

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Pedro Augusto Galvão Tizei

**“Avaliação de novas estratégias para fermentação de etanol por
Saccharomyces cerevisiae: Análise de expressão gênica durante
estímulo bioelétrico e seleção de linhagens por ensaios em larga
escala”**

CAMPINAS,

2013

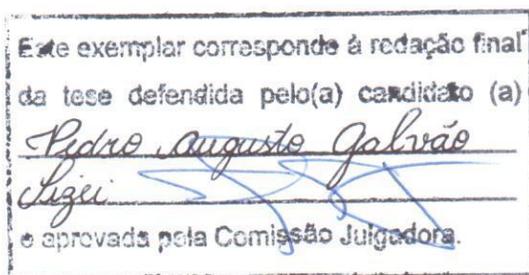


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PEDRO AUGUSTO GALVÃO TIZEI

“AVALIAÇÃO DE NOVAS ESTRATÉGIAS PARA FERMENTAÇÃO DE ETANOL POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE ESTÍMULO BIOELÉTRICO E SELEÇÃO DE LINHAGENS POR ENSAIOS EM LARGA ESCALA”



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

T545a Tizei, Pedro Augusto Galvão, 1987-
Avaliação de novas estratégias para fermentação de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*: análise de expressão gênica durante estímulo bioelétrico e seleção de linhagens por ensaios em larga escala / Pedro Augusto Galvão Tizei. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Etanol. 3. Eletroquímica. 4. Transcriptoma. 5. Ensaio biológico automatizado. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of new strategies for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression analysis during bioelectric stimulus and selection of strains by high-throughput assays

Palavras-chave em Inglês:

Saccharomyces cerevisiae

Ethanol

Electrochemistry

Transcriptome

Automated biological assay

Área de concentração: Genética de Microrganismos

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Luiz Carlos Basso

Renato Vicentini dos Santos

Data da defesa: 27-02-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de fevereiro de 2013

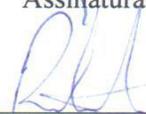
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador)



Assinatura

Dr. Renato Vicentini Dos Santos



Assinatura

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso



Assinatura

Dr. Adhemar Zerlotini Neto

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Agradecimentos

Aos meus pais, Rita e Augusto, pelo apoio incondicional durante todo este período. Ao meu irmão, Luiz, pelas conversas à distância que sempre me deram novas idéias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gonçalo, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelas discussões sinceras, pelos conselhos, pela liberdade durante o andamento do mestrado e por tudo que pude aprender enquanto estive no laboratório.

Ao Marcelo, por toda a ajuda durante o início do trabalho e depois pela paciência enquanto aprendi bioinformática.

Aos amigos que dividiram bancadas e muitos momentos importantes: André, Luige, Dayanne, Marina, Aline, Nádia, Leandro. Obrigado pelos momentos divertidos, pelas discussões sérias e, principalmente, por todo o apoio.

Aos demais amigos, do LGE, da Unicamp e da USP, pelos momentos de descontração, pelo apoio nos momentos difíceis.

À Eliane, Silvia e Mari pela paciência e disposição para me ajudar com os mais diversos problemas e pelas conversas no laboratório.

À FAPESP, à CAPES e à ETH Bioenergia S/A pelo apoio financeiro durante a realização do trabalho.

Resumo

A produção fermentativa de etanol a partir de substratos chamados de “primeira geração”, como cana-de-açúcar e amido de milho, já atingiu níveis muito elevados de eficiência. As linhagens industriais utilizadas nestes processos já são adaptadas ao ambiente industrial e possuem características que dificultam o melhoramento por engenharia genética tradicional. Duas abordagens inovadoras foram utilizadas para buscar processos fermentativos mais eficientes: o uso de reatores bioelétricos para alterar os produtos da fermentação e um ensaio de engenharia evolutiva para otimizar fenótipos heterólogos.

Foram feitas fermentações bioelétricas com *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo aumentos de produtividade de etanol, sem alterar o rendimento final, e também mudanças nas proporções dos subprodutos glicerol e acetato. Uma resposta distinta foi observada para uma linhagem industrial cultivada nas mesmas condições.

Foram realizadas análises de expressão gênica global de linhagens de laboratório e industrial fermentando sob estímulo bioelétrico. Não foram observadas alterações na via fermentativa, mas houveram variações grandes na expressão de genes relacionados a outros aspectos da fisiologia da levedura, como genes para síntese de lipídios de membrana e genes desconhecidos ou com funções aparentemente não-relacionadas ao processo fermentativo. Também foi evidente uma resposta global diferente entre as duas linhagens.

Foi estabelecido um método automatizado para ensaios de engenharia evolutiva, que permitiu a seleção de linhagens por crescimento em celobiose. Utilizando apenas a variabilidade presente no genoma de uma linhagem industrial diplóide, foi possível obter linhagens haplóides com desempenho superior à linhagem parental. Portanto, esta estratégia pode ser viável para se obter fenótipos superiores utilizando linhagens distantes de *S. cerevisiae*.

Abstract

Fermentative ethanol production from substrates known as "first generation", such as sugar cane and corn starch, has reached very high levels of efficiency. The industrial strains used in these processes are already adapted to the industrial environment and possess characteristics that hinder further improvement by traditional genetic engineering. Two innovative approaches were used to seek more efficient fermentation processes: the use of bioelectric reactors to alter fermentation products and an evolutionary engineering assay to optimize heterologous phenotypes.

Bioelectric fermentations were carried out with *Saccharomyces cerevisiae*, obtaining increases in ethanol productivity, without changing the final yield, and also changes in the proportions of byproducts glycerol and acetate. A distinct response was observed for an industrial strain cultivated under the same conditions.

Global gene expression analyses were carried out for a laboratory and industrial strain under bioelectric stimulus. No changes were observed for the fermentative pathway, but there were large variations in expression for genes related to other aspects of yeast physiology, such as membrane lipid synthesis and unknown genes or genes with functions that are apparently unrelated to the fermentation process. A difference in the global response for the two strains was also evident.

An automated method for evolutionary engineering assays was established, which allowed the selection of strains by growth on cellobiose. Using only the genetic variability present within the genome of a diploid industrial strain, it was possible to obtain haploid strains with superior growth rate when compared to the parental strain. Therefore, this strategy may be viable for obtaining superior phenotypes using distant strains of *S. cerevisiae*.

Sumário

Introdução	1
1. O etanol como biocombustível	1
2. Avanços científicos brasileiros na produção de etanol.....	3
Capítulo I – Análise de Expressão Gênica Durante Estímulo Bioelétrico	7
I.1 Introdução	7
I.1.1 Sistemas bioelétricos	7
I.1.2 Métodos de análise da expressão gênica diferencial.....	12
I.1.3 Objetivos	14
I.2 Materiais e Métodos.....	14
I.2.1 Construção e uso de reatores bioelétricos.....	14
I.2.2 Metodologia de monitoramento das fermentações	16
I.2.3 Construção de linhagens com expressão alterada do gene NQR1	17
I.2.4 Extrações de RNA	19
I.2.5 Seqüenciamento de RNA	20
I.2.6 Análise dos dados de RNA-Seq	21
I.3 Resultados e Discussão.....	22
I.3.1 Fermentações com estímulo elétrico	22
I.3.2 Construção de linhagens com expressão alterada do gene NQR1	28
I.3.3 Análise dos resultados de expressão gênica	31
I.4 Conclusões e Perspectivas.....	45
Capítulo II – Evolução de linhagens por seleção de em larga escala	47
II.1 Introdução	47
II.1.1 Engenharia Evolutiva no desenvolvimento de microrganismos industriais	47
II.1.2 Seleção de linhagens por crescimento em celobiose	49
II.1.3 Objetivos	50
II.2 Materiais e métodos.....	51
II.2.1 Construção das linhagens diplóides	51
II.2.2 Desenvolvimento de método para cultivo e ensaio de crescimento	52
II.2.3 Condições de cultivo para seleção	53
II.3 Resultados e Discussão.....	53

II.3.1 Desenvolvimento do ensaio automatizado e padronização das condições de cultivo.....	53
II.3.2 Crescimento das linhagens diplóides.....	58
II.3.3 Crescimento das linhagens haploides	61
II.4 Conclusões e Perspectivas	63
Lista de Abreviações	66
Referências Bibliográficas	67
Anexos	72

Introdução

1. O etanol como biocombustível

O aumento global do consumo energético e da emissão de carbono, como resultado da geração de energia a partir de fontes fósseis, tem agido como uma forte motivação para grupos de pesquisa de todo o mundo que investigam fontes alternativas de energia. Para substituir os combustíveis fósseis, tais fontes alternativas não podem contribuir com a degradação de ambientes naturais e com o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, além de necessariamente serem renováveis (Martinelli & Filoso 2008). Os biocombustíveis são uma opção promissora para este propósito, por serem produzidos em processos fotossintéticos, que absorvem CO₂ atmosférico e geram biomassa para ser posteriormente convertida em um composto que pode servir como combustível no lugar de derivados do petróleo.

Dentre os biocombustíveis já desenvolvidos, o etanol ocupa uma posição de destaque por já ser produzido em grandes quantidades, principalmente pelo Brasil e pelos Estados Unidos, e a tecnologia para utilizá-lo em veículos está bem desenvolvida, na forma de motores “flex” para veículos ou como aditivo na gasolina. Esse composto pode ser produzido por fermentação de sacarose naturalmente presente em certas plantas, de glicose produzida por hidrólise enzimática de amido contido em grãos, além de monossacarídeos resultantes da hidrólise de celuloses e hemiceluloses da parede celular de qualquer material vegetal (Wheals et al. 1999).

O uso desta última fonte de açúcares, também conhecido como biomassa lignocelulósica resulta no chamado “etanol de segunda geração”, que é estudado por grupos de pesquisa de todo o mundo, em busca de métodos de produção eficientes e economicamente viáveis (Soccol et al. 2009). Como o etanol de segunda geração pode ser produzido a partir de qualquer tipo de material vegetal, será possível aumentar a produção mundial de etanol utilizando gramíneas plantadas em terras inadequadas para produção de alimentos e também resíduos de outras culturas. Existem dois principais desafios para que essa nova forma de

produção se torne viável: a recalcitrância da biomassa lignocelulósica à hidrólise e a busca por microorganismos capazes de fermentar o material hidrolisado de forma eficiente. A dificuldade de hidrólise da biomassa se deve à estrutura altamente compacta e resistente da parede celular vegetal, que atualmente requer elevados investimentos em processos químicos ou físicos para tratamento, além de grandes quantidades de enzimas hidrolíticas (Himmel et al. 2007). A limitação no passo de fermentação se deve ao fato da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ser incapaz de fermentar pentoses sem modificações genéticas para introduzir uma via heteróloga e remover a repressão catabólica por glicose (Ha et al. 2011)

Portanto, a maior parte do etanol produzido no mundo ainda é “etanol de primeira geração”, proveniente da fermentação industrial de duas fontes distintas de açúcares: glicose resultante da hidrólise enzimática de amido contido em grãos como o milho nos Estados Unidos e caldo de cana-de-açúcar com alto teor de sacarose no Brasil (Wheals et al. 1999) (Robertson et al. 2008). No entanto, o processo de produção de etanol utilizado pelo Brasil é mais vantajoso dos pontos de vista energético, econômico e ambiental. O balanço energético do etanol de cana-de-açúcar, definido como a razão entre o conteúdo energético em um determinado volume de etanol e a quantidade de energia proveniente de combustíveis fósseis utilizada durante a sua produção, é estimado em 8,2 enquanto o balanço energético do etanol de milho é apenas 1,3 (Goldemberg 2008). O custo de produção do etanol de milho é superior ao custo do combustível de cana-de-açúcar, devido ao maior custo da matéria prima e à maior complexidade do processo industrial necessário para realizar a hidrólise do amido. No entanto, o aproveitamento de subprodutos da fermentação industrial de etanol nos Estados Unidos principalmente para a alimentação de gado permitiu a expansão desta indústria nos últimos dez anos. (Wheals et al. 1999) (Goldemberg 2008). Desde 2007, os Estados Unidos se tornaram o maior produtor mundial de etanol e o crescimento desta produção se manteve em um ritmo estável, enquanto a produção de etanol brasileira se estagnou, como pode ser visto na figura 1 (RFA 2012).

