

RUTE SALGUES GUEIROS

**OTIMIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO GENÉTICA
DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS PARA APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL**

Recife

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**OTIMIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO GENÉTICA
DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS PARA APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL**

RUTE SALGUES GUEIROS

Recife

2006

**Otimização das técnicas de manipulação genética de
leveduras industriais para aplicação na
produção de álcool combustível**

RUTE SALGUES GUEIROS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas.
Área: Biologia Celular e Molecular

ORIENTADOR: PROF.DR.MARCOS ANTÔNIO DE MORAIS JÚNIOR
CO-ORIENTADOR: PROF.DR.DIOGO ARDAILLON SIMÕES

Recife
2006

Gueiros, Rute Salgues

Otimização das técnicas de manipulação genética de leveduras industriais para aplicação na produção de álcool combustível / Rute Salgues Gueiros. – Recife: O Autor, 2006.

x, 67 folhas : il., fig., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Engenharia metabólica 2. Genética de microorganismos 3. Leveduras – *Saccharomyces cerevisiae* 4. Álcool combustível I. Título.

**579.25
579**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

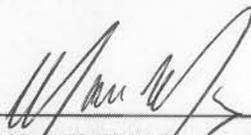
**UFPE
CCB – 2006 059**

**Otimização das técnicas de manipulação genética de
leveduras industriais para aplicação na
produção de álcool combustível**

RUTE SALGUES GUEIROS

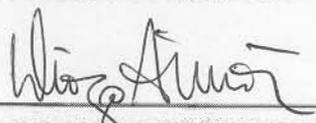
Comissão Examinadora

ORIENTADOR:



Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Júnior
Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

CO-ORIENTADOR:

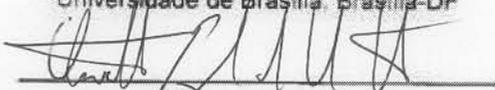


Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões
Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

EXAMINADORES:



Profa. Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes
Universidade de Brasília, Brasília-DF



Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife-PE

À Deus meu grande amigo.
Aos meus pais Epitácio (*in memoriam*) e Rinalda pelo amor incondicional
e por me ensinarem o caminho em que devo andar, dedico.

“O coração do homem traça o seu caminho,
mas o Senhor lhe dirige os passos.
Provérbios 16.9”.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida, a quem confio o meu futuro.

Ao professor Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior pela orientação, apoio e por todos os conhecimentos científicos transmitidos no decorrer deste trabalho.

Ao professor Dr. Diogo Ardaillon Simões pela dedicação, apoio e ensino ao longos destes anos.

Aos colegas de turma do Mestrado em Ciências Biológicas, pelo convívio e crescimento durante esses dois anos de aprendizado. Espero que todos alcancem seus sonhos.

Aos colegas de laboratório pelo convívio agradável, pelas conversas e até brincadeiras: Alecsandra, Bereneuza, Brígida, Carolina, Diana, Eliane, Esteban, Hélder, Hélio, Humberto, João, José, Maíra, Mariland, Meiriane, Rafael, Renato, Roxane, Sandra, Scheila e Tereza.

Em especial a minha amiga Elaine pela amizade e cumplicidade. Que Deus lhe guie sempre, dando-lhe coragem e mostrando a Sua vontade.

As amigas Carla e Fernanda por estarem no mesmo barco da Engenharia Metabólica, por compartilharem comigo as metodologias! Muito obrigada! Deus ajude vocês a ultrapassarem todas as ondas!!!

Aos amigos que estando perto ou longe são especiais na minha vida!

A Nalva, minha eterna babá, você é uma mãezinha para mim! Obrigada por seu amor e por seus “mimos”.

A Erlon por fazer parte da minha vida, pelo seu amor, incentivo, por me compreender e compartilhar todos estes anos.

A família de Erlon, por me acolherem com amor! Especialmente Edvaldo, Conceição, Elton, Éder e Edvaldo Filho (Didi).

A minha família, pois, vocês me dão força para vencer. Cada um de vocês é especial para mim. Em especial, “as priminhas Rafaela e Raissa”.

Ao meu irmão Epitácio, “Tacinho”, pelo amor, apoio e incentivo a todo instante.

Aos meus pais Epitácio (*in memoriam*) e Rinalda, pelo amor, por terem me educado e me ensinado os valores da vida. Mainha, obrigada pela dedicação e paciência! Te amo!

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS..... | iii |
| LISTA DE TABELAS..... | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | vii |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO..... | 2 |
| 3. OBJETIVOS..... | 2 |
| 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 4.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O BIOETANOL..... | 3 |
| 4.2. Leveduras..... | 5 |
| 4.3. Ciclo de vida..... | 5 |
| 4.4. Aplicações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 8 |
| 4.5. Fermentação alcoólica..... | 9 |
| 4.6. Metabolismo redox em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 11 |
| 4.7. Engenharia Metabólica em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 13 |
| 4.8.1. Deleção gênica para otimização do rendimento em etanol..... | 14 |
| 4.8.2. Integração gênica para otimização do rendimento de etanol..... | 17 |
| 4.8.3. Análise <i>in silico</i> da deleção de <i>GDH</i> e integração de <i>gapN</i> | 19 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 22 |
| 6. ARTIGOS CIENTÍFICOS..... | 30 |
| Deleção do gene <i>GDH1</i> de linhagens industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> produtoras de álcool combustível..... | 31 |
| Resumo..... | 31 |
| Introdução..... | 32 |
| Materiais e Métodos..... | 33 |
| Resultados..... | 37 |
| Discussão..... | 41 |
| Agradecimentos..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| Referências bibliográficas..... | 44 |
| Integração do gene <i>gapN</i> de <i>Streptococcus mutans</i> em linhagens industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>..... | 46 |
| Resumo..... | 46 |
| Introdução..... | 47 |
| Materiais e Métodos..... | 49 |
| Resultados..... | 52 |
| Discussão..... | 54 |
| Agradecimentos..... | 55 |
| Referências bibliográficas..... | 56 |
| ANEXO 1..... | 58 |
| ANEXO 2..... | 61 |
| ANEXO 3..... | 65 |

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Figura 1. Produção mundial de etanol. Fonte: BODIESELBR - http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm - acesso em 07/05/2006..... | 4 |
| Figura 2. Produção e custo do etanol no Brasil. Fonte: BODIESELBR - http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm - acesso em 07/05/2006..... | 4 |
| Figura 3. Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 6 |
| Figura 4. Brotamento de células de levedura | 7 |
| Figura 5. Ciclo de vida da célula heterotática e da célula homotática em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 8 |
| Figura 6. Mapa do metabolismo central mostrando a produção de etanol e de glicerol a partir da glicose assimilada..... | 10 |
| Figura 7. Função fisiológica do tráfego redox etanol-acetaldeído sob condições anaeróbicas. Na biossíntese dos aminoácidos, NADH mitocondrial é gerado. Sob condições anaeróbicas o NADH pode ser reoxidado via formação de glicerol, antes de ser transportado para citosol. Pdh, complexo piruvato desidrogenase; CS, citrato sintase; Idh, isocitrato desidrogenase; <i>GDH1</i> , glutamato desidrogenase..... | 15 |
| Figura.8. Estratégia para deleção gênica a partir da amplificação de um cassete de deleção já integrado em uma linhagem mutante. A. Construção do cassete de | |

integração com regiões longas de homologia usando primers (setas em amarelo) que emparelhem com as regiões 5' e 3' do gene já deletado pelo cassete KanMX. B. Recombinação homóloga e interrupção gênica da linhagem-alvo com o produto de amplificação contendo o cassete de deleção ladeado pelas seqüências de homologia.....17

Figura 9. Esquema do *by-pass* de parte da oxidação do gliceraldeído 3-fosfato em *S. cerevisiae* pela nova via promovida pela introdução do gene *gapN*.....19

Figura 10. Mapa metabólico mostrando a integração entre a glicólise e via de assimilação de amônia. A introdução da reação enzimática catalizada pelo produto do gene bacteriano *gapN* está mostrada.....21

ARTIGO- Deleção do gene *GDH1* de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de álcool combustível

Figura 1. Desenho esquemático da integração do fragmento de interrupção gênica no loco *GDH1* de *S. cerevisiae*. O produto de integração da marca KanMX no locus *GDH1* está representado na linha superior, em oposição ao gene íntegro representado na linha inferior. As setas em amarelo representam os primers utilizados.....36

Figura 2. Amplificações das linhagens de laboratório diplóides construídas para os genótipos homozigota $\Delta gdh1$ e heterozigota para *GDH3* e *GLT1* (linha 1), heterozigota *GDH1*, *GDH3* e *GLT1* (linha 2), homozigota *GDH1* (linha 3) e heterozigota *GDH1*/ $\Delta gdh1$ (linha 4) com os primers GDH1+up e GDH1rev (painel A), KanC e GDH1Rrev (painel B) e GDH1+up e GDH1Rrev (painel C).....39

Figura 3. Análise das colônias JP1 recombinantes produzidas pela integração do cassete KanMX. O DNA dos recombinantes foi amplificado com os primers

GDH1+up e KanB que verifica a integração do cassete no genoma (painel A), GDH1sup e KanB que verifica a integração no locus *GDH1* (painel B) e GDH1sup e GDH1rev que verifica a presença de formas intactas do gene *GDH1* (painel C). A ausência do produto de amplificação que representa deleção completa do gene *GDH1* no transformante 14 está mostrada pela seta.....40

Figura 4. Análise do locus *GDH1* na linhagem industrial JP1 (linhas 1, 4, 7, 10 e 13), na linhagem de laboratório CEN.PK 638-3B (linhas 2, 5, 8, 11 e 14) e do transformante 14 (linhas 3, 6, 9, 12 e 15) com os pares de primers GDH+up e GDH1rev (linhas 1-3), GDH1+up e KanB (linhas 4-6), KanFW e GDH1Rrev (linhas 7-9), GDH1sup e KanB (linhas 10-12) e GDH1sup e GDH1rev (linhas 13-15). As posições de hibridização dos primers estão mostradas na Figura 1.....41

ARTIGO- Integração do gene *gapN* de *Streptococcus mutans* em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 1. Construção do vetor integrativo pHO-GAPN. Linha 1: Marcador λ -HindIII; linha 2: amplificação do cassete de expressão *TPI1-gapN* de 2413pb a partir do plasmídeo pYX212-*GAPN* com os primers TPI1for e GAPNrev; linha 3: plasmídeo recombinante pGEM-GAPN; linha 4: pGEM-GAPN digerido com *BamHI* para liberação do cassete de expressão *TPI1-gapN* de 2413pb; linha 5: vetor pM4297; linha 6: pM4297 digerido com *BamHI*; linha 7: pM4297 digerido com *NotI*; linha 8: pM4297 digerido com *EcoRI*; linha 9: plasmídeo recombinante pHO-GAPN; linha 10: pHO-GAPN digerido com *BamHI*; linha 11: pHO-GAPN digerido com *NotI*; linha 12: pHO-GAPN digerido com *EcoRI*; linha 13: marcador λ -HindIII. Os valores em kb das bandas do marcador de peso molecular estão mostradas.....53

Figura 2. PCR de verificação da integração do gene *gapN* no genoma da linhagem industrial JP1. O DNA do plasmídeo pHO-GAPN (linha 1) e do transformante JP1-GAPN (linha 2) foi submetido a amplificação com os primers TPI1for e KanB.....53

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Bancos de dados para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 12 |
| Tabela 2. Genes e enzimas codificadas das rotas de assimilação de amônia em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 15 |

ARTIGO- Deleção do gene *GDH1* de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de álcool combustível

| | |
|---|----|
| Tabela 1. PCRs com diferentes combinações dos primers, tamanho gerado e objetivos de verificação..... | 37 |
| Tabela 2. Seqüências dos primers de amplificação de <i>GDH1</i> , construção dos cassetes de interrupção e verificação..... | 37 |
| Tabela 3. Obtenção de linhagens laboratoriais diplóides por cruzamentos entre linhagens de genótipos conhecidos..... | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS

3-PGA: 3-fosfoglicerato

6-PGDH: 6-fosfogluconato desidrogenase

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

ALDH: aldeído desidrogenases

ATP: adenosina trifosfato

Cre: cre recombinase

CS: citrato sintase

D-G3P: gliceraldeído-3-fosfato

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

EMP: Embden–Meyerhof–Parnas

EUROSCARF: European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional analysis

GAPDH: gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase

GAPN: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDH1: glutamato desidrogenase

GDH3: glutamato desidrogenase

GOGAT: glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase

GPD: glicerol-3-fosfato desidrogenase

GPP: glicerol-3-fosfato fosfatase

GS: glutamina sintetase

GLN1: glutamina sintetase

GLT1: glutamina sintase

IDH: isocitrato desidrogenase

G-418: Geneticina sulfato

KanMX: cassete de deleção contendo o gene *kan* que confere resistência bacteriana a kanamicina e resistência de leveduras a geneticina.

Kb (ou Kbp): pares de kilobases

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KIACS2 : acetil co-enzima A sintase da levedura *Kluyveromyces lactis*

MAT: Mating Type (sinal de acasalamento)

Mpb: pares de megabase
MIPS: Munich Information Center for Protein Sequences
NAD⁺: nicotinamida adenosina dinucleotideo
NADH: nicotinamida adenosina dinucleotideo reduzida
NADP⁺: nicotinamida adenosina dinucleotideo fosfato
NADPH: nicotinamida adenosina dinucleotideo fosfato reduzida
NH₄⁺: íon amônia
ORFs: open reading frame (quadro de leitura aberto)
Pdh: complexo piruvato desidrogenase
PGK: fosfoglicerato quinase
TAE: tampão tris acetato EDTA
TBE: tampão tris borato EDTA
TPI1- triose fosfato isomerase

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

BY4741: *Mat a his3 leu2 ura3 met15*
BY4742: *Mat α his3 leu2 lys2 ura3*
CEN.PK 638-3B: *Mat a, ura3 gdh1 gdh3 glt1*
JP1: linhagem industrial
YOR-375c: *Mat α his3 leu2 lys2 ura3 gdh1*

Linhagem de bactéria

DH5α: linhagem de *Escherichia coli* utilizada em experimentos de clonagem

Meios

LB: meio Luria-Bertani
YNB: Yeast Nitrogen base medium
YPD: Yeast-Pepton-Dextrose

RESUMO

O setor industrial de produção de álcool combustível, como uma atividade biotecnológica, ainda não experimentou o uso das novas tecnologias de modificação genética nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual poderia contribuir para o aumento do rendimento de etanol e/ou utilização de fontes alternativas de carbono para o processo fermentativo. Neste trabalho, linhagens industriais de *S. cerevisiae* previamente selecionadas pela capacidade de permanência no processo industrial foram utilizadas como hospedeiras em experimentos de manipulação genética com intuito de modificar o metabolismo redox de forma a aumentar o rendimento a etanol. Entretanto, a constituição genética das linhagens industriais requereu que uma série de adaptações aos procedimentos convencionais de manipulação genética em linhagens de laboratório fossem otimizadas. O primeiro tipo de atividade consistiu no desenho experimental e no aprimoramento dos procedimentos de deleção gênica baseados na recombinação de seqüências homólogas em cassetes de integração. Para este fim, o gene *GDH1*, codificador da enzima glutamato desidrogenase, foi parcial ou completamente removido do genoma da linhagem industrial com o uso de fragmentos de PCR que continham seqüências com mais de 300 bp de homologia com as regiões 5' e 3' do gene alvo. Este gene codifica a principal enzima da via de assimilação de amônia e sua remoção deve causar a substituição dos cofatores NADPH por NADH nesta via. Tanto a extensão das seqüências de homologia quanto os tipos de primers de verificação da integração e da deleção foram otimizados. A segunda estratégia consistiu na inserção genômica por integração homóloga do gene bacteriano *GAPN* codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Ao contrário da enzima da levedura, esta enzima bacteriana utiliza NADPH como cofator, ao invés de NADH, e não promove a síntese de ATP. O gene bacteriano foi clonado em um plasmídeo que apresenta seqüências das regiões 5' e 3' do gene *HO* de *S. cerevisiae* e o cassete de integração foi utilizado para inserção no lócus *HO* do genoma da levedura. Para esta atividade, os tipos de primers de verificação da integração também foram otimizados. O conjunto de procedimentos experimentais descritos neste trabalho abre oportunidades para futuras manipulações genéticas que possam produzir células recombinantes úteis para os processos industriais. Além disso, faz-se necessária a construção de vetores de integração que permitam a posterior remoção da marcas de resistência a antibióticos, mantendo-se a capacidade de adaptação aos ambientes industriais.

Palavras-chaves: Genética de Microorganismos, Biologia Celular e Molecular, Engenharia Metabólica, Leveduras-*Saccharomyces cerevisiae*, álcool combustível

ABSTRACT

The industrial production of bioethanol, as a biotechnological activity, have not yet taken the advantages of the recombinant DNA technology that can contribute to improve ethanol production by increasing ethanol yields and/or by fermenting alternative carbon sources. In this work, an industrial *S. cerevisiae* strain previously isolated for its dominance in the industrial process was used as host for genetic modification in order to improve ethanol production by modifying the redox metabolism. However, the complexity of the industrial cells genetic constitution demand for a series of adaptation in the experimental methods currently used for laboratory strains. The first approach was based on the use of linear DNA integration fragments to delete yeast genes by homologous recombination. For this purpose, the *GDH1* gene, which encodes the yeast NADPH-dependent glutamate dehydrogenase, was partially or totally deleted from the yeast genome by the use of long (over 300 bp) flanking DNA sequences with homology to the 5'-upstream and 3'-downstream sequences of the targeted gene. This gene encodes the main enzyme involved in ammonia assimilation in *S. cerevisiae* and its deletion turns ammonia assimilation to the alternative NADH-dependent pathway. It changes the cofactor normally required for ammonia assimilation and promote a redox unbalance that theoretically leads to increased ethanol production. In the course of the experiments the length of homologous regions and the procedures for cells transformation and recombinant identification were improved. The second approach was based on the site-specific integration of heterologous gene in the genome of industrial yeast. The bacterial *gapN* gene, which encodes for the non-phosphorylating glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase in *Streptococcus mutants*, was cloned under the control of the yeast *TPI1* gene promoter in an integrative plasmid that targets DNA integration to the HO locus of the yeast genome. Opposite to the yeast enzyme, the bacterial enzyme uses NADPH as cofactor and its activity does not produce ATP at substrate level during the glycolysis. Yeast transformants were obtained and confirmed after improvement in the experimental procedures currently used for laboratory yeast strains. The results described in the present work open the perspective for genetic manipulation of any bioethanol-producing yeast cells isolated from different industrial plants. Moreover, the recombinants produced will be further tested for the recently published metabolic hypothesis that proposed the redox modification via *GDH1* deletion and *gapN* expression as efficient approaches to improve bioethanol production.

Keywords: genetic of microorganisms, Cellular and Molecular biology, metabolic engineering, yeasts-*Saccharomyces cerevisiae*, alcohol

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o maior produtor de álcool combustível, seguido pelos EUA, África do Sul, Austrália e países do Caribe. A produção mundial de álcool aproxima-se dos 40 bilhões de litros por ano, dos quais 15 bilhões de litros são produzidos no Brasil. A região Nordeste é responsável por cerca de 30% da produção nacional.

No Brasil, o etanol é produzido a partir da fermentação do caldo de cana de açúcar ou melaço de cana de açúcar por células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em condições de anaerobiose. Dois são os sistemas atualmente utilizados: a batelada e o sistema contínuo. O processo fermentativo apresenta CO₂, etanol, biomassa e glicerol como produtos gerados, sendo os primeiros os mais relevantes. Entretanto, os dois últimos têm sido alvos de muitos projetos de pesquisa, pois acabam utilizando carbono e energia que poderiam ser utilizadas para aumentar a produção de etanol.

