

Engenharia genética de *Komagataella phaffii* para aumento da tolerância a inibidores derivados de lignocelulose

Lívia Teixeira Duarte-Brandão¹, Mariana Nogueira de Moura Freitas², Diogo Keiji Nakai³, João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Resumo

Em razão do crescimento mundial da demanda energética e das preocupações ambientais, torna-se urgente a busca por fontes alternativas de energia e materiais renováveis que poderão diminuir a dependência que a humanidade tem das fontes fósseis. A biomassa lignocelulósica, composta por celulose, hemicelulose e lignina, por ser uma matéria-prima renovável e abundante, atrai grande interesse para a produção de energia, biocombustíveis e produtos químicos de base biológica. Para ser utilizada em processos biotecnológicos, a biomassa lignocelulósica precisa ser submetida a pré-tratamentos e hidrólise, processos que, além de hexoses e pentoses, também liberam furaldeídos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que são tóxicos para os microrganismos que irão converter os açúcares nos produtos desejados. Com o objetivo de aumentar a tolerância de *K. phaffii* aos compostos inibitórios presentes no hidrolisado lignocelulósico, um gene potencialmente responsável pela conversão de inibidores foi identificado e validado neste trabalho. Para tanto, uma nova linhagem de *K. phaffii* foi construída pela superexpressão de um gene nativo (GX) sob controle do promotor PGK1. O desempenho da linhagem transformante, denominada M12 pKLD-GX, foi avaliado em diferentes condições de cultivo na presença de diferentes inibidores. Os resultados demonstram que tal linhagem apresentou maior tolerância ao inibidor HMF (hidroximetil-furfural) do que a linhagem controle, fazendo com que o composto fosse convertido mais rapidamente. Desse modo, podemos concluir que o gene GX conferiu à levedura um aumento na resistência ao inibidor HMF.

Termos para indexação: *Komagataella phaffii*, *Pichia pastoris*, furfural, HMF, hidrolisado lignocelulósico.

Introdução

A demanda energética mundial tem crescido rapidamente nos últimos anos, ao mesmo tempo em que os combustíveis fósseis têm se tornado cada vez mais escassos e caros. Visando a suprir a demanda energética e considerando também questões ambientais, nos últimos anos tem aumentado o interesse mundial por processos biotecnológicos renováveis e sustentáveis para a produção de energia, biocombustíveis e produtos químicos de base biológica (Mankar et al., 2021). Nesse contexto, a biomassa lignocelulósica, por ser uma matéria-prima renovável, apresenta grande potencial para a produção de biocombustíveis de segunda geração e outros produtos químicos de base biológica, por se tratar de uma alternativa às fontes fósseis de carbono. A biomassa lignocelulósica é majoritariamente composta por três polímeros: celulose (35%—50%), hemicelulose (20%—35%) e lignina (5%—30%), e as proporções de cada componente variam dependendo da fonte da qual a

¹ Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, livia.duarte@embrapa.br

² Biotecnologista, mestranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, mariana.freitas@colaborador.embrapa.br

³ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Ciências Mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁴ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

biomassa lignocelulósica foi extraída (Buchholz; Seibel, 2008). Entre as fontes de biomassa lignocelulósica, destacam-se os resíduos agroindustriais, florestais e urbanos.

Para ser aproveitada, a biomassa lignocelulósica precisa ser submetida a pré-tratamentos (físico, químico, biológico, mecânico ou combinado) e hidrólise ou despolimerização, para que os açúcares possam ser utilizados como fonte de carbono e energia para os microrganismos em processos biotecnológicos. Além de hexoses e pentoses, os processos de pré-tratamento e hidrólise também liberam compostos que inibem o metabolismo dos microrganismos que irão converter os açúcares nos produtos desejados (Almeida et al., 2007).

Os inibidores lignocelulósicos podem ser classificados em três grupos principais: furaldeídos (2-furaldeído e 5-hidroximetil-2-furaldeído ou HMF), ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) e compostos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coniferil aldeído, ácido ferúlico e outros) (Almeida et al., 2007). A construção de uma levedura tolerante a esses compostos inibitórios presentes na biomassa é então de grande interesse.

