

TOLERÂNCIA A INIBIDORES EM CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* EVOLUÍDAS PARA TERMOTOLERÂNCIA E MODIFICADAS GENÉTICAMENTE PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE ENZIMAS

Palavras-Chave: LEVEDURAS MODIFICADAS, FERMENTAÇÃO, INIBIDORES.

Autores:

LIVIA KAORI HANITA, FEA – UNICAMP

Me. ENYLSOON XAVIER RAMALHO (co-orientador), FEA - UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. ROSANA GOLDBECK COELHO (orientadora), FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A produção biotecnológica de etanol combustível a partir de biomassa lignocelulósica, o chamado etanol de segunda geração, tem sido considerada uma alternativa promissora para aproveitar eficientemente esses resíduos agroindustriais que atualmente na grande maioria das usinas são destinados basicamente à queima para produção de vapor (ALONSO PIPPO et al., 2011; MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 2018). Esse processo consiste na degradação da lignocelulose e conversão por via fermentativa dos açúcares liberados em etanol, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* o principal micro-organismo utilizado (MAGA et al., 2019).

No processo pode haver uma degradação extensiva da lignocelulose gerando compostos tóxicos para o micro-organismo que podem inibir o seu crescimento e ou a produção de etanol, como os furanos, ácidos fracos e fenólicos, sendo esse um desafio significativo para a produção eficiente de etanol de segunda geração (ALMEIDA et al., 2007).

Apesar de haver alguns métodos de desintoxicação desse substrato, como tratamento com sulfitos, troca iônica e adição de lacase, realizar mais uma etapa no processo afeta sua viabilidade técnica e econômica, além de haver uma certa perda de açúcares fermentescíveis. Então, uma alternativa consiste na aplicação de cepas do micro-organismo fermentativo que toleram concentrações maiores de inibidores (KOPPRAM, ALBERS e OLSSON, 2012; RIVARD et al., 1996).

Nesse contexto, este projeto visa avaliar a tolerância a inibidores de cepas de *S. cerevisiae* que passaram por estudos genéticos para apresentarem outras características de interesse. De Melo *et al.* (2020) realizou a evolução dirigida da cepa *S. cerevisiae* SA-1 (Usina Santa Adélia, brasileira, industrial) para aumentar sua termotolerância, obtendo uma cepa capaz de atuar a 40 °C. Essa nova cepa termotolerante foi modificada geneticamente via CRISPR/Cas9 por Lopes et al. (2020) para expressão heteróloga de enzimas celulolíticas e oxidativas. Tais modificações podem ter provocados efeitos inesperados na tolerância da levedura a inibidores visto que é possível ter ocorrido mudanças genéticas que afetem o seu equilíbrio metabólico, tornando-a mais suscetível ou mais resistente a determinados inibidores (BARRICK e LENSKI, 2013; MENEGON, GROSS e JACOBUS, 2022). Então, para verificar essa hipótese, as cepas citadas foram incubadas na presença de diferentes inibidores em diferentes concentrações sendo avaliados o crescimento microbiano e a produção de etanol.

METODOLOGIA:

Foram estudadas as seguintes cepas da levedura *S. cerevisiae* SA-1:

- SAP, cepa parental da qual se originou a cepa termotolerante;
- SAT, cepa termotolerante obtida por evolução dirigida para atuar a 40 °C (DE MELO et al., 2020);
- Três cepas originadas a partir da cepa termotolerante modificada geneticamente via CRISPR/Cas9 para expressão heteróloga de enzimas celulolíticas e oxidativas (LOPES et al., 2020):
 - SATEG, que expressa uma endoglucanase de *Acremonium strictum* (END) e uma β -glicosidase de *Acremonium strictum* (GLU);
 - SATCC, que expressa as celobio-hidrolases 1 e 2 de *Trichoderma reesei* (CBH1 e CBH2);
 - SATLC, que expressa uma mono-oxigenase lítica de polissacarídeo de *Aspergillus nidulans* (LPMO) e uma celobiose desidrogenase de *Aspergillus nidulans* (CDH).

