

Análise filogenética e expressão heteróloga de uma xilose isomerase bacteriana em *Saccharomyces cerevisiae*

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

Resumo

A crise climática atual pressiona a substituição das fontes de energia de origem fóssil por alternativas sustentáveis. Nesse cenário, o bioetanol de segunda geração, produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir da fermentação de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica de restos agrícolas, representa uma alternativa para a gasolina. Porém, uma fração desta biomassa é composta por pentoses, como a xilose, incapazes de serem metabolizadas pela *S. cerevisiae*. A inserção de uma via metabólica para conversão direta da xilose em xilulose, um intermediário da via das pentose-fosfato quando fosforilada, por meio da enzima xilose isomerase, permite o consumo deste açúcar por *S. cerevisiae*, possibilitando um melhor aproveitamento da lignocelulose para produção de bioetanol. Contudo, poucas xilose isomerases foram satisfatoriamente expressas em *S. cerevisiae*. Neste trabalho, uma nova xilose isomerase, nomeada Xy1, identificada em uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras, permitiu o consumo de xilose por uma cepa de *S. cerevisiae*, denominada LXB. No entanto, houve alta variação no crescimento médio desta cepa. Uma árvore filogenética inferida com sequências codificadoras para xilose isomerases de fungos e bactérias evidenciou a origem bacteriana da Xy1, devido a maior proximidade evolutiva a xilose isomerases de bactérias do filo Firmicutes. A variação no crescimento da LXB pode estar relacionada a problemas pós-traducionais da enzima bacteriana quando expressa em *S. cerevisiae*. Portanto, estudos adicionais da Xy1 são necessários para elucidar e corrigir os fatores que impedem o uso desta enzima para a produção de bioetanol de segunda geração.

Palavras-chave: xilose isomerase, *Saccharomyces cerevisiae*, bioetanol, Firmicutes.

Introdução

A crescente crise climática atual, derivada dos constantes impactos ambientais antropogênicos, como a queima de combustíveis fósseis, um dos principais fatores que impulsionam o aquecimento global, têm representado uma ameaça real para o futuro da humanidade (Easterling et al., 2000; Coumou; Rahmstorf, 2012; Al-Ghussain, 2019). Logo, a necessidade para o uso de alternativas sustentáveis nos diversos setores industriais tem se tornado cada vez mais evidente. Nesse contexto, o uso de biocombustíveis como

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

² Bióloga, mestre em Ciências Biológicas, colaboradora da Embrapa Agroenergia, isis.mendes@colaborador.embrapa.br

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

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

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

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

substituto aos combustíveis fósseis representa uma solução promissora para suprir a demanda global de energia, especialmente para o transporte (Alalwan; Alminshid; Aljaafari, 2019). Entre estes, o bioetanol de segunda geração, produzido a partir da fermentação de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica de restos agrícolas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, destaca-se por ser a principal alternativa sustentável para a gasolina, especialmente por evitar conflitos de uso com biomassa derivada de plantações para consumo, como acontece com o bioetanol de primeira geração (Rulli et al., 2016; Alalwan; Alminshid; Aljaafari, 2019).

No entanto, uma vez que a levedura *S. cerevisiae* é incapaz de metabolizar pentoses, como a xilose, presente em relativa abundância na fração hemicelulósica da biomassa lignocelulósica (Isikgor; Becer, 2015), esta fração não é aproveitada adequadamente para a produção de bioetanol. Desde então, esforços de engenharia metabólica têm sido realizados para a criação de cepas de *S. cerevisiae* capazes de converter xilose em xilulose, implementando uma via de oxirredução, utilizando as enzimas xilose redutase (XR) seguida da xilose desidrogenase (XDH), ou uma via direta utilizando a enzima xilose isomerase (XI). A xilulose é, em seguida, convertida no intermediário da via das pentose-fosfato: xilulose-5-fosfato, pela xiluloquinase, uma enzima já presente em *S. cerevisiae* (Jeffries, 2006; Cunha et al., 2019; Zhao et al., 2020). Porém, devido a problemas de eficiência relacionados a um desequilíbrio redox causado pela preferência distinta de cofatores pelas enzimas da via oxirredutiva, tem-se optado a implementação da via direta utilizando xilose isomerase. Entretanto, poucas xilose isomerases foram expressas com sucesso em *S. cerevisiae* (Walfridsson, 1996; 2002; Kuyper et al., 2005; Brat; Boles; Wiedmann, 2009; Madhavan et al., 2009; Hector et al., 2013).

