

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Clonagem e expressão em *Saccharomyces cerevisiae* de xilose redutases e xilitol desidrogenase das leveduras brasileiras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*

Adriane Mouro¹, Gabriela F. Gubert¹ e Boris U. Stambuk^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Bioquímica - Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de leveduras. Florianópolis - SC 88040-900 - *e-mail: boris.stambuk@ufsc.br

RESUMO

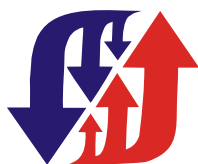
Embora *Saccharomyces cerevisiae* fermente com eficiência hexoses, esta levedura é incapaz de fermentar pentoses como xilose, presente nos hidrolisados de hemicelulose. A enzima xilose redutase dependente de NAD(P)H, que reduz xilose a xilitol, é o primeiro passo no metabolismo da xilose, mas o desbalanço de cofatores provocado pela xilitol desidrogenase dependente de NAD⁺, pode levar ao acúmulo de xilitol. Esse trabalho teve por objetivo clonar e expressar enzimas do metabolismo da xilose de leveduras *Spathaspora* e avaliar sua atividade enzimática em *S. cerevisiae*. Nossos resultados mostraram que o gene da XDH clonada de *S. passalidarum* é dependente de NAD⁺, enquanto que a XR clonada de *S. arborariae* apresentou atividade com ambos os cofatores e com interessante propriedades cinéticas. Já a XR clonada de *S. passalidarum* mostrou atividade dependente de NADPH, indicando a existência de diferentes XRs presentes nos genomas das leveduras *Spathaspora* analisadas.

Palavras-chave: Bioetanol, *Spathaspora*, xilose.

INTRODUÇÃO

O álcool combustível tem adquirido importância nos últimos anos devido ao futuro esgotamento das reservas combustíveis fósseis. Uma atrativa fonte de matéria prima para a obtenção de etanol é a biomassa lignocelulósica, composta de lignina, celulose e hemicelulose. No caso do Brasil, o bagaço da cana de açúcar é uma interessante fonte de celulose e lignocelulose, cujos polímeros podem ser utilizados nos processos fermentativos para a produção de álcool combustível. Embora a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* fermente eficientemente hexoses, esta levedura é incapaz de fermentar pentoses como a xilose presente nos hidrolisados de hemicelulose. A habilidade de leveduras em fermentar xilose tem sido descrita desde os anos 80. Desde então, os organismos mais estudados tem sido *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *C. tropicalis*, e principalmente *Schefferomyces stipitis*. Nos últimos anos foram descritas novas espécies do clado *Spathaspora* que são capazes de produzir etanol a partir de xilose, com destaque para as espécies *Spathaspora passalidarum*, uma levedura isolada do intestino de besouros presentes em madeira (Nguyen, et al. 2006) e *S. arborariae*, uma levedura isolada a partir de madeira em decomposição em duas diferentes localidades do Brasil (Cadete et al., 2009).

A enzima xilose redutase (XR) é o primeiro passo no metabolismo da xilose, uma enzima NAD(P)H-dependente que reduz xilose a xilitol, mas o desbalanço causado em seguida



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

pela xilitol desidrogenase (XDH) dependente de NAD^+ , pode levar ao acúmulo de xilitol. Então, a seleção de XRs com alta atividade enzimática e afinidade pelos dois cofatores é importante para o aumento da produtividade de etanol de xilose. Este trabalho teve por objetivo a clonagem de xilose redutases de três leveduras do gênero *Spathaspora* (duas *S. passalidarum* e uma *S. arborariae*) e a xilitol desidrogenase de *S. passalidarum*, visando a expressão em *S. cerevisiae* CENPK2-1C para avaliação da sua atividade enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de leveduras e meios de cultivo

A *Escherichia coli* DH5 α usada para clonagem foi crescida em meio Luria Bertani suplementado com 100 mg/L de ampicilina. *Sacharomyces cerevisiae* CENPK2-1 C, contendo o gene *XKS1* sobre-expresso, foi usado para a clonagem dos genes. As linhagens de levedura, *S. arborariae*, *S. passalidarum* e *S. cerevisiae* foram crescidas em meio rico YP com 20 g/L de glicose ou xilose, ou meio sintético sem uracila com 20 g/L de glicose.

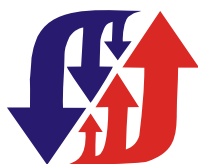
Clonagem dos genes XRs e XDH e determinação da sua atividade enzimática.