Foram preparados pré-inóculos no meio de cultivo líquido YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 5%; m/v) e incubados a 30 °C e agitação de 200 rpm durante 24 h. Por fim, avaliou-se a tolerância aos inibidores com ácidos fracos (ácido acético, fórmico e láctico) em microplacas de 96 poços sob agitação suave no leitor de microplacas Tecan Infiniti® 200 PRO durante 24 h a 30 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Primeiramente, avaliou-se o crescimento das cepas sob efeito do ácido acético com 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L. Notou-se que na maior concentração de ácido acético houve uma inibição total em todas as cepas. Já nas concentrações de 6 g/L e 7 g/L, as cepas modificadas geneticamente apresentaram maior crescimento quando comparadas à cepa parental, demonstrando, assim, uma maior resistência à substância testada. Destaca-se também que, na menor concentração, a cepa SATEG teve melhor desempenho, enquanto na intermediária, foi a SAT, como visto na Figura 1.

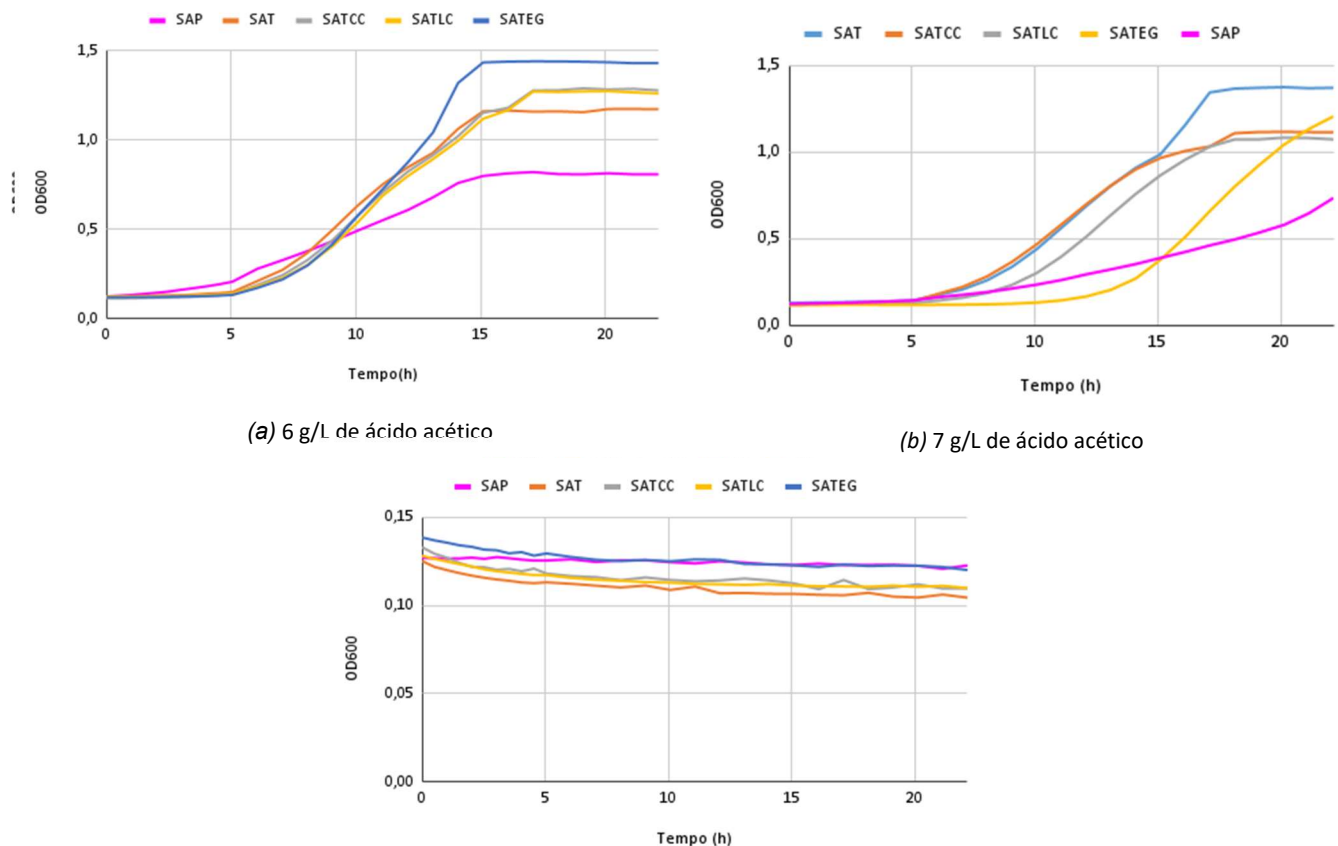


Figura 1. Curva de crescimento a 30 °C das cepas parentais e geneticamente modificadas na presença de ácido acético