Por meio de um *screening* funcional de uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras, Mendes (2016) identificou um gene codificante para xilose isomerase de origem bacteriana, o qual denominou de *Xy1* e, posteriormente, teve os códons otimizados para expressão em *S. cerevisiae*, sendo renomeado para *XyBet*. No presente trabalho, os resultados da reavaliação da filogenia do gene *Xy1* e a expressão funcional do gene *XyBet* em *S. cerevisiae*, por meio do cultivo em meio com xilose como única fonte de carbono, são apresentados.

Material e Métodos

Análise filogenética do gene *Xy1/XyBet*

A sequência de aminoácidos deduzida do gene *Xy1* foi comparada com sequências presentes no banco de dados RefSeq (Oleary et al., 2015) do NCBI usando a ferramenta blastp (Madden; Tatusov; Zhang, 1996), para identificar sequências similares codificantes para xilose isomerases de outros organismos. No mesmo banco de dados, para fins de comparação, foram também coletadas sequências pertencentes a organismos dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria e do reino Fungi, assim como sequências de xilose isomerases com atividade funcional confirmada em *S. cerevisiae*. Com essas sequências, uma árvore filogenética foi inferida no programa MEGAX (Kumar et al., 2018) utilizando o método de probabilidade máxima (*Maximum likelihood*) e o modelo baseado em matriz JTT (Jones; Taylor; Thornton, 1992), após alinhamento das sequências pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004).

Transformação da cepa LC-7 de *Saccharomyces cerevisiae*

Para a expressão heteróloga do gene *XyBet* em *S. cerevisiae*, foi utilizada a cepa LC-7, desenvolvida por engenharia evolutiva em um trabalho de mestrado realizado na Embrapa Agroenergia (Paes, 2015). O gene *XyBet* foi inserido no vetor plasmidial não integrativo p424GPD (Mumberg; Müller; Funk, 1995). No mesmo vetor, o gene *xylA* de *Piromyces* sp. foi usado como controle positivo. O vetor vazio foi usado como controle negativo. A transformação da levedura foi conduzida segundo o protocolo de Gietz e Schiestl (2007) com LiAc/ssDNA/PEG e os transformantes foram cultivados em meio sólido YNB (1,7 g/L YNB Sigma®, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 15 g/L agar) suplementado com 30 g/L de glicose e 100 mg/L de uracila para recuperação das células. As placas foram incubadas por 48 horas a 30° C. A capacidade de crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono foi confirmada pelo cultivo em meio YNB suplementado com 40 g/L de xilose, 100 mg/L de uracila e 15 g/L ágar a 30° C. As cepas transformadas foram renomeadas para LXB (LC-7 + p424GPD-*XyBet*), LXP (LC-7 + p424GPD-*xylA* de *Piromyces* sp.) e LP4G (LC-7 + p424GPD).

Expressão funcional do gene *XyBet* em *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliação quantitativa do crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono, as cepas LC-7 de *S. cerevisiae* transformadas foram inicialmente cultivadas em meio sólido YNB suplementado com 20 g/L de glicose, 100 mg/mL uracil e 15 g/L de ágar. As placas foram incubadas por 3 dias a 30° C. Três colônias de cada cepa foram selecionadas e inoculadas separadamente em tubos de ensaio estéreis de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido YNB 2X suplementado com 20 g/L de glicose e xilose e 100 mg/L de uracila. Os tubos foram incubados a 30° C e 200 rpm por aproximadamente 3 dias. As células foram lavadas com água destilada estéril e inoculadas a OD₆₀₀ = 0,5 inicial em 40 mL de meio YNB suplementado com 40 g/L de xilose, 100 mg/L de uracila e tampão ftalato de potássio pH 5,5 em frascos erlenmeyers de 250 mL, incubados a 30° C e sob 200 rpm de agitação. Foram retiradas amostras de cada ponto da curva de crescimento para quantificação do crescimento por absorbância em OD₆₀₀.

