



PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PROGRAMA PIBIC

ENGENHARIA GENÉTICA RACIONAL DE *Saccharomyces cerevisiae* VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA-GERAÇÃO

Pesquisador Responsável: Dr. Leandro Vieira dos Santos

Instituição sede: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE/
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM

RESUMO

Um polo de biorrefino busca integrar a produção de uma grande quantidade de matéria-prima renovável e de baixo custo com tecnologias de extração e conversão dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica para a produção de etanol e outros produtos bioquímicos. O etanol de segunda-geração (2G) é uma promissora alternativa de utilização desses açúcares, gerados a partir de fontes renováveis de energia. Para esse fim, o desenvolvimento de linhagens microbianas eficientes capazes de converter o açúcar de cinco carbonos xilose em etanol é fundamental para a viabilização da tecnologia de etanol 2G. Previamente, nosso grupo desenvolveu uma levedura industrial com alta capacidade de fermentar xilose, sendo a primeira levedura desenvolvida no país que teve sua liberação comercial aprovada e hoje é utilizada na indústria 2G brasileira. O sequenciamento genômico de linhagens isoladas de experimentos de evolução adaptativa independentes identificou mutações pontuais que levaram a inativação dos genes *ISU1* e *SSK2*, e que conferem as linhagens a capacidade de consumir xilose. *ISU1* codifica uma proteína mitocondrial envolvida na montagem de clusters de Fe-S, e *SSK2* é um componente da via de osmorregulação MAPKKK. A inserção dessas mutações em *Saccharomyces cerevisiae* viabiliza a fermentação de xilose, sem a necessidade do procedimento de evolução. O objetivo desse projeto é a exploração de parceiros de interação metabólica dos genes *ISU1* e *SSK2*, visando reforçar a compreensão da base genética e da interação da complexa rede metabólica envolvida na fermentação de xilose em *S. cerevisiae*. As informações obtidas podem ser utilizadas na engenharia racional e desenvolvimento de linhagens com maior capacidade de fermentação de xilose, apropriadas para serem utilizadas na produção de etanol 2G.

1. Revisão de literatura

Visando mitigar o aquecimento global, é imprescindível o desenvolvimento de tecnologias que empreguem alternativas renováveis de energia. Além de barreiras econômicas e tecnológicas para o contínuo uso do petróleo, como o alto custo para a extração de novas reservas (e.g. pré-sal), a principal motivação para o uso de fontes alternativas são os prejuízos causados ao meio ambiente pela emissão de gases causadores do efeito estufa (GHG), principalmente o CO₂. Os níveis de CO₂ na atmosfera ultrapassaram a alarmante marca de 400 ppm em 2016 (Fig. 1) (Gustavsson et al., 2017; Abas et al. 2015). Conferências envolvendo os principais líderes mundiais tem motivado a elaboração de políticas de descarbonização, visando a reestruturação da matriz energética dos países signatários até o final do século para a redução da emissão de gases causadores do efeito estufa (Paris agreement, 2015).

O biocombustível mais utilizado no mundo é o etanol. No Brasil, ele é produzido principalmente através da fermentação de açúcares extraídos do caldo da cana-de-açúcar, o chamado etanol de primeira-geração (1G). Estados Unidos e Brasil são os dois principais produtores mundiais de etanol, responsáveis, respectivamente, por 56 e 26,85 bilhões de litros de etanol produzidos em 2015. Esse valor corresponde a 85,27% da produção mundial (RFA, 2016).