Já no aspecto ambiental, a vantagem do etanol de cana se deve à maior produtividade por hectare da cana e também ao fato de que a produção de etanol a partir do milho compete com a utilização do milho como alimento e matéria-prima

para outras indústrias(Wheals et al. 1999). A produção brasileira de etanol ainda possui uma outra vantagem: a possibilidade de co-geração, que é a queima do bagaço da cana-de-açúcar em caldeiras com a finalidade de gerar energia elétrica para uso próprio das usinas e para venda de energia excedente para companhias elétricas(Ensinas et al. 2007)

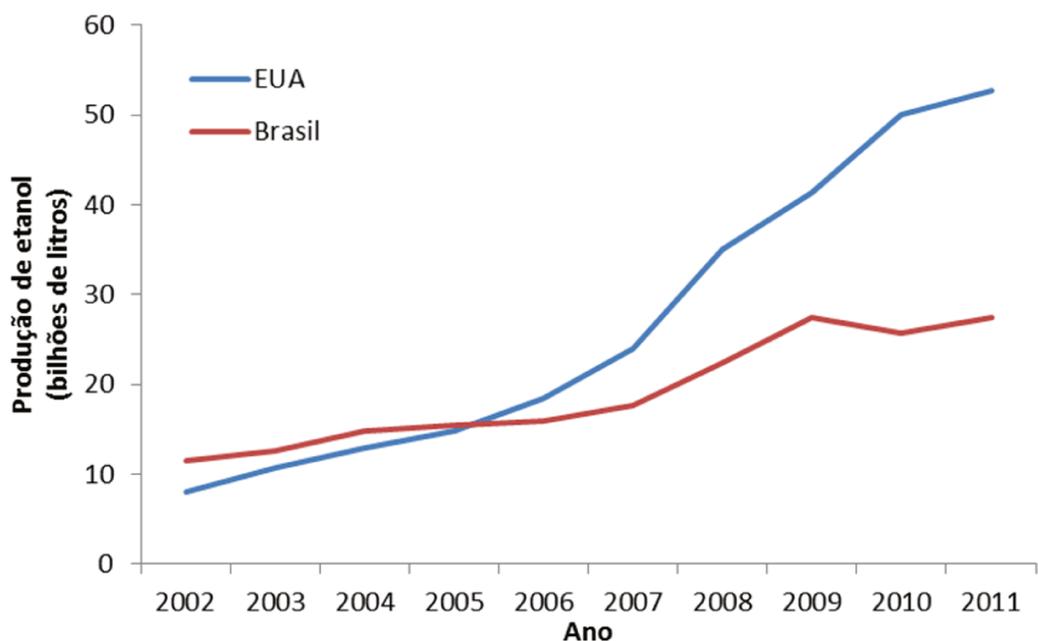


Figura 1 – Comparação entre a produção anual de etanol no Brasil e nos EUA (RFA 2012)

2. Avanços científicos brasileiros na produção de etanol

O emprego do etanol como combustível alternativo no Brasil teve início na década de 1970, quando o governo criou o Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool) para manter o fornecimento de combustíveis no mercado nacional durante o período de crise de fornecimento de petróleo. Essa medida foi possível graças às condições geográficas e climáticas favoráveis ao plantio de cana de açúcar no Brasil, principalmente na região Sudeste, onde hoje se concentra a maioria da área plantada com essa cultura(Martinelli & Filoso 2008). Desde o início do ProÁlcool, as atividades de diversos grupos de pesquisa permitiram a realização de avanços em todos os passos do processo de produção de álcool: desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar, expansão das áreas de cultivo, otimização de métodos de processamento e fermentação nas usinas e seleção de linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* de alta

performance no ambiente industrial(M. Oliveira & Vasconcelos 2006).

Dentre os campos de pesquisa relacionados à produção do etanol que foram citados, as linhagens de leveduras da espécie *S. cerevisiae* utilizadas na fermentação do caldo de cana-de-açúcar até recentemente eram muito pouco estudadas. Silva-Filho e colaboradores(De Souza Liberal et al. 2005) demonstraram que, em muitas usinas, as leveduras comerciais inoculadas no início do período produtivo eram substituídas por linhagens nativas de maior capacidade de permanência no ambiente das dornas de fermentação. No entanto, essa substituição freqüentemente não era notada, pois a produtividade das linhagens nativas, que estavam mais adaptadas às condições encontradas, era igual. A predominância das linhagens nativas também apresenta um problema para a introdução de linhagens geneticamente modificadas, já que as leveduras transgênicas geradas a partir de linhagens de laboratório também são substituídas durante o processo de fermentação(Cunha et al. 2006).

Um estudo de longo prazo das leveduras da coletadas em usinas de todo o Brasil(Basso et al. 2008), resultou no isolamento de várias linhagens nativas que possuem características de interesse para as usinas, alta produtividade e uma grande capacidade de permanência durante todo o período de fermentação. Algumas das linhagens isoladas durante o trabalho passaram a ser utilizadas como inóculo em um grande número de usinas e hoje são denominadas leveduras industriais, como as linhagens PE-2 e CAT-1. Juntas, estas duas linhagens foram utilizadas na produção de 60% do etanol produzido no Brasil na safra de 2007/2008(Basso et al. 2008).

A grande capacidade produtiva e a robustez das linhagens industriais atualmente utilizadas na produção de etanol motivou a busca dos fatores genéticos e fisiológicos que são responsáveis por essas características desejáveis. Nosso grupo recentemente realizou uma análise genética de um diplóide isolado da linhagem PE-2, denominado JAY270, e o seqüenciamento do genoma completo de um esporo, chamado de JAY291, derivado deste diplóide(Argueso et al. 2009). Este trabalho foi a primeira análise genética de uma levedura industrial produtora de etanol e revelou mecanismos que podem explicar a grande capacidade de adaptação ao meio apresentada pela linhagem, como a elevada heterozigose e a presença de rearranjos nas regiões distais dos

cromossomos, que permitem a variação no número de cópias de genes importantes para a sobrevivência no ambiente das dornas de fermentação. Por exemplo, os genes SNO2/3 e SNZ2/3 estão envolvidos no processo de resposta a estresse oxidativo e possuem cópias adicionais no genoma do haplóide JAY291, em relação à linhagem S288c de laboratório, o que sugeriu que esses genes possam ter um papel importante na capacidade de sobrevivência da linhagem PE-2 (Argueso et al. 2009). Essa hipótese foi corroborada por um outro trabalho que analisou variações do número de cópias dos genes SNO e SNZ em linhagens industriais, incluindo PE-2 e CAT-1 e demonstrou que o aumento de número de cópias destes genes torna o crescimento mais eficiente em condições similares às encontradas nas dornas de fermentação de usinas de etanol (B. U. Stambuk et al. 2009). Mais recentemente, foi publicado o genoma de uma segunda linhagem industrial utilizada pela indústria de etanol brasileira, a linhagem CAT-1. Este genoma apresenta características muito similares ao da linhagem PE-2 e estas linhagens são filogeneticamente próximas quando comparadas a linhagens de laboratório ou de produção de vinho (Babrzadeh et al. 2012). No entanto, um estudo comparativo de genomas de múltiplas linhagens de *S. cerevisiae* mostrou que a espécie possui uma enorme reserva de variabilidade genética, que ainda pode ser explorada para o desenvolvimento de linhagens para processos industriais futuros, como os de segunda geração (Liti et al. 2009).

O seqüenciamento do genoma de uma levedura industrial é um avanço importante na compreensão desses organismos, principalmente por possibilitar a realização de análises mais detalhadas de aspectos da fisiologia dessas linhagens. Com uma seqüência genômica completa, é possível estudar a função de genes individuais e também realizar análises de expressão gênica de forma global. Tais abordagens complementam as informações obtidas com o genoma, na busca de estratégias para o melhoramento genético das leveduras industriais e na elaboração de métodos inovadores para aumentar a eficiência da produção de etanol nas usinas.

O objetivo deste trabalho foi buscar novos métodos capazes de gerar ganhos em eficiência para a indústria de bioetanol. Para tanto, foram utilizadas estratégias multidisciplinares pouco exploradas por este campo até o momento, mas com potencial para resultar em grandes benefícios a médio e longo prazos.

As informações já existentes sobre as leveduras de laboratório e industriais serviram de base para o planejamento dos experimentos e interpretação dos resultados obtidos.

Capítulo I – Análise de Expressão Gênica Durante Estímulo Bioelétrico

I.1 Introdução

I.1.1 Sistemas bioelétricos

Um método descrito na literatura que pode gerar avanços na produção de etanol por *S. cerevisiae* é a aplicação de uma corrente elétrica para estimular o metabolismo da levedura em fermentadores modificados com eletrodos, denominados reatores bioelétricos (Thrash & Coates 2008). Em um reator bioelétrico, microrganismos são cultivados em uma câmara contendo o catodo, eletrodo que recebe a corrente elétrica, de um circuito elétrico acoplado a uma fonte de corrente elétrica e este eletrodo transfere elétrons às células. O eletrodo que completa o circuito elétrico normalmente se encontra em uma câmara separada do catodo por uma membrana permeável a íons, para que possa ocorrer o equilíbrio de cargas no sistema. Os elétrons recebidos pelas células podem, então, ser utilizados em reações do metabolismo envolvendo redução de substratos.

A reação final da via de síntese do etanol está incluída na categoria citada, já que uma molécula de acetaldeído é reduzida por dois elétrons provenientes de uma molécula de NADH, gerando uma molécula de etanol como produto. Em uma cultura de *S. cerevisiae* sem estímulo elétrico externo, em um meio de cultura com glicose como única fonte de carbono, os elétrons carregados por moléculas de NADH são provenientes somente do metabolismo da glicose pela via glicolítica. Mais especificamente, os elétrons são transferidos para NAD⁺ na reação de fosforilação de gliceraldeído 3-fosfato (G3P) a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3BPG), que pode ser convertido em acetaldeído após uma série de outras reações da via glicolítica (Figura 1). Portanto, se todos os elétrons transferidos para NAD⁺ na reação de G3P a 1,3BPG fossem utilizados na redução de acetaldeído a etanol, seria atingida a eficiência teórica máxima da fermentação de glicose a etanol, 51,1g de etanol para cada 100g de glicose (2 Mols ou 92g de etanol para cada 1 Mol ou 180g de glicose). No entanto, essa situação não ocorre porque o parte do

NADH celular é sempre direcionado à síntese de subprodutos como o glicerol, que tem uma função de proteção contra *stress* osmótico (Ying 2006), impossibilitando a conversão completa de acetaldeído a etanol e gerando subprodutos indesejáveis na produção de combustíveis, como acetato. As leveduras industriais atingem uma eficiência de até 92% do valor teórico máximo (L. C Basso et al. 2008). Os elétrons provenientes dos eletrodos nos reatores bioelétricos seriam uma forma de fornecer poder redutor suficiente às células para que uma maior proporção dos substratos presentes no meio seja direcionada para a produção de etanol, diminuindo também a geração de subprodutos, ou então induzindo a reciclagem de NADH para NAD⁺ e acelerando o fluxo de carbono pela via fermentativa (Figura 2). Esta previsão é corroborada por estudos realizados com *S. cerevisiae* em reatores bioelétricos, que observaram aumentos na taxa de produção de etanol (Nakanishi et al. 1998) (Shin, et al. 2002) e de até 12% na concentração de etanol ao final da fermentação (Shin, et al. 2002), quando comparados com culturas sem a aplicação de correntes elétricas. Porém, ambos estes estudos somente relatam o aumento de produtividade, sem investigar os mecanismos moleculares que estariam envolvidos no processo.

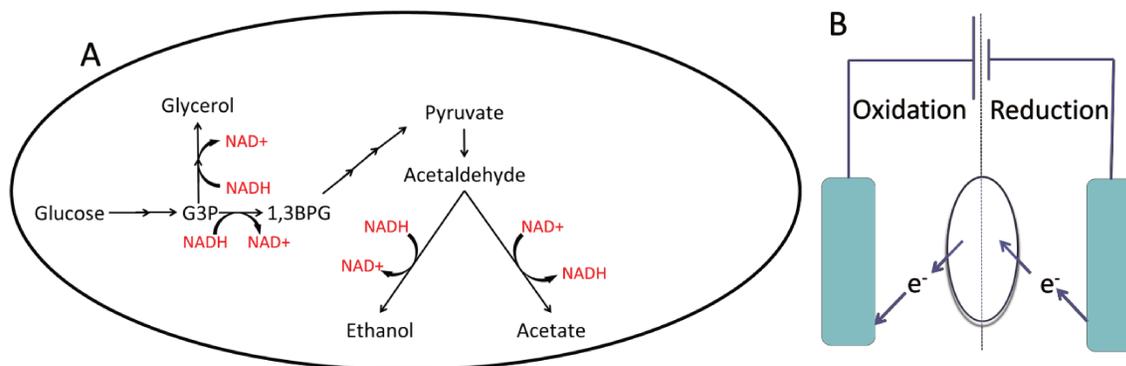


Figura 2. A- Esquema da via de produção de etanol, com os passos de produção e consumo de NADH. B – Representação das possíveis reações que podem ser mediadas por um sistema bioeletroquímico, fornecendo ou removendo elétrons do metabolismo microbiano.