Resultados e Discussão

Foram coletadas, ao todo, 57 sequências de aminoácidos referentes a xilose isomerases bacterianas e fúngicas para montagem da árvore filogenética comparativa. Evidenciando sua origem bacteriana, o gene *Xy1* localizou-se inserido, como um grupo irmão, em um clado composto por xilose isomerases de organismos do filo Firmicutes (Figura 1), o qual é representado por bactérias gram-positivas de solo capazes de utilizar diferentes fontes de carbono, como pentoses, hexoses e polissacarídeos complexos, como xilana (Gu et al., 2010; Sharmin et al., 2010; Zhao et al., 2020). É interessante notar que a primeira xilose isomerase de um membro do filo Firmicutes, *Lachnoclostridium phytofermentans* (Brat; Boles; Wiedmann, 2009), encontra-se como grupo externo ao clado formado, majoritariamente, por membros do filo Bacteroidetes, no qual também estão incluídas as xilose isomerases de *Piromyces* sp., *Orpinomyces* sp. e *Prevotella ruminicola*, todas com atividade funcional em *S. cerevisiae* (Kuyper et al.,

2005; Madhavan et al., 2009; Hector et al., 2013). Possivelmente, a atividade funcional da primeira em *S. cerevisiae* deriva de sua proximidade evolutiva com as últimas, ou vice-versa.