O etanol de segunda-geração é produzido a partir dos polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal, sendo uma interessante destinação de resíduos lignocelulósicos gerados pela agroindústria, além do uso de culturas dedicadas ao processo, como é o caso da cana-energia. O material lignocelulósico, principal componente da biomassa, é constituído por cadeias de celulose, hemicelulose e lignina, em concentrações que variam entre espécies vegetais (Rudolf, 2009). O principal desafio da segunda-geração é o acesso e disponibilização dos açúcares presentes nas cadeias celulósicas e hemicelulósicas, de maneira economicamente viável, para posterior etapa de fermentação e produção do etanol 2G. A despolimerização do material lignocelulósico e liberação dos açúcares é realizada pelas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. O pré-tratamento da biomassa resulta no aumento da acessibilidade aos polissacarídeos constituintes da parede celular vegetal a ação das enzimas hidrolíticas, etapa posterior no processo. No pré-tatamento, diferentes tecnologias podem ser utilizadas, submetendo a biomassa a tratamento químicos, físicos, biológicos ou com uma combinação desses, removendo e alterando estruturas

e separando a lignina e a hemicelulose da celulose (Maurya et al., 2015). Na hidrólise enzimática, um coquetel de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas é utilizada para clivar as longas cadeias desses polissacarídeos, liberando os açúcares monoméricos que podem ser fermentados pelo micro-organismo.

Os açúcares constituintes das frações celulósicas e hemicelulósicas são formados por cadeias de cinco e seis carbonos. Linhagens selvagens de *S. cerevisiae* são incapazes de metabolizar as pentoses xilose e arabinose, provenientes da hidrólise da hemicelulose. Tendo em vista a significativa parcela da hemicelulose na constituição da biomassa lignocelulósica (25-30%), é imprescindível o desenvolvimento de uma cepa capaz de metabolizar ambos os grupos de açúcares (Hahn-Hägerdal et al., 2007). Além disso, durante o processo de produção de etanol, parte dos açúcares monoméricos e a lignina, liberados durante a desconstrução da biomassa, acaba sendo convertido em compostos inibitórios do processo fermentativo, resultando em três principais grupos de inibidores: (i) Furanos (e.g. furfural e HMF); (ii) Ácidos fracos (e.g. ácido acético, fórmico e levulínico, principalmente); (iii) Compostos fenólicos (e.g. vanilina, ácidos p-cumárico, ferúlico, siríngico, vanílico e gálico, siringaldeído, entre outros) (Almeida et al., 2007; Ling et al., 2014). Assim sendo, além de um eficiente consumo de xilose, a linhagem tem que ser tolerante a diversos compostos tóxicos presentes no meio de fermentação a fim de produzir etanol de segunda-geração (Santos et al., 2016a).

Existem duas vias mais estudadas para a construção de linhagens modificadas de *S. cerevisiae* para fermentação de xilose: a via de dois passos utilizando as enzimas Xilose Redutase – Xilitol Desidrogenase (XR-XDH) e a via Xilose Isomerase (XI). A interconversão xilose a xilulose utilizando a enzima xilose isomerase (XI) é uma abordagem mais interessante, ocorrendo em um único passo, evitando o desbalanço redox gerado pela via XR-XDH e a formação de subprodutos que diminuem o rendimento de etanol. No interior da célula, pela ação da xiluloquinase (*XKSI*), a xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato, a qual pode ser direcionada à via das pentoses-fosfato (PPP). Xilulose-5-fosfato é metabolizada a gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato, componentes da via glicolítica (Embden-Myerhof-Parnas). Esses são convertidos em piruvato, o qual é descarboxilado a acetaldeído e reduzido a etanol.

Nosso grupo publicou em 2016 um trabalho que relata o desenvolvimento de uma eficiente linhagem fermentadora de xilose, construída a partir da cepa industrial PE-2 (Santos et al., 2016b). A linhagem foi desenvolvida a partir da expressão