O etanol tem se tornado a alternativa mais promissora como composto carburante e fonte de energia e a demanda por este produto tem aumentado significativamente nos últimos anos, induzindo o aumento na produção nacional. Existem três alternativas para este aumento: a expansão da área plantada com cana de açúcar, o aumento no rendimento fermentativo e a utilização de outras fontes de carbono como resíduos celulolíticos. A primeira alternativa encontra barreiras ambientais, enquanto que as duas últimas requerem uma série de modificações genético-metabólicas das células da levedura. Para tanto, várias estratégias estão sendo propostas na literatura com vistas ao redirecionamento dos fluxos metabólicos para o aumento da produção de etanol, com conseqüente diminuição de glicerol e de biomassa, dentro do que se chama modernamente de “Engenharia Metabólica”.

No presente trabalho foram implementadas duas estratégias de modificação genética de vias metabólicas de uma linhagem industrial, uma delas por meio de deleção do gene *GDH1* e a outra pela a integração do gene heterólogo *gapN*. Ambas as propostas visam o redirecionamento dos fluxos metabólicos que levam a redução da produção de glicerol e a otimização do rendimento de etanol.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O bioetanol, álcool obtido através da fermentação de microorganismos, é um combustível renovável. A demanda deste combustível vem aumentando anualmente devido aos preços atrativos no mercado e às imposições das leis de proteção ambiental em alguns países, pelo fato deste combustível ser menos poluente do que a gasolina. Portanto, é de grande interesse econômico para a indústria alcooleira do Brasil a possibilidade da utilização de uma linhagem geneticamente modificada que permita o aumento do rendimento de etanol a partir da mesma quantidade de cana processada. Os resultados obtidos neste trabalho representam o início da modificação genética com linhagens industriais de *S. cerevisiae* que foram isoladas diretamente do processo fermentativo e abre perspectivas para o início da utilização da tecnologia do DNA recombinante no contexto deste setor industrial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Obtenção de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* com vias metabólicas modificadas geneticamente para otimização do rendimento fermentativo a etanol.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Construção de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente pela deleção do gene *GDH1* que atua na via de assimilação de amônia;

3.2.2. Construção de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente pela integração do gene heterólogo *gapN* proveniente da bactéria *Streptococcus mutants*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O BIOETANOL

O benefício ambiental associado ao uso de álcool é enorme, pois cerca de 2,3 t de CO₂ deixam de ser emitidas para cada tonelada de álcool combustível utilizado, sem considerar outras emissões, como o SO₂.

A cana-de-açúcar é a segunda maior fonte de energia renovável do Brasil com 12,6% de participação na matriz energética atual, considerando-se o álcool combustível e a co-geração de eletricidade, a partir do bagaço. Dos 6 milhões de hectares, cerca de 85% da cana-de-açúcar produzida no Brasil está na Região Centro-Sul (concentrada em São Paulo, com 60% da produção) e os 15% restantes na região Norte-Nordeste. Na safra 2004, das 380 milhões de toneladas de cana-de-açúcar moídas, aproximadamente 48% foram destinadas à produção de álcool. No total foram produzidos 15,2 bilhões de litros de álcool e uma geração de energia elétrica superior a 4 GWh durante a safra, o que representa aproximadamente 3% da nossa geração anual (FONTE: BIODIESELBR -<http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm> - acesso em 07/05/2006).

A comercialização dos carros bicompostíveis, tipo flex, iniciada em março de 2003, tem impulsionado a demanda interna pelo álcool hidratado. Segundo a associação Nacional de Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea), foram comercializados 40.178 veículos flex naquele ano, que representam 3.1% das vendas internas no atacado. Em 2004 passando para 328.379 automóveis, equivalente a 21.6%. Em 2005, no primeiro semestre, as vendas marcaram 302.435 unidades, 39.5% do total comercializado. (FONTE: IPARDES-http://www.ipardes.gov.br/pdf/bol_ana_conjuntural/bol_27_4g.pdf - acesso em 07/05/2006).

A figura 1 compara a produção de etanol em diferentes países e a figura 2 demonstra como o ganho de escala, a prática empresarial e as inovações tecnológicas tornaram o álcool competitivo com a gasolina.

O bioetanol é um produto biotecnológico que é gerado a partir da conversão bioquímica da glicose da sacarose da cana de açúcar em etanol e dióxido de carbono. No Brasil, muitos estudos foram feitos sobre a microbiologia

do processo, mas pouco se avançou no conhecimento de mecanismos celulares que governam a produção de etanol durante a fermentação e até o momento este setor ainda não se beneficiou do potencial da manipulação genética. A seguir serão apresentadas informações básicas sobre a levedura da fermentação e sobre as possibilidades de aprimoramento do rendimento industrial por manipulação genética.

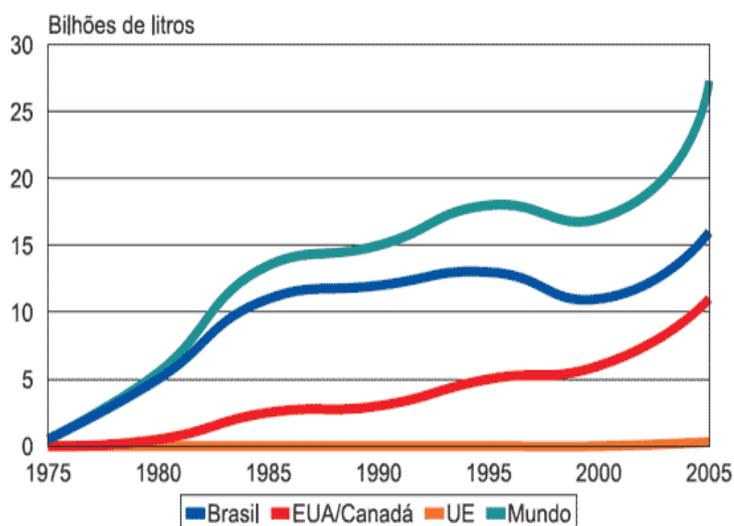


Figura 1. Produção mundial de etanol. Fonte: BIODIESELBR - <http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm> - acesso em 07/05/2006

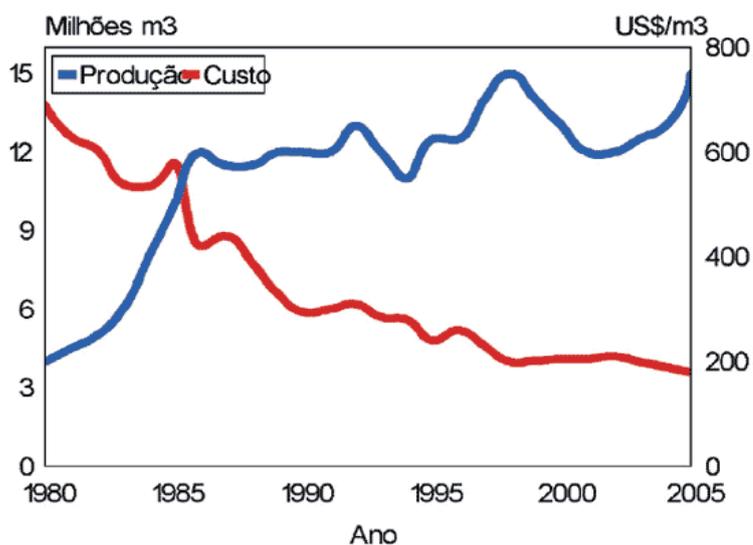


Figura 2. Produção e custo do etanol no Brasil. Fonte: BIODIESELBR - <http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm> - acesso em 07/05/2006

4.2. Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares normalmente não filamentosos, com formato esférico ou oval, amplamente distribuídas na natureza. Microorganismos eucariontes, heterotróficos, saprófitos ou parasitas, podem ser encontrados associados ao solo, húmus, plantas, animais, água ou outro substrato fornecedor de açúcar (PHAFF, 1990; WALKER, 1998).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* (ALEXOPOULOS, 1996).

As leveduras possuem cromossomos lineares de tamanhos diferentes, com DNA fita-dupla. Os cromossomos das leveduras são muito pequenos, não sendo possível a determinação do cariótipo através do bandeamento cromossômico, entretanto a cariotipagem pode ser realizada através da técnica de eletroforese em campo pulsado. Células haplóides de *S. cerevisiae* possuem 16 cromossomos que variam em comprimento de 245 a 2200 Kpb, totalizando um genoma de 14 Mpb. O genoma de *S. cerevisiae* foi completamente seqüenciado, estando em progresso a análise funcional de seus genes (WINZELER et al. 1999).

4.3. Ciclo de vida

As leveduras se reproduzem geralmente por brotamento, embora ocorram gêneros que se reproduzam por fissão, fissão-brotamento ou brotamento em base larga. Os brotos podem ser produzidos em qualquer parte da célula (brotamento multilateral), ou nos dois pólos da célula (brotamento bipolar) ou ainda em um único local da célula (brotamento monopolar) (SAMSON, 1996).

A família Saccharomycetaceae inclui leveduras que são predominantemente unicelulares e podem produzir pseudomicélio, possuem reprodução assexuada primariamente por brotamento multilateral e produzem ascósporos livres a partir de ascos que se originam tanto de um zigoto como partenogeneticamente de uma célula somática (ALEXOPOULOS, 1996). O asco é um tipo especial de esporângio no qual se desenvolvem os produtos da

meiose, os ascósporos (FINCHAN et al., 1979).

O ciclo meiótico em leveduras é caracterizado pela geração de quatro células haplóides, esporos, que são agrupadas em ascos. A divisão celular por brotamento ocorre quando uma protuberância surge na superfície externa e à medida que o broto cresce em tamanho o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto. O material da parede celular é então sintetizado entre o broto e a célula parental, e o broto eventualmente se separa da mãe. Algumas vezes, muitos brotos de diferentes gerações permanecem presos à mãe, formando grupos ou uma cadeia de células. Uma única célula pode produzir mais de vinte e quatro células-filha por brotamento (ALEXOPOULOS., 1996; TORTORA., 2002) (Figuras 3 e 4).

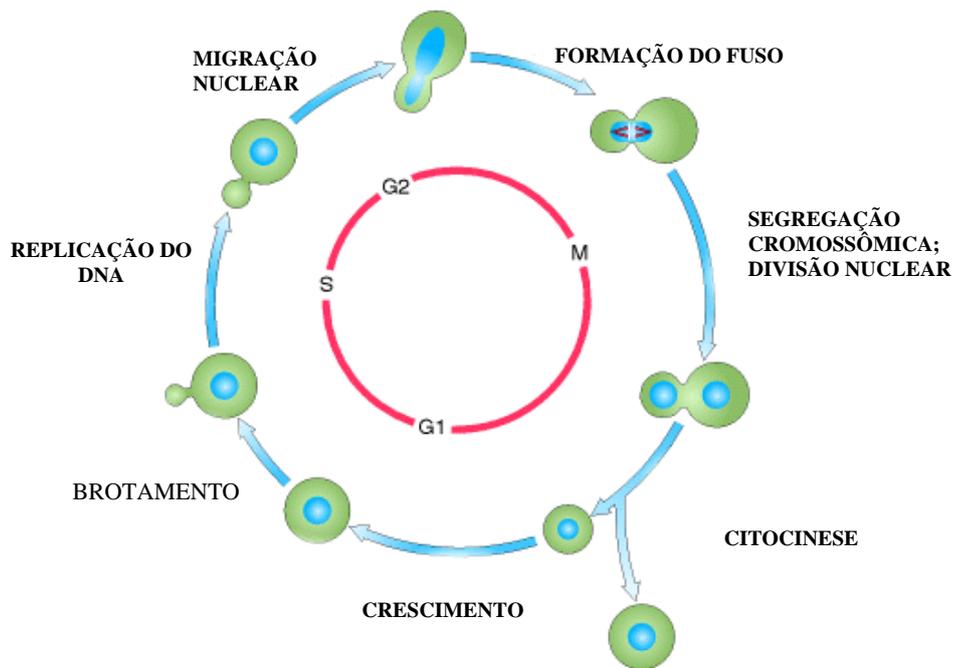


Figura 3. Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*
FONTE: Modern Genetic Analysis, Anthony J.F. Griffiths, 1999



Figura 4. Brotamento de células de levedura
FONTE: <http://www.sciencephoto.com>

Em *S. cerevisiae* encontram-se nos ascos duas células com o sinal de reprodução “a” e duas com o sinal de reprodução “ α ”, e as conjugações ocorrem apenas entre células de diferentes sinais de reprodução. Nas cepas selvagens, os dois tipos celulares haplóides podem se interconverter, ou seja, uma célula com sinal “a” pode se tornar uma com sinal “ α ” ou vice-versa (ALEXOPOULOS, 1996). Os fatores que determinam a qual sinal a célula pertence localizam-se no locus MAT (Mating Type) (CASTILHO-VALARICIUS et al., 1992; WALKER, 1998). Esta interconversão de sinais de reprodução é regida pelo mecanismo de conversão gênica, segundo o qual genes de informação (a) ou (α), presentes nos loci HMR ou HML, localizados próximo ao telômero do cromossomo III, são transferidos para o locus de expressão MAT, localizado no mesmo cromossomo. As cepas de leveduras utilizadas em laboratório para estudos genéticos são heterotáticas, não portadoras da propriedade de interconversão, e dessa forma as células haplóides expressam sempre o mesmo sinal de reprodução (a ou α), o que garante a estabilidade das informações genéticas em estudo. Em espécies homotáticas selvagens ocorre uma mutação no locus HO, é codificada uma endonuclease sítio específica responsável pela conversão gênica e promove a diploidização de linhagens haplóides (CASTILHO-VALARICIUS et al., 1992; VOTH et al, 2001; KLAR, 1987) (Figura 5).

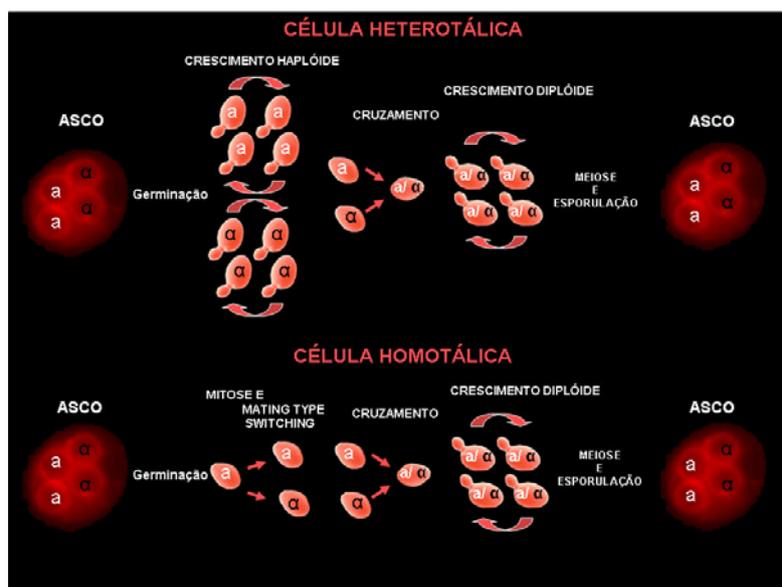


Figura 5. Ciclo de vida da célula heterotática e da célula homotática em *Saccharomyces cerevisiae*.

O genoma da *S. cerevisiae* foi completamente seqüenciado por um consórcio de laboratórios em diferentes países. A sucessão de 12.068 kilobases definem 6.400 genes potencialmente codificadores de proteínas, havendo ainda aproximadamente 140 genes que especificam RNAr, 40 genes para pequenas moléculas de RNA nucleares e 275 genes de RNAt. O seqüenciamento gerou um conjunto de informações sobre a organização dos seus 16 cromossomos e permitiu algumas deduções sobre a sua história evolutiva. O genoma mostra uma quantidade considerável de redundância genética (GOFFEAU et al., 1996).

4.4. Aplicações de *S. cerevisiae*

O reino Mycota compreende uma enorme biodiversidade, tornando-se modelo de organismos cujas aplicações compreendem a produção de combustível, produtos químicos, produtos alimentícios, fármacos e enzimas. O melhor exemplo destes é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um dos melhores modelos de organismos eucariotos para estudos sobre os processos biológicos fundamentais (JEWETT et al, 2006 e HOHMANN, 2005).

Saccharomyces cerevisiae é utilizada há dezenas de séculos como fermento, na panificação e produção de vinhos. Evidências moleculares de sua presença em fermentação de vinho foi obtida em jarras escondidas no túmulo

do rei Scorpion I, um dos primeiros reis do Egito, datando de 3150_{BC} (CAVALIERI et al., 2003). Recentemente a levedura *S. cerevisiae*, modelo há anos para estudos genômicos, tem atraído interesse como modelo para estudos de ecologia e genética evolutiva (LANDRY et al., 2006).

Com capacidade de crescimento anaeróbico facultativo, esta levedura pode utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como acceptor final de elétrons, o que lhes permite sobreviver em vários ambientes. Na presença de oxigênio, as leveduras respiram para metabolizar os carboidratos até dióxido de carbono e água. Na ausência de oxigênio, as células fermentam os carboidratos até etanol e dióxido de carbono (TORTORA et al, 2002).

As células de levedura transformam os açúcares dos diferentes substratos em vários produtos de interesse comercial através do processo de fermentação. Este processo é utilizado na indústria de alimentos para produção de vinhos, cerveja, bioetanol e pão. Além disso, leveduras são utilizadas na indústria química (produção de enzimas, pigmentos, acidulantes de alimentos e redutores químicos), na indústria farmacêutica (vacinas, hormônios, probióticos e fatores sanguíneos), na tecnologia ambiental (controle biológico, biorremediação, utilização de subprodutos industriais, bioabsorção de metais), nas pesquisas biomédicas (metabolismo de drogas, doenças genéticas humanas, câncer e AIDS), além das pesquisas fundamentais nas áreas de biologia celular, bioquímica, genética molecular e biologia molecular (WALKER, 1998). As indústrias de bebida à base de fermentação alcoólica dependem da habilidade de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* de converter os açúcares dos diferentes substratos (maltose, sacarose, amido) em glicose, e este em dióxido de carbono e etanol (WEALS et al. 1999).

4.5. Fermentação alcoólica

A formação de etanol em *Saccharomyces* e em outras leveduras ocorre a partir da assimilação da glicose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas, ou via glicolítica. Nessa via a glicose é oxidada a gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é convertido a piruvato, o qual é descarboxilado a acetaldeído. Na reação subsequente o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase as custas de NADH⁺. Os

dois NAD^+ formados são utilizados na oxidação de outra molécula de glicose, mantendo-se assim o equilíbrio redox (redução-oxidação) na célula (WALKER, 1998) A diidroxiacetona pode ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato, e posteriormente a etanol, ou, alternativamente, reduzida a glicerol (Figura 6).

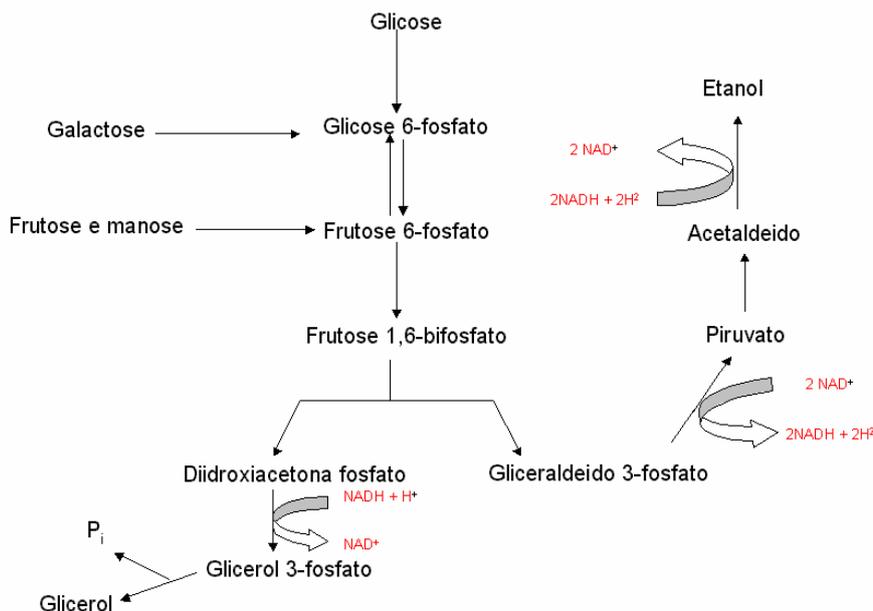


Figura 6. Mapa do metabolismo central mostrando a produção de etanol e de glicerol a partir da glicose assimilada.

