

Construção de novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de utilizar xilose para a produção de bioetanol

Victor M. Honorato¹, Bárbara Gomes Paes², João Ricardo Moreira de Almeida³

Resumo

A utilização de microrganismos para o aproveitamento de biomassa lignocelulósica e produção de bioetanol vem atraindo grande interesse para pesquisas na área de biotecnologia. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser tratada como um dos grandes protagonistas nesse contexto, seja pelo grande conhecimento acerca de suas características ou pelas inúmeras possibilidades de seu uso em estudos envolvendo engenharia genética. Sabe-se que essa levedura é incapaz de utilizar xilose para a produção de bioetanol. Sendo essa pentose o segundo açúcar mais presente na biomassa lignocelulósica, a obtenção de leveduras capazes de utilizá-la representaria um grande avanço para a produção de uma energia mais barata e sustentável. O consumo de xilose em *S. cerevisiae* pode ser obtido pela expressão de uma xilose isomerase, enzima que converte xilose a xilulose, a qual pode ser metabolizada pela levedura. Neste trabalho, uma linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* melhorada para o consumo de xilose foi transformada com plasmídeos episomais contendo sete novos genes codificadores para xilose isomerase. Transformantes selecionados foram avaliados pela capacidade de crescer em meio mínimo contendo xilose como única fonte de carbono. As novas xilose isomerases possibilitaram o crescimento das linhagens obtidas, porém a taxas menores que as obtidas com a linhagem controle contendo a XI de *Piromyces* sp. Esse crescimento está associado tanto com a atividade da xilose isomerase como com possíveis mutações além do plasmídeo obtido no processo de evolução adaptativa da levedura. Novos estudos envolvendo essas leveduras transformadas podem revelar o perfil de seu crescimento, bem como a produção de metabólitos nesse processo.

¹ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, victor.honorato@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutoranda em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, barbara.paes@colaborador.embrapa.br

³ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

Introdução

O avanço industrial e tecnológico sempre esteve diretamente ligado com altas demandas de produção de energia. Dentro desse contexto, os combustíveis fósseis sempre se apresentaram como grandes protagonistas. Entretanto, alguns fatores como a finitude desses recursos, além dos grandes impactos ambientais causados por sua utilização, vêm chamando a atenção para energias alternativas. Sendo assim, a utilização de recursos presentes na biomassa apresenta grande destaque, seja por sua ampla disponibilidade ou por seus benefícios econômico-ambientais. Mais especificamente podemos tratar da biomassa lignocelulósica como uma fonte alternativa. Dentro desse tipo de matéria-prima são encontrados resíduos agrícolas (bagaço de cana-de-açúcar, cascas e gramíneas), geralmente descartados, que podem ser utilizados para a produção de bioetanol (MATSUSHIKA et al., 2009). Entre os compostos mais abundantes na biomassa lignocelulósica, a glicose e a xilose ocupam, respectivamente, o primeiro e o segundo lugares (PAES; ALMEIDA, 2014). O bioetanol atualmente produzido em biorrefinarias é resultado dos processos de conversão de hexoses por meio de processos metabólicos realizados por diferentes microrganismos (PAES; ALMEIDA, 2014). Existe uma diversa gama de agentes responsáveis por esses bioprocessos, como, por exemplo, bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Um dos organismos que apresenta maior efetividade na produção de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Por ser amplamente utilizado como modelo científico, esse é um organismo extremamente bem conhecido, tendo suas vias metabólicas e métodos de bioengenharia bem descritos. No entanto, ainda existem alguns desafios relacionados à *S. cerevisiae* e sua capacidade de produzir etanol, como, por exemplo, a utilização de xilose no metabolismo. Existem duas vias principais de catabolismo da xilose, a via xilose redutase – xilitol desidrogenase (XR-XDH), utilizada majoritariamente por fungos, e a via da Xilose Isomerase (XI), utilizada principalmente por bactérias (Figura 1). A via XR-XDH é caracterizada por ocasionar um desbalanço durante o processo de excreção do xilitol (MATSUSHIKA et al. 2009). A fim de tentar evitar essa dificuldade, uma alternativa interessante é a bioengenharia de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de expressar genes codificadores para xilose isomerase.

Neste trabalho, uma linhagem curada de *Saccharomyces cerevisiae* foi transformada utilizando novos genes codificadores para XI. Dessa maneira, analisaremos a eficiência da utilização da xilose pela via da isomerização.