Isso demonstra que, ao substituir o meio durante a fase de crescimento exponencial, a população seria forçada a se adaptar a uma nova carga de inibidores quando o estado das células geralmente apresenta baixa tolerância ao estresse, afetando a fase lag (SALINAS *et al.*, 2013).

Analogamente, com o ácido fórmico, os ensaios foram realizados de 1 a 2,5 g/L e notou-se diferença de crescimento entre as cepas a entre 2 e 2,5 g/L. Na Figura 2, também se observou uma maior taxa de crescimento microbiano nas cepas SATEG e SAT, enquanto a parental teve maiores dificuldades ou, como no caso da maior concentração, não houve crescimento. Além disso, o ácido fórmico apresentou uma menor concentração inibitória devido à sua maior acidez em comparação com o ácido acético. Esta diferença é atribuída ao efeito indutivo do grupo doador de elétrons do grupo metila do ácido acético, que desestabiliza sua base conjugada (BAADER, 2019).

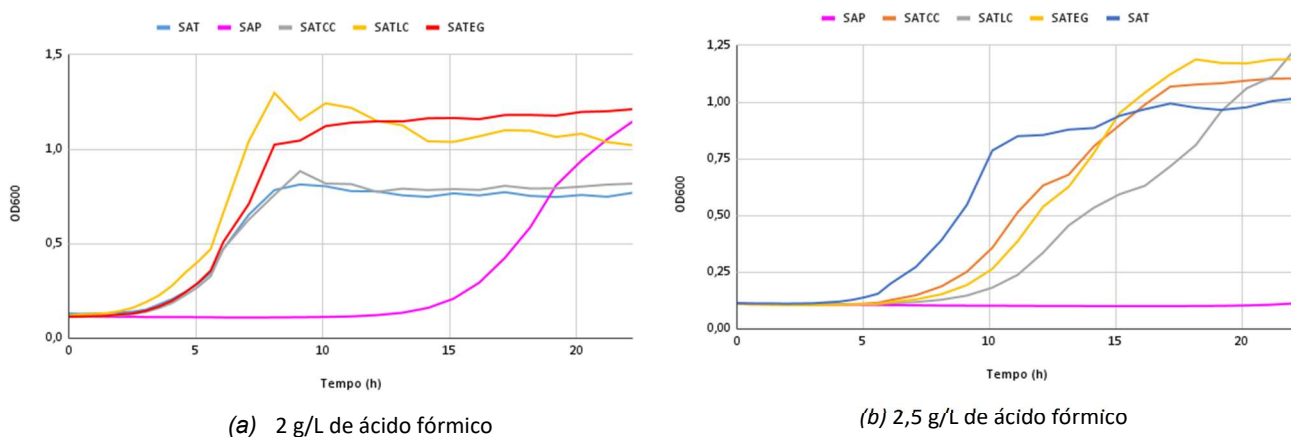


Figura 2. Curva de crescimento a 30 °C das cepas parentais e geneticamente modificadas na presença de ácido fórmico