No processo completamente anaeróbio 1 g de glicose renderia teoricamente 0,51 g de etanol e 0,49g de CO_2 . Entretanto, devido à produção de biomassa, o rendimento de 0.46 g de etanol e de 0.44 g de CO_2 a partir de 1 g de glicose é mais realístico.

No processo de produção de álcool combustível no Brasil, o caldo de cana cru ou o melaço são fermentados pela *S. cerevisiae* ao longo de toda a safra. Após cada batelada de fermentação, ou durante o processo de fermentação contínua, as células de levedura são separadas do meio fermentado por centrifugação e reutilizadas no processo, após serem tratadas com ácido sulfúrico para redução da contaminação bacteriana. A elevada concentração de açúcar no meio de fermentação, temperatura entre 33°C e 35°C e o ambiente anaeróbio contribuem para a maior eficiência na produção

de etanol. O curto tempo de fermentação de 6 h a 10 h nas fermentações em batelada permite a reutilização das leveduras até três vezes por dia, num período de aproximadamente 200 dias de atividade fermentativa (WEALS et al. 1999).

O glicerol é o principal subproduto da fermentação em *S. cerevisiae*. Em condições normais o glicerol é liberado para o meio extracelular, porém em condição de estresse osmótico acumula-se no citoplasma. O glicerol se acumula no meio intracelular devido a um aumento de sua síntese, retenção pela membrana plasmática ou absorção a partir do meio extracelular. O glicerol é sintetizado pela redução da diidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fostato, uma reação catalisada pela enzima glicerol-3-fostato desidrogenase (GPD), seguida pela defosforilação do glicerol-3-fostato pela glicerol-3-fostato fosfatase (GPP). Essas enzimas são produtos dos genes *GPD1* ou *GPD2* e *GPP1* ou *GPP2*, respectivamente. A diidroxiacetona fosfato pode ser formada a partir da quebra de frutose-1,6-difosfato ou alternativamente a partir de gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triose-3-fosfato isomerase. Essa via parece ser a única rota para a produção de glicerol em *S. cerevisiae*, uma vez que mutantes $\Delta gpd1/\Delta gpd2$ não produzem glicerol. A produção de glicerol é maior em meio rico em glicose (NEVOIGT e STAHL, 1997).

4.6. Metabolismo redox em *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma completamente seqüenciado (DUJON, 1996). Seu genoma compreende em torno 6.400 genes que estão anotados e sendo estudados detalhadamente. Isso é possível devido à disponibilidade de vários bancos de dados cujas informações podem ser avaliadas e interpretadas ou formuladas hipóteses sobre a sua genética (Tabela 1). Para entender, caracterizar e explorar os fungos completamente, pesquisas científicas estão sendo desenvolvidas para entender detalhadamente seu metabolismo. Caracterizar o metabolismo dos fungos é muito importante, em particular sua diversidade química através de suas vias e seus metabólitos pelos compartimentos celulares (JEWETT, 2006).

O balanço redox citosólico é pré-requisito para a vida celular, para

manter a atividade metabólica em ordem e possibilitar o crescimento celular. A levedura *S. cerevisiae* carece de atividades transidogenases (BRUINENBERG, 1985 e VAN DIJKEN, 1986) e os pares redox NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ são compartimentalizados em estruturas membranares. Por isso, para manter o balanço redox, as coenzimas redutoras tem que ser reoxidadas no compartimento em que são produzidas. (BRUINENBERG. et al, 1983; ALBERS et al, 1998; BAKKER . et al, 2001; MICHEL et al, 2004;).

Tabela 1. Bancos de dados para *Saccharomyces cerevisiae*

| Recurso | URL | Referência |
|--|---|--------------------------------------|
| Saccharomyces Database (SGD) | http://www.yeastgenome.org | WENG <i>et al</i> , 2003 |
| Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD) | http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast | GULDENER <i>et al</i> . 2005 |
| Genome Database | http://genome-www5.stanford.edu/ | GOLLUB <i>et al</i> . 2003 |
| Genolevures | http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php | Sherman <i>et al</i> .2004 |
| Saccharomyces Genome Deletion Project | http://www.sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html | WINZELER <i>et al</i> . 1999 |
| Genemerge | http://www.oeb.harvard.edu/hartl/lab/publications/GeneMerge/GeneMerge.html | CASTILLO-DAVIS & HARTL 2003 |
| Oathway Processor | http://cgr.harvard.edu/cavaliери/pphtml | GROSU <i>et al</i> , 2002 |
| Bagel | http://web.uconn.edu/townsend/software | TOWNSEND & HARTL 2002, TOWNSEND 2004 |

A síntese de 1 mol de glicerol resulta no consumo de 1mol de NADH, enquanto que outros bio-produtos, como acetato, conduzem à produção do NADH citosólico. Contudo, a grande parte do NADH em excesso no citosol é direcionado para a produção de biomassa (ALBERS et al, 1996). A síntese de proteínas, ácidos nucleicos e até mesmo os lipídeos reduzidos são associados com a produção assimilatória de NADH, ou seja, o NADH produzido durante o metabolismo respiratório. Em anaerobiose, a única maneira de *S. cerevisiae* reoxidar o excedente de NADH produzido a partir da produção de biomassa é pela síntese de glicerol (ALBERS et al, 1998; ALBERS et al, 1996; NORDSTRÖM , 1968; MICHEL et al, 2004).

A formação de glicerol cumpre dois papéis fisiológicos em *S. cerevisiae*, estando envolvido no metabolismo do carbono em diferentes rotas. Por um lado, ele é utilizado como única fonte de carbono sob condições aeróbicas a partir de sua assimilação como gliceraldeído 3-fosfato, o qual é dirigido para o ciclo de Krebs e cadeia respiratória e posterior. O glicerol é um bio-produto tanto do crescimento celular aeróbio, pois o excedente líquido de NADH gerado pela produção de ácidos orgânicos (succínico, acético e pirúvico) deve ser reoxidado, como da fermentação alcoólica. Portanto, a produção de glicerol é absolutamente essencial para a manutenção do equilíbrio redox e em células mutantes para a via de produção de glicerol estas mostram-se inaptas para crescer em condições anaeróbicas. Além disso, esta reoxidação de NADH via produção de glicerol também é importante para a reciclagem do fosfato inorgânico usado na glicólise (ANSELL et al 1997; THEVELEIN e HOHMANN, 1995).

A formação de glicerol e sua acumulação intracelular constituem também um mecanismo de osmorregulação, protegendo a célula contra o excesso de pressão de turgescência e é essencial para o restabelecimento das atividades biológicas durante a osmorregulação da célula. O papel que o glicerol desempenha como osmorregulador em *S. cerevisiae* foi bem apresentado por Blomberg e Adler (1989) quando mostrado que a concentração intracelular deste soluto era proporcional à concentração de sal nos experimentos de estresse osmótico.

4.7. Engenharia Metabólica em *Saccharomyces cerevisiae*

A modificação de reações bioquímicas específicas ou introdução de novas vias com o uso da tecnologia do DNA recombinante constituem o que hoje é denominado de engenharia metabólica. Ela se divide em uma etapa analítica, na qual se analisa a célula para identificar o alvo mais promissor para manipulação genética e em uma etapa de engenharia genética das células, na qual as modificações genéticas são geradas (OLSSON e NIELSEN, 2000; OSTERGAARD et al, 2000). Algumas estratégias de engenharia metabólica em leveduras vêm sendo propostas para redirecionar o fluxo de carbono destinado à produção de glicerol para etanol.

4.8.1. Deleção gênica para otimização do rendimento em etanol

Em *S. cerevisiae* a redução de NAD^+ para NADH ocorre em processos dissimilatórios bem como em reações de assimilação. Existem diversos mecanismos de reoxidação de NADH nesta levedura, dentre elas a fermentação alcoólica, a produção de glicerol, a respiração do NADH citosólico via NADH desidrogenase mitocondrial externa, respiração do NADH via o *shuttle* glicerol-3-fosfato e oxidação do NADH intramitocondrial via NADH desidrogenase mitocondrial interna. Existe uma compartimentalização que ocorre em consequência da impermeabilidade da membrana interna da mitocôndria ao NADH e NAD^+ (BAKKER et al, 2001).

Em anaerobiose, a reoxidação não pode ser realizada na cadeia respiratória, e então o excesso de NADH é reoxidado via produção de glicerol por redução da diidroxiacetona fosfato, havendo, conseqüentemente, subtração de intermediários de cadeia carbonada da glicólise para este fim.

Analisando o fluxo metabólico em anaerobiose de culturas em condições limitadas de glicose, Nissen et al (1997) mostraram a formação de NADH na matriz mitocondrial. Em particular, a síntese de glutamato a partir do piruvato, que envolve o complexo piruvato desidrogenase e isocitrato desidrogenase, é a maior fonte para biossíntese deste NADH (Figura 7).

Uma estratégia para diminuir o impacto negativo da produção de glicerol no rendimento alcoólico consiste em alterar o tipo de coenzima reduzida requerida para a assimilação de amônia catalisada pela enzima glutamato desidrogenase dependente de NADPH, que em *S. cerevisiae* é codificada pelo gene *GDH1*.

A principal via de assimilação de amônia em *S. cerevisiae* ocorre pela ação da glutamato desidrogenase dependente de NADPH (GDH-NADPH) (Tabela 2) que converte 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) a glutamato. Subseqüentemente, glutamato é convertido a glutamina pela incorporação de outro íon amônio às custas de ATP pela glutamina sintetase (GS) acoplada a glutamato sintase, ou glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (Tabela 2). Quando a concentração de amônia é alta no meio, acima de 5 mM, a assimilação ocorre pela via GDH-NADPH. Por outro lado, em baixas

concentrações de amônia, a assimilação deste composto ocorre pela via GS-GOGAT que utiliza NADH como coenzima (Tabela 2).

A substituição da rota envolvendo o gene *GDH1* pela segunda rota que envolve duas reações acopladas GS-GOGAT permite reoxidar NADH a NAD⁺ durante a síntese de glutamato a partir de amônia, diminuindo a produção de glicerol associada ao crescimento celular em anaerobiose. Além disso, ocorre uma demanda adicional de ATP para a biossíntese celular produzindo um aumento de parte do fluxo glicolítico que vai a etanol, em detrimento ao fornecimento de precursores para a biossíntese protéica (Tabela 2), ou seja, cai o rendimento em células e aumenta o rendimento em etanol (NISSEN et al, 2000). A soma das duas últimas rotas permite a síntese de glutamato com consumo de NADH e ATP.

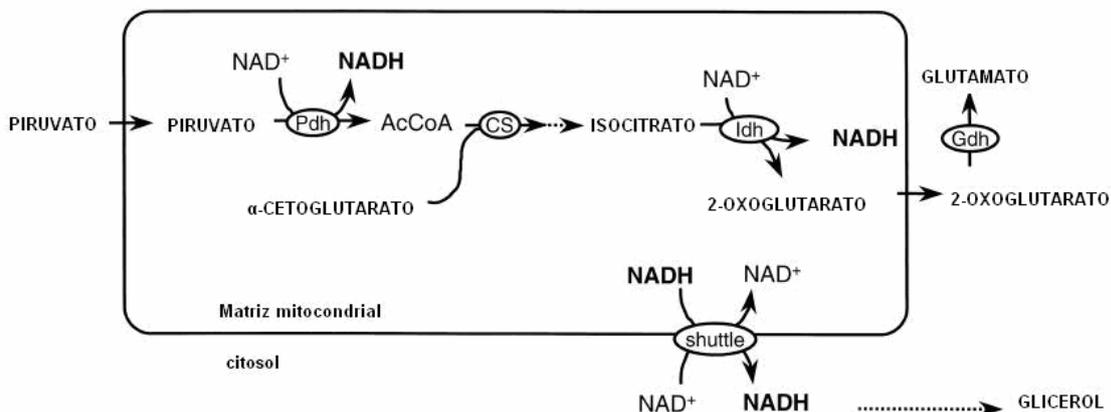


Figura 7. Função fisiológica do tráfego redox etanol-acetaldeído sob condições anaeróbicas. Na biossíntese dos aminoácidos, NADH mitocondrial é gerado. Sob condições anaeróbicas o NADH pode ser reoxidado via formação de glicerol, antes de ser transportado para citosol. Pdh, complexo piruvato desidrogenase; CS, citrato sintase; Idh, isocitrato desidrogenase; *GDH1*, glutamato desidrogenase.

Tabela 2. Genes e enzimas codificadas das rotas de assimilação de amônia em *Saccharomyces cerevisiae*

| GENE | ENZIMA | ROTA METABÓLICA |
|--|-------------------------|--|
| <i>GDH1</i> | glutamato desidrogenase | α -cetoglutarato + NH ₄ ⁺ + NADPH → glutamato + NADP ⁺ |
| <i>GLN1</i> | glutamina sintetase | Glutamato + NH ₄ ⁺ + ATP → glutamina + ADP + Pi |
| <i>GLT1</i> | glutamato sintase | α -cetoglutarato + glutamina + NADH → 2 glutamato + NAD ⁺ |
| Σ α -cetoglutarato + NH ₄ ⁺ + NADH + ATP → glutamato + NAD ⁺ + ADP + Pi | | |

Para se alterar a via de assimilação é necessária a eliminação da atividade da enzima *GDH-NADPH* através da deleção do gene *GDH1*. Esta deleção pode ser feita a partir do uso de técnicas moleculares que utilizam cassetes de integração gênica como o loxP-KanMX-loxP, que apresenta a marca de seleção KanMX. Um sistema análogo a este foi utilizado pela “European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional analysis - EUROSCARF” em um consórcio de deleção de mais de 4000 genes de *S. cerevisiae* com cassetes de deleção construídos por PCR e que apresentam a marca de seleção KanMX ladeado por regiões homólogas de 40 pb.

Para o aperfeiçoamento do sistema de deleção é importante a presença de uma marca de seleção. Marcas de resistência a antibióticos são dominantes e não requerem linhagens com mutações auxotróficas. Porém, por várias razões estas marcas devem ser retiradas, incluindo o uso em linhagens industriais e a reutilização da mesma marca em outras deleções (GÜLDENER et al, 1996; REGENBERG e HANSEN, 2000; STEENSMA e TER LIND, 2001). Uma das marcas de seleção positiva mais utilizada é o gene que confere resistência em leveduras ao antibiótico Geneticina (G-418), o qual é o mesmo que confere resistência bacteriana ao antibiótico Kanamicina. Este gene é bastante utilizado para interromper genes clonados e, conseqüentemente, gerar deleções gênicas a partir de transformações celulares com esta seqüência interrompida. Entretanto, para utilização em linhagens industriais, as legislações ambientais brasileiras não permitem a liberação de organismos geneticamente modificados que possuam marcas de resistência a antibióticos. Portanto, faz-se necessária a remoção da marca de seleção das células recombinantes, que pode ser feita a partir de eventos de recombinação intracromossomal entre as seqüências repetidas que ladeiam a marca de seleção, tais como seqüências *hisG* e loxP. Este evento pode ser induzido pela presença de uma recombinase Cre que é codificada por um gene presente em plasmídio epissomal auxiliar (STEENSMA e TER LINDE 2001).

O cassete loxP-KanMX-loxP já presente em uma linhagem recombinante da coleção EUROSCARF constitui uma excelente ferramenta para a produção de fragmentos de deleção por integração homóloga. Para isto, é necessário a amplificação deste cassete com primers que reconheçam as porções 5' e 3' do gene que está deletado na linhagem recombinante (Figura

8a). Assim, o cassete de deleção conterá o gene KanMX4 ladeado pelas regiões loxP, e estas sendo ladeadas pelas seqüências homólogas ao gene alvo. Desta forma, o fragmento de DNA contendo [região alvo 5'-loxP-KanMX-loxP-região alvo 3'] poderá ser utilizado para transformação celular e deleção do gene por recombinação homóloga (Figura. 8B).

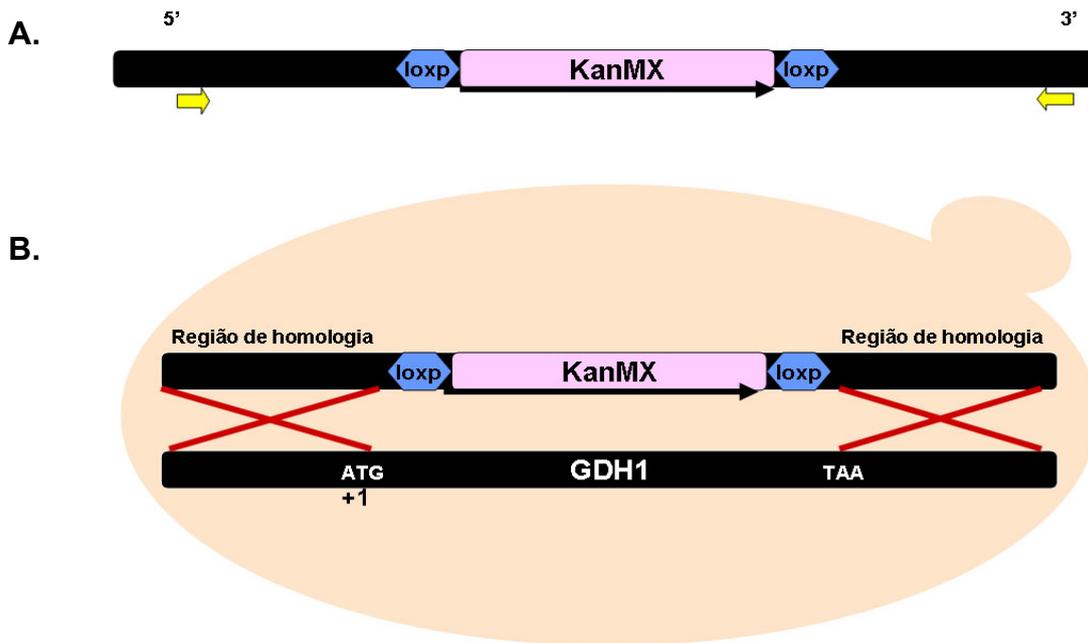


Figura.8. Estratégia para deleção gênica a partir da amplificação de um cassete de deleção já integrado em uma linhagem mutante. **A.** Construção do cassete de integração com regiões longas de homologia usando primers (setas em amarelo) que emparelhem com as regiões 5' e 3' do gene já deletado pelo cassete KanMX. **B.** Recombinação homóloga e interrupção gênica da linhagem-alvo com o produto de amplificação contendo o cassete de deleção ladeado pelas seqüências de homologia.

4.8.2. Integração gênica para otimização do rendimento de etanol

Outra estratégia de engenharia metabólica para redirecionar o fluxo de carbono destinado à produção de glicerol para etanol é a expressão heteróloga do gene *gapN*, o qual codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.9) em *Streptococcus mutans*. GAPN é uma enzima tetramérica pertencente a primeira classe da superfamília das aldeído desidrogenases (ALDH), que participam em vários níveis do metabolismo celular. A análise a

partir do alinhamento da seqüência de aminoácidos mostrou que GAPN compartilha 20% a 30% de identidade com a superfamília das aldeído desidrogenases (HABENICHT, 1997). É encontrada em células fotossintéticas e não-fotossintéticas de plantas superiores, microorganismos fotossintéticos, e em várias eubactérias, tais como certas linhagens de *Streptococci*.