Estudos preliminares demonstraram que a levedura *Komagataella phaffii* aumenta a expressão de diferentes genes em resposta a inibidores lignocelulósicos (Paes et al., 2021). Este trabalho tem como objetivo identificar e validar um gene capaz de aumentar a tolerância da levedura a compostos inibitórios. Baseado em análises de similaridade e funcionalidade com genes de *Saccharomyces cerevisiae*, o gene GX de *K. phaffii* foi selecionado para superexpressão na levedura. Finalmente, sua funcionalidade foi avaliada em ensaios com a levedura geneticamente modificada.

Materiais e métodos

Linhagens e plasmídeos

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens X33 (Invitrogen) e M12 (Betancur et al., 2017) da levedura *Komagataella phaffii*. Para as transformações por eletroporação foram utilizadas células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10BT1 (Invitrogen). Os plasmídeos utilizados foram o pGEM-T Easy (Promega) e o pKLD (Betancur et al., 2017), plasmídeo que foi obtido a partir do vetor pKLD-XYD, após digestão com *Bam*HI e *Not*I para a excisão do XYD e posterior inserção do gene de interesse.

Clonagem do gene GX no vetor de expressão pKLD

Inicialmente, o DNA genômico de *K. phaffii* X-33 foi extraído e utilizado como molde para a amplificação do gene GX. Após amplificação, o produto da reação de PCR foi purificado utilizando-se o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega). Após purificação, o fragmento correspondente ao gene GX foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega), conforme instruções do fabricante. A seguir, células eletrocompetentes *E. coli* DH10BT1 foram transformadas por eletroporação, utilizando-se 2 µL do sistema de ligação previamente preparado. As células transformadas foram plaqueadas em LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina, 100 µL de IPTG 100 mM e 20 µL de X-gal 50 mg/mL, e incubadas a 37 °C, por 16 horas. Os clones pGEM-GX obtidos foram então digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I, para confirmação deles e obtenção do inserto.

Para clonagem no vetor de expressão pKLD, o inserto e o vetor foram obtidos por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Not*I. Após ligação, células de *E. coli* foram transformadas e selecionadas como previamente descrito. A confirmação da clonagem foi realizada por digestões com *Bam*HI/*Not*I e *Eco*RV.

Transformação de *K. phaffii* por eletroporação

O DNA plasmidial pKLD-GX foi digerido com *Bam*HI/ *Not*I e *Eco*RV e utilizado para transformação de *K. phaffii* linhagem M12 por eletroporação, seguindo o protocolo descrito no kit *Pichia* Expression (Invitrogen). Após transformação, a seleção dos clones de *K. phaffii* M12 foi feita em placas contendo meio mínimo MD, que foram incubadas a 30 °C por cinco dias. Os clones obtidos foram crescidos em placa contendo meio mínimo MD e foram escolhidos os clones com melhor crescimento para os experimentos subsequentes em microplacas e fermentação em frascos Erlenmeyer.

Efeito da superexpressão de GX no metabolismo de inibidores e xilose

Para avaliar o efeito da superexpressão de GX no metabolismo de inibidores e xilose, clones transformantes *K. phaffii* M12-GX foram avaliados em diferentes condições de cultivo. Para experimentos em microplacas e frascos Erlenmeyer, foram utilizados os meios de cultivo YNB contendo glicose 40 g/L suplementados com os furaldeídos furfural 2 g/L ou HMF 2 g/L, ou hidrolisado 30% e também YNB contendo xilose 40 g/L. A xilose foi escolhida pois estudos prévios demonstraram que enzima responsável pela redução de xilose também é capaz de reduzir HMF. As placas ou frascos Erlenmeyer foram incubadas a 30 °C, e amostras foram periodicamente coletadas para medição de biomassa por OD600 e também para quantificação de metabólitos.

Análise e quantificação de metabólitos

Amostras retiradas dos cultivos fermentativos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para quantificação dos compostos glicose, xilose, xilitol, glicerol, etanol, ácido acético e HMF. Foi utilizado sistema HPLC Acquity H-Class (Waters), equipado com detector de Índice de Refração (RID) e coluna HPX 87H (Bio-Rad). As corridas foram realizadas em fase móvel de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 45 °C. Os compostos HMF e furfural também foram analisados no detector Photodiode Array (PDA), na mesma coluna.