heteróloga eficiente do gene que codifica a enzima xilose isomerase, além da superexpressão dos genes xiluloquinase (*XKSI*), ribulose 5-fosfato epimerase (*RPE1*), ribose 5-fosfato isomerase (*RKII*), transaldolase (*TALI*), transcetolase (*TKLI*), e deleção do gene *GRE3*. A linhagem desenvolvida foi submetida a um processo de melhoramento via evolução adaptativa, atingindo rendimentos de até 0,46 g etanol/ g xilose (> 90%). Entre as mutações geradas durante o processo de evolução, se destacam o aumento do número de cópias da XI e mutações que levaram a perda de função dos genes *ISUI* e *SSK2* e conferiram a capacidade de fermentar xilose para a cepa evoluída (Santos et al., 2016b). A evolução adaptativa tem sido aplicada como um procedimento necessário a fim de obter linhagens capazes de consumir xilose eficientemente. Somente com as modificações genéticas, as linhagens geradas na literatura não apresentam rendimento e produtividade satisfatórios, impossibilitando seu uso em escala comercial (Walfridsson et al., 1996; Kuyper et al., 2003; Kyuyper et al., 2005). Na evolução adaptativa, ou engenharia evolutiva, o micro-organismo desenvolvido é submetido a uma pressão seletiva a fim de se alcançar o fenótipo desejado. O processo de evolução é uma estratégia de melhoramento de micro-organismos, onde mutações aleatórias que favorecem o fenótipo tendem a ser fixadas na população e selecionam o micro-organismo na condição imposta. O processo de evolução para aumento do consumo de xilose já foi extensivamente empregado no desenvolvimento de cepas modificadas de *S. cerevisiae*, aumentando as taxas de consumo da pentose e melhorando a performance global (Sonderegger e Sauer, 2003; Demeke et al., 2013; Diao et al., 2013; Lee et al., 2014, Santos et al., 2016b). Usualmente, as linhagens são cultivadas em quimiostato (cultura contínua) ou em bateladas sucessivas em meio contendo xilose como fonte de carbono.

A partir do sequenciamento de apenas duas linhagens evoluídas, em experimentos paralelos, identificamos mutações nos genes *ISUI* e *SSK2*, que eram responsáveis pela capacidade adquirida de fermentação de xilose (Santos et al., 2016b). Os genes pertencem a vias diferentes e não obviamente associadas ao metabolismo de carboidratos. *ISUI* é componente da via mitocondrial de montagem de clusteres de Fe-S e *SSK2* é componente da via MAPKKK de resposta a estresse osmótico. Concomitantemente, outro grupo publicou um resultado semelhante, reforçando a hipótese do nosso grupo. Sato et al. (2016) identificou os genes *ISUI*, *HOG1* e *IRA2* como responsáveis pela capacidade de fermentar xilose pela linhagem produzida por

seu grupo. Somente com a análise de duas linhagens fomos capazes de começar a elucidar a base genética que regula a fermentação de xilose em *S. cerevisiae*, passo essencial para a viabilização da tecnologia 2G. Mesmo sendo pertencentes a vias metabólicas distintas, a combinação das mutações identificadas em *ISU1* e *SSK2* na linhagem LVY70, tiveram efeito sinérgico conferindo a linhagem uma assimilação mais eficiente de xilose em comparação com as duas mutações isoladas (Santos et al., 2016b) (Fig. 1).