Esta enzima cataliza a oxidação irreversível de gliceraldeído-3-fosfato (D-G3P) e NADP^+ em 3-fosfoglicerato (3-PGA) e NADPH na via glicolítica. Estudos recentes mostraram que certas linhagens de *S. mutans* não possuem as enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) para as reações de oxidação da via da pentose monofosfato. Como conseqüência, membros desta espécie usam alternativamente um mecanismo para gerar NADPH. Essa bactéria vence este dilema metabólico processando duas atividades gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma específica para NAD^+ e outra específica para NADP^+ . A enzima NAD^+ específica satisfaz o requerimento para a via glicolítica, enquanto a enzima NADP^+ específica deve ser responsável pela geração de NADPH para biossíntese. Portanto, é requerida para suprir a falta das enzimas redutoras de NADP^+ na via oxidativa da hexose fosfato nesse organismo (HABENICHT, 1997; MARCHAL et al, 2001; MARCHAL e BRANLANT, 2001; BROWN e WITTENBERGER, 1971; BOWDEN, 1991; LOESCHE, 1986; WITTENBERGER e CROW, 1976; YAMADA e CARLSSON, 1973; BOYD et al, 1995).

Em *S. cerevisiae*, a conversão de gliceraldeído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato ocorre via duas reações catalisadas pela glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)- NAD^+ dependente e pela fosfoglicerato quinase (PGK), convertendo NAD^+ em NADH e ADP a ATP, respectivamente. Nessa estratégia, a produção de glicerol é substituída pela produção de etanol envolvendo a oxidação de NADH. Em estudo recente, uma linhagem de levedura modificada geneticamente pela integração do gene *gapN* desta enzima apresentou uma queda na produção de glicerol de 40% e um aumento de 3% no rendimento em etanol sem afetar a taxa de crescimento específica máxima. Isto se dá pela substituição de parte da via normal de *S. cerevisiae*, de redução de NAD^+ , pela via bacteriana, de redução de NADP^+ (Figura 9). A reação resultante da glicose a etanol re-oxidiza a mesma quantidade de NADH por

glicose como a reação da glicose a glicerol e produz NADPH ao invés de usar ATP, resultando na produção alta de biomassa de acordo com o modelo metabólico predito. (BRO e cols., 2006).

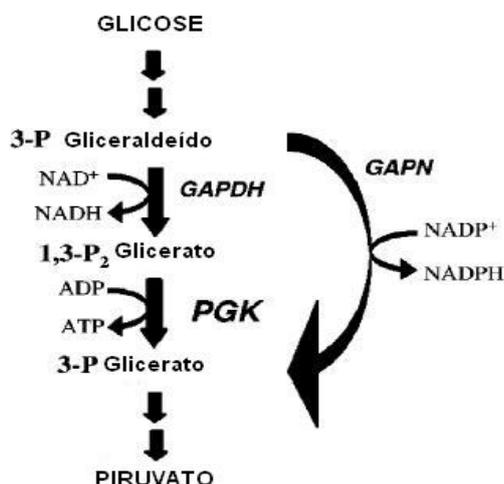


Figura 9. Esquema do *by-pass* de parte da oxidação do gliceraldeído 3-fosfato em *S. cerevisiae* pela nova via promovida pela introdução do gene *gapN*.

Os resultados obtidos por Nissen e cols. (2000) e Bro e cols. (2006) foram gerados em condições laboratoriais que diferem das industriais principalmente pela composição dos meios e pela relação biomassa/volume. Além disso em meios naturais aminoácidos são a principal fonte de nitrogênio o que reduziria o efeito da alteração feita nas linhagens de Nissen e cols. (2000).

4.8.3. Análise *in silico* da deleção de *GDH* e integração de *gapN*

Diversos metabólitos de *S. cerevisiae* envolvidos nas diversas reações bioquímicas estão presentes no banco de dados de vias metabólicas Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (KANEHISA et al, 2004) e no Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) (MEWES et al, 2004).

Essas estratégias metabólicas de deleção do gene *GDH1* e integração do gene *gapN* foram analisadas recentemente por estudos estatísticos envolvendo algoritmos. Essa ferramenta permite a análise de dados do transcriptoma celular. Estes métodos raramente proporcionam a percepção da arquitetura regulatória do metabolismo sem a análise inteligente destes resultados (PATIL e NIELSEN, 2005).

Entretanto, dados recentes mostram que para maioria desses genes a indução é promovida por efeitos pleiotrópicos que nada tem a ver com o mecanismo estudado. Desta forma, faz-se necessário a comparação entre os dados de expressão gênica (transcriptoma), os níveis de produção das diversas proteínas celulares naquela condição (proteoma) e os níveis dos metabólitos (metaboloma). Com isso, constitui-se um quadro mais completo sobre a importância daquele gene no contexto estudado (IHMEELS, LEVY et al, 2004 ; DERISI et al, 1997 ; MIKI et al, 2001; EISEN et al, 1998; HERRERO et al, 2004; SHERLOCK, 2000).

No estudo realizado por Patil e Nielsen (2005) foram analisados os dados da linhagem selvagem de *S. cerevisiae* e do mutante para deleção do gene *GDH1*. A análise fisiológica desta linhagem demonstrou um efeito no metabolismo redox, observado pelo aumento do rendimento de etanol e diminuição da produção de glicerol (BRO e cols. 2006). Usando o método de algoritmos puderam ser observados vários metabólitos repórter, incluindo amônia, glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato e sedoheptulose 7-fosfato. De fato a identificação da amônia como metabólito é sensato, pois a via de assimilação da amônia foi alterada. É mais difícil saber por que estes três açúcares fosfatados aparecem como metabólitos repórter. Contudo, estes representam pontos de ramificação da EMP (Embden–Meyerhof–Parnas) e da via das pentoses fosfato. Após a deleção de *GDH1*, a exigência de NADPH em conexão com o crescimento celular é reduzida em cerca de >40% (MARCHAL et al, 2001), com redução da requisição para o desvio de glicose através da via das pentoses fosfato, que atua como fonte primária de NADPH em *S. cerevisiae* (PATIL e NIELSEN, 2005).

Com a análise matemática do banco de dados foram encontrados 181 genes no MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) distribuídos em 68 categorias funcionais, dos quais 31% para o metabolismo dos aminoácidos e transporte, utilização dos carboidratos e metabolismo dos nucleotídeos. Além de *GDH1* foram encontrados 10 genes codificadores de enzimas catalizadoras de reações de oxidoredução envolvendo os co-fatores NADPH/NADH, demonstrando claramente o efeito da deleção de *GDH1* no metabolismo redox. De fato, esses co-fatores representam as duas chaves para o metabolismo celular (PATIL e NIELSEN, 2005; MEWES et al, 2004).

Usando-se este tipo de abordagem analítica, a integração de *gapN* mostrou ser a melhor estratégia para otimização do rendimento em etanol. Esta estratégia prediz que a produção de glicerol é substituída pela produção de etanol envolvendo a oxidação de NADH. Entretanto, os resultados *in vivo* mostraram que a produção de glicerol não foi completamente eliminada como prevista pelo modelo matemático (BRO et al, 2006). Isto indica que existem outros tipos de interações nas redes metabólicas que tendem a manter as concentrações constantes dos metabólitos e que ainda não estão bem definidas.

Estas análises *in silico* dependem do conhecimento não apenas das vias metabólicas como também da integração entre elas (Figura 10). A identificação de pontos metabólicos chaves e dos cofatores e intermediários das reações bioquímicas podem, então, dirigir modificações genéticas específicas capazes de contribuir para o redirecionamento dos fluxos metabólicos que teriam como resultado final o aumento na produção do metabólito de interesse.

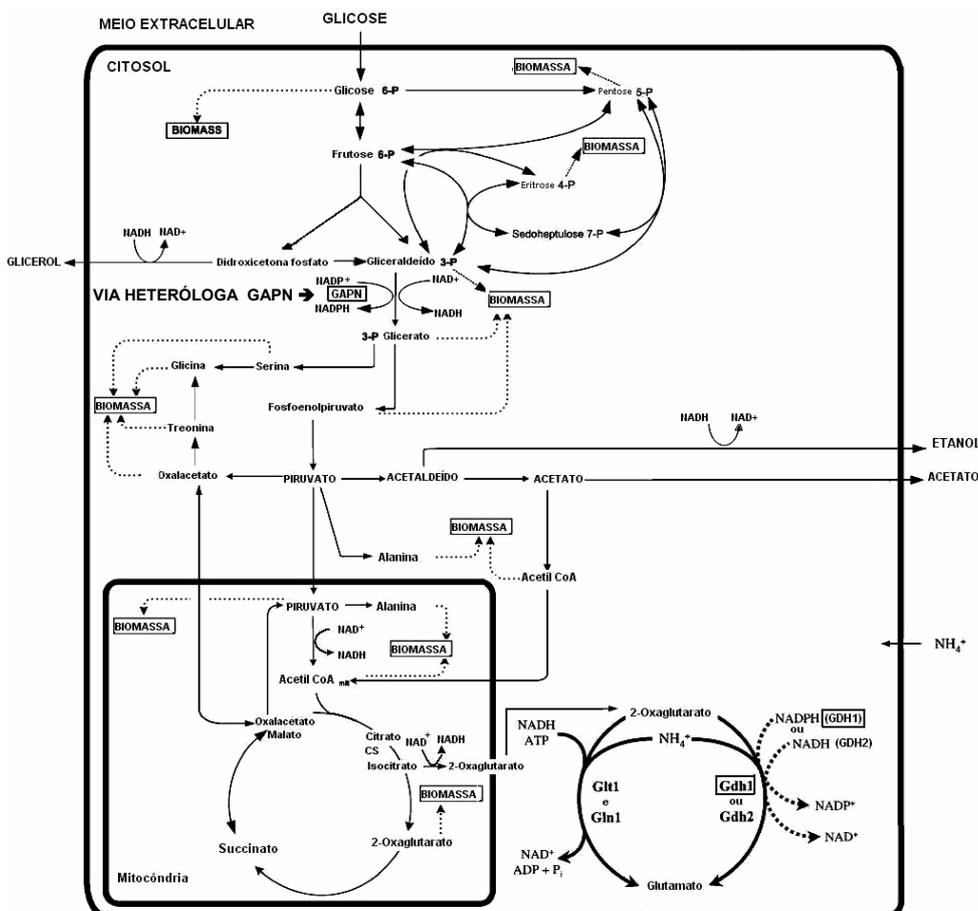


Figura 10. Mapa metabólico mostrando a integração entre a glicólise e via de assimilação de amônia. A introdução da reação enzimática catalizada pelo produto do gene bacteriano *gapN* está mostrada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS E, LARSSON C, LINDÉN G, NIKLASSON C, GUSTAFSSON L Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae*. Anaerobic growth and product formation. **Appl Environ Microbiol** 62: 3187–3195, 1996.

ALBERS E, LIDÉN G, LARSSON C, GUSTAFSSON L Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Recent Res Dev Microbiol** 2: 253–279, 1998.

ALEXOPOULOS,C.J., MIMS,C.W. and BLACKWELL,M. **Introductory Micology**. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., pp:272-285, 1996.

ANSELL, R., GRANATH, K., HOHMANN, S., THEVELEIN, J.M. AND ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD.-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **EMBO J.** 16, 2179-2187, 1997.

ANTHONY J. F. GRIFFITHS, JEFFREY H. MILLER, WILLIAM M. GELBART *Genética Moderna*, **Ed.** Guanabara Koogan, 1ed, 589p, 2001

BAKKER, B.M., OVERKAMP,K.M.,VAN MARIS,A.J., KOTTER,P., LUTTIK,M.A., VAN DIJKEN, J.P.,PRONK, J.T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology** , 25(1):15-37, 2001.

BLOMBERG, A., AND L. ADLER. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** 171:1087–1092, 1989.

BOWDEN, G. H. W. Which bacteria are cariogenic in humans? **Dental caries.** 1:266–286, 1991.

BOYD D. A., CVITKOVITCH D. G., AND HAMILTON I. R. Sequence, Expression, and Function of the Gene for the Nonphosphorylating, NADP-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus mutans* . **Journal of Bacteriology.** 177: 2622–2727, 1995.

BIODIESELBR Álcool - Etanol Brasileiro.

Disponível em:<<http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm>> Acesso em 07/05/2006

BRO, C., REGENBERG, B. & NIELSEN, J. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production

Biotechnol. Bioeng. 85: 269–276, 2006.

BROWN, A. T., AND C. L. WITTENBERGER Mechanism for regulating the distribution of glucose carbon between the Embden-Meyerhof and hexosemonophosphate pathways in *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol.** 106:456–467, 1971.

BRUINENBERG, P.M., VAN DIJKEN, J.P., SCHEFFERS WA. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. **J Gen Microbiol** 129: 953–964, 1983.

BRUINENBERG, P.M., VAN DIJKEN, J.P., KUENEN, J.G. AND SCHEFFERS, W.A. Oxidation of NADH and NADPH by mitochondria from the yeast *Candida utilis*. **J. Gen. Microbiol.** 131: 1043-1051, 1985.

CASTILHO-VALAVICIUS, B.A. et al. The molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 44(5): 301-309, 1992.

CASTILLO-DAVIS CI, HARTL DL Genemerge — post-genomic analysis, data mining, and hypothesis testing. **Bioinformatics.** 19: 891–892, 2003.

CAVALIERI D, MCGOVERN PE, HARTL DL, MORTIMER R, POLSINELLI M Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. **Journal of Molecular Evolution**, 57:226–232, 2003.

DERISI, J.L., IYER, V.R., AND BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science** 278: 680–686, 1997.

DUJON, B. The yeast genome project: What did we learn? **Trends Genet.** 12: 263–270, 1996.

EISEN MB, SPELLMAN PT, BROWN PO, BOTSTEIN D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci.** 95:14863-14868, 1998.

EUROSCARF. Worldwide gene deletion project (EUROFAN II) <<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/projects.html>> Acesso em: 22 de maio de 2006

FINCHAN,J.R.S.; DAY,P.R. and RADFORD, A. **Fungal Genetics, Botanical Monographs.** 4th ed. Los Angeles: Blackwell Scientific Publications, v.4, pp: 12-16, 1979.

GOFFEAU, A.L.et al. Life with 6000 genes, **Science**, 274 : 546-567, 1996.

GOLLUB J, BALL CA, BINKLEY G *ET AL.* The Stanford microarray database: data access and quality assessment tools. **Nucleic Acids Research**, 31: 94–96, 2003.

GROSU P, TOWNSEND JP, HARTL DL, CAVALIERI D Pathway Processor: a tool for integrating whole-genome expression results into metabolic networks. **Genome Research**, 12: 1121–1126, 2002.

GÜLDENER, U., HECK, S., FIEDLER, T., BEINHAUER,J.,HEGEMANN,J.H.. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic Acids Research.** 24 (13):2519-2524, 1996.

GÜLDENER U, MUNSTERKOTTER M, KASTENMULLER G. CYGD: the comprehensive yeast genome database. **Nucleic Acids Research**, 33, 364–368, 2005.

HABENICHT A. The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemistry, structure, occurrence and evolution. **Biol. Chem.** 378:1413–1419, 1997.

Herrero, J., Vaquerizas, J. M., Al-Shahrour, F., Conde, L., Mateos, A., Diaz-Uriarte, J. S. R. & Dopazo, J. New challenges in gene expression data analysis and the extended GEPAS. **Nucleic Acids Res.** 32, W485–W491, 2004.

HO, N. W., CHEN, Z., BRAINARD, A. P., SEDLAK, M. Successful design and development of genetically engineered *Saccharomyces* yeasts for effective

cofermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 65:163-192, 1999.

HOHMANN S. The Yeast Systems Biology Network: mating communities. **Curr Opin Biotechnol**, 16:356-360, 2005.

IPARDES- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Setor sucroalcooleiro: conjuntura e perspectiva. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/pdf/bol_ana_conjuntural/bol_27_4g.pdf> Acesso em: 07 de maio de 2006

JEWETT M. C, HOFMANN G. AND NIELSEN J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, 17:191–197, 2006.

ÚNICA- UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Álcool Combustível. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>> Acesso em 07/05/2006

IHMELS, J., LEVY, R., AND BARKAI, N. Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nat Biotechnol** 22: 86–92, 2004.

JEWETT M. C, HOFMANN G. AND NIELSEN J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, 17:191–197, 2006.

KANEHISA,M., GOTO,S., KAWASHIMA,S., OKUNO,Y. AND HATTORI,M. The KEGG resources for deciphering the genome. **Nucleic Acids Res.**, 32: 277–280, 2004.

KLAR AJ The mother–daughter mating type switching asymmetry of budding yeast is not conferred by the segregation of parental HO gene DNA strands. **Genes and Development**, 1: 1059–1064, 1987.

LANDRY C. R., TOWNSEND J. P., HARTL D. L. and CAVALIERI D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology** 15: 575–591, 2006.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol.** 50:353–380, 1986.

MARCHAL S. AND BRANLANT G. Evidence for the Chemical Activation of Essential Cys-302 upon Cofactor Binding to Nonphosphorylating Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans* **Biochemistry** 38:12950-12958, 1999.

MARCHAL S. C. D, SOPHIE R.C., FREDERIQUE T.F., AUBRY A., BRANLANT G. Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans* **Chemico-Biological Interactions** 130: 15–28, 2001.

MARCHAL S. AND BRANLANT G. Engineered nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase at position 268 binds hydroxylamine and hydrazine as acyl acceptors. **J. Biochem.** 268: 5764–5770, 2001.

MEWES, H. W., AMID, C., ARNOLD, R., FRISHMAN, D., GULDENER, U., ANNHaupt, G., MUNSTERKOTTER, M., PAGEL, P., STRACK, N., STUMPFLEN, V., ET AL. MIPS: analysis and annotation of proteins from whole genomes. **Nucleic Acids Res.** 32: 41–44, 2004.

MICHEL R., AGUILANIU H., AVÉRET N., BUNOUST O., CAMOUGRAND N., GRANDIER X.V., LARSSON C., PAHLMAN I.L., MANON S. AND GUSTAFSSON L. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* **Molecular and Cellular Biochemistry** 256/257: 73–81, 2004.

MAGAZANIK B. Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell** 2, 827-829, 2003.

MIKI, R., KADOTA, K., BONO, H., MIZUNO, Y., TOMARU, Y., CARNINCI, P., ITOH, M., SHIBATA, K., KAWAI, J., KONNO, H., et al. Delineating developmental and metabolic pathways *in vivo* by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98:2199–2204, 2001.

NEVOIGT E., STAHL U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews** 21: 231-241, 1997.

NISSEN, T.L., SCHULZE, U., NIELSEN, J. AND VILLADSEN, J. Flux distribution in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces*

cerevisiae. **Microbiology** 143: 203-218, 1997.

NISSEN, T. L., KIELLANO-BRANOT, M. C., NIELSEN, J., VILLOSEN, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic engineering**, 2: 69-77, 2000.

NORDSTRÖM K. Yeast growth and glycerol formation. **J Inst Brew** 74: 429–432, 1968.

OLSSON, L., NIELSEN, J. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. **Enzyme and Microbial Technology**, 26:785-792, 2000.

OSTERGAARD, S., OLSSON, L., NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(1):34-50, 2000.

PATIL KR, NIELSEN J. Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. **Proc Natl Acad Sci**, 102:2685-2689, 2005.

PHAFF, H.J. Isolation of yeast from natural source. In isolation of Biotechnological organisms from nature. **Labeda** (ed), US Mc-Graw-Hill, Inc., 53-59, 1990.

REGENBERG, B., HANSEN, J. GAP1, a novel selection and counter-selection marker for a multiple gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 16:1111-1119, 2000.

SAMSON, R.A. **Introduction to food-borne fungi**. 5th ed. Netherlands: Centraal bureau Voor Schimmelcultures. pp: 222-229, 1996.

SOUZA, Jr.C.G. pDblet um plasmídeo projetado para a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*, pode ser usado como um vetor de clonagem para a levedura de brotamento *Kluyveromyces marxianus*. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Genética. UFPE. Recife, 1999.

SHERLOCK, G. Analysis of large scale gene expression data. **Curr. Opin. Immunol.** 12: 201–205, 2000.

SHERMAN D, DURRENS P, BEYNE E, NIKOLSKI M, SOUCIET JL Genolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. **Nucleic Acids Research**, 32:315– 318, 2004.