Utilizando ferramentas de bioinformática BLASTp e BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o genoma da *S. arborariae* (Lobo et al., 2014) foi usado para a busca de novos genes com homologia para XRs e XDHs de leveduras de outras espécies. Com base nas sequências obtidas, primers foram desenhados para amplificar os genes, introduzindo os sítios de restrição (*EcoRI* and *BamHI*) para clonagem no plasmídeo pPGK (Watanabe et al. 2007). O DNA genômico das linhagens *S. arborariae* e *S. passalidarum* foram purificados utilizando o YeaStar Genomic DNA KitTM (Zymo Research). Após a obtenção dos fragmentos por PCR, estes foram inseridos no plasmídeo pPGK e transformados em leveduras CENPK 2-1C, pelo método de acetato de lítio (Gietz et al., 1992).

As atividades das enzimas XRs e XDHs em extratos celulares foi determinada pela oxidação de NADPH ou NADH, e redução de NAD^+ , a 340 nm como descrito por Matsushika et al. (2008), respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do genoma da *S. passalidarum* (Wohlbach et al., 2011) foi realizada uma busca, com o uso de BLASTp, para os genes de XR e XDH. Uma sequência anotada como XR com 318 aminoácidos, foi utilizada para a busca de sequências similares no genoma de *S. arborariae*, permitindo a identificação de uma ORF não anotada que apresentou 94% de identidade com o gene *XYL1* (XR) de *S. passalidarum*. Com o uso de primers construídos a partir da sequência encontrada no genoma da *S. arborariae*, um fragmento de DNA de ~1 kb, foi amplificado a partir do DNA genômico das linhagens *S. arborariae* H.M.19.1a, *S. passalidarum* H.M.D. 1.3 e *S. passalidarum* H.M.D. 16.1. Entretanto, para a XDH, com a sequência anotada de 362 aminoácidos e a busca de sequências similares dentro do genoma de *S. arborariae* disponível no NCBI, nenhuma sequência com significativa similaridade foi encontrada. Nesse caso, a partir da sequência de XDH encontrada no genoma da *S. passalidarum*, foi realizada a clonagem e um fragmento de ~1,1 kb foi obtido a partir do DNA da linhagem *S. passalidarum* H.M.D. 16.1.



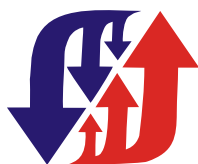
XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Como pode ser visto na Tabela 1, os genes clonados a partir de *S. passalidarum* tiveram significativa atividade de XR dependente do cofator NADPH, mas praticamente nenhuma atividade com NADH. Embora as linhagens selvagens de *S. passalidarum* apresentaram atividade com ambos os cofatores, os genes clonados não mostraram a mesma atividade, sugerindo haver mais de uma XR em seu genoma. De fato, o genoma anotado da *S. passalidarum* mostra uma segunda XR putativa (*xyl1.2*) com 318 aminoácidos e 76% e 75% de identidade ao gene XR de *S. passalidarum* e *S. arborariae* clonado e sequenciado pelo nosso grupo, respectivamente. Já a XR clonada a partir de *S. arborariae* teve uma atividade NADH-dependente que corresponde a ~30% da atividade medida com NADPH, se mostrando bastante similar às atividades encontradas nas linhagens selvagens de *S. arborariae*. Conforme mostrado na Tabela 1, assim como na linhagem *S. passalidarum* selvagem, a XDH clonada mostrou significativa atividade, utilizando o cofator NAD⁺ e nenhuma atividade utilizando o cofator NADP⁺.

Tabela 1. Atividade específica de XR e XDH em leveduras.

Leveduras ^a :	Plasmídeo:	Atividade XR ou XDH (U [mg proteína] ⁻¹) com:		Fonte
		NADPH	NADH	
<i>S. arborariae</i> H.M. 19.1a	–	0,45±0,01	0,12±0,01	Mouro, 2012
<i>S. passalidarum</i> H.M.D. 1.3	–	0,38±0,02	0,27±0,01	Mouro, 2012
<i>S. passalidarum</i> H.M.D. 16.1	–	0,59±0,02	0,38±0,01	Mouro, 2012
<i>S. cerevisiae</i> AMY-1	pPGK	0,03±0,01	0,03±0,01	Neste estudo
<i>S. cerevisiae</i> AMY-2	pPGK-XRSp1.3	1,52±0,20	0,05±0,01	Neste estudo
<i>S. cerevisiae</i> AMY-3	pPGK-XRSp16.1	4,09±0,67	0,06±0,01	Neste estudo
<i>S. cerevisiae</i> AMY-4	pPGK-XRSa19.1a	2,66±0,02	0,81±0,30	Neste estudo
		NADP ⁺	NAD ⁺	
<i>S. passalidarum</i> H.M.D. 16.1	-	0,003±0,0	1,29±0,05	Mouro, 2012
<i>S. cerevisiae</i> AMY-1	pPGK	---	0,01±0,01	Neste estudo
<i>S. cerevisiae</i> AMY-5	pPGK-XDHSp16.1	----	2,20±0,21	Neste estudo

