

Projeto PIBIC

Título: Estudo da toxicidade de α -olefinas em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Pesquisador Responsável: Wesley Cardoso Generoso

Instituição: Lab. Nacional de Biorrenováveis (LNBR)

Grande parte dos estudos e desenvolvimento de tecnologias para a produção de hidrocarbonetos renováveis baseiam-se principalmente em processos químicos que dependem de altas temperaturas e pressão, além de metais pesados, que são fatores ambientalmente desfavoráveis¹. Nesse sentido, uma alternativa promissora é o desenvolvimento de rotas biológicas baseada em micro-organismos modificados utilizando enzimas capazes de produzir hidrocarbonetos de forma mais específica e customizada para as aplicações. Além disso, a rota biológica é capaz de produzir produtos mais puros além de dispensar o uso de etapas de hidrogenação, o que a torna mais sustentável e menos onerosa².

No entanto, os hidrocarbonetos não são produtos primários do metabolismo celular, sendo produzidos em quantidades muito baixas, o que recentemente elevou o interesse científico na descoberta e desenvolvimento de microrganismos modificados e enzimas produtoras de hidrocarbonetos, principalmente impulsionado na produção sustentável de combustíveis e produtos químicos *drop-in*³. De acordo com o tamanho, estes hidrocarbonetos podem ser empregados em diferentes aplicações como biocombustíveis *drop-in*: gasolina veicular (C4-C10), diesel (>C14) e querosene de aviação (C10-C16). Além disso, a ausência de oxigênio nestes compostos traz vantagens sobre os biocombustíveis de primeira geração, etanol e biodiesel, como uma solubilidade limitada em água, maior eficiência de combustão e utilização direta na infraestrutura já utilizada para os derivados de petróleo⁴.

Os alcenos terminais (α -olefinas) são uma classe de hidrocarbonetos capazes de serem produzidos de forma biotecnológica e moléculas chaves para produção de uma infinidade de derivados, devido à sua dupla ligação carbono-carbono terminal. Este tipo de olefinas são intermediários importantes para a produção de surfactantes, polímeros, pesticidas e lubrificantes⁵. Além disso, esses alcenos também podem ser

incorporados diretamente na produção tradicional de combustíveis como moléculas *drop-in*, o que se torna um propósito significativo em um cenário de redução da utilização de recursos fósseis. Entre os derivados de petróleo, a alfa-olefina é uma molécula bastante atrativa para pesquisas, com mercado global decorrente de US\$ 13,7 bilhões até 2028⁶.

De maneira geral, estes compostos são produzidos por diferentes microrganismos como derivados da via de biossíntese de ácidos graxos³. As principais rotas investigadas para a produção de alceno é pela descarboxilação direta de uma molécula de ácido graxo, que resulta em um alceno com dupla ligação terminal. Essa rota de produção de alceno é resultado da ação de descarboxilases de dois tipos principais: as enzimas com grupo heme (P450)⁷ e as enzimas que utilizam o ferro metálico como cofator⁸. A principal diferença entre esses dois tipos de descarboxilases é a necessidade das enzimas P450 por um parceiro para iniciar a reação (uma redutase ou peróxido de hidrogênio), enquanto as descarboxilases que usam ferro metálico realizam a reação de forma independente. O LNBR tem investido nos estudos destas enzimas há alguns anos e já caracterizou genes interessantes para aplicação em engenharia metabólica para produção de alcenos, o que já foi iniciado recentemente.

Existem poucos exemplos de produção microbiana destes hidrocarbonetos relatados na literatura^{2,3}, e melhores resultados foram obtidos com bactéria *Escherichia coli* (~ 500 mg/L). No entanto, o uso de leveduras em processos industriais oferece várias vantagens em relação ao uso de bactérias, como biossegurança, uma vez que muitas espécies isoladas da natureza raramente são classificadas como patógenos agressivos; a separação mais fácil das células da fermentação; maior tolerância a condições adversas, como flutuação de pH e temperatura, insuficiência de nutrientes, suprimento de oxigênio; e sua prevalência natural em meios de cultura, devido à produção de ácidos orgânicos, álcoois e toxinas *killer*⁹. Em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os melhores resultados foram obtidos com a descarboxilase membranaar UndB de *Pseudomonas fluorescens*, porém os resultados correspondem a apenas 10% do título alcançado para bactérias¹⁰. Um dos entraves da produção de alceno em *S. cerevisiae* é devido ao elevado acúmulo interno dos produtos, o que reduz o *fitness* celular devido à toxicidade¹⁰. Outro fator importante para a toxicidade dos alcenos é a sua natureza altamente hidrofóbica, o que leva à internalização destes compostos na membrana

plasmática e assim a deixando menos robusta frente as condições adversas comuns de cultivos microbianos (flutuação de pH, temperatura, estresse osmótico, entre outros), o que promove a morte prematura das células¹¹.