STEENSMA, H.Y.and TER LIND, J.J.M. Plasmids with the Cre-recombinase and the dominant *nat* marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, 18: 469-472, 2001.

THEVELEIN, J.M. AND HOHMANN, S. Trehalose synthase, guard to the gate of glycolysis in yeast? **Trends Biochem. Sci.** 20: 3-10, 1995.

TORTORA,G.J.; FUNKE,B.R. and CASE,C.L. **Microbiologia**. 6^a ed. São Paulo: Artmed.pp:322-326, 2002.

TOWNSEND JP, HARTL DL Bayesian analysis of gene expression levels: statistical quantification of relative mRNA level across multiple strains or treatments. **Genome Biology**, 3, research 0071.1–0071.16, 2002.

TOWNSEND JP Resolution of large and small differences in gene expression using models for the Bayesian analysis of gene expression levels and spotted DNA microarrays. **BMC Bioinformatics**, 5: 54, 2004.

VAN DIJKEN, SCHEFFERS WA. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol** 32: 199–224, 1986.

VOTH W. P., JAMES D. RICHARDS, JANET M. SHAW AND DAVID J. STILLMAN Yeast vectors for integration at the HO locus. **Nucleic Acids Research**, Vol. 29, N0 12 e 59, 2001.

WALKER, G. M.. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley and Sons Ltd, England., 1998.

WENG S, DONG Q, BALAKRISHNAN R *et al.* *Saccharomyces* Genome Database (SGD) provides biochemical and structural information for budding yeast proteins. **Nucleic Acids Research**, 31: 216–218, 2003.

WHEALS, E.A., BASSO,L.C., ALVES,D.M.G. and AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology** 17: 482-487, 1999.

WITTENBERGER, C. L., AND V. L. CROW. Regulation of carbon flow within and between metabolic pathways in certain species of *Streptococcus*. **Special Suppl. Microbiol.** Abstr. 3:617– 629, 1976.

WINZELER, E.A., SHOEMAKER, D.D., ASTROMOFF, A., LIANG, H., ANDERSON, K., ANDRE, B., BANGHAM, R., BENITO, R., BOEKE, J.D., BUSSEY, H., et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. **Science** 285: 901–906, 1999.

YAMADA, T., AND J. CARLSSON Phosphoenolpyruvate carboxylase and ammonium metabolism by oral streptococci. **Arch. Oral Biol.** 18:799–812, 1973.

ZALDIVAR, J., NIELSEN, J., OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl Microbiology Biotechnology.** 56(1-2):17-34, 2001.

6. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Deleção do gene *GDH1* de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de álcool combustível

Rute Salgues Gueiros¹, Marcos Antonio de Moraes Junior^{1,2} e Diogo Ardaillon Simões^{1,3}

¹Núcleo de Engenharia Metabólica, ²Departamento de Genética e ³Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Os conceitos da engenharia metabólica vêm sendo utilizados com o objetivo de aumentar rendimentos e incluir novas rotas metabólicas que possibilitem a produção de metabólitos de interesse biotecnológico. Isto requer o entendimento prévio das rotas metabólicas e os possíveis efeitos globais provenientes de manipulações genéticas dirigidas. O setor industrial de produção de álcool combustível, como uma atividade biotecnológica, pode se valer deste conceito na modificação das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que proporcionariam um aumento do rendimento de etanol e/ou utilização de fontes alternativas de carbono para o processo fermentativo. Entretanto, a constituição genética das linhagens industriais requer que uma série de adaptações aos procedimentos convencionais de manipulação genética em linhagens de laboratório sejam otimizadas. Neste trabalho, linhagens industriais de *S. cerevisiae* previamente selecionadas pela capacidade de permanência no processo industrial foram geneticamente manipuladas com intuito de modificar o metabolismo redox de forma a aumentar o rendimento a etanol. O tipo de atividade consistiu no desenho experimental e no aprimoramento dos procedimentos de deleção gênica baseados na recombinação de seqüências homólogas em cassetes de integração. Para este fim, o gene *GDH1* foi parcial ou completamente removido do genoma da linhagem industrial com o uso de fragmentos de PCR que continham seqüências com mais de 300 bp de homologia com as regiões 5' e 3' do gene alvo. Este gene codifica a principal enzima da via de assimilação de amônia e sua remoção deve causar a substituição dos cofatores NADPH por NADH nesta via. Tanto a extensão das seqüências de homologia quanto os tipos de primers de verificação da integração e da deleção foram otimizados. O conjunto de procedimentos experimentais descritos neste trabalho abre oportunidades para futuras manipulações genéticas que possam produzir células recombinantes úteis para os processos industriais, tais como células sem marcas de resistência a antibióticos, mantendo-se a capacidade de adaptação aos ambientes industriais, já que estas manipulações são sítio-dirigidas, e obviamente adquirindo-se a nova capacidade metabólica adquirida pelas modificações programadas.

Palavras chaves: engenharia metabólica, fermentação alcoólica, metabolismo redox, modificação genética, *Saccharomyces cerevisiae*

1. INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na indústria biotecnológica para produção de pão, vinho, cerveja e bioetanol por fermentação alcoólica. Esta levedura tornou-se um organismo modelo para estudos de mecanismos biológicos fundamentais, o que possibilitou o desenvolvimento de muitas técnicas de manipulação genética. Com isso, várias iniciativas de modificações genéticas com o intuito de melhorar seu desempenho em processos industriais estão em curso. Recentemente, estas modificações genéticas estão sendo programadas a partir de análises metabólicas que indicam o(s) gene(s) específico a ser modificado ou inserido no genoma da célula-alvo. Isto constitui o que se define de engenharia metabólica. Assim, a tecnologia do DNA recombinante é usada para aumentar rendimentos celulares por modificação de reações bioquímicas específicas e para incluir novas rotas metabólicas que possibilitem a produção de metabólitos de interesse industrial.

As células de levedura podem ser geneticamente manipuladas tanto para a eliminação de um gene ou um conjunto de genes do genoma ou para a integração de genes homólogos ou heterólogos em regiões específicas do genoma da célula hospedeira. Para ambas estratégias podem ser utilizados fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR que apresentem extremidades homólogas ao sítio de integração genômica, os quais podem ser genes específicos ou regiões intergênicas.

Em 2000, Nissen e colaboradores propuseram uma modificação na via de assimilação de amônia em *S. cerevisiae* a partir da deleção do gene *GDH1*, o qual codifica a enzima glutamato desidrogenase dependente de NADP^+ . Esta enzima constitui a principal via de assimilação da amônia da levedura e sua deleção promove uma mudança na assimilação deste composto para a via alternativa GS-GOGAT (glutamina sintase e glutamato 2-oxoglutarato amino transferase). Desta forma, NADH, ao invés de NADPH, passa a ser utilizado na assimilação de amônia e essa alteração no metabolismo redox tem como efeito secundário o aumento da produção de etanol.

Para uso desta estratégia no contexto industrial deve-se levar em conta dois aspectos. O primeiro é a modificação genética de linhagens industriais com

alta adaptabilidade e o segundo é a análise dos recombinantes em condições mais próximas possíveis das industriais do que aquelas utilizadas pelos autores.

Para o primeiro aspecto, faz-se necessário a identificação de linhagens mais adaptadas aos processos industriais. Silva-Filho et al (2005) utilizou técnicas de análise molecular para identificar linhagens dominantes no processo de fermentação alcoólica industrial. A linhagem JP1 foi identificada pela alta capacidade de dominância em processo fermentativo de diferentes destilarias que usam caldo de cana como substrato. Esta linhagem apresenta além desta característica, altas taxas específicas de crescimento e também um bom rendimento em etanol. A alta produção de glicerol aliada às características que favorecem a sua utilização para modificação genética torna esta linhagem atrativa para iniciativas de modificação genética como aquela proposta por Nissen et al (2000).

O presente trabalho teve como objetivo a otimização de técnicas moleculares de modificação genética da linhagem industrial JP1 de *S. cerevisiae* para a modificação do metabolismo redox relacionado à assimilação de amônia de forma a aumentar o rendimento a etanol. A otimização do procedimento de modificação genética descrita neste trabalho abre oportunidades para futuras manipulações genéticas por engenharia metabólica, já que estas ainda apresentam-se limitadas por sua complexidade metodológica. O aperfeiçoamento destas técnicas possibilitará a produção de células recombinantes úteis para os processos industriais, tais como células com uma nova capacidade metabólica, porém sem marcas de resistência a antibióticos e que sejam mantidas no contexto industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Linhagens e meios de cultura

A linhagem laboratorial CEN.PK 638-3B (*Mat a, his3, leu2, lys2, ura3, Δgdh1, Δgdh, Δglt1*), fornecida por Peter Koeter, Universidade de Frankfurt, Alemanha, foi utilizada para construção das linhagens diplóides de laboratório e para produção do cassete de deleção com longas regiões de homologia ao gene alvo *GDH1*. Também foram utilizadas as linhagens YOR-375c, BY4741, BY4742, fornecidas pela empresa EUROSCARF (Frankfurt, Alemanha) para

utilização nos experimentos de cruzamentos genéticos. A linhagem JP1, isolada a partir do processo fermentativo da destilaria Japungu Agroindustrial SA na safra 2000-2001, foi utilizada para as modificações genéticas.

A linhagem DH5 α da bactéria *Escherichia coli* foi utilizada para manutenção e amplificação dos plasmídeos.

O meio sintético YNB suplementado foi utilizado para seleção auxotrófica dos cruzamentos genéticos de acordo com o genótipo esperado. O meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% de glicose) foi utilizado para o cultivo e manutenção das células de levedura. As células transformadas foram selecionadas neste meio suplementado com os antibióticos Geneticina 200 $\mu\text{g/ml}$. Meio LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 0,1% NaOH 1N) acrescido de ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ foi utilizado para cultivo e manutenção das células de bactéria contendo os plasmídeos. Para meios sólidos foi utilizado 2% de ágar.

2.2. Obtenção de linhagens laboratoriais diplóides

As linhagens foram cruzadas em placa com meio sintético seletivo para a linhagem esperada. As culturas foram estriadas de forma que houvesse regiões de sobreposição das culturas. As placas foram incubadas a 30°C por 16 horas. A cultura crescida foi reinoculada em nova placa com meio seletivo.

2.3. Extração e Quantificação de DNA

O DNA total dos transformantes foi extraído segundo o protocolo descrito por Silva-Filho et al (2005) como a seguir. Em cada microtubo foi adicionado 1 ml de cultura de uma colônia de células transformantes, estas foram coletadas por centrifugação a 10000 rpm por 3 minutos a 24°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspense em 600 μl de solução tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH8,0; EDTA 25mM pH8,0; SDS 1%; NaCl 25mM) e as amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão manual a cada 10 minutos. O lisado celular foi extraído com 600 μl de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico nas proporções 25:24:1) por agitação vigorosa em vórtex e centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos a 24°C. A fase aquosa (superior) foi transferida para novo tubo e submetida a nova extração

com 500 µl de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) como acima. A fase aquosa (superior) foi transferida para novo tubo e o DNA total foi precipitado por adição de 800 µl de etanol absoluto gelado, seguido de incubação por 2 horas a -20°C. O DNA foi coletado por centrifugação a 13000rpm por 15 minutos a 24°C e o sedimento foi lavado com 300 µl de etanol 70%, seco em estufa a 37°C por 30' a 90' e suspenso em 100 µl de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM).

O DNA total das amostras de transformantes e as amostras plasmidiais foram quantificados a partir de uma diluição de 1:200 (ex. 3 µl da solução estoque e 597 µl água destilada). Esta diluição foi levada a espectrofotômetro para leitura em comprimento de onda de $\lambda = 260\text{nm}$. A absorbância da solução foi utilizada para determinar a concentração de DNA, levando em consideração que $1D.O_{260\text{nm}} = 50\mu\text{g/ml}$ (SAMBROOK *et al.*, 1989)

2.4. Construção do cassete de interrupção com regiões longas de homologia

O protocolo de transformação de bactérias por cloreto de cálcio descrito por Ausubel *et al.* (1989) foi utilizado para amplificar os plasmídeos em *E. coli* e estes foram extraídos pelo método de lise alcalina (Sambrook e cols., 1989).

Para a construção dos cassetes de interrupção foram utilizados os pares de primers GDH1+up x GDH1Rrev para amplificar o DNA de CEN.PK 638-3B pela seguinte reação: 1x de tampão para PCR; 2,5 mM de MgCl₂; 2,5 pmol de cada primer; 0,2mM de dNTPs e 2,5U de *Taq* DNA polimerase para um volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram incubadas a 94° por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 3 minutos, com extensão final a 72°C por 3 minutos. A partir destas amplificações do DNA molde de CEN.PK 638-3B é gerado um fragmento de DNA de aproximadamente 2,4 kb contendo cerca de 400 pb da região 5' do gene *GDH1*, a marca genética de seleção e cerca de 400 pb da região 3' do gene *GDH1* (Figura 1 e Tabela 1).

O fragmento de PCR gerado foi purificado com kit de purificação PureLink™ Promega e utilizado para transformar células de levedura segundo o protocolo descrito por Gietz e Woods (2002) modificado. Após o procedimento de transformação as células foram incubadas em meio YPD por 2 h a 30°C e

semeadas em placas de Petri com meio YPD contendo 200 µg/mL de Geneticina (G-418 Sulfate-GIBCO).

2.5. Análise do gene *GDH1* nas células recombinantes

O DNA dos transformantes foi testado para verificação da integridade ou ausência do gene *GDH1* cromossômico pelo uso de diferentes combinações de primers (Tabela 1 e 2). A posição de hibridização de cada um dos primers no locus *GDH1* íntegro e no alelo interrompido deste locus estão mostrados na Figura 1.

Para verificação da presença do gene *GDH1* foram utilizados os primers GDH1rev e GDH1for pela seguinte reação: 1x de tampão para PCR; 1,5 mM de MgCl₂; 2,5 pmol de cada primer; 0,2 mM de dNTPs e 2,5U de *Taq* DNA polimerase para uma reação final de 25 µl. As reações de amplificação foram incubadas a 94° por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 3 minutos. As amplificações foram analisadas em gel de agarose 0,8% revelado com brometo de etídio.

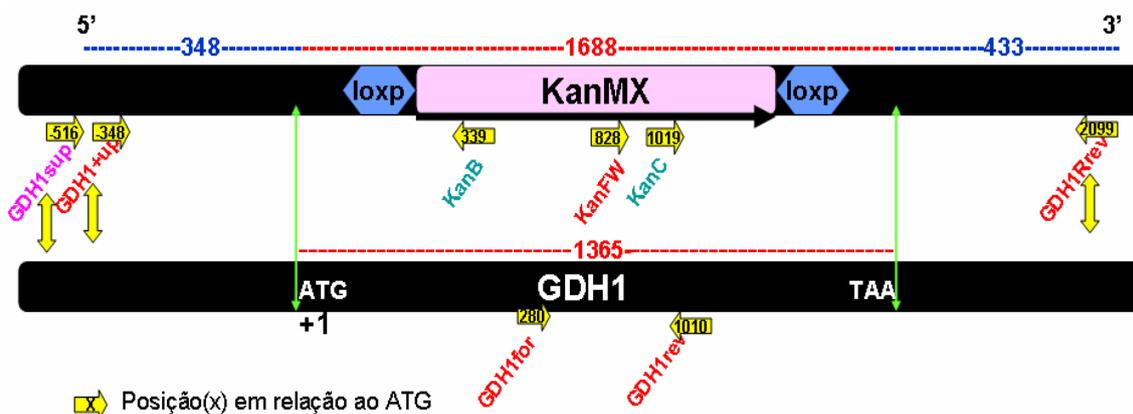


Figura 1. Desenho esquemático da integração do fragmento de interrupção gênica no loco *GDH1* de *S. cerevisiae*. O produto de integração da marca KanMX no locus *GDH1* está representado na linha superior, em oposição ao gene íntegro representado na linha inferior. As setas em amarelo representam os primers utilizados.

Tabela 1. PCRs com diferentes combinações dos primers, tamanho gerado e objetivos de verificação.

| PCR <i>GDH1</i> | Tamanho do produto | Verificação |
|--------------------|--------------------|---------------------------------|
| GDH1+up x GDH1rev | 1.3kb | Presença de <i>GDH1</i> |
| GDH1+up x KanB | 687pb | Integração do cassete |
| KanFW x GDH1Rrev | 1.3kb | Integração do cassete |
| GDH1sup x KanB | 855pb | Integração no locus <i>GDH1</i> |
| GDH1sup x GDH1rev | 1.5kb | Presença de <i>GDH1</i> |

Tabela 2. Seqüências dos primers de amplificação de *GDH1*, construção dos cassetes de interrupção e verificação

| Primer | Seqüência | TM (°c) |
|----------|--|------------|
| GDH1for | 5'-CTT GAA ATT CTT GGG TTT CG-3' | 53,2 |
| GDH1rev | 5'-TCG GCA ATA AAC TTG ACA CC-3 | 55,3 |
| GDH1+up | 5'- ACC CCA CGT CCA ATC AGC AGA- 3' | 58,9 |
| GDH1sup | 5'-CAG GCT CCC CTT ATG CAG G-3' | 61,4 |
| GDH1Rrev | 5'- ATG CGG GTA CGG TCT GGA TAA A- 3' | 57,1 |
| KanFW | 5'- CCC CGG CAA AAC AGC ATT CC-3' | 60,6 |
| KanB | 5 ' CTG CAG CGA GGA GCC GTA AT 3 ' | 61,4 |
| KanC | 5 ' - TGA TTT TGA TGA CGA GCG TAA T - 3' | 56,1 |

3. RESULTADOS

A linhagem JP1 foi escolhida como linhagem industrial pelo fato de ser utilizada como fermento de partida na destilaria Japungu Agroindustrial S/A. Esta linhagem tem apresentado boa estabilidade populacional, altas taxas específicas de crescimento e também um bom rendimento em etanol e alto rendimento em glicerol (SILVA-FILHO ET AL, 2005). A linhagem foi submetida a ensaio de resistência a geneticina, sendo sensível na concentração de 200 µg/ml em meio sólido. Esta concentração foi, então, utilizada nos experimentos de transformação celular.

3.1. Construção de linhagens diplóides

Os cruzamentos foram obtidos como descrito na metodologia e utilizados com a finalidade de serem controles de amplificações, pois apresentam genótipo conhecido. As linhagens diplóides geradas são deletadas total ou parcialmente para o gene *GDH1* (Tabela 3) A linhagem diplóide $\Delta gdh1$ e heterozigota para *GDH3* e *GLT1* foi obtida pelo cruzamento entre a linhagem CEN.PK 638-3D e a linhagem YOR 375c. A linhagem de laboratório diplóide heterozigota *GDH1*, *GDH3* e *GLT1* foi obtida pelo cruzamento entre a linhagem BY4742 e a linhagem CEN.PK 638-3B. A linhagem de laboratório diplóide heterozigota *GDH1/\Delta gdh1* entre a linhagem BY4741 e a linhagem YOR 375c. A linhagem de laboratório diplóide *GDH1* foi obtida pelo cruzamento entre a linhagem BY4741 e a linhagem BY4742. Estes diplóides foram utilizados para teste dos sistemas de verificação por PCR e os resultados estão mostrados na Figura 2. Pode-se verificar que linhagens com deleção completa do gene *GDH1* não apresentam amplificação com o primer interno GDH1rev. Além disso, a presença da marca KanMX no genoma da levedura pode ser visualizada com o primer KanC. Quando o locus *GDH1* é deletado, pode-se verificar a presença de dois produtos de amplificação que correspondem às diferenças no tamanho dos cassetes de integração utilizados (Figura 2C, linha 1) ou pela presença de um alelo íntegro e de um alelo deletado (Figura 2C, linha 4). Portanto, os primers utilizados servirão para detectar a integração correta do cassete de deleção e para mostrar o estado da linhagem recombinante em relação ao locus *GDH1*.