Resultados e discussão

Clonagem do gene GX no vetor de expressão pKLD

Inicialmente, o fragmento gênico de 1.134 pb correspondente ao gene GX foi amplificado a partir do DNA genômico de *K. phaffii* X33 por meio de reação de PCR, utilizando-se conjunto específico de primers. Posteriormente, o produto de PCR foi subclonado no vetor pGEM-T Easy, originando o plasmídeo pGEM-T-GX. Para realizar a clonagem do gene GX no vetor de expressão pKLD, os plasmídeos pKLD-XYD e pGEM-T-GX foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Not*I. As bandas correspondentes ao vetor pKLD e GX foram purificadas e ligadas. Após transformação de *E. coli*, transformantes foram recuperados e o DNA plasmidial foi extraído com sucesso. Para confirmação do plasmídeo pKLD-GX, o DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Sal*I. Os dois clones analisados apresentaram a banda esperada de aproximadamente 1.134 pb (dados não mostrados). Finalmente, o vetor pKLD-GX foi sequenciado e os resultados de alinhamento de sequência confirmaram mais uma vez a correta clonagem do gene.

Transformação de *K. phaffii* e seleção inicial de transformantes

Na transformação de *K. phaffii* M12 foram obtidos 16 clones, os quais foram plaqueados em meio seletivo com antibiótico (Figura 1). Dentre os 16 clones *K. phaffii* M12 pKLD-GX obtidos, sete foram escolhidos para análise do crescimento em diferentes meios de cultura em microplacas. A levedura *K. phaffii* M12-pKLD foi utilizada como controle em todos os experimentos. Todas as linhagens demonstraram crescimento celular similar no meio YNB-glicose, demonstrando que a

superexpressão do gene GX não afeta negativamente o metabolismo da linhagem. Observou-se que houve maior crescimento da levedura Kp-GX-L2.1 no meio YNB-HMF e houve maior crescimento da levedura denominada Kp-GX-L1.3 no meio YNB-xilose, quando comparadas com o comportamento da levedura *K. phaffii* M12 controle. Nos meios suplementados com furfural e hidrolisado, não foram observadas diferenças entre o crescimento das leveduras transformadas e da levedura M12 controle, por isso esses meios não foram mais utilizados nos cultivos posteriores em frascos Erlenmeyer (dados não mostrados). Os clones Kp-GX-L2.1 e Kp-GX-L1.3 foram escolhidos para análises detalhadas de crescimento e metabolismo.