O estímulo do metabolismo de microrganismos por correntes elétricas é um exemplo de aplicação de sistemas bioeletroquímicos, que envolvem trocas de elétrons entre microrganismos e circuitos de eletrodos, em reações de óxido-redução (Rabaey 2010). Esses sistemas são objeto de interesse de grupos de pesquisadores do mundo todo desde o início do século XX, quando Potter (Potter

1911) demonstrou que culturas de *S. cerevisiae* e da bactéria *Escherichia coli* são capazes de gerar pequenas diferenças de potencial elétrico entre dois eletrodos mantidos em soluções de composições idênticas, mas com os organismos inoculados somente na câmara de um dos eletrodos. Vinte anos mais tarde, Cohen (Cohen 1931) conseguiu gerar correntes elétricas mais intensas com bactérias de cinco espécies diferentes, adicionando compostos capazes de facilitar a transferência de elétrons entre células e eletrodos, como íons ferricianeto e benzoquinona. Essas substâncias são apenas dois exemplos de uma classe de compostos atualmente denominados “mediadores redox” exógenos, que são moléculas pequenas e solúveis adicionadas ao meio de cultura. Essas moléculas são capazes de sofrer reações reversíveis de oxidação-redução, em condições de potencial elétrico permissivas à troca de elétrons tanto com componentes celulares como com eletrodos(Rabaey 2010).

Desde o trabalho de Cohen, milhares de artigos envolvendo sistemas bioeletroquímicos foram publicados, principalmente com o objetivo de gerar eletricidade a partir de elétrons provenientes do metabolismo de microrganismos, as chamadas células combustíveis microbianas(Rabaey 2010). Os trabalhos que envolvem a aplicação de uma corrente elétrica para aumentar a produção de compostos reduzidos são mais escassos, mas existem indícios de que organismos capazes de exportar elétrons para o meio também são capazes de importar elétrons do meio(Emde & Schink 1990a)(Emde & Schink 1990b), o que sugere um grau de reversibilidade no processo. Um grande número de espécies de bactérias e fungos possui a capacidade de realizar trocas de elétrons com o meio externo e observou-se que todos esses organismos se dividem em duas categorias em relação ao mecanismo pelo qual ocorre o processo. Uma minoria das espécies de bactérias, dos gêneros *Shewanella* e *Geobacter*, é capaz de interagir fisicamente com a superfície dos eletrodos através de proteínas de membrana ou estruturas especializadas, processo chamado de transferência direta de elétrons(Schaetzle et al. 2008). As demais bactérias e todos os fungos estudados realizam as trocas de elétrons indiretamente por meio de mediadores redox, endógenos ou exógenos(Rabaey 2010). A adição de mediadores exógenos possui desvantagens significativas em relação aos sistemas em que os organismos produzem seus próprios mediadores. Entre essas desvantagens estão o alto custo e a

complexidade do processo de síntese dos compostos orgânicos utilizados como mediadores e a toxicidade de algumas dessas substâncias às células do sistema (Emde & Schink 1990a) (Thrash & Coates 2008). Portanto, o emprego de microrganismos capazes de sintetizar compostos mediadores pode resultar em sistemas bioeletroquímicos mais eficientes e com menor custo de operação.

Recentemente, descrições de novos mediadores redox endógenos vêm sendo publicadas com uma alta frequência (Marsili et al. 2008) (Y.-F. Wang et al. 2008) (Y.-F. Wang et al. 2007) (T. Zhang et al. 2008) (Tian Zhang et al. 2006), até mesmo em organismos que eram considerados inadequados para uso em sistemas bioeletroquímicos, como *E. coli* (Rabaey 2010). Até o momento, nenhum mediador endógeno foi identificado em *S. cerevisiae* e alguns autores sugerem que essa ausência torna as leveduras muito pouco eficientes na realização de trocas de elétrons com o meio, o que significaria que a adição de mediadores sintéticos seria necessária para viabilizar reatores bioelétricos com esses organismos (Gunawardena et al. 2008) (Schaetzle et al. 2008). Porém, os resultados positivos de estimulação elétrica deste organismo para a produção de etanol foram obtidos em meios de cultura sem a adição de mediadores exógenos (Nakanishi et al. 1998) (Shin, et al. 2002). Além destas observações não explicadas, os mediadores endógenos de *E. coli* somente foram encontrados quando o organismo foi cultivado por períodos extensos em uma célula combustível microbiana, o que demonstra que condições ambientais são capazes de modular a produção dos mediadores endógenos (Tian Zhang et al. 2006). Portanto, *S. cerevisiae* pode ser capaz de sintetizar algum composto que aja como mediador em condições ambientais específicas, ou a transferência de elétrons ocorre por algum mecanismo ainda não descrito e que pode ser de grande interesse do ponto de vista de pesquisa básica.

Uma outra estratégia que está sendo explorada nas pesquisas com sistemas bioelétricos é o desenvolvimento de organismos com modificações genéticas que aumentam a eficiência da transferência de elétrons. Em *E. coli*, a superexpressão do gene *GldA*, que codifica para uma glicerol desidrogenase, resulta na secreção de compostos não identificados que agem como mediadores redox (Xiang et al. 2009), mas que possuem características eletroquímicas diferentes dos mediadores endógenos previamente descritos em *E. coli* (T. Zhang

et al. 2008). Em condições de fermentação de glicose, esse gene se encontra reprimido, o que pode explicar o fato desses mediadores não terem sido identificados em organismos selvagens(Xiang et al. 2009). Buscas no banco de dados do genoma de *Saccharomyces* (*Saccharomyces* Genome Database, www.yeastgenome.org) revelaram que *S. cerevisiae* não possui um gene com homologia significativa a GldA de *E. coli* e também não possui uma outra enzima com atividade de glicerol desidrogenase. Portanto, nesta espécie não deve ocorrer a síntese de mediadores endógenos pela mesma via que gera os mediadores de *E. coli*.

No entanto, uma enzima de *S. cerevisiae* recentemente identificada por Jiménez-Hidalgo e colaboradores(Jiménez-Hidalgo et al. 2009), denominada NQR1, possui características que sugerem um possível papel na troca de elétrons entre a célula e o meio. Essa enzima é uma NADH-coenzima Q redutase e foi localizada na membrana plasmática por ensaios de imunofluorescência e Western blot em amostras de células subfracionadas(Jiménez-Hidalgo et al. 2009). Portanto, é possível que NQR1 catalise transferências de elétrons entre os meios extra- e intracelular por meio de redução ou oxidação de coenzima Q, que difunde livremente na membrana plasmática. A expressão do gene é induzida por teores reduzidos de glicose no meio e a sua superexpressão, por meio de vetores de expressão contendo a seqüência codificante completa, resultou em um aumento da respiração acompanhado de uma redução na produção de etanol(Jiménez-Hidalgo et al. 2009). O resultado do ensaio de superexpressão indica que, nas condições utilizadas, NQR1 facilitou a transferência de elétrons de NADH intracelular para substratos do meio extracelular, o que induziu o início do metabolismo aeróbico para suprir o déficit de NADH e levou à menor produção de etanol. No ambiente de um reator bioelétrico, em que existe um excesso de compostos reduzidos pelo catodo no meio extracelular, a superexpressão de NQR1 permitiria avaliar se esta enzima também é capaz de mediar um processo inverso ao descrito, pois resultaria em uma maior síntese de compostos reduzidos, como o etanol. Células portando deleções deste gene são inviáveis, o que impossibilita a utilização de deleções no estudo da função do gene(Yu et al. 2006).

A estratégia de modificação genética dos microrganismos para melhorar a eficiência dos sistemas bioelétricos é promissora, mas o conhecimento sobre os

mecanismos moleculares de transferência de elétrons nos microorganismos ainda é escasso. São necessários estudos da expressão gênica diferencial dos organismos durante as culturas em sistemas bioelétricos, para que mais genes envolvidos no processo possam ser identificados.

I.1.2 Métodos de análise da expressão gênica diferencial

O estudo da expressão gênica diferencial pode contribuir de forma significativa para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos em um determinado processo, pois determina quais genes tiveram sua expressão alterada em resposta a uma mudança nas condições do experimento. As principais técnicas utilizadas para realizar uma análise global dos padrões de transcrição são SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*)(Varela et al. 2005), hibridação em microarranjos de DNA(Ehrenreich 2006) e seqüenciamento de RNA (RNA-Seq) em seqüenciadores de segunda geração('t Hoen et al. 2008)(Marioni et al. 2008b)(Torres et al. 2008). Para os três métodos, é necessária a extração de RNA das células nas diferentes condições estudadas e a transcrição reversa deste RNA para gerar moléculas de DNA complementares (cDNA) a cada espécie de RNA presente na amostra.

A técnica de SAGE utiliza fragmentos de cDNA ligados *in tandem* em plasmídeos bacterianos, para que possam ser amplificados e isolados para posterior seqüenciamento. Após o seqüenciamento, são necessárias análises computacionais para identificar os genes correspondentes a cada fragmento seqüenciado e quantificar a expressão de cada gene com base no número de vezes que a sua seqüência foi encontrada na amostra(Varela et al. 2005). A maior desvantagem deste método é a necessidade de um passo de clonagem dos fragmentos de cDNA em vetores para transformação de bactérias, processo que consome muito tempo.

Os microarranjos de DNA são lâminas contendo cópias de todos os genes de um organismo, depositados de forma ordenada, e que são hibridadas com o cDNA de cada condição de interesse(Ehrenreich 2006). Para realizar a comparação entre duas condições de cultura, as amostras de cDNA são previamente marcadas com fluoróforos distintos para cada condição e as

intensidades de fluorescência dos dois fluoróforos permitem a quantificação relativa da expressão de cada gene, já que a fluorescência é proporcional à quantidade de cDNA marcado hibridado com a lâmina. Esta técnica é simples e pode ser realizada em pouco tempo, mas depende da disponibilidade dos arranjos de DNA específicos para o organismo estudado. Existem microarranjos comercializados para linhagens de levedura de laboratório, mas para as linhagens industriais de produção de etanol seria necessária a produção de novos arranjos a partir do genoma seqüenciado.

O método de RNA-Seq evita alguns dos problemas das outras duas técnicas, pois utiliza fragmentos de cDNA de fita dupla, que são ligados a adaptadores, amplificados *in vitro* e submetidos ao seqüenciamento em equipamentos de segunda geração, como Illumina HiSeq2000 (Marioni et al. 2008a). Como na técnica de SAGE, os resultados obtidos devem passar por alinhamentos com seqüências genômicas para identificar os fragmentos e a quantificação da expressão é feita pelo número de cópias seqüenciadas de cada gene. A principal vantagem deste método é que milhões de fragmentos são simultaneamente seqüenciados, possibilitando a detecção de transcritos fracamente expressos. O elevado custo dos equipamentos e reagentes para a realização de RNA-Seq eram uma desvantagem significativa quando a técnica foi desenvolvida, mas o rápido desenvolvimento e a intensa competição entre as empresas responsáveis estão tornando essa técnica cada vez mais acessível.

Até o momento, os estudos de expressão gênica em leveduras foram focados principalmente no perfil de expressão durante a produção industrial de alimentos e bebidas, como pão (Tanaka et al. 2006) (Tanaka *et al.*, 2006), vinho (Varela et al. 2005) e cerveja (Olesen et al. 2002) (Olesen *et al.*, 2002). Mais recentemente, foi feita uma análise de expressão durante a produção de etanol a partir de amido hidrolisado (Li et al. 2010). Entretanto, ainda não existe um estudo publicado que analise diferenças de expressão gênica em leveduras cultivadas sob estímulo de correntes elétricas e este tipo de trabalho também é escasso para outros organismos cultivados em sistemas bioelétricos. Uma análise recente, por microarranjos, da expressão gênica de *E. coli* cultivada em uma célula combustível microbiana revelou aumentos na expressão de genes relacionados à cadeia respiratória e ao transporte de compostos pela membrana (Qiao et al.

2009), o que pode indicar um papel importante para as proteínas codificadas por esses genes no processo de transferência de elétrons. Portanto, mais estudos de expressão diferencial são necessários para uma maior elucidação dos mecanismos que atuam nas células cultivadas em sistemas bioelétricos.

I.1.3 Objetivos

O objetivo desta etapa do trabalho foi buscar mecanismos moleculares de *Saccharomyces cerevisiae* responsáveis pelo aumento na produção de etanol sob estímulo por correntes elétricas e vias possíveis para otimização do método

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

1. Reproduzir os resultados de estímulo do metabolismo em linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* por correntes elétricas, gerando aumentos de concentração final de etanol.

2. Avaliar se o cultivo de linhagens de leveduras industriais em condições de estímulo por corrente elétrica é capaz de gerar um aumento na produção de etanol.

3. Gerar linhagens com alterações de expressão para o gene NQR1.

4. Analisar a expressão gênica das leveduras de laboratório e industriais em condições de cultura com estímulo elétrico, para identificar genes que atuam no processo.