Os resultados das duas transformantes contendo a enzima xilose redutase da levedura *S. passalidarum* (linhagens AMY-2 e AMY-3), embora tenham mostrado alta afinidade pelos dois cofatores (65-94 $\mu\text{M}_{\text{NADPH}}$ e 40-89 $\mu\text{M}_{\text{NADH}}$), a velocidade máxima desta enzima foi muito superior quando utilizou NADPH (4,7-5,7 U/mg), em relação ao NADH (0,1-0,2 U/mg). Em relação a afinidade por xilose, as enzimas de ambas as espécies apresentaram média afinidade pela xilose utilizando NADPH (30-53mM), e baixa afinidade utilizando NADH (270-280 mM). A análise cinética da xilose redutase de *S. arborariae* expressa na levedura *S. cerevisiae* (AMY-4) revelou que a enzima apresentou alta afinidade pelo NADPH (26,1 μM) e maior afinidade pelo NADH (12,8 μM). Embora a afinidade da xilose redutase pelo NADPH ser menor do que para o NADH, a velocidade máxima foi maior quando a enzima utilizou NADPH (2,62 U/mg), em relação ao NADH (0,96 U/mg). Esta enzima apresentou média afinidade para xilose quando utilizada tanto com o cofator NADPH (57,72 mM) como com NADH (29,48 mM), e velocidade máxima de 2,79 U/mg e 0,96 U/mg, utilizando NADPH e NADH, respectivamente. A análise cinética da enzima xilitol desidrogenase da levedura *S. passalidarum* expressa em *S. cerevisiae* (linhagem AMY-5), consoante a XDHs de outras espécies, mostrou uma enzima apresentando



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

baixa afinidade tanto pelo xilitol (86 mM) quanto pelo NAD⁺ (521 μM), e velocidade máxima por volta de 2-4 U/mg e 4,26 U/mg utilizando NAD⁺ e xilitol, respectivamente.

Um número considerável de *S. cerevisiae* recombinantes contendo os genes heterólogos XR e XDH de *S. stipitis* vem sendo descritas nos últimos anos. Em diferentes linhagens de *S. stipitis* o K_m para NADH é 3 a 15 vezes maior que o K_m com NADPH (van Vleet and Jeffries, 2009). Resultados mais satisfatórios obtivemos com *S. cerevisiae* expressando XR de *S. arborariae*, onde a enzima apresentou maior afinidade utilizando NADH, em relação a NADPH.

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam a presença de diferentes xilose redutases no genoma de leveduras *Spathaspora*, e a presença de uma xilitol desidrogenase estritamente dependente de NAD⁺ no genoma de *S. passalidarum*. Os genes clonados da xilose redutase de *S. arborariae* e xilitol desidrogenase de *S. passalidarum* mostraram-se como uma alternativa interessante para a expressão em leveduras industriais visando a produção de bioetanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cadete, R. M. ; Santos, R. O.; Melo, M. A.; Mouro, A.; Gonçalves, D. L.; Stambuk, B.U.; Gomes, F. C. O.; Lachance, M-A; Rosa, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. FEMS Yeast Res. 9, 1338-1342, 2009.
- Gietz, D.; St Jean, A.; Woods, R.A.; Schiestl, S.H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Res. 20, 1425, 1992.
- Jeffries T. W & Van Vleet, J.R.H. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. FEMS Yeast Res. 9, 793-807, 2009.
- Lobo, F. P.; Gonçalves, D. L.; Alves-Jr, S. L. Gerber, A.L.; de Vasconcelos, A.T.R.; Basso, L.C.; Franco, G.R.; Soares, M.A.; Cadete, R.M.; Rosa, C.A., Stambuk, B.U. Draft genome sequence of the xylose-fermenting yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-H.M. 19.1a. Genome Annou. 2, e01163-13, 2014.
- Matsushika, A.; Watanabe, S.; Kodaki, T.; Maikino, K.; Inoue, H.; Murakami, K.; Takimura, O.; Sawayama, S. Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increase ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 81, 243–255, 2008.
- Mouro, A. Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.
- Nguyen, N; Suh, S.; Marshall, C.J.; Blackwell, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesse* sp.nov. Mycol Res. 110, 1232-1241, 2006.
- Watanabe, S.; Saleh, A.A.; Pack, S.P.; Annalru, N.; Kodaki, T.; Makino, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. J Biotechnol. 130, 316-319, 2007.
- Wohlbach, D. Kuo, A., Sato, T. K., Potts, K. M., Salamov, A. A., LaButti, K. M., Lucas, S. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. Proc Nat Acad Sci USA, 108, 13212-13217. 2011.