

THIAGO OLITTA BASSO

MELHORAMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM

Saccharomyces cerevisiae

POR ENGENHARIA EVOLUTIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2011

THIAGO OLITTA BASSO

MELHORAMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM

Saccharomyces cerevisiae

POR ENGENHARIA EVOLUTIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:
Andreas Karoly Gombert

Co-orientador:
Aldo Tonso

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Basso, Thiago Olitta.

Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva / Thiago Olitta Basso. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Andreas Karoly Gombert.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Fisiologia e engenharia metabólica de leveduras.

Versão do título para o inglês: Improvement of alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* by evolutionary engineering.

Descritores: 1. Sacarose 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Invertase 4. Engenharia evolutiva 5. Etanol 6. *AGT1* I. Gombert, Andreas Karoly II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB62/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Thiago Olitta Basso.

Título da Tese: Melhoria da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva.

Orientador(a): Andreas Karoly Gombert.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*Ao meu amor Luisa, por ser quem é...
te amo!*

*Aos meus pais e irmãos pelo carinho, exemplo e apoio
durante toda a minha vida!*

Sem vocês simplesmente não seria!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Andreas Karoly Gombert pela sábia orientação e oportunidades concedidas. Espero muito por transmitir todos os ensinamentos que aprendi com ele durante estes quatro anos;

Ao meu co-orientador Prof. Aldo Tonso pela dedicação constante em desenvolver e aprimorar o sistema de cultivos contínuos do LEB (parte fundamental deste doutoramento), pela amizade e também pelos passeios inusitados no comércio da Santa Ifigênia e arredores;

Ao Prof. Boris Stambuk por compartilhar uma das suas linhas de pesquisa, pelas sugestões ao longo do trabalho e por dividir comigo sua vasta experiência sobre o metabolismo de leveduras;

Ao amigo Marcelo Dário, companheiro de labuta nos “itermináveis” cultivos contínuos, pelo apoio e dedicação em inúmeras etapas experimentais deste projeto de doutoramento;

Aos Prof. Jack Pronk, Prof. Ton van Maris, Prof. Jean-Marc Daran e ao doutorando Ir. Stefan de Kok pela profunda dedicação ao projeto e excelente clima de trabalho proporcionado durante o ano passado em Delft no Industrial Microbiology Group (Delft University of Technology);

Às pessoas que participaram desta trajetória, seja no Brasil ou na Holanda, ensinando-me muito sobre ciência e convivência ao longo de todo o caminho! Os nomes de cada um de vocês sempre passam pela minha mente e acredito que ao colocá-los neste texto em ordem alfabética, como é de costume, deixaria nossa relação deveras “protocolar”. Esta nunca foi nem nunca será a minha intenção e gostaria de registrar os meus sinceros agradecimentos à cada um de vocês! Muitíssimo obrigado!

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo;

Ao Laboratório de Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo;

À CAPES pela concessão da bolsa de doutoramento e da bolsa de estágio-sanduíche, modalidade PDEE, processo 2388-0/09;

Ao CNPq pelo auxílio concedido na modalidade Edital Universal, projeto “Engenharia Evolutiva de Leveduras”, Edital MCT/CNPq/02/2006, processo 484785/2006-0;

À FAPESP pelo auxílio concedido na modalidade “Auxílios Regulares”, dentro do Programa BIOEN, projeto “Engenharia Evolutiva de Leveduras”, processo 2007/59776-7.

“To alcohol: the cause of... and solution to... all of life's problems.”

Homer J. Simpson

RESUMO

Basso TO. Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Durante o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meios contendo sacarose, a enzima invertase hidrolisa a sacarose no ambiente extracelular em glicose e frutose, as quais são posteriormente captadas pelas células por difusão facilitada. Num trabalho prévio, a localização da enzima invertase foi modificada nesta levedura, eliminando-se a forma extracelular e superexpressando-se a forma intracelular da enzima (Stambuk et al., 2009). Como resultado, a captação de sacarose por esta linhagem modificada (*iSUC2*) é realizada pelo co-transporte ativo com íons H^+ , implicando no gasto de 1 mol de ATP para cada mol de H^+ extrudado pelas células para manutenção do pH intracelular. Como forma de compensar este gasto energético, espera-se que a linhagem *iSUC2* desvie uma maior parte do fluxo de carbono para a geração de energia e, conseqüentemente, para a formação de etanol, em relação a uma linhagem selvagem. No presente trabalho, uma avaliação fisiológica quantitativa de uma linhagem com esta modificação genética foi realizada tanto em quimiostatos limitados por sacarose, como em cultivos descontínuos com sacarose como única fonte de carbono. Os dados obtidos em quimiostatos anaeróbios demonstram que na linhagem *iSUC2* a enzima invertase ficou retida no ambiente intracelular e apresentou atividade absoluta total cerca de duas vezes maior que na linhagem-referência (*SUC2*). Além disto, verificou-se um aumento de 4% no fator de conversão de sacarose a etanol ($Y_{ETH/S}$), em relação à linhagem *SUC2*. No entanto, como foi observado que cerca de 8 % da sacarose não foi consumida pelas células da linhagem *iSUC2* durante o estado-estacionário dos quimiostatos anaeróbios, decidiu-se melhorar a capacidade do transporte ativo deste dissacarídeo nesta linhagem através de uma estratégia de engenharia evolutiva caracterizada pelo cultivo destas células em quimiostatos longos limitados por sacarose, em anaerobiose. Obteve-se assim, após cerca de 60 gerações, uma linhagem mutante (*iSUC2* evoluída) com atividade de transporte de sacarose 20 vezes superior à linhagem *iSUC2*, sendo capaz de consumir toda a sacarose do meio de cultivo. Esta linhagem apresentou um aumento de 11% no $Y_{ETH/S}$ e uma diminuição de 27% no fator de conversão de sacarose a células ($Y_{X/S}$), quando comparada à linhagem-referência. A análise do transcriptoma revelou

o aumento da expressão de vários genes codificadores de transportadores de hexoses, bem como genes relacionados ao metabolismo de maltose, incluindo o gene do transportador de alta-afinidade para alfa-glicosídeos *AGT1*, quando a linhagem *iSUC2* evoluída foi comparada à linhagem *iSUC2*. Detectou-se que a evolução em quimiostato resultou na duplicação do gene *AGT1*, sem que houvesse mutação neste gene. Através da superexpressão do gene *AGT1* na linhagem *iSUC2*, conseguiu-se gerar uma linhagem que apresentou $Y_{ETH/S}$ muito próximo ao da linhagem *iSUC2* evoluída. No entanto, outros parâmetros fisiológicos, foram diferentes nestas duas linhagens, indicando que a duplicação do gene *AGT1* não foi a única mutação que ocorreu durante o processo de evolução em quimiostato. Este trabalho ilustra o potencial da combinação entre engenharia metabólica e engenharia evolutiva para a obtenção de linhagens de levedura melhoradas, para aplicação na produção industrial de etanol combustível a partir de meios contendo sacarose.

Palavras-chave: Sacarose. *Saccharomyces cerevisiae*. Invertase. Engenharia evolutiva. Etanol. *AGT1*.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