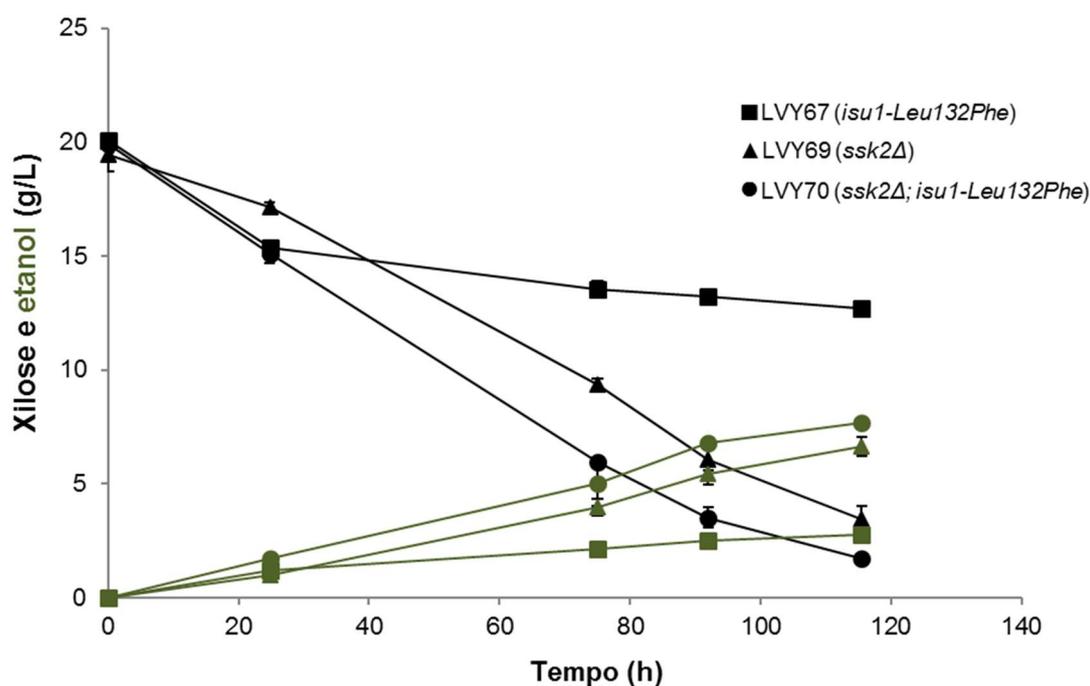


Figura 1. Consumo de xilose e produção de etanol pelas linhagens contendo mutações nos genes *ISU1* e *SSK2*. A combinação das mutações conferiu à linhagem LVY70 uma capacidade superior de assimilação de xilose (Santos et al., 2016b).

2. Objetivo

O projeto tem como objetivo a engenharia genética racional de *S. cerevisiae* e manipulação direta da via de formação de clusters de Fe-S e MAPKKK, visando a otimização da fermentação de xilose e produção de etanol de segunda-geração.

2.1 Objetivos específicos

- Identificação de alvos metabólicos da via de formação de clusters de Fe-S e MAPKKK;

- Construção de cassetes de expressão gênica para a superexpressão ou deleção de genes candidatos de interesse;
- Transformação da cepa industrial evoluída fermentadora de xilose LVY34.4 (Santos et al., 2016b).
- Transformação da cepa industrial não evoluída LVY27 (Santos et al., 2016b);
- Fermentação comparativa das cepas desenvolvidas e análise dos resultados.

3. Metodologia

3.1 Linhagens utilizadas e condições de crescimento

Para os experimentos de clonagem e multiplicação dos plasmídeos será utilizada a linhagem bacteriana de *Escherichia coli* DH5 α (Stratagene[®]). Quando necessário, a linhagem será ativada à 37 °C por esgotamento em meio de cultura LB (Luria-Bertaini).

As linhagens de *S. cerevisiae* serão cultivadas em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose) e incubadas a 30 °C, 200 rpm. Transformantes de *S. cerevisiae* serão selecionados em meio YNB (6,7 g/L de yeast nitrogen base without aminoacids, Difco), suplementado com drop-out sem uracila ou em meio YPD suplementado com 300 μ g/ml de zeocina.

3.2 Identificação dos alvos metabólicos de interesse

A escolha dos alvos metabólicos para a construção dos cassetes de expressão gênica para a superexpressão ou deleção dos genes de interesse será realizada inicialmente de acordo com os parceiros de interação dos genes *ISU1* e *SSK2*, identificados previamente como associados ao metabolismo de xilose. *ISU1* é componente da via mitocondrial de montagem de clusters de Fe-S e *SSK2* é componente da via MAPKKK de resposta a estresse osmótico. Os genes componentes das mesmas vias ou de associação direta (figura 2) serão putativos alvos de manipulação gênica para otimização do consumo de xilose.