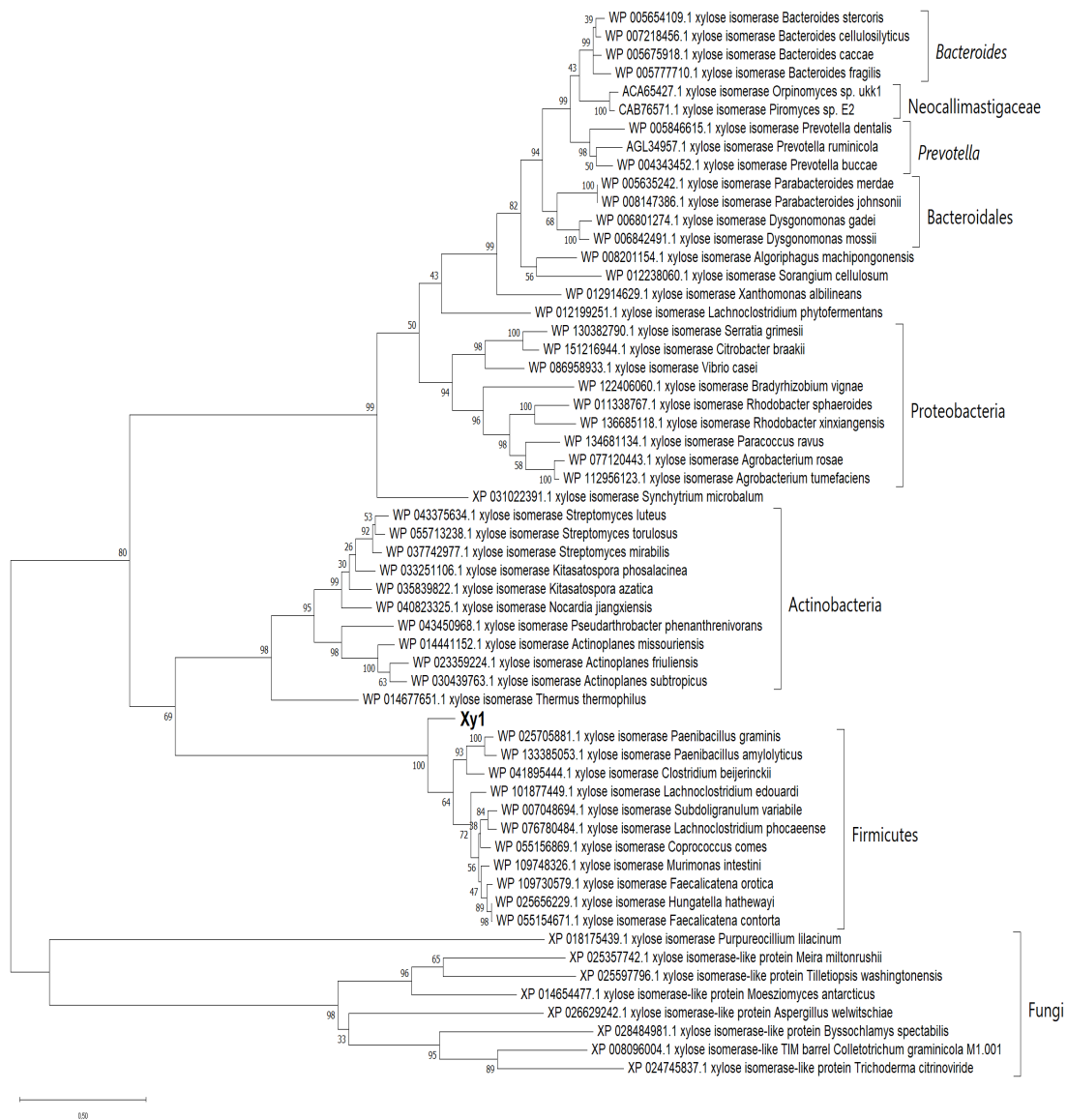


Figura 1. Árvore filogenética construída com 57 xilose isomerases bacterianas e fúngicas. Também foram incluídas xiloses isomerase com atividade funcional confirmada em *Saccharomyces cerevisiae* (Walfridsson, 1996; Kuyper et al., 2005; Brat; Boles; Wiedmann, 2009; Madhavan et al., 2009; Hector et al., 2013). A posição do gene Xy1 encontra-se destacada em negrito. A porcentagem de árvores em que os táxons associados se agruparam encontra-se próxima aos ramos. Foi utilizada o método de Probabilidade Máxima (Maximum Likelihood) (Jones; Taylor; Thornton, 1992) para inferência da árvore filogenética no programa MEGAX (Kumar et al., 2018)

Após confirmação da transformação da LC-7, a capacidade de crescimento das cepas LXB e LXP em meio sólido com xilose como única fonte de carbono foi confirmada após cerca de 14 dias, com um maior crescimento para a LXP em relação a LXB. Não foi

observado crescimento pela LP4G, como esperado para estas condições. A avaliação quantitativa do crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono apresentou resultados similares, visto que tanto a LXP quanto a LXB apresentaram crescimento, novamente com a primeira apresentando um crescimento mais rápido em comparação à última. Porém, pode-se observar tanto uma maior variabilidade de crescimento entre as réplicas de cada cepa. O controle-positivo LXP apresentou um crescimento mais homogêneo, com baixa variação das réplicas em relação ao crescimento médio ($s_{312h} = 0,268$), enquanto a LXB, no decorrer do experimento, apresentou uma variação crescente ($s_{312h} = 2,253$), devido ao baixo crescimento de uma das réplicas em comparação as outras (Figura 2A). Em um segundo experimento subsequente, sob as mesmas condições, foi observado um crescimento similar para ambas as cepas, porém, desta vez, duas réplicas da LXB apresentaram baixo crescimento, o que resultou em uma redução considerável da média de crescimento, assim como um alto desvio-padrão ao final do período de cultivo ($s_{312h} = 3,069$) (Figura 2B).