Para o ácido láctico, foram realizados ensaios de 1 a 20 g/L. Observou-se que apenas na maior concentração houve uma inibição da cepa parental. Apesar do desempenho inicial superior das cepas modificadas, a absorbância final foi semelhante à das demais cepas (Figura 3). Um dos fatores que contribui com a eficiência dos ácidos orgânicos é a constante de dissociação. Enquanto o ácido acético possui um pKa de 4,75, o láctico possui um pKa de 3,88; assim, este último apresentou menor influência no crescimento das cepas (REBONATTO, 2018; ALBERS, 2009).

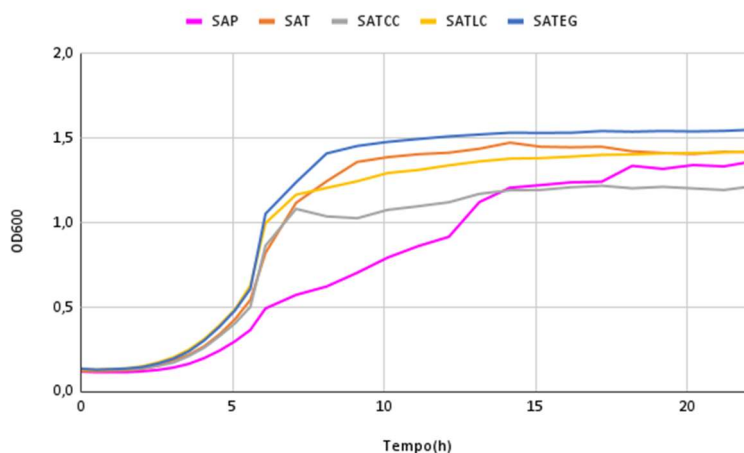


Figura 3. Curva de crescimento a 30 °C das cepas parentais e geneticamente modificadas na presença de 20 g/L de ácido láctico

Em pequenas concentrações de ácidos fracos (menores que 100 mmol/L), observa-se um aumento da taxa de fermentação, cujo mecanismo proposto é o aumento da demanda de ATP devido ao aumento do transporte através da membrana plasmática. Esse ATP é adquirido por meio de um aumento na produção de etanol pela formação de biomassa (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Por outro lado, em concentrações maiores, há indícios de que cepas termotolerantes convertem os inibidores mais rapidamente em comparações às parentais, o que pode indicar uma maior habilidade da cepa modificada de metabolizar os componentes inibitórios (LORENZO, 2013).

CONCLUSÕES:

Os resultados indicam que as modificações genéticas para o aumento da termotolerância obtida por evolução dirigida para atuar a 40 °C também aumentaram a resistência aos ácidos fórmico, acético e láctico. Em geral, notou-se o maior crescimento da cepa SATEG. Além disso, em algumas concentrações, é possível observar uma diminuição na velocidade de crescimento, porém, ao final, houve o crescimento dentro do esperado. Também se ressalta que, mesmo sendo mais forte que o ácido acético, o ácido láctico necessita de uma maior concentração para inibir as cepas, inclusive a cepa parental. Esses achados sugerem que a manipulação genética de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser uma estratégia eficaz para melhorar a resistência a inibidores, contribuindo para a viabilidade técnica e econômica da produção de etanol de segunda geração.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, J. R.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, abr. 2007.
- ALONSO PIPPO, W.; LUENGO, C. A.; ALONSOAMADOR MORALES ALBERTERIS, L.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuel. Part 2: Socio-economic aspects and techno-economic analysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, n. 3, p. 257–266, 7 ago. 2011.
- ÁVILA, P. F.; FORTE, M. B. S.; GOLDBECK, R. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 116, p. 180–188, set. 2018.
- BARRICK, J. E.; LENSKI, R. E. Genome dynamics during experimental evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 12, p. 827–839, 29 dez. 2013.
- DE MELLO, F. DA S. B.; CORADINI, A. L. V.; TIZEI, P. A. G.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G.; TEIXEIRA, G. S. Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 49–58, jan. 2019.
- DE MELO, A. H. F.; LOPES, A. M. M.; DEZOTTI, N.; SANTOS, I. L.; TEIXEIRA, G. S.; GOLDBECK, R. Evolutionary engineering of two robust brazilian industrial yeast strains for thermotolerance and second-generation biofuels. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 91–98, 1 abr. 2020.
- FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; TRENTO, A.; VAN RENSBURG, E.; GARCÍA-APARICIO, M.; VAN ZYL, W. H.; CASELLA, S. Exploring grape marc as trove for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 168, 29 dez. 2013.
- HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. VAN; FAAIJ, A. P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384–410, abr. 2005.
- KOPPRAM, R.; ALBERS, E.; OLSSON, L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 32, 11 dez. 2012.