I.2 Materiais e Métodos

I.2.1 Construção e uso de reatores bioelétricos

As fermentações com estímulo por corrente elétrica foram feitas em um reator construído com base nos experimentos de Nakanishi e colaboradores (Nakanishi et al. 1998). O reator é constituído de um frasco Erlenmeyer com dois eletrodos inseridos diretamente dentro do meio de cultura, sem separação entre o catodo e o anodo do circuito (Figura 3). Nesta configuração, podem ocorrer tanto

reações de redução (doação de elétrons) como oxidação (remoção de elétrons). O desenho original utilizava eletrodos de platina, mas por questões de custo e disponibilidade, foram construídos eletrodos de aço inox 304. Durante os experimentos, foi possível verificar uma notável oxidação dos eletrodos durante as fermentações. Portanto, os eletrodos eram polidos para expor uma superfície lisa e não-oxidada antes de cada experimento, evitando assim efeitos de isolamento elétrico causados pela oxidação do material.

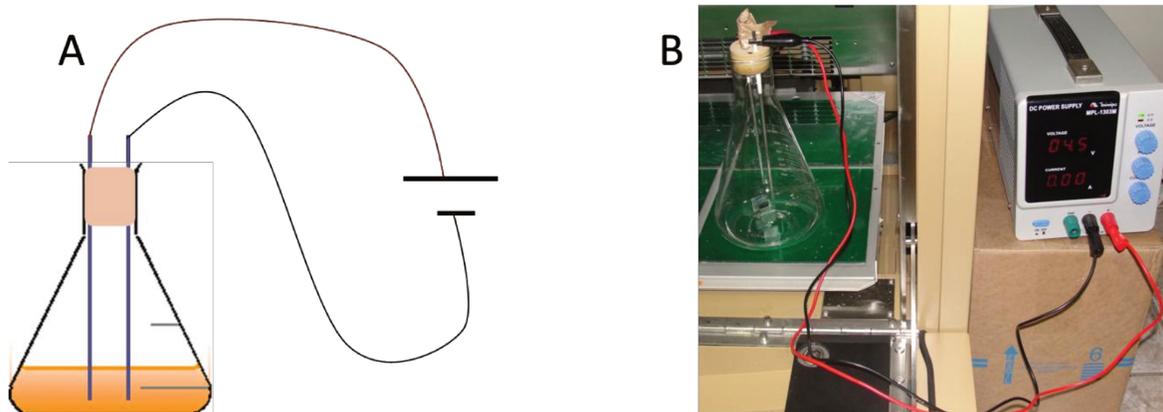


Figura 3. A – Representação esquemática do reator bioelétrico montado para a realização dos experimentos. Ambos os eletros estão imersos no meio de cultura e a corrente é fornecida por uma fonte de corrente externa. B – Sistema montado e colocado dentro do *shaker* onde as culturas eram incubadas com agitação constante a 170rpm e 30°C.

A corrente elétrica foi aplicada nas fermentações por meio de uma fonte de voltagem DC (Minipa, Brasil) (Figura 3). A voltagem aplicada e a corrente que passa pelo sistema foram monitoradas periodicamente ao longo das fermentações por meio de um multímetro. Todos os experimentos de fermentação com estímulo elétrico foram feitos com um controle sem corrente elétrica com o mesmo lote de meio de cultura, inoculado com a mesma quantidade de células e incubado nas mesmas condições. Com esses controles, é possível determinar o efeito da corrente elétrica de forma direta, removendo a variação que normalmente ocorre entre experimentos devido a variações no meio de cultura, temperatura de incubação, agitação e quantidade de células inoculadas.

O meio de cultura utilizado para todas as culturas foi YEPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose). Para os experimentos de

fermentação, a concentração de glicose utilizada foi 10% ou 18%, mantendo os demais componentes inalterados. Para iniciar as fermentações, foi inicialmente feito um pré-inóculo em 5mL de YEPD, utilizando uma única colônia isolada de uma cultura em meio YEPD com ágar, que foi mantido a 30°C com 170rpm de agitação em uma incubadora Multitron (Infors HT, Suíça). Após o crescimento do pré-inóculo, todo o meio de cultura foi transferido para um frasco contendo 100mL de YEPD e a mesma incubação foi feita. Esta cultura foi utilizada como inóculo das fermentações, fazendo as diluições apropriadas para que a densidade óptica inicial seja próxima de 0,5, com base em medidas de absorbância a 600nm.

I.2.2 Metodologia de monitoramento das fermentações

A quantificação de substratos, etanol e subprodutos de fermentação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As amostras retiradas das fermentações foram centrifugadas para remoção de células, diluídas com água Milli-Q (Millipore, EUA) para que fiquem dentro das concentrações aceitáveis para detecção e filtradas em membranas de 0,45µm. Para cada composto que se deseja monitorar, foi feita uma curva padrão com diluições conhecidas da substância e então as amostras de fermentação podiam ser precisamente quantificadas. Foi padronizado um método na coluna Aminex HPX-87H (BioRad, EUA), no cromatógrafo Alliance 2795HT (Waters, EUA) com monitoramento por índice de refração por um detector Waters 2414. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 2mM a um fluxo de 0,6mL/min e os compostos monitorados são glicose, glicerol, ácido acético e etanol. O primeiro é o substrato para fermentação utilizado no meio de cultura e glicerol e ácido acético são subprodutos da fermentação.

O método estabelecido se mostrou bastante reprodutível, de alta sensibilidade, e capaz de quantificar compostos em concentrações até 50g/L. Portanto, foi considerado adequado para realizar o monitoramento dos produtos e do consumo de substrato para todas as fermentações do trabalho. Todos os resultados de fermentações apresentados foram obtidos por meio desta metodologia.

Além das análises por HPLC, foi monitorado o crescimento celular durante todas as fermentações, por meio de espectrofotometria. As amostras coletadas são medidas em um espectrofotômetro Ultrospec2000 (Pharmacia, Suécia), no comprimento de onda de 600nm. Quando as medidas eram superiores ao limite de detecção do aparelho (1 unidade de absorbância), foram feitas diluições das amostras e do meio de cultura utilizado como branco, para que as medições continuassem precisas.

I.2.3 Construção de linhagens com expressão alterada do gene NQR1

Para alterar a expressão do gene NQR1, foram feitas construções de vetores contendo promotores endógenos de *S. cerevisiae* ligados ao gene de resistência a geneticina, KanMX4, para substituição do promotor endógeno deste gene. Primeiro, foram escolhidos três promotores com valores de expressão inferiores ao do gene NQR1 e dois promotores que são mais fortemente expressos (Tabela 1). Os dados de expressão são derivados de RNA-Seq de uma fermentação em escala industrial com a linhagem JAY-270 (Osmar Vaz de Carvalho Netto, dados não publicados). As regiões consideradas parte do promotor contemplam toda a sequência *upstream* do sítio de início de tradução do respectivo gene, até o início da sequência codificante do gene adjacente no genoma da linhagem JAY270.

Tabela 1 – Valores de expressão do gene NQR1 e dos promotores escolhido em uma fermentação industrial com a linhagem JAY270

Gene	Expressão (RPKM \pm desvio padrão)
NQR1	52 \pm 22
BET5	14 \pm 2
YPD1	21 \pm 3
SDT1	36 \pm 3
PFY1	730 \pm 116
TEF1	6170 \pm 2297

As construções foram feitas amplificando os promotores do DNA genômico de JAY270 por PCR com a enzima GoTaq Flexi (Promega, EUA) e as seguintes condições de reação: 7,5pmol de cada *primer*, 0,25mM dNTPs, 3,5mM MgCl₂, 2ul de tampão Go Taq Flexi Buffer 5x, 30ng de DNA genômico e 0,1μL de enzima Go Taq Flexi para uma reação de 10μL. Os parâmetros da reação foram os seguintes: 2 minutos a 95°C para desnaturação inicial do DNA; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C; 5 minutos de extensão final a 72°C. Os primers desenhados para essa amplificação contém sítios para as enzimas de restrição EcoRI e SacII em suas extremidades 5', para que os fragmentos amplificados possam ser ligados ao vetor pFA6-KanMX4. Após o PCR, as reações foram corridas em gel de agarose 1% para verificação da amplificação dos fragmentos e uma nova reação feita com volume total de 50μL. Estas reações foram, então, purificadas utilizando o kit PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

O plasmídeo pFA6-KanMX4 e os promotores amplificados foram digeridos com as endonucleases de restrição EcoRI e SacII com as seguintes condições: 2μL de tampão NEB4, 0,5 μL de enzima EcoRI, 1,5 μL de enzima SacII, 1 μg de DNA plasmidial ou 100ng de DNA amplificado dos promotores em um volume final de 20uL, incubando por 5 horas a 37°C. A digestão completa do vetor foi checada correndo digestões feitas com cada enzima separadamente em gel de agarose e os produtos digeridos foram purificados com o kit PureLink PCR Purification kit. Então, cada promotor foi ligado ao vetor linearizado utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Promega, EUA) nas seguintes condições: 1 μL de tampão Ligase Buffer, 0,3 μL de enzima T4 Ligase, 20ng de DNA no total (promotor:vetor na razão molar 3:1) em um volume total de 10 μL e incubando a 25°C por uma hora. As ligações foram transformadas por eletroporação em *E. coli* DH10B e os plasmídeos resultantes extraídos por *mini-prep* com lise alcalina(Ausubel et al. 1998). Ao final deste processo, um vetor para cada promotor escolhido havia sido construído

Para a transformação das leveduras, foi amplificado de cada vetor um fragmento contendo o promotor de interesse na extremidade 3' e o gene marcador KanMX4 na extremidade 5'. Os primers utilizados para esta reação de PCR

possuíam em suas extremidades 5' caudas de 45pb com homologia à região imediatamente *upstream* e *downstream* do sítio de iniciação da tradução do gene NQR1. Dessa forma, os produtos gerados poderiam ser utilizados para transformação de leveduras por recombinação homóloga, inserindo o novo promotor e o marcador de resistência a geneticina entre a sequência codificante do gene e seu promotor original, deixando o gene sob o controle transcricional do novo promotor. A transformação foi feita pelo método de acetato de lítio (Ausubel et al. 1998). Após as transformações, os clones positivos foram confirmados amplificando a região inserida em cada linhagem, por PCR. Os promotores foram sequenciados usando o kit Big Dye Terminator (Life Technologies, EUA) no sequenciador ABI 3500 (Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A esporulação de linhagens diplóides foi feita segundo protocolo de Ausubel e colaboradores (Ausubel et al. 1998). As tétrades resultantes foram digeridas em tampão de micromanipulação (Sorbitol 1M, Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 10mM, NaH_2PO_4 10mM, contendo 20 μL de solução 1mg/mL da enzima Lyticase (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão fosfato 10mM pH 7,5 e 4 μL de β -mercaptoetanol) por uma hora a 30°C. Após a digestão, a dissecação foi feita utilizando um micromanipulador, em meio YEPD, e as placas foram incubadas a 30°C para crescimento dos esporos isolados e observação dos resultados

I.2.4 Extrações de RNA

Todas as extrações de RNA foram feitas com material coletado durante as fermentações. O meio de cultura foi imediatamente centrifugado a 8000g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e as células congeladas em nitrogênio líquido, antes de serem armazenadas a -80°C até o momento da extração. Antes de iniciar a extração, o material foi descongelado lentamente em banho de gelo, lavado com H_2O DEPC e centrifugado novamente a 8000g por 5 minutos a 4°C. As extrações foram feitas de acordo com o protocolo de fenol ácido quente (Ausubel et al. 1998).

As células lavadas foram ressuspensas em 400µL de tampão TES (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 10mM, 0,5%SDS) e foram adicionados 400µL de fenol ácido, vortexando vigorosamente cada tudo por 10 segundos. O material foi incubado a 65°C por uma hora, vortexando todos os tubos a cada 10 minutos. Após essa incubação, os tubos foram transferidos para banho de gelo por 5 minutos e centrifugados a 13000g por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tudo, ao qual foram adicionados 400µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), misturando o conteúdo dos tubos por vortex e repetindo o passo de centrifugação. A nova fase aquosa foi transferida para tubos contendo 40µl de acetato de sódio 3M pH5,2 e 1mL de etanol 100% gelado, os tubos foram incubados a -20°C por 15-30 minutos para precipitação do RNA e centrifugados a 13000g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi lavado com etanol 70% gelado e centrifugado novamente por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos abertos, invertidos sobre papel toalha, para que o etanol remanescente evaporasse. Então, o material foi ressuspensado em H₂O, quantificado por espectrofotometria no aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e sua qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante.