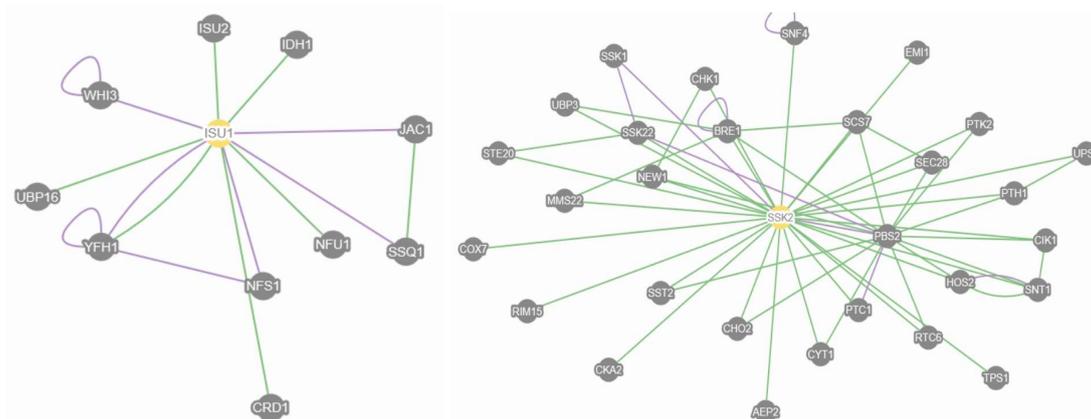


Figura 2. Rede de interação metabólica dos genes *ISU1* e *SSK2* (yeastgenome.org).

3.3 Construção dos plasmídeos

Para a construção dos cassetes será utilizada a técnica descrita por Gibson et al. (2009), que consiste na fusão de fragmentos de DNA com um mix das enzimas T5 exonuclease, Taq ligase e DNA polimerase em uma única reação. O cassete utilizará o plasmídeo pRS426 como molde, linearizado com a enzima *Bam*HI. Os fragmentos serão amplificados usando a Phusion DNA polymerase (NEB). A correta construção de cada cassete para superexpressão será verificada por sequenciamento Sanger.

Para o processo de seleção e combinação de múltiplas integrações, será utilizado o sistema *Cre/loxP* (Gueldener et al., 2002). O gene *URA3*, flanqueado sequências *loxP* na mesma orientação, nas duas extremidades, permite que esse marcador seja reciclado em todos os cassetes de superexpressão. Para a superexpressão, o gene a ser testado será flanqueado pelo promotor forte e constitutivo *TDHI*. Para deleção, sequências de homologia a região promotora e terminadora do gene a ser deletado será inserido nas extremidades upstream e downstream do gene que codifica resistência a zeocina.

3.4 Construção das linhagens

Os cassetes amplificados utilizando a enzima Phusion DNA polymerase (NEB) serão purificados através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Os amplicons serão utilizados na transformação da levedura utilizando o método de acetato de lítio descrito por Gietz e Schiestl (2007). As linhagens LVY27 e LVY34.4, derivadas da cepa industrial de *S. cerevisiae* PE-2, serão utilizadas para o

desenvolvimento das linhagens. A seleção dos transformantes será realizada conforme descrito no item 3.1.

3.5 Ensaio fermentativo

O ensaio fermentativo para comparação das cepas será realizado em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de xilose), em condições semi-anaeróbicas, utilizando garrafas seladas de 100 mL e volume de trabalho de 80 ml, iniciando a cultura com OD de aproximadamente 1,0 (0,25 g DCW/L). A temperatura e velocidade de agitação serão mantidas constantes, respectivamente, em 30 °C e 150 rpm. Todos os experimentos serão realizados em triplicata. Amostras serão retiradas para medir OD e para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a determinação do peso seco, as células serão coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes e secadas a 65°C, conforme descrito anteriormente (Santos et al., 2016b).