Tabela 3. Obtenção de linhagens laboratoriais diplóides por cruzamentos entre linhagens de genótipos conhecidos.

| Parentais | Genótipo das linhagens diplóides | Meio de seleção |
|---------------------|---|-----------------|
| CEN.PK YOR 375c | $\frac{a \quad + \quad + \quad + \quad ura3 \quad gdh1 \quad gdh3 \quad glt1}{\alpha \quad his3 \quad leu2 \quad lys2 \quad ura3 \quad gdh1 \quad + \quad +}$ | YNB+ura |
| CEN.PK BY 4742 | $\frac{a \quad + \quad + \quad + \quad ura3 \quad gdh1 \quad gdh3 \quad glt1}{\alpha \quad his3 \quad leu2 \quad lys2 \quad ura3 \quad + \quad + \quad +}$ | YNB+ura |
| BY 4741 YOR 375c | $\frac{a \quad his3 \quad leu2 \quad + \quad ura3 \quad met15 \quad +}{\alpha \quad his3 \quad leu2 \quad lys2 \quad ura3 \quad + \quad gdh1}$ | YNB+his+leu+ura |
| BY 4741 BY 4742 | $\frac{a \quad his3 \quad leu2 \quad + \quad ura3 \quad met15}{\alpha \quad his3 \quad leu2 \quad lys2 \quad ura3 \quad +}$ | YNB+his+leu+ura |

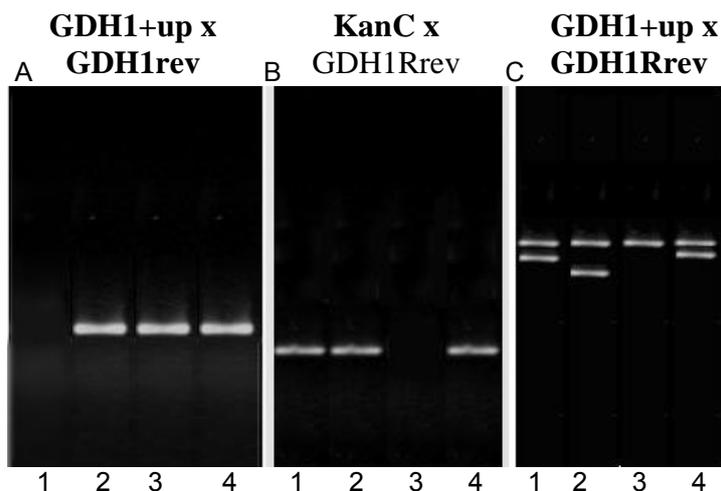


Figura 2. Amplificações das linhagens de laboratório diplóides construídas para os genótipos homocigota $\Delta gdh1$ e heterocigota para *GDH3* e *GLT1* (linha 1), heterocigota *GDH1*, *GDH3* e *GLT1* (linha 2), homocigota *GDH1* (linha 3) e heterocigota *GDH1*/ $\Delta gdh1$ (linha 4) com os primers *GDH1+up* e *GDH1rev* (painel A), *KanC* e *GDH1Rrev* (painel B) e *GDH1+up* e *GDH1Rrev* (painel C).

3.2. Deleção do gene *GDH1* da linhagem JP1

Para a estratégia de deleção do gene *GDH1*, foi amplificado o cassete de interrupção já inserido no genoma da linhagem de laboratório CEN.PK 638-3B com o uso dos primers *GDH1+up* x *GDH1 Rrev* (Figura 1).

A linhagem industrial JP1 foi submetida à transformação com o DNA linear (*GDH1-loxP-KanMX-loxP-GDH1*) contendo extremidades com cerca de 400 bp de homologia às regiões 5' (-348 a +1) e 3' (+1365 a +1798) do gene *GDH1*, gerando células transformadas resistentes a geneticina (Figura 1).

Dos transformantes JP1 obtidos, dezesseis amostras foram analisadas por PCR com os primers que verificam a integridade do gene *GDH1* (*GDH1sup* x *GDH1rev*) e com primers que identificam a integração no sítio correto. Com a utilização dos primers *GDH1+up* e *KanB* foi possível verificar a integração do cassete ao genoma em todos os transformantes testados (Figura 3A). Adicionalmente, amplificações de todos os transformantes com os primers *GDH1sup* e *KanB* confirmaram a integração no locus *GDH1* (Figura 3B).

Das dezesseis amostras analisadas para a correta integração, 15 apresentaram a amplificação do fragmento de 1,5 kb correspondente a região 5' do gene *GDH1*. Isto indica que uma segunda cópia do gene continuava intacta (Figura 3C). Contudo, uma das amostras analisadas (transformante T14) não

apresentou este fragmento de amplificação, indicando a deleção total de *GDH1* nesse transformante com apenas um passo de transformação. Para comprovar este resultado, foram realizadas novas amplificações com outras combinações de primers, comparando as mesmas amplificações na linhagem JP1 parental e a linhagem de laboratório CEN.PK 638-3B (Figura 4). Pode-se verificar que a linhagem JP1 apresenta o produto de amplificação correspondente ao gene *GDH1* (Fig. 4, linhas 1 e 13), mas nenhuma amplificação é visualizada quando os primers que hibridizam na marca KanMX são utilizados. Estes primers, por outro lado, produzem fragmento de amplificação nas linhagens recombinantes de laboratório e industrial (Fig. 4, linhas 5-6, 8-9 e 11-12). O transformante industrial T14 não produz produtos de amplificação para o gene *GDH1* quando se utilizam primers internos ou externos ao gene (Fig. 4, linhas 3 e 15). Isto comprova o resultado anterior de deleção completa deste gene na linhagem industrial.

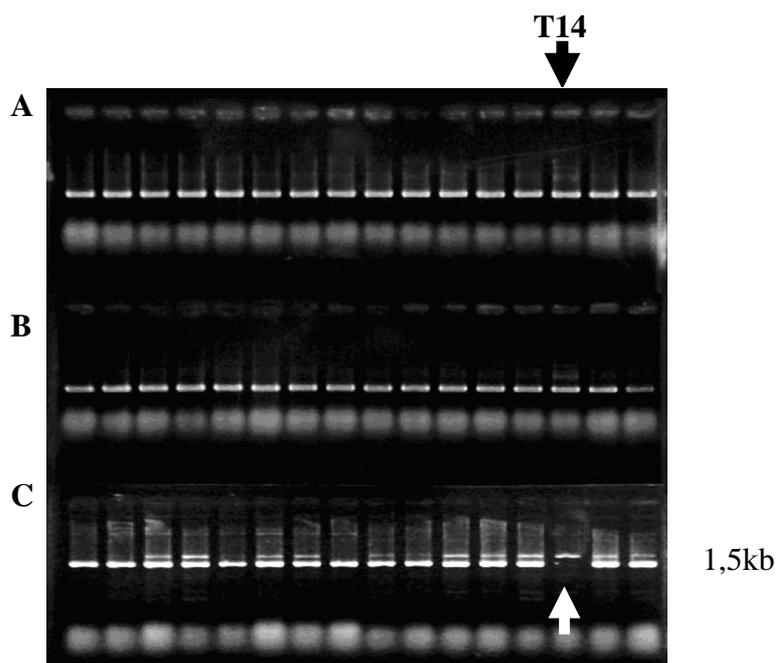


Figura 3. Análise das colônias JP1 recombinantes produzidas pela integração do cassete KanMX. O DNA dos recombinantes foi amplificado com os primers GDH1+up e KanB que verifica a integração do cassete no genoma (painel A), GDH1sup e KanB que verifica a integração no locus *GDH1* (painel B) e GDH1sup e GDH1rev que verifica a presença de formas intactas do gene *GDH1* (painel C). A ausência do produto de amplificação que representa deleção completa do gene *GDH1* no transformante 14 está mostrada pela seta.

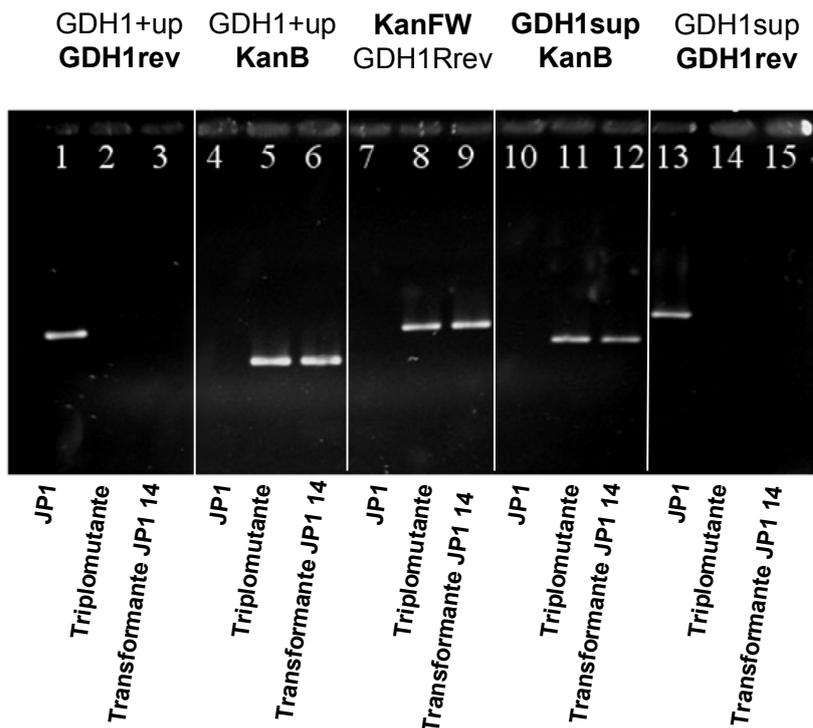


Figura 4. Análise do locus *GDH1* na linhagem industrial JP1 (linhas 1, 4, 7, 10 e 13), na linhagem de laboratório CEN.PK 638-3B (linhas 2, 5, 8, 11 e 14) e do transformante 14 (linhas 3, 6, 9, 12 e 15) com os pares de primers GDH+up e GDH1rev (linhas 1-3), GDH1+up e KanB (linhas 4-6), KanFW e GDH1Rrev (linhas 7-9), GDH1sup e KanB (linhas 10-12) e GDH1sup e GDH1rev (linhas 13-15). As posições de hibridização dos primers estão mostradas na Figura 1.

4. DISCUSSÃO

As linhagens industriais de *S.cerevisiae* frequentemente apresentam ao menos duas cópias de cada gene, sendo geralmente poliplóides. Além disso, tais linhagens são comumente desprovidas de marcas auxotróficas, o que leva a necessidade de incorporação de genes de seleção positiva, geralmente heterólogos, presentes na molécula transformante de DNA circular ou linear. Para isto, as técnicas de manipulação genética devem ser desenvolvidas e otimizadas.

Pelo fato dessas linhagens serem pelo menos diplóides há a necessidade da utilização de sistemas otimizados para a deleção gênica e que sejam ferramentas para novos alvos de modificação. Estes sistemas devem permitir, por exemplo, a remoção das marcas de seleção para sua reutilização em futuras modificações na linhagem modificada, assim como a aplicação desse mutante na indústria. Além disso, duas outras características genéticas

devem ser levadas em consideração: a existência de genes parálogos, como exemplo o gene *GDH3* parálogo de *GDH1*, e o polimorfismo de nucleotídeos entre as seqüências gênicas depositadas nos bancos genéticos e as seqüências de nucleotídeos daqueles genes em linhagens industriais. Estes fatores podem gerar certa dificuldade no desenvolvimento da metodologia eficaz, por isso a necessidade de sua otimização.

Um banco de mutantes deletados em mais de 4.000 genes de *S. cerevisiae* foi construído pelo “European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional analysis – EUROSCARF (Universidade de Frankfurt, Alemanha)” (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/projects.html>). No trabalho desenvolvido pelo grupo Alemão, a estratégia utilizada consistiu de cassetes obtidos por PCR com regiões curtas com homologia de 40 pb ao gene alvo. Entretanto, esta estratégia não foi positiva para cerca de 10% das ORFs testadas, e nestes casos, a dificuldade teria sido solucionada utilizando-se primers com 60 pb ou mais de homologia. Entretanto, sabe-se que certos alvos mostram-se particularmente difíceis para a integração de cassetes de deleção com seqüências flanqueadoras curtas. Zeeman e Steensma (2002) só conseguiram deletar o gene *KIACS2* que codifica a acetil co-enzima A de *Kluyveromyces lactis* quando aumentaram de 700 pb para 7 kb a região flanqueadora do fragmento de integração contendo a marca de resistência a geneticina.

Antunes (2003) e Gueiros (2004) apresentaram as dificuldades para deleção do gene *GDH1* em linhagens industriais e laboratoriais utilizando regiões curtas de 40 pb de homologia para o gene alvo. Os fragmentos de integração utilizados naqueles trabalhos foram obtidos pela amplificação do cassette presente no vetor pUG6 que contém seqüências loxP ladeando o gene KanMX. O fragmento gerado apresentou o gene KanMX na orientação inversa do gene alvo *GDH1*. Os transformantes JP1 obtidos foram analisadas por PCR com os primers que verificam a integridade do gene *GDH1* (Gdh1for x Gdh1rev) e todos apresentaram a amplificação do fragmento de 750 pb correspondente à região interna do gene. Em princípio, isto indicaria que uma segunda cópia do gene continuava intacta, já que se espera que esta linhagem industrial seja diplóide. Entretanto, esta amplificação foi observada também para os transformantes gerados por Antunes (2003), os quais foram submetidos a um

segundo passo de transformação com o cassete de interrupção interna. Este fato sugeriu a possibilidade de que estes primers de verificação estariam amplificando outra região do genoma da levedura. Portanto, uma nova estratégia de identificar a deleção do gene *GDH1* foi desenhada com base na utilização do primer *GDH1up*, o qual hibridiza em uma seqüência de 40 bp antes do sítio ATG, e do primer *KanFW*, o qual hibridiza em uma seqüência interna ao gene *KanMX*. Todos os transformantes analisados falharam em amplificar o fragmento esperado com estes dois primers. Por outro lado, a verificação da presença do cassete integrado ao genoma pôde ser constatada amplificando-se com os primers *KanFW* x *IDPfor* e *IDPprev* x *KanRE*, gerando fragmentos de 900 bp e 200 bp, respectivamente, do cassete em todas as amostras analisadas quanto a correta integração. Logo, a presença do gene *GDH1* pode ser verificada em todos transformantes através da amplificação com os primers *GDH1up* x *GDH1rev*. A partir destes resultados foi concluído que as células resistentes geradas após a transformação eram mesmo recombinantes. Entretanto, o fragmento de integração parece ter sido inserido em outro sítio que não o *locus* do gene *GDH1*. A hipótese era que o fragmento de deleção estivesse integrando no gene parólogo *GDH3*. Entretanto, as análises de alinhamento de seqüências mostraram que o primer *GDH1sup* e *GDH1+up* não são capazes de hibridizar no *locus GDH3*, nem em qualquer outra região do genoma.

No presente trabalho, foram utilizadas regiões longas de homologia com cerca de 400 bases. Desta forma, linhagens deletadas para pelo menos uma das cópias genômicas do gene alvo foram produzidas. A interrupção de *GDH1* foi obtida segundo o método descrito por Gietz e Woods (2002) com modificações que permitiram aumentar a eficiência de transformação (Anexo 3.) Estas modificações referem-se ao aumento na concentração do DNA a ser inserido na levedura para 5µg e o período de incubação a 42^oC por 40 minutos. Estas condições foram otimizadas das utilizadas anteriormente por Nielsen (2000) e Güldener e cols. (2002). Com essas duas modificações no tamanho das regiões de homologia e aprimoramento da técnica de transformação foi possível identificar em apenas um único passo de integração a geração de uma linhagem com deleção completa no gene *GDH1*. Estes resultados mostram que

para cada gene industrial a ser deletado algumas modificações nas técnicas devem ser feitas.

Com relação aos transformantes deletados GDH1 obtidos neste trabalho, o passo futuro será de remoção da marca KanMX a partir da recombinação entre as seqüências loxP mediada pela recombinase Cre, e a realização de ensaios fisiológicos para avaliar o rendimento em etanol.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, a Facepe, ao BNB/Fundeci e a Fluxome sciences AS (Dinamarca) pelo suporte financeiro ao trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES,D.F. Uso da engenharia metabólica em *Saccharomyces cerevisiae* para a otimização da produção de álcool. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Genética. UFPE. Recife, 2003.

AUSUBEL, F.M.,BRENT,R., KINGSTON,R.E., MOORE,D.D., SEIDMAN,J.G., SMITH,J.A., STRUHL,K. **Current protocols in molecular biology**, Vol 1 & 2. Jonh Wiley & Sons, In. New York, USA, 1989.

EUROSCARF. Worldwide gene deletion project (EUROFAN II) <<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/projects.html>> Acesso em: 22 de maio de 2006

GIETZ, R.D. AND R.A. WOODS. Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Methods in Enzymology** 350: 87-96, 2002.

GUEIROS,R.S. Avaliação do sistema cre-loxP na engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para otimização da produção de etanol. **Monografia**. Departamento de Genética. UFPE. Recife, 2004.

GUELDENER, U., HEINISCH, J., KOEHLER, G. J., VOSS, D., HEGEMANN, J. H. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple e knockouts in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, 30 (6):e23, 2002.

NISSEN, T. L., KIELLANO-BRANOT, M. C., NIELSEN, J., VILLOSEN, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic engineering**, 2: 69-77, 2000.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.. **Molecular Cloning**, Vol 1, 2 & 3, 20 ed. CSH. New York, USA, 1989.

SILVA-FILHO E.A., DOS SANTOS S.K.B., RESENDE A.M., DE MORAIS J.O.F., DE MORAIS JR MA, SIMÕES D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek** 88:13–23, 2005.

ZEEMAN, A.M. AND. STEENSMA, H. Y The acetyl co-enzyme A synthetase genes of *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**. 20: 13–23, 2002.

Integração do gene *gapN* de *Streptococcus mutans* em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*

Rute Salgues Gueiros¹, Marcos Antonio de Moraes Junior^{1,2} e Diogo Ardaillon Simões^{1,3}

¹Núcleo de Engenharia Metabólica, ²Departamento de Genética e ³Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Os conceitos da engenharia metabólica vêm sendo utilizados com o objetivo de aumentar rendimentos e incluir novas rotas metabólicas que possibilitem a produção de metabólitos de interesse biotecnológico. Isto requer o entendimento prévio das rotas metabólicas e os possíveis efeitos globais provenientes de manipulações genéticas dirigidas. O setor industrial de produção de álcool combustível, como uma atividade biotecnológica, pode se valer deste conceito na modificação das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que proporcionariam o aumento do rendimento de etanol e/ou utilização de fontes alternativas de carbono para o processo fermentativo. Entretanto, a constituição genética das linhagens industriais requer que uma série de adaptações aos procedimentos convencionais de manipulação genética em linhagens de laboratório sejam otimizadas. Neste trabalho, linhagens industriais de *S. cerevisiae* previamente selecionadas pela capacidade de permanência no processo industrial foram geneticamente manipuladas com intuito de modificar o metabolismo redox de forma a aumentar o rendimento a etanol. A estratégia consistiu na inserção genômica por integração heteróloga do gene bacteriano *GAPN* codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Ao contrário da enzima da levedura, esta enzima bacteriana utiliza NADPH como cofator, ao invés de NADH, e não promove a síntese de ATP. O gene bacteriano foi clonado em um plasmídeo que apresenta seqüências das regiões 5' e 3' do gene HO o qual codifica uma endonuclease que promove a interconversão dominante para o homotalismo de *S. cerevisiae* e o cassete de integração foi utilizado para inserção no locus HO do genoma da levedura. Para este caso, os tipos de primers de verificação da integração foram otimizados. O conjunto de procedimentos experimentais descritos neste trabalho abre oportunidades para futuras manipulações genéticas que possam produzir células recombinantes úteis para os processos industriais, tais como células sem marcas de resistência a antibióticos, mantendo-se a capacidade de adaptação aos ambientes industriais, já que estas manipulações são sítio-dirigidas, e obviamente adquirindo-se a nova capacidade metabólica pelas modificações programadas.