Para a eletroforese em gel desnaturante, foi preparado um gel com 1,5% (w/v) de agarose contendo 0,5% de formaldeído (v/v) em tampão MOPS (MOPS-NaOH ph 7,0 20mM, Acetato de sódio 10mM, EDTA 1mM). Aproximadamente 1µg de cada amostra de RNA foi diluída em tampão de carregamento (2,5µl de MOPS 10x, 4,5µl de formaldeído, 12,5µl de formamida, 1µl de xilenocianol 0,25% (w/v), 8µl de H₂O DEPC e 1µl de brometo de etídio 10mg/ml), incubada a 65°C por 10 minutos, 4°C por 2 minutos e aplicada no gel. O tampão de corrida utilizado foi MOPS, a voltagem aplicada foi de 4v/cm, por aproximadamente 90 minutos.

1.2.5 Seqüenciamento de RNA

A purificação do RNA mensageiro e a preparação das bibliotecas para sequenciamento foram feitas com o kit TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina, EUA), no centro de sequenciamento de alto desempenho da University of North Carolina (EUA), pelo aluno Javier Correa Alvarez (processo fapesp nº) sob

supervisão do Prof. Piotr Mieczkowski. As amostras foram marcadas com *tags* de forma que seis amostras diferentes foram sequenciadas em cada calha de uma corrida no sequenciador HiSeq2000 (Illumina, EUA), gerando sequências de 50 pares de base. Amostras provenientes de um mesmo ponto de uma fermentação, controles e tratadas, foram sempre sequenciadas em uma mesma calha para reduzir a variabilidade que ocorre entre corridas distintas de sequenciamento. Após o sequenciamento, os dados foram tratados e enviados ao Brasil na forma de sequências FASTQ, contendo os reads e seus respectivos valores de qualidade.

I.2.6 Análise dos dados de RNA-Seq

Toda a análise dos dados de RNA-Seq foi feita utilizando os servidores do Laboratório de Genômica e Expressão. As sequências utilizadas como referência foram o genoma(Goffeau et al. 1995) e os genes da linhagem S288c (www.yeastgenome.org), além do genoma e da predição dos genes para a linhagem industrial JAY270(Argueso et al. 2009). Para os alinhamentos, foi utilizado o software Bowtie(Langmead et al. 2009), com os parâmetros descritos na seção Resultados. A determinação do valor de corte para expressão foi feita utilizando o software OriginPro8 (OriginLab, EUA). A análise estatística da expressão diferencial dos genes em cada par de bibliotecas foi feita utilizando os pacotes BaySeq(Hardcastle & Kelly 2010) e DESeq (Anders & Huber 2010). Todos os valores de expressão serão apresentados na forma de RPKM (*reads* por kilobase de modelo de éxon por milhão de reads alinhados) ou na forma de *fold change*, que é a fator pelo qual o valor de expressão de um gene difere da sua condição controle. A análise de enriquecimento de categorias GOSlim foi realizada utilizando o pacote BINGO do software de análise e visualização de dados Cytoscape.

I.3 Resultados e Discussão

I.3.1 Fermentações com estímulo elétrico

Os experimentos de fermentação foram inicialmente feitos com um isolado haploide da linhagem de laboratório de *S. cerevisiae* S288c, denominada FY23. Essa linhagem possui um desempenho fermentativo pobre se comparado com as linhagens industriais utilizadas nas usinas de etanol do Brasil, mas foi escolhida por ser geneticamente e fisiologicamente mais bem caracterizada do que as linhagens industriais. Esse fator facilita a análise dos dados de expressão gênica que serão gerados de leveduras sob estímulo elétrico, já que seu genoma está muito bem anotado, reunindo todas as informações conhecidas sobre cada gene no Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org)

A tabela 2 contém os resultados dos testes iniciais de fermentação com a linhagem S288c no reator bioelétrico. Foram feitos experimentos com voltagem igual a 1,5V, mas estes não apresentaram diferenças em relação aos controles, então não foram incluídos na tabela. Na condição de voltagem de 6,0V, os eletrodos apresentaram sinais de corrosão, então decidiu-se realizar os experimentos seguintes sempre utilizando 4,5V. Nas demais condições, foi possível observar aumentos de produtividade de etanol entre 3% e 6% e aumentos similares na taxa de consumo de glicose quando era aplicada a corrente elétrica. Por outro lado, o rendimento de etanol não foi afetado, nunca apresentando uma variação maior que 1% entre o controle e a condição experimental, sendo que em alguns casos o controle teve um rendimento final ligeiramente maior que a cultura estimulada por corrente elétrica. Outra alteração que foi observada nas condições de estímulo elétrica foi na razão entre as concentrações finais de ácido acético e glicerol. Em todas as condições de estímulo elétrico, essa razão foi bastante superior em relação ao controle, o que indica que a corrente elétrica está exercendo uma grande influência sobre o metabolismo desses metabólitos diretamente relacionados ao estado redox da célula. Um efeito que foi observado por Nakanishi *et al.* (1998) e não foi observado nestes experimentos é um aumento na taxa de crescimento celular quando a corrente é aplicada. Em todos os experimentos, o crescimento foi acompanhado

pela absorbância a 600nm das amostras e não houveram diferenças entre as condições experimentais e controles.

Tabela 2 – Resumo dos resultados dos experimentos de fermentação com estímulo elétrico, com a linhagem S288c

Condições do experimento		Rendimento de etanol (g/g substrato consumido)	Produtividade de etanol (g/Lh)	Taxa de consumo de glicose (g/Lh)	Razão ácido acético / glicerol (g/g)
10% glicose, 3V	Controle	0,47	1,38	2,94	0,45
	Experimental	0,46	1,45	3,13	0,61
	Razão controle / experimental	0,99	1,05	1,06	1,37
10% glicose, 4,5V	Controle	0,45	1,78	3,91	0,32
	Experimental	0,45	1,89	4,10	0,50
	Razão controle / experimental	1,00	1,06	1,05	1,54
10% glicose, 6V	Controle	0,47	1,95	4,19	0,30
	Experimental	0,47	2,01	4,35	0,52
	Razão controle / experimental	0,99	1,03	1,04	1,69
18% glicose, 6V	Controle	0,47	1,83	3,85	0,15
	Experimental	0,48	1,91	4,07	0,30
	Razão controle / experimental	1,01	1,05	1,06	2,02

Para realizar a análise de expressão gênica em larga escala, foram realizadas fermentações em volumes maiores de meio de cultura, para permitir a coleta periódica de células, que teriam seu RNA total extraído. Nesses experimentos, também foi incluída a linhagem industrial diplóide JAY270, para determinar se esta responderia da mesma forma ao estímulo bioelétrico e comparar as alterações de expressão gênica nas duas linhagens. Neste

experimento (Figura 4), a linhagem JAY270 manteve a massa celular elevada no final da fermentação com estímulo bioelétrico, enquanto na condição controle houve uma queda da massa celular observada por absorbância a 600nm, diferentemente do que ocorre com a linhagem de laboratório. O aumento da produtividade de etanol para esta linhagem foi menor do que o observado para S288c, mas ainda pode ser observado. Na linhagem industrial, não houve o efeito claro sobre a concentração final dos subprodutos como ocorreu na linhagem de laboratório.

Controle
Bioelétrico

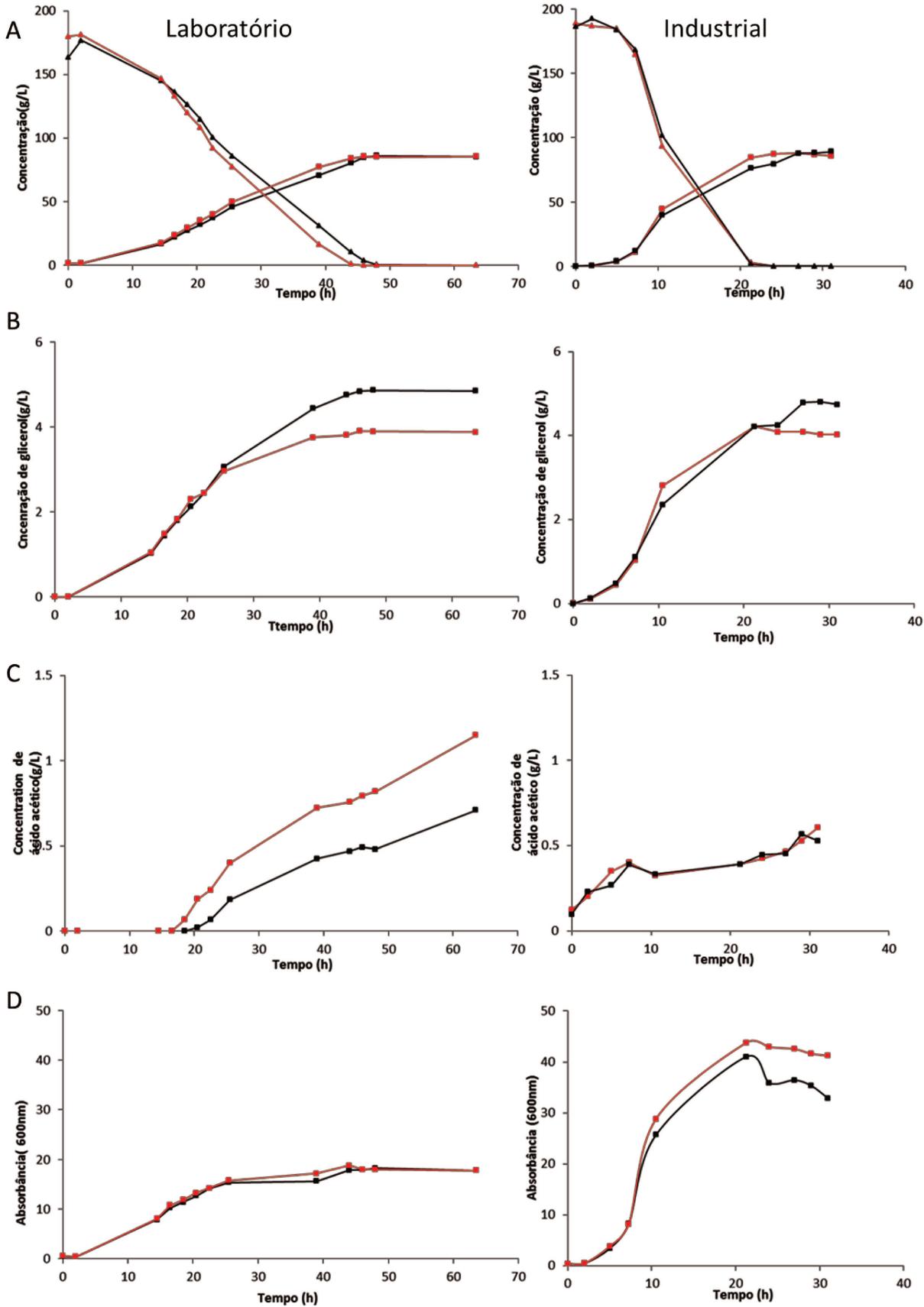


Figura 4 – Resultados das fermentações que foram utilizadas para análise de expressão gênica, à esquerda está a fermentação com a linhagem de laboratório S288c e à direita é a fermentação com a linhagem industrial JAY270. A – Consumo de glicose e produção de etanol. B – Produção de glicerol. C – Produção de ácido acético. D – Crescimento celular. Nesta figura, o controle sempre está em preto e a condição com estímulo bioelétrico, em vermelho.

Seis pontos de cada uma dessas fermentações foram escolhidos e o RNA extraído foi submetido para sequenciamento de RNA na University of North Carolina (EUA). Para a linhagem S288c, as coletas foram nos tempos 0h, 4h, 18,5h, 27,5h, 42,5h e 48,5h. Já para a linhagem JAY270 as coletas foram feitas após 0h, 5h, 10,5h, 21,25h, 27h e 31h de fermentação. Um total de quatro *lanes* do sequenciador Illumina HiSeq2000 foram utilizados para a análise de expressão, contendo bibliotecas em multiplex de 6 amostras para cada lane utilizado.

Para garantir que os resultados observados eram decorrentes de algum efeito direto das correntes elétricas sobre o metabolismo das leveduras, foram realizados experimentos para determinar se as alterações observadas poderiam ser indiretamente causadas. O primeiro fator testado foi a temperatura, já que a passagem de corrente elétrica pelo meio de cultura gera calor, assim como ocorre em qualquer meio condutor. Para isso, foi feito um experimento sem corrente elétrica e sob duas condições diferentes de temperatura (30°C e 32°C), mantendo as demais condições iguais (Figura 5). Esse experimento demonstrou que o efeito da corrente elétrica não pode ser resultado do aquecimento do meio de cultura, já que a cultura a 32°C teve um desempenho muito inferior à fermentação nas condições normais. As leveduras utilizadas tiveram seu crescimento afetado negativamente pela fermentação em temperatura mais alta que o habitual, provavelmente por estarem adaptadas há muitas gerações ao cultivo nas condições relativamente amenas de laboratório.