3.6 Quantificação dos produtos da fermentação

A quantificação de glicose, xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol será realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando o cromatógrafo Alliance (Waters) com detector de índice de refração (Waters 2414) e detector de matriz de fotodiodo (Waters 2998) a 280 nm. As amostras serão analisadas por HPLC-RI utilizando a coluna de exclusão iônica HPX-87H (300mm x 7,8mm, BioRad®), aquecida em forno a 35 °C, H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. Uma curva padrão com as concentrações conhecidas com compostos de interesse também serão analisadas pelo mesmo procedimento. As concentrações dos compostos nas amostras serão determinadas por comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos com as curvas de calibração.

4. Cronograma

Atividades	1° Bi	2° Bi	3° Bi	4° Bi	5° Bi	6° Bi
Seleção dos alvos metabólicos de interesse						
Desenho dos primers						
Construção dos cassetes de expressão gênica						
Transformação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i>						

Fermentação comparativa						
Elaboração de relatório científico						

7. Bibliografia

1. Abas N, Kalair A, Khan N. Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*, 69: 31-49, 2015.
2. Almeida RM, Modig T, Petersson A. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 340-349, 2007.
3. Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. & Hieter, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119–122 (1992).
4. Demeke *et al.* Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 6: 89, 2013.
5. Diao L, Liu Y, Qian F, Yang J, Jiang Y, Yang S. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. *BMC Biotechnology*, 13: 110, 2013.
6. Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. & Hegemann, J. H. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 30, e23 (2002).
7. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345 (2009).
8. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc / SS carrier DNA / PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 38–41 (2007).
9. Gustavsson, L., Haus, S., Lundblad, M., Lundström, A., Ortiz, C. A., Sathre, R., ... Wikberg, P. E. (2017). Climate change effects of forestry and substitution of carbon-intensive materials and fossil fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 612–624.
10. Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 147-177, 2007.

11. Kuyper M et al. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Research*, 4: 69-78, 2003.
12. Kuyper M, Hartog MM, Toirkens MJ, Almering MJ, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk J T. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5: 399-409, 2005a.
13. Lee S-M, Jellison T, Alper HS. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 122, 2014.
14. Ling H, Teo W, Chen B, Leong SSJ, Chang MW. Microbial tolerance engineering toward biochemical production: From lignocellulose to products. *Current Opinion in Biotechnology*, 29: 99-106, 2014.
15. Maurya DP, Singla A, Negi S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5: 597-609, 2015.
16. Paris agreement. Disponível em:
http://unfccc.int/files/essential_background/convention/application/pdf/english_paris_agreement.pdf. Acesso em dezembro de 2015.
17. Renewable Fuels Association - RFA. Disponível em:
<http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>. Acesso em dezembro de 2016.
18. Rudolf A, Karhumaa K, Hahn-Hagerdal B. Ethanol production from traditional and emerging raw materials. In: Satyanarayana T, Kunze G. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 489-514p. Editora Springer. Heidelberg, 2009.
19. Santos LV *et al.* Second-generation ethanol: The need is becoming a reality. *Industrial Biotechnology*, 12: 40-57, 2016a.
20. Santos LV, Carazzolle MF, Nagamatsu ST, Sampaio MNV, Almeida LD, Pirolla RAS, Borelli G, Corrêa TLR, Argueso JL, Pereira GAG. Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Nature Scientific Reports*, 6: 38676, 2016b.



21. Sato TK *et al.* Directed evolution reveals unexpected epistatic interactions that alter metabolic regulation and enable anaerobic xylose use by *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics*, 12: e1006372, 2016.
22. Sonderegger M, Sauer U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1990-1998, 2003.
23. Walfridsson M *et al.* Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4648-4651, 1996.