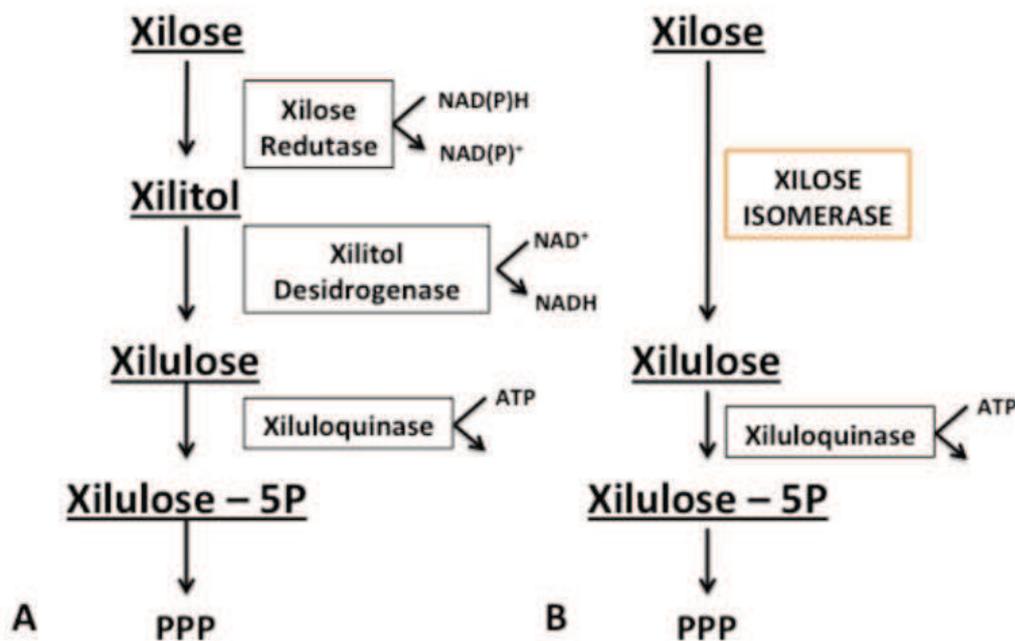


Figura 1. Vias metabólicas da xilose em fungos e bactérias. A: via XR-XDH; B: via da Xilose Isomerase.

Fonte: Paes (2015).

Materiais e métodos

Linhagem de levedura

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada, que chamaremos de Levedura Curada 7 (LC7), é o resultado da cura da levedura CEN.PK 113.3C $\Delta trp1-289::p424-GPDXI$, $\Delta ura-52::p426-TEFXK$ (Levedura 7- XIXK (L7XIXK) construída previamente em um trabalho de mestrado realizado na Embrapa Agroenergia (PAES, 2015). A cura consistiu na retirada dos plasmídeos p424-GPDXI e p426-TEFXK do citoplasma da levedura. A linhagem L7XIXK demonstrava melhores taxa de crescimento, menor fase lag e maior produtividade de etanol.

Escolha dos genes

Dez novos genes possivelmente codificadores para xilose isomerase foram prospectados em bancos de dados, a partir de semelhança com os genes: XI *Piromyces*, descrito por Kuyper et al. (2003), XI *Burkholderia*, XI *Prevotella ruminicola*. Os genes foram sintetizados por empresa terceirizada e clonados no mesmo plasmídeo p424 utilizado anteriormente.

Transformação de leveduras

A linhagem LC7 foi transformada com os diferentes genes sintetizados. Como parâmetros comparativos, foram criadas as linhagens LC7XIPiro, da linhagem curada transformada com plasmídeo contendo XIPiromyces e LC7Ø da mesma linhagem transformada com o plasmídeo vazio. A transformação foi realizada por choque térmico seguindo o protocolo descrito por Gietz e Schiestl (2007). Porém, algumas mudanças foram feitas no protocolo. Durante o preparo de células competentes esperou-se que a OD600 duplicasse três vezes. Foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial nas transformações. Os transformantes foram selecionados em meio YNB suplementado com glicose (20 g/L) e URA (100 mg/L).

Identificação de transformantes

Após a transformação, três colônias de cada gene foram replicadas e crescidas em meio YNB Glicose em shaker com rotação de 200 rpm e 30 °C. Em um primeiro teste, as células crescidas em meio de glicose foram transferidas para tubos falcon contendo 10 mL de meio mínimo YNB xilose. Posteriormente, foram selecionados os transformantes que apresentaram crescimento em meio mínimo com xilose, os quais tiveram colônias isoladas e validadas por PCR para os genes de interesse.