- LOPES, A. M. M.; FÉLIX DE MÉLO, A. H.; PROCÓPIO, D. P.; TEIXEIRA, G. S.; CARAZZOLLE, M. F.; DE CARVALHO, L. M.; ADELANTADO, N.; PEREIRA, G. A. G.; FERRER, P.; FILHO, F. M.; GOLDBECK, R. Genome sequence of *Acremonium strictum* AAJ6 strain isolated from the Cerrado biome in Brazil and CAZymes expression in thermotolerant industrial yeast for ethanol production. **Process Biochemistry**, v. 98, p. 139–150, nov. 2020.
- MAGA, D.; THONEMANN, N.; HIEBEL, M.; SEBASTIÃO, D.; LOPES, T. F.; FONSECA, C.; GÍRIO, F. Comparative life cycle assessment of first- and second-generation ethanol from sugarcane in Brazil. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 24, n. 2, p. 266–280, 30 fev. 2019.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, E.; AMEZCUA-ALLIERI, M. A.; SADHUKHAN, J.; ANELL, J. A. Sugarcane bagasse valorization strategies for bioethanol and energy production. Em: **Sugarcane - Technology and Research**. [s.l.] InTech, 2018.
- MENEGON, Y. A.; GROSS, J.; JACOBUS, A. P. How adaptive laboratory evolution can boost yeast tolerance to lignocellulosic hydrolyses. **Current Genetics**, v. 68, n. 3–4, p. 319–342, 1 ago. 2022.
- RIVARD, C. J.; ENGEL, R. E.; HAYWARD, T. K.; NAGLE, N. J.; HATZIS, C.; PHILIPPIDIS, G. P. Measurement of the inhibitory potential and detoxification of biomass pretreatment hydrolysate for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57–58, n. 1, p. 183–191, mar. 1996.
- YOSHIDA, N.; MINAMIMURA, T.; YOSHIDA, T.; OGAWA, K. Effect of hypergravitational stress on microbial cell viability. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 3, p. 342–344, jan. 1999.
- BAADER, J. W. **Conceitos Básicos para o Estudo de Mecanismos de Reações Orgânicas**. São Paulo: Instituto de Química - USP, 2019.
- SALINAS, V., GORWA-GRAUSLUND, M.F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnol Biofuels**, v.6, n 151, 20 out. 2013
- REBONATTO, B. *et al.* Sinergismo entre ácidos orgânicos e sorbato de potássio no controle de *Aspergillus flavus*. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 3, p. 114-125, 2018.
- ALBERS E, LARSSON C: A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2009, 36:1085–1091.
- JÖNSSON, L.J., ALRIKSSON, B. & NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol Biofuels** v. 6, 16 (2013). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- FAVARO, L. *et al.* Exploring grape marc as trove for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, 2013. 168 p. v. 6.