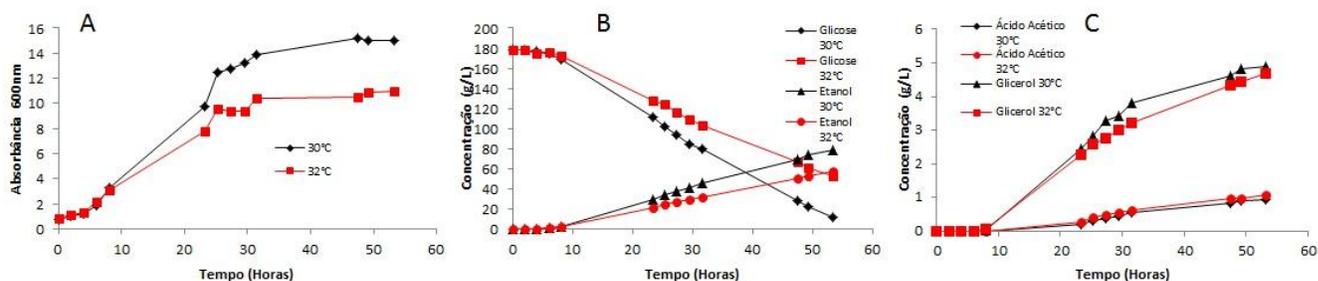


Figura 5 – Fermentação sob duas temperaturas distintas, sem estímulo elétrico. O meio inicial continha 180g/L de glicose. A – Crescimento celular, representado por medidas de absorvância a 600nm. B – Quantificação de glicose e etanol. C – Quantificação de ácido acético e glicerol

O segundo fator testado foi a capacidade da própria corrente elétrica de realizar reações de oxidação e redução na superfície dos eletrodos, de forma completamente independente de células. Se essas reações abióticas fossem as responsáveis pelo efeito observado nas fermentações, a incubação de um meio de cultura sem células com corrente elétrica deveria resultar em perda de glicose e glicerol e produção de etanol ou ácido acético. Para isso, foi utilizado o meio de cultura do experimento do efeito da temperatura, já que havia glicose remanescente e todos os produtos estavam presentes em concentrações detectáveis. O meio foi centrifugado para remoção da massa celular e autoclavado para garantir a sua esterilidade, depois foi incubado nas condições de fermentação, incluindo a corrente elétrica (6,0V) em um dos frascos. Amostras foram tomadas periodicamente durante dois dias e não houveram mudanças detectáveis nas concentrações dos quatro metabólitos quantificados (Figura 6).

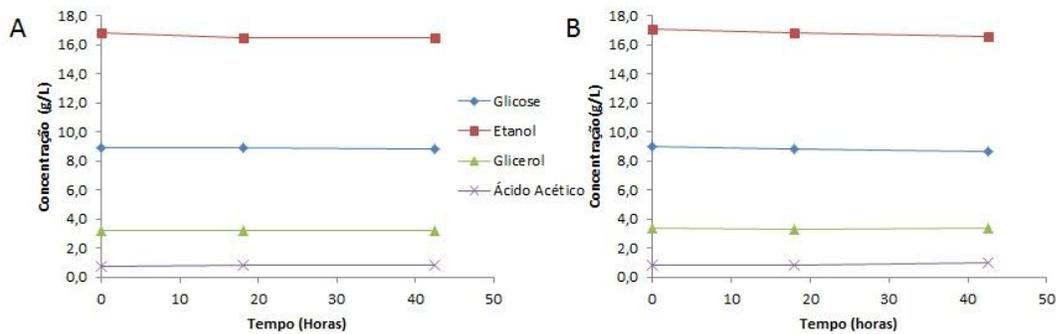


Figura 6 – Controle do efeito da corrente elétrica sobre o substrato e os produtos da fermentação em um meio contendo todos os compostos na ausência de células. A – Frasco controle, sem corrente elétrica. B – Frasco experimental, com voltagem de 6,0V.

Um outro fator que poderia afetar os resultados é a presença de O_2 no meio de cultura nos experimentos com corrente aplicada, já que era possível observar evolução de gases a partir dos eletrodos quando corrente era aplicada. No controle, após o crescimento celular, a concentração de O_2 dissolvida é muito próxima de zero. No entanto, em um experimento realizado em fermentadores, não foi possível observar diferenças entre um controle em condições anaeróbicas e uma fermentação com uma taxa de aeração baixa, simulando o que era observado nos eletrodos do sistema bioelétrico. Portanto, todos esses experimentos juntos permitem concluir que os resultados observados nas fermentações provêm de uma interação entre a corrente elétrica e as leveduras, não podendo ser explicada por alterações de temperatura, ou reações químicas simples ocorrendo na superfície dos eletrodos, ou uma influência de gás oxigênio liberado na superfície dos eletrodos.

I.3.2 Construção de linhagens com expressão alterada do gene NQR1

Foram transformadas as linhagens haploides S288c de laboratório e JAY270 industrial com as cinco construções para alterar a expressão do gene NQR1. Linhagens haploides foram utilizadas para evitar a influência do promotor original que continuaria regulando o gene NQR1 no cromossomo homólogo, já que

a transformação resulta na inserção da construção em apenas um loco do genoma. As transformações com os dois promotores de expressão mais alta não apresentaram problemas. No entanto, dos promotores para redução de expressão, somente a construção com o promotor YPD1 resultou em clones positivos. Essas três construções que foram obtidas com sucesso foram amplificadas do genoma por PCR e sequenciadas para confirmar a integridade das sequências inseridas. Somente os promotores PFY1 e TEF1 tiveram suas sequências completamente confirmadas, enquanto o promotor YPD1 inserido possuía uma inserção de uma sequência indesejada na região imediatamente adjacente à sequência codificante de NQR1, possivelmente anulando a função deste novo promotor.

As tentativas de transformação com as construções dos promotores BET5 e SDT1 resultavam em zero colônias ou falsos positivos que não continham insertos substituindo o promotor do gene NQR1. Como NQR1 é um gene essencial para a espécie *S. cerevisiae*, uma possível explicação para essa dificuldade de transformação seria que os promotores escolhidos não eram capazes de produzir uma quantidade suficiente de transcritos do gene NQR1 para a manutenção da célula e todas as células que eram transformadas se tornavam inviáveis. Para confirmar esta hipótese, todas as construções foram transformadas na linhagem JAY270, que é diploide e pode ser esporulada para confirmar o fenótipo letal dos haploides resultantes. Desta vez, todas as transformações resultaram em colônias que continham os insertos desejados, então todos os transformantes diploides foram esporulados. Após a dissecação das tétrades resultantes, todos os transformantes que tiveram as construções com os promotores BET5 e SDT1 inseridos em seus genomas tiveram no máximo dois esporos viáveis por tétrade (Figura 7). Já os diplóides que foram transformados as construções YPD1, PFY1 e TEF1 tiveram tétrades com quatro esporos viáveis, como seria esperado quando a expressão do gene NQR1 não está completamente. Portanto, pode-se concluir que os promotores construídos para reduzir a expressão do gene NQR1 resultaram em uma redução na transcrição desse gene forte demais para que a célula se mantenha viável. A inserção indesejada observada na construção do promotor YPD1 provavelmente contém algum elemento que permitiu a manutenção da expressão normal deste gene, o que levou ao isolamento de colônias na transformação dos haploides.

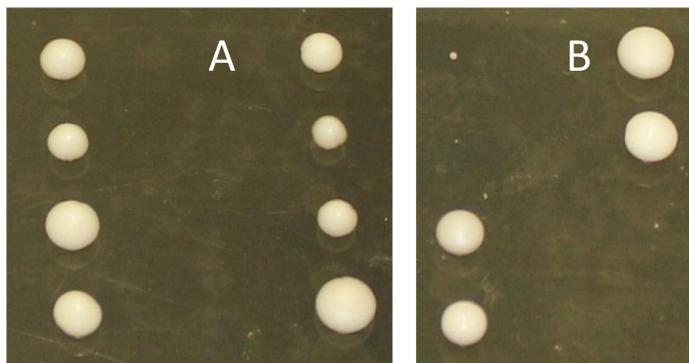


Figura 7. Tétrades dissecadas das linhagens transformadas com as construções para alteração de expressão do gene NQR1. A – Linhagem transformada com promotor TEF1, mais forte que o promotor NQR1, com quatro esporos viáveis por tétrede. B – Linhagem transformada com promotor BET5, mais fraco que o promotor NQR1, com apenas dois esporos viáveis por tétrede.

Como Jiménez-Hidalgo e colaboradores (Jiménez-Hidalgo et al. 2009) relataram uma redução na produção de etanol quando o gene NQR1 era superexpresso, em condições de fermentação normal, foram feitos testes fermentativos com as linhagens transformadas com os promotores PFY1 e TEF1. Foi utilizado meio YEPD contendo 10% de glicose e as amostras coletadas foram quantificadas por HPLC como para as fermentações bioelétricas. No entanto, não foi possível observar alterações na produção de etanol, no consumo de glicose ou nas concentrações dos subprodutos glicerol e acetato em nenhum dos experimentos realizados. Uma possível explicação para este conflito com os resultados de Jiménez-Hidalgo e colaboradores (Jiménez-Hidalgo et al. 2009) é o fato de que os experimentos relatados nesse trabalho terem sido feitos com meios contendo baixas concentrações de glicose, no máximo 2%, que foi rapidamente consumida e induziu o início do consumo de etanol pela via respiratória. Já nos experimentos aqui descritos, a alta concentração de glicose provavelmente manteve a respiração reprimida durante todo o período observado, impedindo o início da respiração. As linhagens industriais portando a construção para superexpressão do gene NQR1 foram a base para o depósito de uma patente de conceito no INPI (ver Anexo).

I.3.3 Análise dos resultados de expressão gênica

Foram geradas 24 bibliotecas distintas, sendo 6 para cada combinação de condição experimental e linhagem. Os números de *reads* obtidos estão na tabela 3. Os dados de sequenciamento gerados foram analisados por meio de alinhamentos dos *reads* contra bancos de dados de *Saccharomyces cerevisiae* S288c e JAY270, utilizando o software Bowtie 0.12.7(Langmead et al. 2009). A primeira análise realizada foi um teste de diferentes parâmetros de alinhamento com um subconjunto dos dados para determinar quais seriam os parâmetros utilizados para o alinhamento e análise do conjunto completo de dados. Foi utilizada uma única biblioteca de JAY270 para este teste, fazendo os alinhamentos contra as bibliotecas de genes anotados de S288c ou os genes preditos para a linhagem JAY270 para determinar se os mesmos parâmetros poderiam ser utilizados em ambos os experimentos.

Tabela 3 – Número de reads obtidos para as bibliotecas de cada experimento

	Reads por biblioteca					
	1	2	3	4	5	6
S288c Bioelétrico	1686451	7866033	16339980	7761251	2626581	21757267
S288c Controle	1912141	27172108	22676499	6013965	2567970	24733351
JAY270 Bioelétrico	6518886	4161652	24644539	8066989	6993427	6172086
JAY270 Controle	6879686	1330388	26834224	8982177	6130422	5152552

Alterações foram feitas no número de *mismatches* permitidos em cada alinhamento e também na presença ou ausência de *reads* com alinhamentos satisfatórios em mais de uma posição na referência nos dados finais. Os dados desta análise preliminar estão na Tabela 4. Permitindo apenas um *mismatch*, a porcentagem de *reads* com alinhamentos únicos foi próxima de 65%, aumentando para cerca de 70% com dois *mismatches* e sendo pouco alterada quando o limite foi aumentado para três *mismatches*. Portanto, escolheu-se continuar as análises permitindo 2 *mismatches* entre os 50pb de cada sequência, para garantir um bom número de reads alinhados e tentar minimizar o número de alinhamentos errôneos que poderiam aparecer para valores maiores. Todos os alinhamentos ambíguos

foram desconsiderados. Os alinhamentos foram, então, feitos para todas as bibliotecas para verificar se o padrão seria mantido e os resultados, que foram considerados satisfatórios, estão na Tabela 5.

Tabela 4. Testes de alinhamento realizados para determinar os parâmetros mais adequados para a análise dos dados de RNA-Seq.

	S288c genes		
	1 mismatch	2 mismatches	3 mismatches
Reads não-alinhados	26.4%	18.0%	15.6%
Alinhamentos ambíguos	9.4%	13.3%	16.6%
Alinhamentos únicos	64.1%	68.7%	67.9%

	JAY270 genes		
	1 mismatch	2 mismatches	3 mismatches
Reads não-alinhados	24.2%	17.4%	15.6%
Alinhamentos ambíguos	11.2%	14.8%	17.8%
Alinhamentos únicos	64.6%	67.8%	66.6%

Tabela 5 – Proporção de alinhamentos únicos obtidos para todas as bibliotecas.