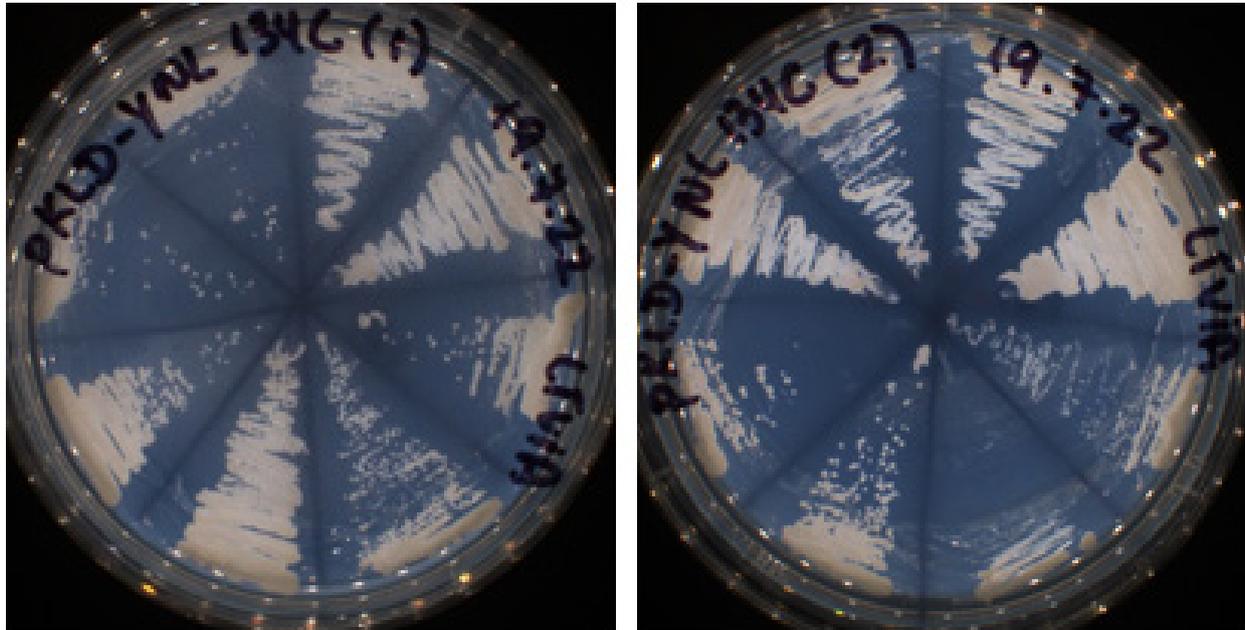


Figura 1. Clones *K. phaffii* M12 pKLD-GX obtidos por eletroporação.

Efeito da superexpressão do gene GX no crescimento e metabolismo de *K. phaffii*

Para avaliar o efeito da superexpressão do gene GX no crescimento e no metabolismo de *K. phaffii*, as linhagens transformantes foram cultivadas em meio YNB suplementado com glicose ou xilose e glicose mais HMF. Nos meios YNB suplementados com glicose e xilose não foram observadas diferenças entre o crescimento das leveduras transformadas e da levedura M12 controle negativo (Kp-C) (Figura 2). Esse resultado indica que o gene GX não afeta o metabolismo de xilose, e é reforçado pelo fato de que os dados de perfil metabólico também não demonstraram diferenças significativas no consumo dos açúcares (dados não mostrados). Entretanto, houve maior crescimento da levedura Kp-GX-L2.1 em meio YNB-HMF, a partir de 31 horas de incubação, quando comparada com o comportamento da linhagem controle (Figura 2).

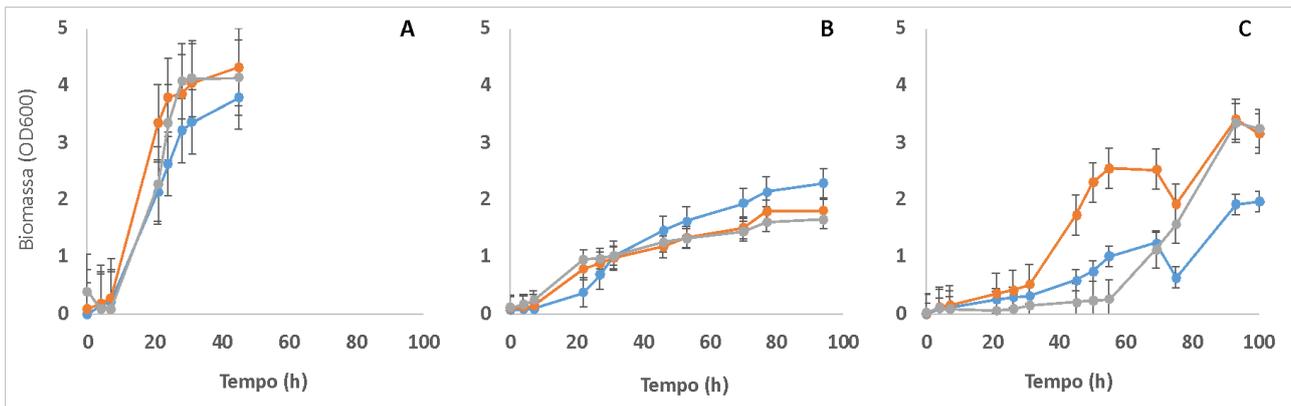


Figura 2. Perfil de crescimento das linhagens recombinantes *K. phaffii* expressando o gene GX na presença e ausência de HMF. Linhagem Kp-GX-L2.1 (laranja), Kp-GX-L1.3 (azul) e Kp-C controle (cinza). (A): meio YNB + glicose 40 g/L. (B): meio YNB + xilose 40 g/L. (C): meio YNB + glicose 40 g/L + HMF 2 g/L. São apresentados valores médios e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