Caracterização dos transformantes

Os transformantes obtidos que demonstraram crescimento em meio mínimo com xilose foram isolados e caracterizados por meio de fermentação aeróbica em erlenmeyer contendo 50 mL de meio mínimo suplementado com xilose e análise dos metabólitos gerados por HPLC.

Resultados e discussão

Foram gerados transformantes para os controles e para sete dos genes codificantes para XI escolhidos. Após o isolamento de transformantes em meio mínimo, a inserção dos plasmídeos contendo os genes de interesse foi confirmada por PCR.

O primeiro teste de crescimento revelou que todas as linhagens foram capazes de crescer em meio mínimo utilizando xilose como única fonte de carbono. O segundo teste, no qual foi feita a fermentação das leveduras em 50 mL

de meio, revelou um crescimento significativo da linhagem controle, transformada com XI-*Piromyces* (C+), com sua OD₆₀₀ variando em 0,374 em 69 horas (Figura 2).

As amostras contendo os genes prospectados, quando comparadas à atividade da linhagem LC7XIPIRO, não apresentaram um crescimento superior ao controle positivo (Figura 2). De qualquer forma, as linhagens MUCI, FLAVO e MEJOT apresentaram melhor crescimento que os controles negativos, que apresentaram um crescimento não significativo, podendo ser fruto apenas de variações no processo de pipetagem ou do espectrofotômetro utilizado para a leitura (Figura 2). A análise completa do perfil de crescimento, feita em triplicata e produção de metabólitos dos transformantes comparado aos controles em alta densidade celular, se faz necessário para melhor avaliação das linhagens construídas.

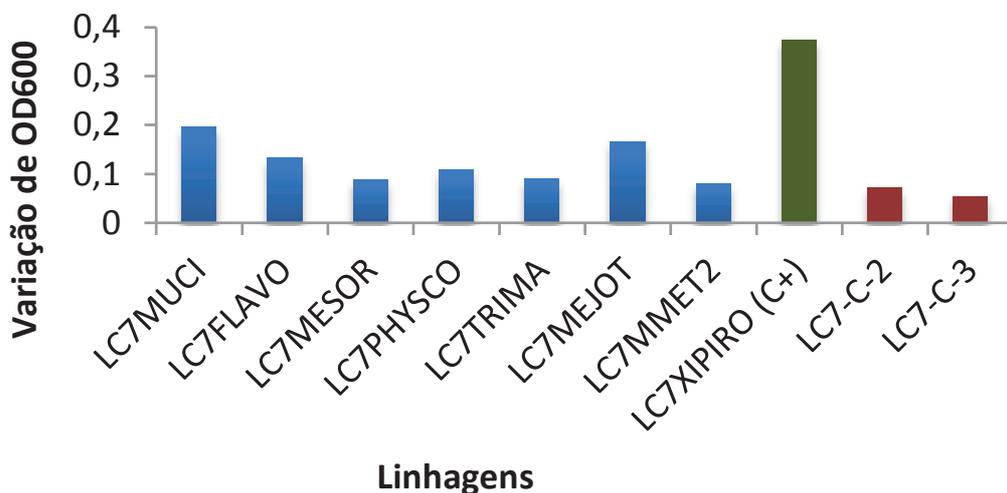


Figura 2. Teste de crescimento em meio mínimo com xilose como única fonte de carbono. As barras representam a variação de crescimento no intervalo de 69 horas. A OD₆₀₀ inicial das amostras foi de 0,5. As cores verde (controle positivo), vermelho (controles negativo) e azul (diferentes genes avaliados) representam as diferentes linhagens.

Conclusões

Neste trabalho, foram construídas linhagens capazes de utilizar uma pentose muito comum na biomassa lignocelulósica, a xilose. Essas linhagens de *S. cerevisiae* foram transformadas com genes codificadores para xilose isomerase, na tentativa de identificar novos genes-alvo, para possível utilização na

construção de linhagens adaptadas ao uso de xilose a partir de biomassa lignocelulósica. Três possíveis candidatos foram identificados.

Apoio financeiro

O projeto foi financiado pela Embrapa e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 1, p. 38-41, 2007.

KUYPER, M.; HARHANGI, H. R.; STAVE, A. K.; WINKLER, A. A.; JETTEN, M. S. M.; DE LAAT, W. T. A. M.; DEN RIDDER, J. J. J.; OP DEN CAMP, H. J. M.; 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**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 69–78, 2003.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 84, n. 1, p. 37–53, 2009.

PAES, B. G. Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. M. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 21, 2014 .