	Média de alinhamentos únicos por biblioteca
S288c controle	70.3%
S288c bioelétrico	68.0%
JAY270 controle	70.3%
JAY270 bioelétrico	69.8%

A mesma biblioteca usada para os testes anteriores foi alinhada mais quatro vezes, utilizando os parâmetros escolhidos acima, usando como referência os genes de S288c, os genes de JAY270, o genoma de S288c e o genoma de JAY270 (Tabela 6). O objetivo destes alinhamentos foi determinar se as diferenças existentes entre os genomas das duas linhagens são suficientes para levar a uma perda grande de informação quando *reads* da fermentação com uma linhagem são alinhados com uma referência da outra linhagem. Como esperado, os alinhamentos contra os genomas tiveram um aumento grande na porcentagem de

reads alinhados, provavelmente devido ao alinhamento de *reads* de RNA ribossomal e outros tipos de RNA não codificante que aparecem no sequenciamento, mesmo após a purificação pelas caudas poli-A. No entanto, esses *reads* foram ignorados e somente aqueles que alinham com sequências gênicas foram considerados para as análises de expressão, pois o objetivo era identificar alterações em genes.

Tabela 6. Estatísticas dos alinhamentos realizados utilizando os *reads* de uma única amostra, comparando com os genomas inteiros ou somente os genes, das linhagens S288c e JAY270.

	Genes S288c		Genes JAY270	
Reads	1330388	(100.0%)	1330388	(100.0%)
Reads não alinhados	239719	(18.0%)	232115	(17.4%)
Reads alinhados	1090669	(82.0%)	1098273	(82.5%)

	Genoma S288c		Genoma JAY270	
Reads	1330388	(100.0%)	1330388	(100.0%)
Reads não alinhados	92705	(7.0%)	80294	(6.0%)
Reads alinhados	1237683	(93.0%)	1250094	(94.0%)

Como a diferença de reads alinhados usando os genes de S288c e JAY270 como referência foi de apenas 0,6%, escolheu-se usar os genes de S288c como referência para todos os dados de sequenciamento. Isso foi feito para facilitar a análise dos dados, já que os genes de S288c estão detalhadamente anotados no *Saccharomyces Genome Database* (www.yeastgenome.org) e os genes de JAY270 ainda não estão completamente anotados na versão atual do genoma dessa linhagem. Com estes resultados, a referência escolhida para o alinhamento de todas as bibliotecas foi o conjunto de todas as ORFs preditas do genoma de S288c, que inclui os genes caracterizados e também genes hipotéticos que ainda não possuem produtos estudados e descritos (<http://www.yeastgenome.org>) .

Antes de iniciar a análise de expressão diferencial, foi estabelecido um valor de RPKM para ser utilizado como corte entre os genes considerados expressos e os não-expressos. Este passo foi necessário porque as leveduras realizam uma transcrição basal de todo o genoma, incluindo regiões que não codificam proteínas e não tem funções claramente conhecidas (Xu et al. 2009; Neil et al. 2009). Portanto, o conjunto contagem de alinhamentos foi separado em dois grupos:

reads que alinham em genes anotados e *reads* que alinham em ORFs preditas. Os RPKMs para cada gene dentro das bibliotecas foram plotados em histogramas e sobrepostos a um histograma destes mesmo valores para as ORFs preditas (Figura 8). Para todas as bibliotecas, observou-se que a distribuição de RPKMs para os genes anotados se aproximava bastante de uma curva log-normal, exceto na longa cauda para os valores mais baixos. Esta cauda coincide com a distribuição aparentemente aleatória observada para os RPKMs das ORFs preditas, portanto foi assumido que ela corresponde àqueles genes que não estão sendo ativamente transcritos, mas que foram detectados em meio à transcrição de fundo. Para se obter o valor de RPKM para corte, foi feito um *fit* log-normal do o histograma dos genes anotados e o ponto no eixo x onde este *fit* passou a ter frequências superiores àquelas observadas para as ORFs preditas foi considerado o valor para corte. Para considerar que um gene está sendo expresso em todas as análises subsequentes, seu valor de RPKM deve ser maior ou igual a 5,8.

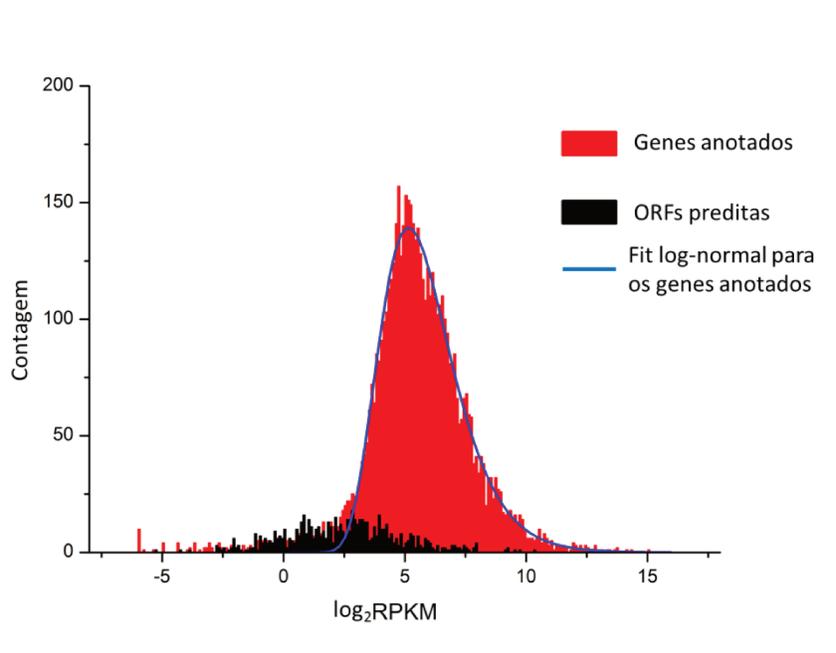


Figura 8 – Distribuição de RPKM para genes anotados e ORFs preditas. A linha azul representa um fit log-normal da distribuição dos genes anotados.

Aplicando este critério de corte aos valores de RPKM obtidos para cada gene em cada biblioteca, é possível determinar o número de genes que tiveram alguma expressão detectável em cada ponto dos experimentos (Figura 9). Nos experimentos feitos com a linhagem S228c, de laboratório, o número de genes

expressos não sofreu grandes alterações ao longo da fermentação, ficando sempre por volta de 5000 genes, de um total de aproximadamente 6000 no genoma(Goffeau et al. 1995). Já na linhagem JAY270 industrial, pode ser observada uma queda drástica no número de genes expressos a partir da quarta biblioteca, tanto no experimento controle como na condição de estímulo bioelétrico. Esta diferença indica uma forte repressão dos genes na linhagem industrial após o consumo total da glicose presente no meio de fermentação, enquanto a linhagem de laboratório parece manter uma regulação global mais relaxada do transcriptoma.

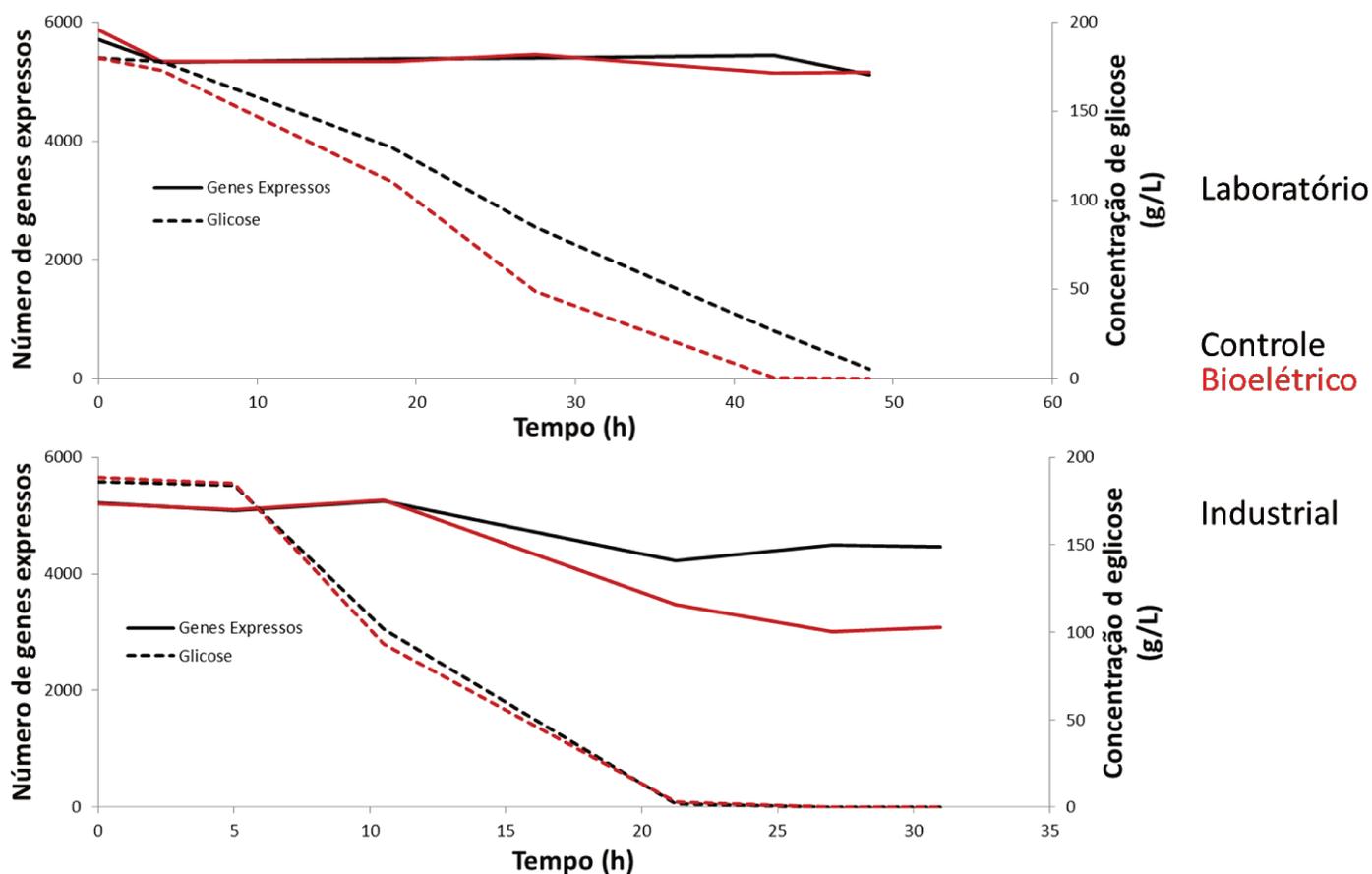


Figura 9 – Número de genes expressos ao longo de cada experimento. A linha tracejada indica a concentração de glicose remanescente em cada ponto coletado e a linha sólida indica o número de genes com níveis detectáveis de expressão nas mesmas bibliotecas

Além de apresentar uma repressão global após o final da fermentação, a linhagem industrial respondeu ao estímulo bioelétrico aumentando o grau desta repressão (Figura 9). A cultura feita com corrente atingiu pouco mais de 3000 genes expressos, enquanto a condição controle permaneceu acima de 4000

genes. Como o estímulo bioelétrico aumenta a taxa de consumo de substrato, essa diferença pode ser explicada pela diferença de tempo para o final da fermentação, mas ela se manteve até o último ponto que representa quase 10 horas após o ponto 4. Portanto, o estímulo bioelétrico parece ter uma influência sobre a expressão gênica em adição à repressão correlacionada com o final da fermentação.

Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando o conjunto de dados contendo todas as bibliotecas, para tentar observar mudanças em larga escala no transcriptoma das leveduras durante os experimentos (Figura 10). Essa análise reduziu toda a informação contida nas bibliotecas em dois eixos que capturam a maior proporção da variância existente nos dados. É clara a separação entre os transcriptoma das duas linhagens no segundo componente, não havendo sobreposição nenhuma entre os pontos que representam cada linhagem. Isto indica que as duas linhagens possuem programas transcricionais bastante distintos para responder às mesmas condições de cultura, o que pode ser importante nas diferenças fenotípicas que existem entre ambas.

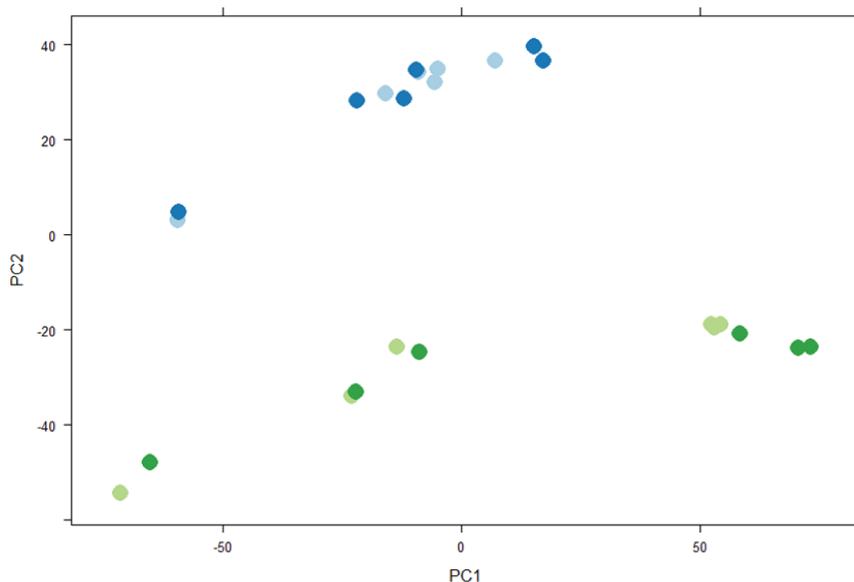


Figura 10 – Análise de componentes principais para todas as bibliotecas sequenciadas neste trabalho. As bibliotecas da linhagem de laboratório estão em azul e as bibliotecas da linhagem industrial, em verde.

