB sem antibiótico; HB101 em meio LB mais ampicilina.

Fotos: Gabriel de Souza Colombo

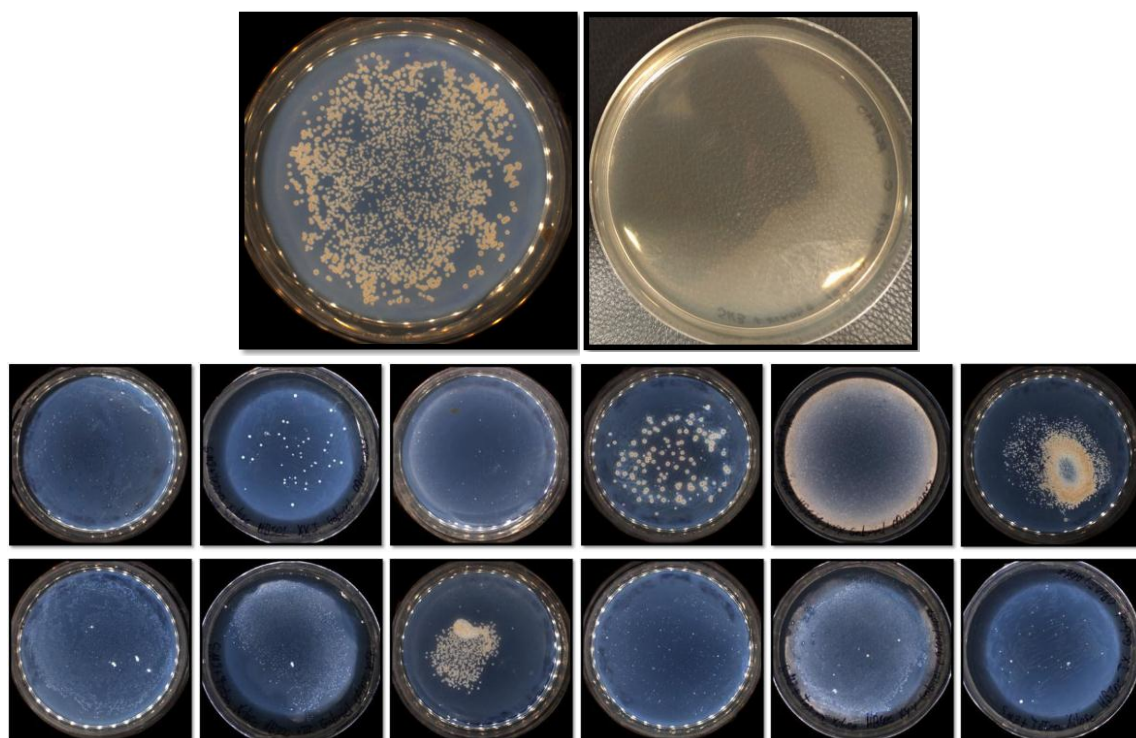


Figura 2. Os 12 clones transformados em meio SM3 com tetraciclina e xilose como única fonte de carbono, juntamente com os controles positivo (*Xy 2G*) e negativo (respectivamente as duas primeiras placas acima das demais). Da esquerda para direita, começando na fileira superior: *Xy XXIX*, *Xy XXI*, *Xy XXVII*, *Xy XIX*, *Xy XXX*, *Xy XXVIII*, *Xy XVII*, *Xy VIII*, *Xy XXIV*, *Xy VI*, *Xy XXV* e *Xy IX*.

Fotos: Gabriel de Souza Colombo

Para confirmação adicional da identidade dos clones, a fim de se obter resultados mais confiáveis, será realizada a digestão dos clones pela enzima *PstI*, após a retirada do vetor das células por minipreparação plasmidial. Assim que os clones

forem digeridos, os insertos serão submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, para comparação do padrão de bandas. Em seguida, os clones que apresentarem maiores chances de possuir um gene que codifica para uma xilose isomerase serão enviados para o sequenciamento por terceiros, para serem posteriormente analisados por meio de ferramentas de bioinformática. Na metodologia de *screening* baseada na sequência, os clones previamente enviados para sequenciamento por Mendes (2016) mostraram-se, em sua maioria, pertencentes a xilose isomerase de organismos distintos. A análise das sequências consenso montadas a partir dos 10 fragmentos de 750 pb obtidos por Mendes (2016) revelou que, das 10 sequências consenso obtidas, 7 são similares à xilose isomerase de diferentes bactérias do rúmen caprino, uma apresentou similaridade a uma bactéria não cultivada e duas sequências não apresentaram semelhança a xilose isomerases presentes no banco de dados nr do GenBank (NCBI).

Conclusão

A fração hemicelulósica da biomassa utilizada para a produção de etanol de segunda geração não é aproveitada para este fim. Leveduras que apresentassem a capacidade de realizar a fermentação alcoólica da xilose presente na hemicelulose se mostrariam como um avanço na produção de bioetanol. Os possíveis genes codificantes para xilose isomerase apresentados neste trabalho podem potencialmente permitir um eficiente consumo da xilose por parte de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, se esta for modificada por meio de engenharia genética. Os possíveis clones positivos obtidos pela metodologia de *screening* baseada na função irão ser posteriormente transformados em *S. cerevisiae* para avaliar a taxa de crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono, após a análise do sequenciamento dos clones. Análises adicionais dos contigs obtidos pela metodologia de *screening* baseada na sequência serão realizadas para a garantia de maior confiabilidade nos resultados obtidos. Em um trabalho consecutivo, serão apresentados os resultados observados após a avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* em meio com xilose e as análises adicionais das sequências consenso obtidas.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Betania Ferraz Quirino, juntamente às minhas amigas e professoras não oficiais, Ísis Viana Mendes e Betulia de Moraes Souto, por toda a ajuda e apoio que me deram, além dos bons momentos. Agradeço também à Embrapa Agroenergia, pelo acolhimento e pela oportunidade de poder ter a minha primeira experiência de trabalho nessa grande empresa.

Referências

- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2304-2311, 2009.
- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7-8, p. 471-499, 2005.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.

KUYPER, M. HARHANGI H. R.; STAVE A. K.; WINKLER A. A.; JETTEN M. S.; DE LAAT W. T.; DEN RIDDER J. J.; OP DEN CAMP H. J.; VAN DIJKEN J. P.; PRONK J.T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 1, p. 69-78, 2003.

MENDES, Í. V. **Identificação de novos genes de xilose isomerase em biblioteca metagenômica de rúmen de caprino**. 2016. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

SARKAR, N.; SUMANTA K. G.; SATARUPA B.; KAUSTAV A. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.