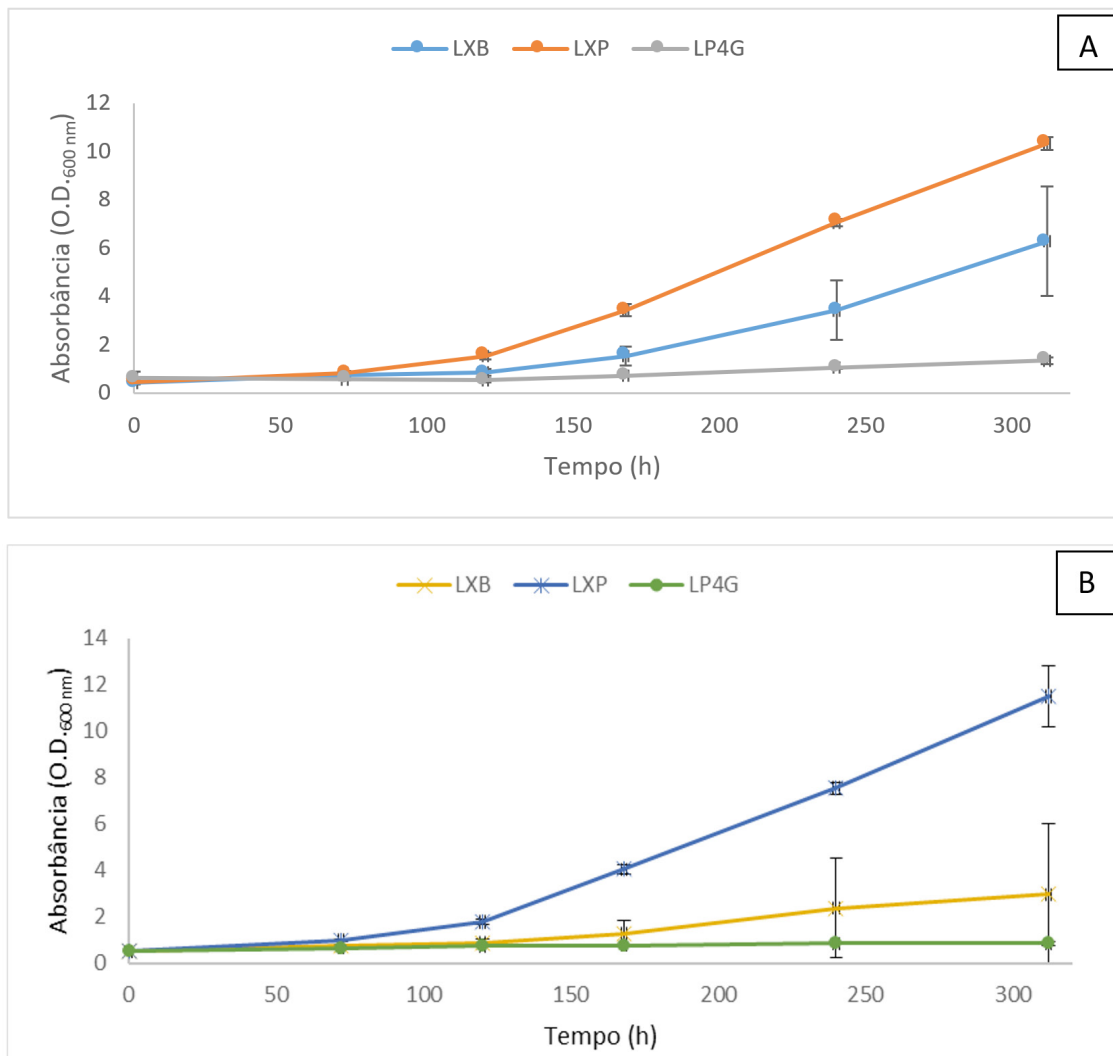


Figura 2. Curvas de crescimento do cultivo em triplicata das cepas LXB, LXP e LP4G em meio suplementado com 40 g/L de xilose, 100 mg/mL de uracila e tampão ftalato de potássio pH 5,5 1X, por um período de 312 horas. A: Primeiro experimento. B: Segundo experimento. Barras de erro indicam desvio-padrão de crescimento médio para cada ponto amostral.

Visto que ambas as cepas-controle (LXP e LP4G) apresentaram o resultado esperado (crescimento do controle positivo LXP e ausência de crescimento do controle negativo LP4G) nos dois experimentos realizados, o que reduz suspeitas de erros experimentais, pressupõe-se que a variabilidade no crescimento médio da LXB deriva de uma instabilidade inerente à xilose isomerase codificada pelo gene *XyBet*, uma vez que o principal fator que diferencia cada cepa é o gene que possuem. Nesse caso, a falta de um crescimento satisfatório de algumas das réplicas da LXB seria um indicativo de problemas pós-traducionais na enzima codificada pelo gene *XyBet* em *S. cerevisiae*, porém insuficientes para impedir o crescimento da cepa em meio com xilose como única fonte de carbono, uma vez que atividade funcional foi observada.

Em um dos primeiros trabalhos sobre esse tema, Sarthy et al. (1987) buscou expressar a xilose isomerase de *Escherichia coli* em *S. cerevisiae*, utilizando cepas e vetores diferentes, porém nenhum transformante foi capaz de crescer em meio com xilose como única fonte de carbono. Análises subsequentes indicaram que os transformantes produziam a enzima, porém a maior parte estaria em uma forma particulada e, portanto, inativa. Outras hipóteses foram levantadas pelos autores para explicar a inatividade da enzima expressa por *S. cerevisiae*, porém a mais provável é o dobramento incorreto da enzima, considerando o trabalho de outros autores que também buscaram a expressão heteróloga de enzimas bacterianas em *S. cerevisiae* (Gárdonyi et al., 2003; Xia et al., 2016a).