Palavras chaves: engenharia metabólica, fermentação alcoólica, metabolismo redox, modificação genética, *Saccharomyces cerevisiae*

1. INTRODUÇÃO

O bioetanol é um produto de grande interesse biotecnológico por ser um combustível renovável, o qual é produzido a partir de processos fermentativos utilizando-se células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta espécie tornou-se alvo de estudos de modificações genéticas pela sua grande aplicação em processos industriais e recentemente despertou o interesse das indústrias alcooleiras no melhoramento do desempenho destas linhagens industriais em processos fermentativos.

Estudos com uso da engenharia metabólica vêm sendo aplicados por meio da tecnologia do DNA recombinante com vistas de aumentar rendimentos celulares por modificação de reações bioquímicas específicas e incluir novas rotas metabólicas que possibilitem a produção de metabólitos de interesse industrial. Recentemente, Bro e cols. (2006) propuseram uma estratégia que consiste em alterar a coenzima de oxirredução de NADH para NADPH em uma das reações da glicólise. Em *S. cerevisiae* a oxidação do gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato utiliza NADH como coenzima e envolve uma fosforilação ao nível do substrato. Posteriormente este 1,3-bifosfoglicerato é defosforilado para gerar 3-fosfoglicerato e ATP. Já na bactéria *Streptococcus mutants* a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, codificada pelo gene *gapN*, cataliza a reação direta de gliceraldeído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato utilizando NADPH como coenzima e sem a necessidade da etapa de fosforilação e geração de ATP. Os autores sugerem, baseados em análises *in silico* dos fluxos metabólicos, que a introdução do gene *gapN* em *S. cerevisiae* promoveria um redirecionamento dos fluxos metabólicos, com diminuição da formação de biomassa, dada pela não produção de uma molécula de ATP na glicólise, e de glicerol, fatores que induziriam a maior produção de etanol. Esta estratégia poderia ser utilizada para a modificação genética de linhagens industriais e testadas em modelos mais próximos possíveis das condições industriais. Entretanto, é necessário que as linhagens apropriadas sejam inicialmente escolhidas.

Para uso desta estratégia no contexto industrial deve-se levar em conta dois aspectos. O primeiro é a modificação genética de linhagens industriais com alta adaptabilidade e o segundo é a análise dos recombinantes em condições

mais próximas possíveis das industriais do que aquelas utilizadas pelos autores. Silva-Filho et al (2005) mostrou que dentre várias linhagens industriais atualmente aplicadas na indústria alcooleira, a linhagem JP1 tem apresentado características que favorecem a sua utilização pra estudos de modificação genética. A estabilidade populacional no ambiente fermentativo depende do uso de linhagens bem adaptadas às condições do processo industrial, a linhagem JP1 tem a capacidade de dominância no processo fermentativo de diferentes destilarias. Esta linhagem apresenta, além desta característica, altas taxas específicas de crescimento e bom rendimento em etanol. Por outro lado, sua produção de glicerol ainda pode ser considerada alta, o que sugere que há condições metabólicas de aumentar ainda mais sua produção de etanol se a produção de glicerol for diminuída. A diminuição da produção de glicerol tem sido conseguida sem aparente perda da viabilidade celular tanto pela modificação da via de assimilação de amônia pelas células de levedura (Nissen et al 2000) como pela introdução do gene *gapN* (Bro et al 2006). A primeira estratégia tem o inconveniente de depender da presença de amônia no meio de fermentação e de algum crescimento celular durante a fermentação. Já a segunda estratégia só dependeria do pouco crescimento celular que já existe durante a fermentação alcoólica industrial.

As células de levedura podem ser geneticamente manipuladas tanto para a eliminação de um gene ou um conjunto de genes do genoma ou para a integração de genes homólogos ou heterólogos em regiões específicas do genoma da célula hospedeira. Para ambas as estratégias podem ser utilizados fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR que apresentem extremidades homólogas ao sítio de integração genômica, os quais podem ser genes específicos ou regiões intergênicas.

Com base nos experimentos de Bro e cols. (2006), o presente trabalho teve como objetivo a otimização de técnicas moleculares de modificação genética de linhagens industriais de *S. cerevisiae* previamente selecionadas pela capacidade de permanência no processo industrial. Estas modificações têm como alvo a modificação do metabolismo redox de forma a aumentar o rendimento a etanol.

A otimização dos procedimentos de modificação genética descritos neste trabalho abre oportunidades para futuras manipulações genéticas por

engenharia metabólica, já que estas ainda apresentam-se limitadas por sua complexidade metodológica. O aperfeiçoamento destas técnicas possibilitará a produção de células recombinantes úteis para os processos industriais, tais como células com uma nova capacidade metabólica, porém sem marcas de resistência a antibióticos e que sejam mantidas no contexto industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Linhagens e meios de cultura

A linhagem industrial JP1 de *S. cerevisiae* foi isolada a partir do processo fermentativo da destilaria Japungu Agroindustrial SA na safra 2000-2001 e utilizada como modelo industrial para as modificações genéticas. A linhagem DH5 α da bactéria *Escherichia coli* foi utilizada para manutenção e amplificação dos plasmídeos.

O meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% de glicose) foi utilizado para o cultivo e manutenção das células de levedura. As células transformadas foram selecionadas neste meio suplementado com o antifúngico Geneticina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. O meio LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 0,1% NaOH 1N) acrescido de ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ foi utilizado para cultivo e manutenção das células de bactéria contendo os plasmídeos. Para meios sólidos foi utilizado 2% de ágar.

2.2. Extração do DNA

O DNA total dos transformantes foi extraído segundo o protocolo descrito por Silva-Filho et al (2005): 1) Em cada microtubo foi adicionado 1 ml de cultura de uma colônia de células transformantes, estas foram coletadas por centrifugação a 10000 rpm por 3 minutos a 24°C; 2) o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em 600 μl de solução tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH8,0; EDTA 25mM pH8,0; SDS 1%; NaCl 25mM); 3) as amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão manual a cada 10 minutos; 4) o lisado celular foi extraído com 600 μl de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico nas proporções 25:24:1) por agitação vigorosa em vortex; 5) as suspensões foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 24°C e a fase

aquosa (superior) foi transferida para novo tubo; 6) uma segunda extração foi feita com 500 µl de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) como acima; 7) após centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 24°C, a fase aquosa (superior) foi transferida para novo tubo; 8) o DNA total foi precipitado por adição de 800 µl de etanol absoluto gelado e incubação por 2 horas a -20°C; 9) o DNA foi coletado por centrifugação a 13000rpm por 15 minutos a 24°C e o sedimento foi lavado com 300 µl de etanol 70%, seco em estufa a 37°C (30' – 90') e suspenso em 100 µl de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM). O DNA das amostras de transformantes e plasmidiais foi quantificado a partir de uma diluição de 1:200 (ex. 3 µl da solução estoque e 597 µl água destilada). Esta diluição foi levada a espectrofotômetro para leitura em comprimento de onda de $\lambda = 260\text{nm}$. A absorbância da solução foi utilizada para determinar a concentração de DNA, levando em consideração que $1\text{D.O.}_{260\text{nm}} = 50\mu\text{g/ml}$ (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os DNAs plasmidiais foram extraídos pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.2 Construção do plasmídeo integrativo pM4297-GAPN

O vetor pYX212-GapN foi concedido gentilmente por Jochen Foster, Fluxome Sciences, Dinamarca. Este vetor apresenta o gene *gapN* sob a regulação do promotor do gene *TPI1* de *S. cerevisiae*. O vetor pM4297 (HO-poly-KanMX4-HO) foi concedido gentilmente por Voth, University of Utah, USA. Este plasmídeo apresenta a marca KanMX4, com o gene que confere resistência ao antibiótico Geneticina G418 para seleção de transformantes em levedura, ladeada pelas seqüências 5' e 3' do gene que codifica a recombinase HO de *S. cerevisiae*. A presença dessas seqüências permite a integração genômica do cassete gênico.

Inicialmente primers foram desenhados para hibridizar na seqüência 5' do promotor TPI1 (primer TPI1for) e na seqüência 3' do gene *gapN* (primer GAPNrev) de forma a amplificar todo o cassete de expressão *TPI1-gapN*. Ambos os primers apresentam sítios de restrição *Bam*HI. A amplificação do cassete de expressão a partir do plasmídeo pGAPN foi realizada pela seguinte reação: 1x de tampão para PCR; 1,5 mM de MgCl₂; 2,5 pmol de cada primer; 0,2 mM de dNTPs e 2,5U de *Taq* DNA polimerase para uma reação final de 25 µl. As reações de amplificação foram incubadas a 94° por 2 minutos, seguido de

30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 3 minutos. As amplificações foram analisadas em gel de agarose 0,8% revelado com brometo de etídio.

O fragmento de 2,4 kb gerado por PCR foi purificado utilizando o kit PureLink™ Promega e utilizado para ligar no vetor pGEM-T Easy (Promega Co., USA). A reação de ligação foi utilizada na transformação de células de bactéria DH5 α utilizando o protocolo de transformação química por cloreto de cálcio (SAMBROOK *et al.*, 1989) e as colônias transformadas foram selecionadas em placa com meio LB suplementado com ampicilina. O plasmídeo recombinante pGEM-GAPN foi extraído e posteriormente digerido com a enzima *BamHI* (Invitrogen) e a banda contendo o cassete de expressão foi purificada do gel de agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen) em 1% TAE (Tampão Tris 40mM, Acetato 20mM, EDTA 1mM) utilizando o kit “QIA Quick Gel Extraction” (Qiagen). Em paralelo, o vetor pM4297 foi linearizado pela digestão com a enzima *BamHI* e purificado por extração com fenol:clorofórmio. As duas espécies de DNA (vetor e inserto) foram quantificados em gel de agarose e reações de ligação foram realizadas segundo Sambrook et al (1989) utilizando-se a relação molar 10:1 de inserto e vetor. As reações foram utilizadas para transformação de bactéria para seleção das colônias transformadas como acima. O plasmídeo recombinante pHO-GAPN foi extraído e posteriormente digerido com a enzima *BamHI* (Invitrogen) para visualização da banda contendo o cassete de expressão. Para confirmação da presença do cassete, todos os plasmídeos recombinantes foram submetidos à reações de PCR com os primers TPI1for e GAPNrev.

2.3. Transformação de células de levedura

Após a verificação, o plasmídeo pHO-GAPN foi digerido com a enzima *NotI* para purificação em gel de agarose do cassete de integração HO-GAPN-KanMX4-HO. A linhagem JP1 parental foi transformada com o cassete de integração utilizando o método de acetato de lítio descrito por Gietz e Woods (2002) modificado e selecionadas em placas YPD com 200 μ g/mL de G418.

Para verificação da integração genômica, o DNA dos transformantes submetido a amplificações com os primers TPI1for e GAPNrev e TPI1for e KanB.

3. RESULTADOS

A linhagem JP1 foi escolhida como linhagem industrial pelo fato de ser utilizada como fermento de partida na destilaria Japungu Agroindustrial S/A. Esta linhagem tem apresentado boa estabilidade populacional, altas taxas específicas de crescimento e também um bom rendimento em etanol e alto rendimento em glicerol (SILVA-FILHO et al, 2005). A linhagem foi submetida a ensaio de resistência a geneticina, sendo sensível na concentração de 200 µg/ml em meio sólido. Esta concentração foi, então, utilizada nos experimentos de transformação celular.

3.1. Integração genômica do gene *GAPN*

Inicialmente, para construção do vetor integrativo contendo o gene *GAPN*, foi realizada a extração dos plasmídeos pYX212-*GAPN* (9775pb) e pM4297(6061pb). Em seguida, foi realizada a amplificação do gene *GAPN* a partir do vetor pYX212-*GAPN*, utilizando os primers TPI1for x *GAPN*rev . O inserto amplificado foi purificado e ligado no vetor pGEM. Seguindo a obtenção da ligação pGEM-*GAPN*, o plasmídeo recombinante foi digerido com *Bam*HI para liberação dos fragmentos de 3015pb e 2413pb, sendo o menor correspondendo ao cassete de expressão (*Bam*HI)TPI1-*GAPN*(*Bam*HI) para clonar em pM4297. A ligação pGEM-*GAPN* foi amplificada com os primers TPI1for e *GAPN*rev para verificação do inserto ligado (Figura 1).

O plasmídeo pM4297 foi digerido com *Bam*HI e ligado com o inserto purificado a partir de pGEM-*GAPN*. O vetor digerido e o inserto purificado formam ligados através do sítio *Bam*HI. O vetor de integração construído pHO-*GAPN* foi digerido com a enzima *Not*I para obtenção do cassete de integração (HO-*GAPN*-KanMX4-HO); este foi purificado para transformar a linhagem de levedura industrial JP1 (Figura 1).

O vetor pHO-*GAPN* foi submetido a digestões com as enzimas *Bam*HI, *Not*I e *Eco*RI, para verificar a presença e a orientação do inserto. A digestão com a enzima *Bam*HI gerou as bandas esperadas de 2.4 kb (inserto) e 6.0 kb (vetor). A digestão com *Not*I gerou as bandas de 3.1kb (vetor) e 5.3 kb (inserto). A digestão com a enzima *Eco*RI gerou bandas de 5.7 e 2.7 kb, possibilitando a identificação do inserto e o sentido no qual a ligação foi realizada (Figura 1). A

linhagem JP1 foi transformada com o cassete HO-GAPN-KanMX4-HO e a integração genômica foi confirmada amplificando com os primers de verificação TPI1for e KanB (Figura 2)

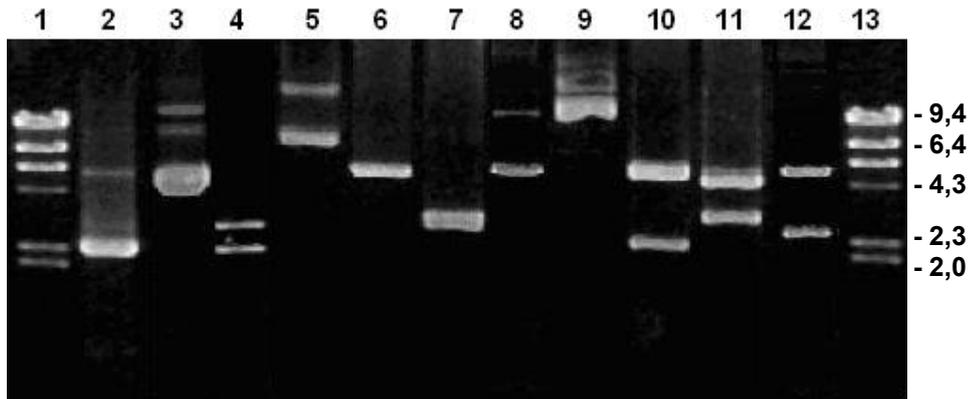


Figura 1. Construção do vetor integrativo pHO-GAPN. Linha 1: Marcador λ -HindIII; linha 2: amplificação do cassete de expressão *TPI1-gapN* de 2413pb a partir do plasmídeo pYX212-GAPN com os primers TPI1for e GAPNrev; linha 3: plasmídeo recombinante pGEM-GAPN; linha 4: pGEM-GAPN digerido com *BamHI* para liberação do cassete de expressão *TPI1-gapN* de 2413pb; linha 5: vetor pM4297; linha 6: pM4297 digerido com *BamHI*; linha 7: pM4297 digerido com *NotI*; linha 8: pM4297 digerido com *EcoRI*; linha 9: plasmídeo recombinante pHO-GAPN; linha 10: pHO-GAPN digerido com *BamHI*; linha 11: pHO-GAPN digerido com *NotI*; linha 12: pHO-GAPN digerido com *EcoRI*; linha 13: marcador λ -HindIII. Os valores em kb das bandas do marcador de peso molecular estão mostradas.

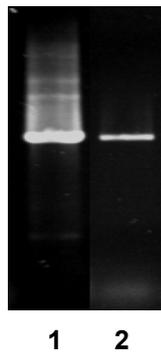


Figura 2. PCR de verificação da integração do gene *gapN* no genoma da linhagem industrial JP1. O DNA do plasmídeo pHO-GAPN (linha 1) e do transformante JP1-GAPN (linha 2) foram submetidos a amplificação com os primers TPI1for e KanB.

4. DISCUSSÃO

Após o advento da tecnologia do DNA recombinante criou-se a idéia de que a simples modificação genética de um sistema biológico poderia gerar produtos biotecnológicos com alta eficiência. Isto parece ser verdade quando se pretende produzir uma determinada proteína homóloga ou heteróloga, as quais são produtos diretos dos genes clonados. Entretanto, quando se pretende produzir um determinado metabólito de interesse industrial, cuja síntese depende de uma série de reações bioquímicas, da disponibilidade dos intermediários biossintéticos e dos fluxos metabólicos, então estas modificações genéticas simples não parecem tão eficientes. A partir deste fato foi introduzido na literatura científica o conceito de engenharia metabólica, que prevê as modificações genéticas por meio da tecnologia do DNA recombinante a partir de dados dos fluxos metabólicos e de sua regulação (OSTERGAARD, 2000). A partir daí, dois tipos de modificações genética não excludentes são possíveis: a deleção de genes homólogos e a superexpressão de genes homólogos ou heterólogos. Nissen et al (2000) propõe ambos os tipos de modificações em células de *S. cerevisiae* que envolvem a deleção do gene *GDH1* e a superexpressão dos genes homólogos *GLN1* e *GLT1*. Estas modificações promovem a mudança do cofator envolvido na assimilação de amônia, via de biossíntese de aminoácidos, que tem repercussão positiva na produção de etanol, via de assimilação de glicose. A integração gênica apresenta vantagens metodológicas em relação as deleções. O primeiro tipo requer geralmente um passo, que, dependendo do sítio de integração, pode gerar células recombinantes com uma ou mais cópias do gene integrado. Já as deleções devem envolver mais de um passo experimental, já que linhagens de leveduras industriais são geralmente poliplóides. A presença de parólogos do gene alvo também pode dificultar o processo de deleção. Ambos os casos requerem eventos de recombinação sítio-específica no genoma da levedura.

Neste trabalho, propomos a modificação genética de linhagens industriais de *S. cerevisiae* pela integração gênica do gene bacteriano *gapN* envolvido em um dos passos da glicólise em *S. mutans*. A atividade da enzima bacteriana levaria a troca na coenzima NADH para NADPH durante a glicólise, diminuindo a produção de ATP nesta via. Isto teria como consequência a queda na

formação de glicerol e de biomassa, com efeito positivo na produção de etanol (BRO ET AL 2006). Esta integração foi feita no locus HO, cujo gene codifica para a endonuclease envolvida na conversão dos sinais de acasalamento a e α nas leveduras ascomicetos. Este locus tem sido utilizado como alvo em experimentos de integração de genes heterólogos por não ser essencial para a viabilidade celular (CASTILHO et al., 1992; SOUZA, 1999; VOTH, 2001; KLAR, 1987; WALKER, 1998; MATHIAS et al, 2004). Entretanto, este cassete de integração tem o inconveniente de não permitir a retirada da marca de seleção pela forma como o cassete de resistência KanMX foi originalmente construído no plasmídeo base pFA6 (WACH, 1994). Portanto, a linhagem construída neste trabalho não poderá ser utilizada industrialmente devido às restrições impostas pela legislação brasileira de biossegurança. Para sua utilização industrial é necessária a remoção desta marca de seleção esta poderá ser realizada pelo desenvolvimento de um vetor que permita a excisão das marcas de seleção. Um vetor que apresenta este sistema é o plasmídeo pUG6 com seqüências loxP ladeando o gene KanMX, estas seqüências possibilitam que este gene de resistência seja removido por recombinação (GÜLDNER ET AL, 1996).