Desta forma, este projeto se objetiva em investigar as bases genéticas da toxicidade causadas por alcenos, especificamente α -olefinas. Será utilizada a abordagem de evolução laboratorial adaptativa, que se baseia no crescimento microbiano na presença de compostos tóxicos por várias gerações, de modo que as células naturalmente evoluídas dominem o meio. Em seguida, os melhores candidatos são isolados e investigados por análise genômica e transcriptômica e, assim, fornecendo informações sobre o mecanismo pelo qual os gargalos podem ser aliviados. Além das abordagens relatadas, o bolsista PIBIC terá a oportunidade de estar em contato com técnicas importantes da área de engenharia metabólica e biologia sintética, como construção de cassetes de expressão, CRISPR-Cas, análises de fluxo metabólico e análises cromatográficas para quantificação dos produtos e intermediários.

Atividades específicas incluídas na abordagem experimental serão:

- A) Estudo de concentração mínima tóxica de uma estirpe laboratorial de *S. cerevisiae* com α -olefinas de dois tamanhos de cadeia distinta (cadeia curta e cadeia média);
- B) Evolução laboratorial adaptativa nas concentrações tóxicas encontradas previamente;
- C) Isolamento de espécimes estáveis com maior tolerância aos alcenos testados;
- D) Avaliação do perfil fenotípico destas cepas evoluídas, como consumo de açúcares e produção de metabólitos primários e ácidos graxos;
- E) Análise de genômica e transcriptômica para identificação de genes putativamente envolvidos na resistência a hidrocarbonetos.

Atividade	Bimestre 1	Bimestre 2	Bimestre 3	Bimestre 4	Bimestre 5	Bimestre 6
A	X					
B	X	X	X			
C			X			
D				X	X	
E					X	X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anbarasan, P. *et al.* Integration of chemical catalysis with extractive fermentation to produce fuels. *Nature* **491**, (2012).
2. Keasling, J. *et al.* Microbial production of advanced biofuels. *Nature Reviews Microbiology* vol. 19 (2021).
3. Kang, M. K. & Nielsen, J. Biobased production of alkanes and alkenes through metabolic engineering of microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* vol. 44 (2017).
4. Karatzos, S., Mcmillan, J. & Saddler, J. The potential and challenges of “drop in” biofuels. *IEA Bioenergy - Task 39* (2014).
5. Amghizar, I., Vandewalle, L. A., van Geem, K. M. & Marin, G. B. New Trends in Olefin Production. *Engineering* **3**, (2017).
6. Fior Markets. Global Alpha Olefins Market Is Expected to Reach USD 13.7 billion by 2028. <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/11/12/2333046/0/en/Global-Alpha-Olefins-Market-Is-Expected-to-Reach-USD-13-7-billion-by-2028-Fior-Markets.html> (2021).
7. Matthews, S. *et al.* Catalytic determinants of alkene production by the cytochrome P450 peroxygenase OleTJE. *Journal of Biological Chemistry* **292**, (2017).
8. Manley, O. M., Fan, R., Guo, Y. & Makris, T. M. Oxidative Decarboxylase UndA Utilizes a Dinuclear Iron Cofactor. *J Am Chem Soc* **141**, (2019).
9. Steensels, J. *et al.* Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews* **38**, (2014).
10. Zhu, Z. *et al.* Enabling the synthesis of medium chain alkanes and 1-alkenes in yeast. *Metabolic Engineering* **44**, (2017).
11. GILL, C. O. & RATLEDGE, C. Toxicity of n-Alkanes, n-Alk-1-enes, n-Alkan-1-ols and n-Alkyl-1-bromides towards Yeasts. *Journal of General Microbiology* **72**, (1972).