Sabe-se que o complexo de chaperonas composto pela proteína GroEL e o cofator GroES, presente em bactérias, mitocôndrias e cloroplastos, é responsável por garantir o correto dobramento proteico nesses sistemas biológicos (Xia et al., 2016b). A ausência deste complexo em eucariotos poderia ser a causa para a inatividade de enzimas bacterianas expressas em *S. cerevisiae* e outros eucariotos. O trabalho de Xia et al. (2016a) corroborou com esta hipótese, demonstrando que a co-expressão do sistema GroEL-GroES da cepa BL21 de *Escherichia coli* em *S. cerevisiae*, junto a uma xilose isomerase da mesma cepa de *E. coli*, permitiu a expressão funcional da enzima pela levedura. Devido a origem bacteriana do gene *Xy1/XyBet*, possivelmente a mesma hipótese explique a falta de um crescimento médio satisfatório da LXB nos experimentos realizados.

Conclusão

Neste trabalho, a expressão funcional de uma nova xilose isomerase bacteriana em *S. cerevisiae* foi apresentada. Ainda que uma alta variação tenha sido observada para o crescimento médio da LXB em meio com xilose como única fonte de carbono, os resultados indicam que a xilose isomerase codificada pelo gene *Xy1/XyBet* possibilita o consumo de xilose pela levedura. Estudos adicionais sobre as características bioquímicas desta enzima são necessários para elucidar os fatores responsáveis pela alta variação observada e obter uma atividade funcional satisfatória para produção de bioetanol de segunda geração. Possivelmente, modificações adicionais na cepa de *S. cerevisiae* também sejam necessárias para atingir este objetivo.

Referências

ALALWAN, H. A.; ALMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, [S. l.], v. 28, p. 127–139, 2019.

- AL-GHUSSAIN, L. Global warming: review on driving forces and mitigation. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 13–21, 2019.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 75, n. 8, p. 2304–2311, 2009.
- COUMOU, D.; RAHMSTORF, S. A decade of weather extremes. **Nature Climate Change**, [S. l.], v. 2, n. 7, p. 491–496, 2012.
- CUNHA, J. T. et al. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 12, n. 1, 2019.
- EASTERLING, D. R. Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. **Science**, [S. l.], v. 289, n. 5487, p. 2068–2074, 2000.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 31–34, jan. 2007.
- GU, Y. et al. Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in Firmicutes. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 255, 2010.
- HECTOR, R. E. et al. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2013.
- SIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 25, p. 4497–4559, 2015.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 320–326, 2006.
- JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 275–282, 1992.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- KUYPER, M. et al. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 5, n. 4–5, p. 399–409, 2005.
- MADDEN, T. L.; TATUSOV, R. L.; ZHANG, J. Applications of network BLAST server. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 266, p. 131–137, 1996.
- MADHAVAN, A. et al. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: Gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 82, n. 6, p. 1067–1078, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1794-6>. Acesso em: 16 set. 2020.
- 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, 2016.
- MUMBERG, Dominik; MÜLLER, Rolf; FUNK, Martin. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, [S. l.], v. 156, n. 1, p. 119–122, abr. 1995.
- O'LEARY, Nuala A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 733–745, 8 nov. 2015.
- PAES, Bárbara Gomes. **Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico**. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- RULLI, M. C. et al. The water-land-food nexus of first-generation biofuels. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.
- SARTHY, A. V. et al. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 9, p. 1996–2000, 1987.
- WALFRIDSSON, M. et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* *xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 12, 1996.
- XIA, P. F. et al. GroE chaperonins assisted functional expression of bacterial enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 113, n. 10, p. 2149–2155, 2016a.
- XIA, P. F.; TURNER, T. L.; JAYAKODY, L. N. The Role of GroE Chaperonins in Developing Biocatalysts for Biofuel and Chemical Production. **Enzyme Engineering**, [S. l.], v. 05, n. 03, 2016b.
- ZHAO, Z. et al. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 21, 2020.