Para confirmar o efeito positivo da expressão do gene GX sobre o metabolismo de HMF, o perfil metabólico das linhagens também foi analisado. Conforme demonstrado na Figura 3, houve uma diferença significativa entre a conversão de HMF pelas leveduras transformadas e a levedura controle. Para as leveduras transformadas Kp-GX-L1.3 e Kp-GX-L2.1, o HMF foi completamente convertido em cerca de 40 horas de incubação, enquanto para a controle o HMF demorou cerca de 80 horas. Embora as leveduras Kp-GX-L1.3 e Kp-GX-L2.1 tenham sido transformadas com o mesmo gene GX, observou-se que a Kp-GX-L1.3 consumiu mais glicose do que a Kp-GX-L2.1, embora tenhamos observado uma menor formação de biomassa no clone Kp-GX-L1.3 quando comparado com o clone Kp-GX-L2.1 (Figura 3).

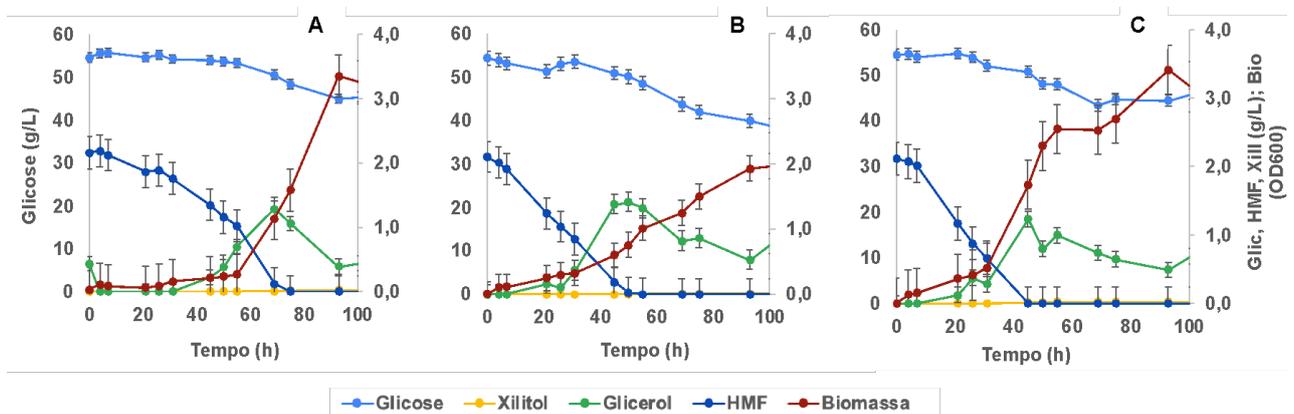


Figura 3. Conversão de HMF e formação de biomassa de linhagens recombinantes *K. phaffii* em meio YNB suplementado com glicose 40 g/L e HMF 2 g/L. (A): *K. phaffii* M12 controle. (B): *K. phaffii* M12-GX L1.3. (C): *K. phaffii* M12-GX L2.1.

Conclusão

O gene GX foi superexpresso com sucesso na levedura *K. phaffii* M12 e gerou uma linhagem mais tolerante ao HMF. Foi demonstrado pela primeira vez que o gene aumenta a capacidade da

levedura converter o HMF, e conseqüentemente permite o melhor crescimento da levedura na presença do inibidor, o que favorece seu uso industrial.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>

BETANCUR, M. O.; REIS, V. C. B.; NICOLA, A. M.; DE MARCO, J. L.; MORAES, L. M. P. de; TORRES, F. A. G. Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, article 99, dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0715-8>.

BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Industrial carbohydrate biotransformations. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 12, p. 1966–1979, ago. 2008. DOI: 10.1016/j.carres.2008.02.007.

MANKAR, A. R.; PANDEY, A.; MODAK, A.; PANT, K. K. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. **Bioresource Technology**, v. 334, Aug., 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125235

PAES, B. G.; STEINDORFF, A. S.; FORMIGHIERI, E. F.; PEREIRA, I. S.; ALMEIDA, J. R. M. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 2, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01170-9>.