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas reais para a modificação de linhagens industriais de *S. cerevisiae* com vistas ao aumento do rendimento em etanol a partir da mesma quantidade de substrato hoje aportado ao processo industrial, o que representará um ganho econômico significativo para as indústrias. Entretanto, o próximo passo é testar se estas modificações genéticas produzem no contexto industrial o mesmo efeito metabólico que é verificado em condições de laboratório. Caso isto não ocorra, novas modificações genéticas devem ser desenhadas e testadas, como prevê o conceito de engenharia metabólica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, a Facepe, ao BNB/Fundeci e a Fluxome sciences AS (Dinamarca) pelo suporte financeiro ao trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRO, C., REGENBERG, B. & NIELSEN, J. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production

Biotechnol. Bioeng. 85: 269–276, 2006.

CASTILHO-VALAVICIUS, B.A. et al. The molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 44(5): 301-309, 1992.

GIETZ, R.D. AND R.A. WOODS. Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Methods in Enzymology** 350: 87-96, 2002.

GÜLDENER, U., HECK, S., FIEDLER, T., BEINHAEUER, J., HEGEMANN, J.H.. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic Acids Research**. 24 (13):2519-2524, 1996.

KLAR A.J. The mother–daughter mating type switching asymmetry of budding yeast is not conferred by the segregation of parental HO gene DNA strands. **Genes and Development**, 1: 1059–1064, 1987.

MATHIAS J. R., HANLON S. E., O'FLANAGAN R. A., SENGUPTA A. M. AND VERSHON A. K. Repression of the yeast HO gene by the MATa2 and MATa1 homeodomain proteins. **Nucleic Acids Research**, 32: 22 6469–6478, 2004.

NISSEN, T. L., KIELLANO-BRANOT, M. C., NIELSEN, J., VILLOSEN, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic engineering**, 2: 69-77, 2000.

OSTERGAARD, S., OLSSON, L., NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(1):34-50, 2000.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.. **Molecular Cloning**, Vol 1, 2 & 3, 20 ed. CSH. New York, USA, 1989.

SILVA-FILHO E.A., DOS SANTOS S.K.B., RESENDE A.M., DE MORAIS J.O.F., DE MORAIS JR MA, SIMÕES D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek** 88:13–23, 2005.

SOUZA, Jr.C.G. pDblet um plasmídio projetado para a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*, pode ser usado como um vetor de clonagem para a levedura de brotamento *Kluyveromyces marxianus*. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Genética. UFPE. Recife, 1999.

WACH A, BRACHAT A, PÖHLMANN R, PHILIPPSEN P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. 10(13):1793–1808, 1994.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley and Sons Ltd, England., 1998

VOTH W. P., JAMES D. RICHARDS, JANET M. SHAW AND DAVID J. STILLMAN Yeast vectors for integration at the HO locus. **Nucleic Acids Research**, Vol. 29, N0 12 e 59, 2001.

ANEXO 1

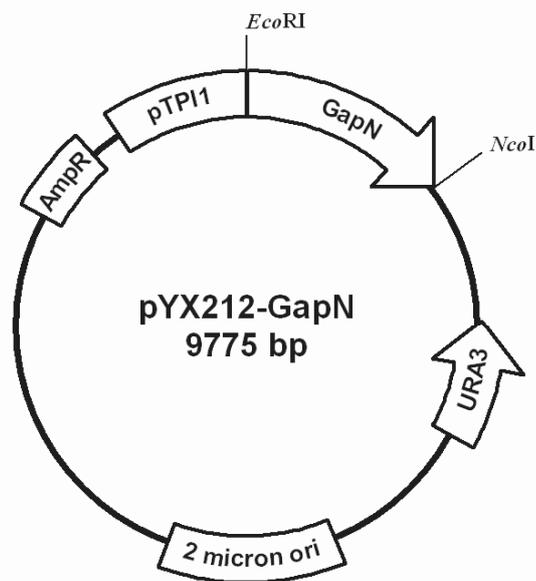


Figura 1. Mapa do plasmídeo pYX212-GAPN que possui o gene GAPN e o promotor TPI1 para expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae*.

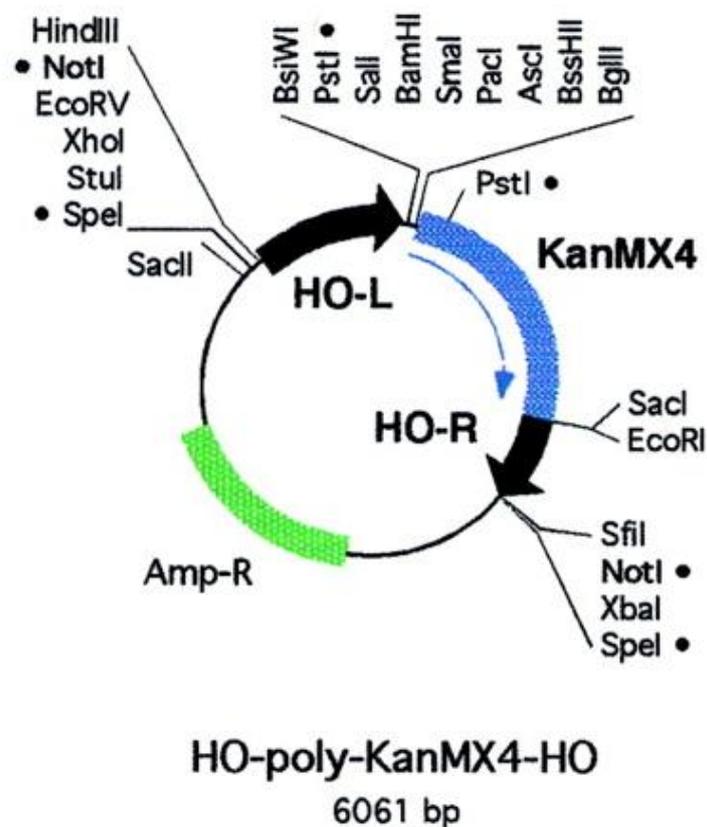


Figura 2. Mapa do plasmídeo pM4297 com as seqüência HO para integração genômica em *Saccharomyces cerevisiae*.

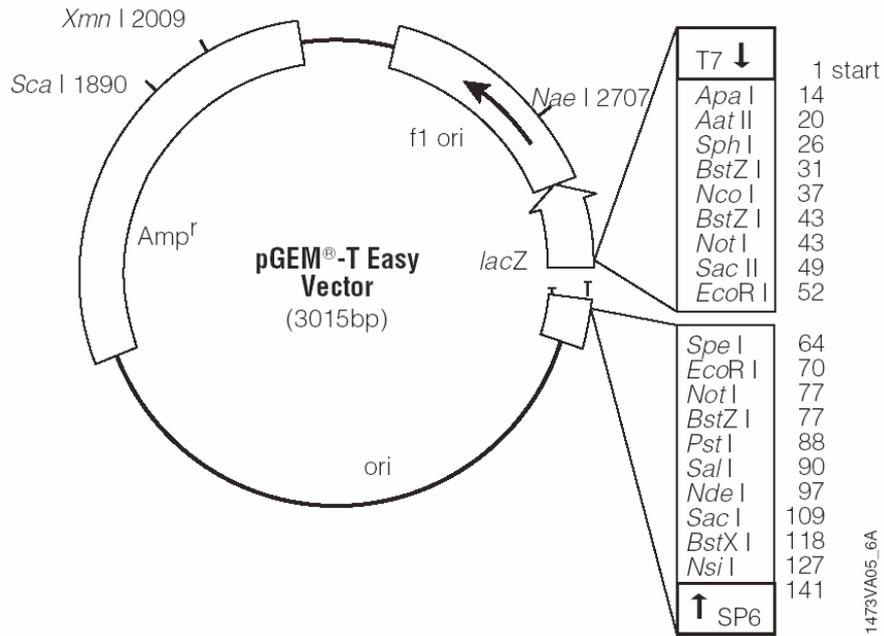


Figura 3. Mapa do plasmídeo pGEM-T Easy vector (Vector Systems -Promega).

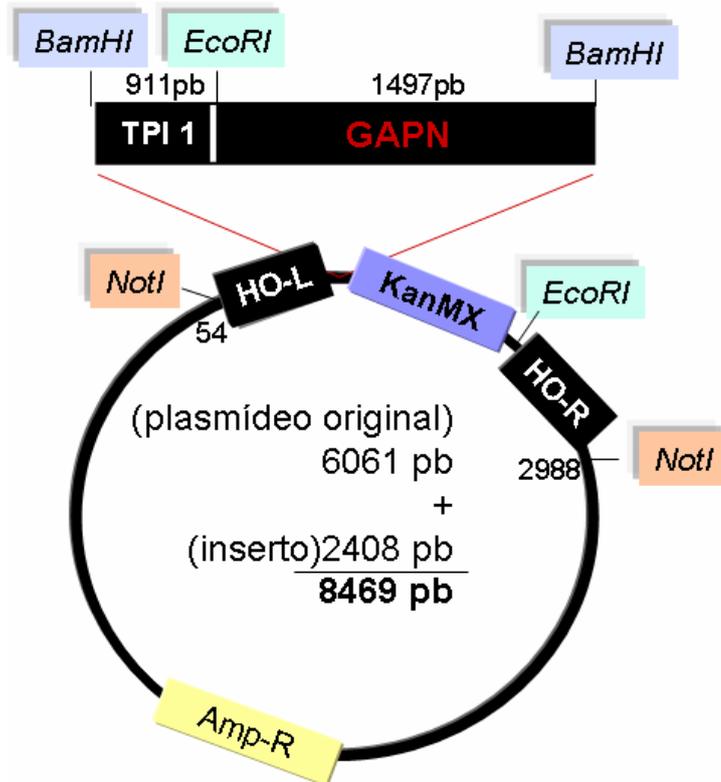


Figura 4. Mapa do plasmídeo pHO-GAPN construído para integrar o gene GAPN no locus HO de Saccharomyces cerevisiae.

ANEXO 2

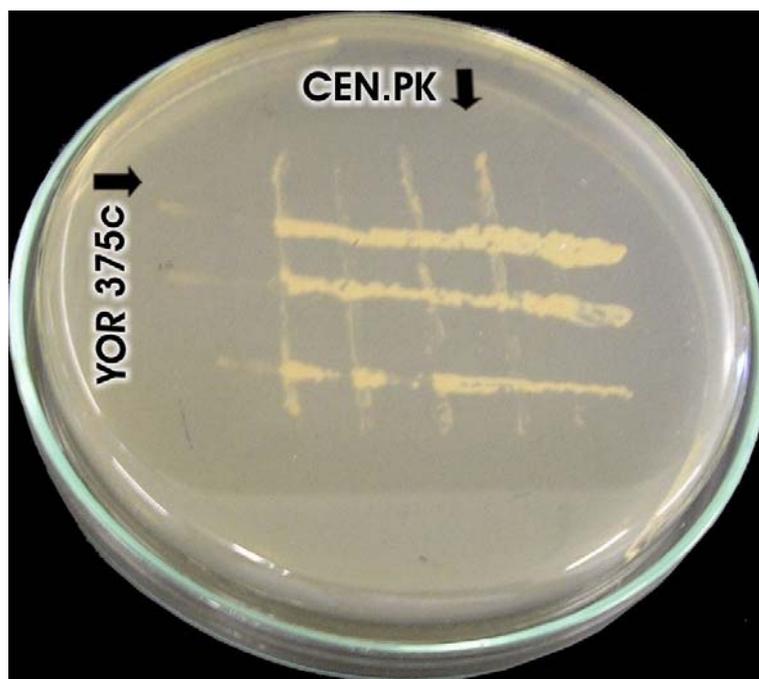


Figura 1. Cruzamento entre a linhagem CEN.PK 638-3D e a linhagem YOR 375c resultando na linhagem diplóide $\Delta GDH1$ e heterozigota para *GDH3* e *GLT1*.

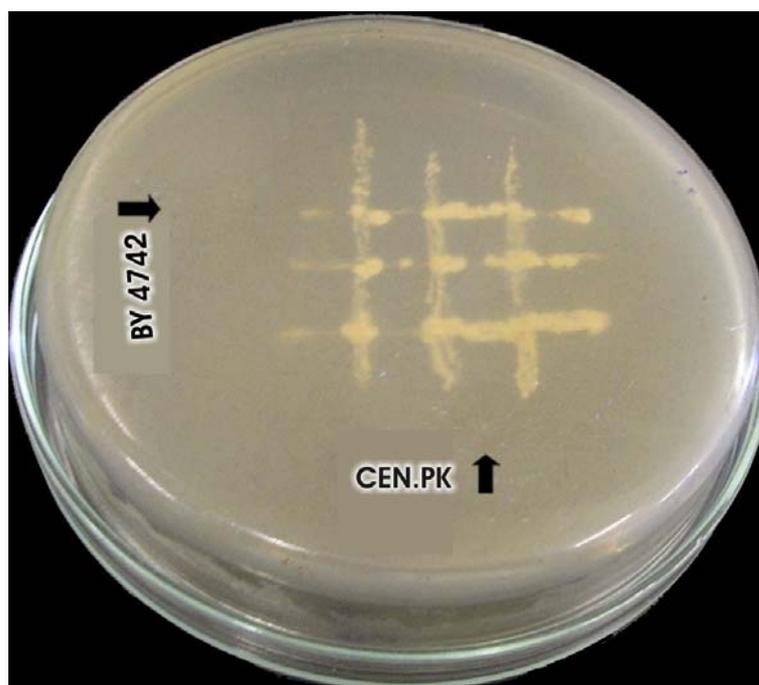


Figura 2. Cruzamento entre a linhagem BY4742 e a linhagem CEN.PK 638-3B resultando na linhagem laboratorial diplóide heterozigota *GDH1*, *GDH3* e *GLT1*.



Figura 3. Cruzamento entre a linhagem BY4741 e a linhagem YOR 375c resultando na linhagem laboratorial diplóide heterozigota *GDH1*.

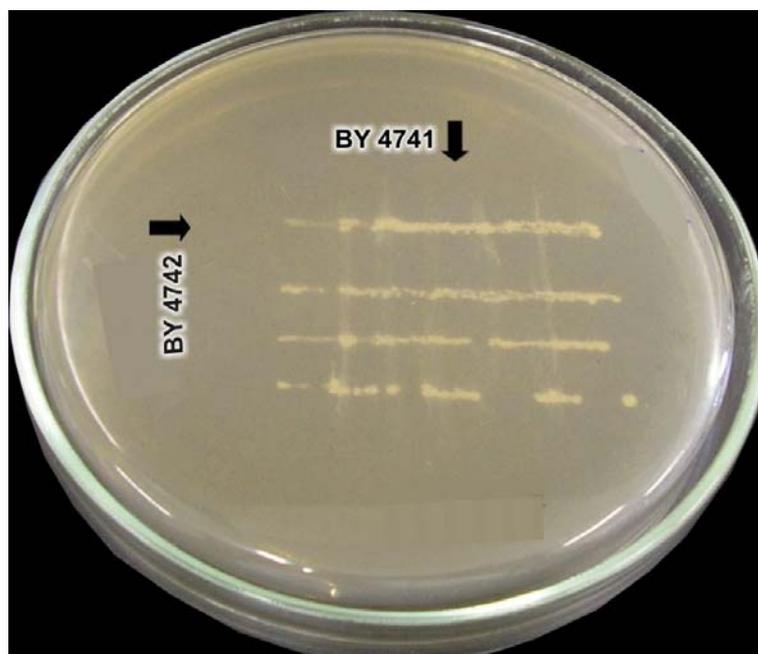


Figura 4. Cruzamento entre a linhagem BY4741 e a linhagem BY4742 resultando na linhagem laboratorial diplóide *GDH1+*.



Figura 5. Placa dos transformantes JP1 industrial com cassete *GDH1-loxP-KanMX-loxP-GDH1*.

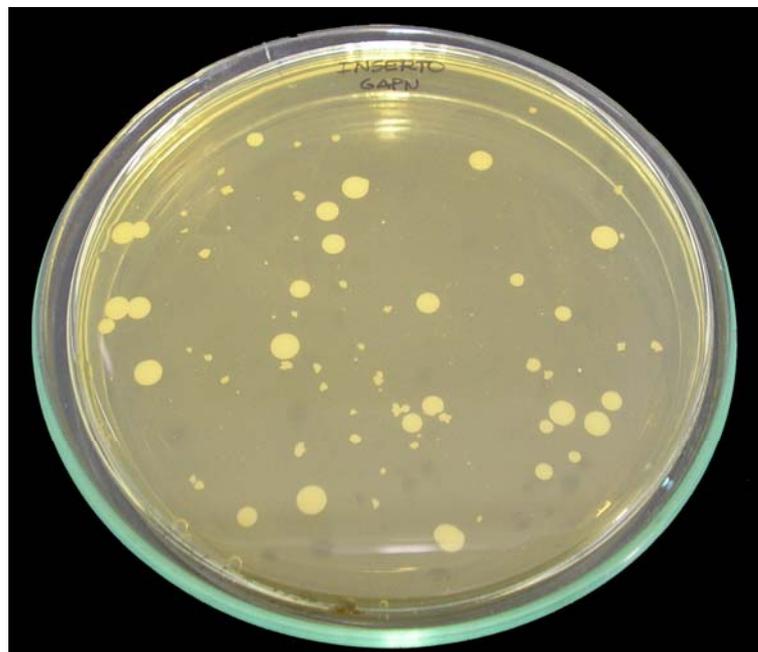


Figura 6. Placa da transformação da linhagem JP1 industrial com o cassete integrativo *HO-GAPN-KanMX4-HO*.

ANEXO 3

Protocolo para transformação de leveduras

1 Dia

Inocular a cultura em frascos de 250ml em 25 ml de meio (YPD ou sintético) e incubar a noite toda sob agitação a 200 rpm e 30°C.

2 Dia

1. Determine a concentração de células em hemocítômetro. Diluir a amostra em água 10^{-1} ou mais para a contagem do número de células. Exemplo para o cálculo da concentração: $239 \text{ cells} \times 5 \times 10$ (fator de diluição) $\times 1/10^{-4} \text{ ml} = 1.2 \times 10^8 \text{ cells/ml}$.

2. Transferir 50 ml de meio em novo frasco para reinóculo. Inocular para uma concentração inicial de $5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$.

3. Incubar sob agitação de 200 rpm a 30°C. Importante que as células completem duas gerações. Crescer por 3 a 5 horas até obter uma concentração de $2 \times 10^7 \text{ cells/ml}$.

4. Quando o crescimento a $2 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ for atingido, centrifugue a cultura a 3000 g por 5 min, lave as células em 25 ml de água destilada estéril ressuspendendo em 1 ml no final.

5. Ferva 1.0 ml DNA carreador (Sperm Salmon) por 5 min esfriando em seguida em gelo.

6. Transferir a suspensão celular para tubo de microcentrifuga de 1.5 ml; centrifugar por 30 segundos e descarte o sobrenadante.

7. Adicione água até um volume final de 1.0 ml e agitar em vortex vigorosamente para ressuspende as células.

8. Pipetar 100 μl da amostra (ca. 10^8 cells) em 1.5 ml microtubo, u m para cada transformação, centrifugar a top speed por 30 segundos e remover o sobrenadante.

9. Preparar o mix de transformação deixando incubado no gelo.

| Reagentes | 1 | 5 (6X) |
|------------------------|--------|---------|
| PEG 3500 50% w/v | 240 µl | 1440 µl |
| LiAc 1.0 M | 36 µl | 216 µl |
| SS-carrier DNA fervido | 50 µl | 300 µl |
| DNA 5µg | 34 µl | 204 µl |
| Total | 360 µl | 2160 µl |

10. Adicionar 360 µl do mix de transformação para cada tubo e ressuspender as células em vortex vigorosamente.
11. Incubar os tubos a 42°C em banho por 40 min.
12. Centrifugar a top speed por 30 segundos e remova o sobrenadante com pipeta.
13. Lavar com 1.0 ml de água destilada estéril centrifugando em seguida. Repetir esse passo até que toda a solução do mix seja removida.
14. Plaquear 100 µl da cultura em placa de Petri com meio seletivo. Incubar por 3 a 4 dias a 30°C.