Como não foi possível observar separações claras entre as amostras de cada linhagem individual na análise conjunta, esta foi refeita sobre dois conjuntos de dados distintos, um para cada linhagem (Figura 11). Assim, foi possível obter uma separação maior entre os pontos que representam cada biblioteca, pois as diferenças grandes entre linhagens não estavam mais presentes. Para a linhagem de laboratório, não foi possível observar diferenças claras entre os pontos representando o controle e a condição de estímulo bioelétrico. Já na linhagem industrial, os três últimos da condição bioelétrica se encontraram bastante separados de seus correspondentes no controle. Esta diferença reflete a repressão diferencial anteriormente observada (Figura 9), o que reforça a influência aparente do estímulo bioelétrico sobre o programa transcricional desta linhagem.

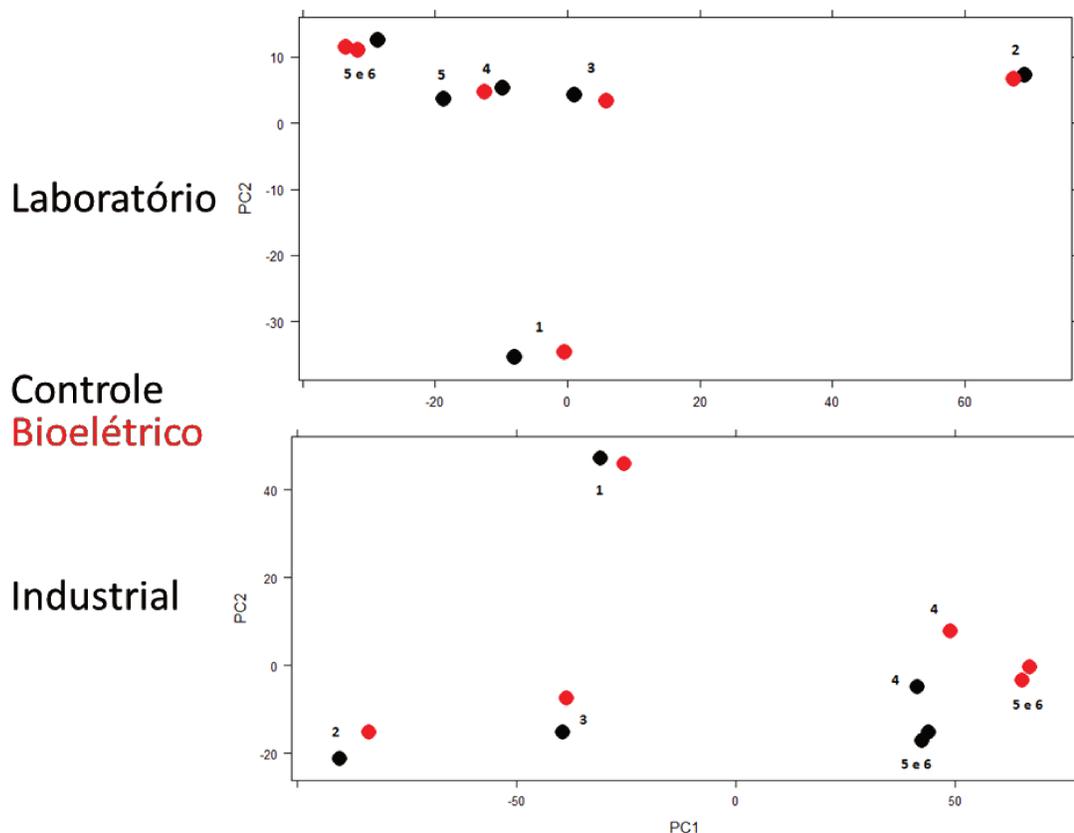


Figura 11 – Análise de componentes principais separando as bibliotecas de acordo com a linhagem. Os pontos em preto são das bibliotecas controle e, em vermelho, as bibliotecas com estímulo bioelétrico. Os números representam cada ponto das respectivas fermentações

Os pacotes baySeq(Hardcastle & Kelly 2010) e DESeq (Anders & Huber 2010) foram utilizados para a análise estatística das diferenças de expressão entre cada par de amostras controle e tratada. Como não foram feitas réplicas das amostras, os softwares utilizam a dispersão existente entre as amostras sendo comparadas para estimar a dispersão nos valores de expressão para todos os genes. Este método subestima o número de genes diferencialmente expressos, portanto não pode ser considerado como uma evidência completamente confiável de expressão diferencial, mas apenas indícios para caminhos futuros de investigação. Para ambos os pacotes, foi utilizado o valor de $p < 0,05$ como critério de corte para os genes diferencialmente expressos, com correção Benjamini-Hochberg para múltiplos testes no pacote DESeq. Os dois métodos foram aplicados em todas as bibliotecas e os resultados obtidos, comparados. Na figura 12, o resultado de ambos os métodos para uma única biblioteca será usado para comparação. O número de genes considerados diferencialmente expressos pelo pacote Bayseq foi muito maior e, quando os dois conjuntos foram comparados, todos os genes da lista gerada pelo programa DESeq estavam contidos na lista do outro pacote. Como este resultado se repetiu para todas as outras bibliotecas, considerou-se que a estimativa gerada pelo Bayseq estava superestimada e somente os resultados gerados pelo pacote DESeq foram utilizados para as análises subsequentes. O número de genes considerados diferencialmente expressos por este critério está listado para cada biblioteca na tabela 7.

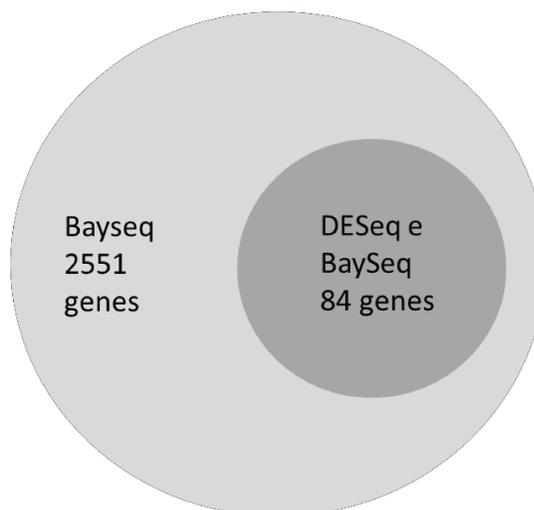


Figura 12 – Comparação entre os números de genes considerados diferencialmente expressos para uma única biblioteca, utilizando os pacotes BaySeq e DESeq.

Tabela 7 – Número de genes considerados diferencialmente expressos em cada ponto dos experimentos, utilizando os critérios de corte do DESeq e por fold-change.

S288C			JAY270		
Tempo (h)	DESeq	Fold change	Tempo (h)	DESeq	Fold change
0	0	0	0	26	2
4	17	0	5	5	0
18.5	84	1	10.5	110	2
27.5	7	0	21.25	28	10
42.5	0	6	27	0	19
48.5	0	1	31	0	20

A lista de genes diferencialmente expressos foi utilizada para um estudo funcional destes genes, através de uma análise de enriquecimento de classes do *Gene Ontology* utilizando o plugin BINGO para o software Cytoscape (Maere et al. 2005). Os genes foram separados em conjuntos de genes reprimidos ou induzidos para cada linhagem e as classes funcionais que se encontraram enriquecidas ($p < 0,05$) em cada categoria estão na Tabela 8. Para ambas as linhagens as classes foram bastante parecidas, estando em sua maioria concentradas em funções metabólicas ou relacionadas a interface da célula com o ambiente (parede

e membrana celular). A presença de alterações de expressão em genes dessas duas grandes categorias reforçam as evidências das fermentações de que o estímulo bioelétrico está realmente provocando uma resposta das células, já que o efeito da corrente elétrica deve necessariamente ocorrer na superfície da célula e afeta o seu metabolismo fermentativo. Este resultado também reflete as observações de Qiao e colaboradores (2009), que mostraram alterações de expressão em genes que codificam oxidoredutases da cadeia respiratória e proteínas de membrana em *E. coli* cultivada em sistemas bioelétrico.

Tabela 8 – Categorias funcionais consideradas enriquecidas pela análise de GOSlim utilizando o pacote BINGO, separadas por genes que mostraram superexpressão ou subexpressão.

S288c		JAY270	
Induzidos	Reprimidos	Induzidos	Reprimidos
Parede celular	Parede celular	Atividade de oxidoredutase	Parede celular
Atividade de oxidoredutase	Atividade de oxidoredutase	Geração de precursores e energia	Atividade de oxidoredutase
Região extracelular	Geração de precursores e energia	Membranas	Membranas
	Membranas	Transportadores	Retículo endoplasmático
	Região extracelular		Metabolismo de lipídeos
	Metabolismo de lipídeos		

Como o número de genes que tiveram sua expressão considerada diferencial pela análise feita pelo algoritmo DESeq, com probabilidade maior que 95%, foi relativamente pequeno devido às limitações do método utilizado para estimar a dispersão sem réplicas biológicas, uma busca manual foi feita nas bibliotecas para procurar outros genes com padrões de expressão e funções interessantes. Para esta última análise, foram escolhidos apenas os genes que tiveram um fator de repressão maior do que 100 (fold change < -100) ou um fator

de indução maior do que 20 (fold change > 20) e que mantiveram o mesmo padrão por pelo menos dois pontos dentro de um experimento (Tabela 7). Um critério diferente utilizado para filtrar os genes reprimidos e induzidos devido à abundância maior de genes reprimidos nas bibliotecas com estímulo bioelétrico, principalmente para a linhagem JAY270. As informações funcionais sobre os genes foram obtidas do *Saccharomyces Genome Database* (www.yeastgenome.org).

No experimento com a linhagem JAY270, dois genes adjacentes do cromossomo XIV tiveram uma indução de mais de 100 vezes nos pontos finais da fermentação (tabela 9), YNR064C e YNR063W. Ambos são genes não essenciais e pouco caracterizados, o primeiro codifica uma epóxido hidrolase que pode estar envolvida em detoxificação de compostos do meio e o segundo tem homologia com fatores de transcrição *zinc-cluster* de fungos. Como os únicos dados sobre esses genes que existem nos bancos de dados são provenientes de estudos em larga escala, ambos são candidatos interessantes para terem uma análise mais aprofundada no futuro, dado que tiveram aumentos de expressão de até 1000 vezes na fermentação bioelétrica em relação ao controle.

Dentre os demais genes que foram fortemente induzidos pela fermentação bioelétrica em JAY270 (tabela 9), está um transportador de Na⁺/fosfato, um transportador de sulfito, uma proteína necessária para sobrevivência em altas temperaturas e uma série de proteínas putativas não-caracterizadas. As proteínas putativas, potencialmente, são as mais interessantes desta lista, já que o genoma de *S. cerevisiae* é um dos mais bem caracterizados entre todos os organismos e genes ainda sem função descrita podem ser responsáveis por processos biológicos atualmente desconhecidos. Como neste experimento, o número de genes que foi induzido é pequeno, a presença de uma proporção grande de genes putativos nesta categoria sugere que uma estudos futuros sobre estes genes pode resultar em um melhor entendimento dos processos envolvidos no estímulo bioelétrico e também elucidar a função destas proteínas desconhecidas.

Tabela 9. Genes selecionados do experimento com a linhagem JAY270. Valores de fold change inferiores a 2 foram omitidos.

Nome sistemático	Sinônimos	Fold Change					Descrição	
		0h	5h	10,5h	21,25h	27h		31h
YNR064C					444.8	1213.8	807.9	Epóxido hidrolase
YNR063W					233.9	358.5	311.7	Proteína <i>zinc</i> -cluster putative
YGR236C	SPG1					26.6	50.6	Proteína envolvida com sobrevivência em altas temperaturas
YBR296C	PHO89				233.9	69.0	49.3	Cotransportador Na ⁺ /Pi
YMR195W	ICY1				14.0	33.6	12.1	Função desconhecida
YHL021C					3.7	29.7	20.1	Função desconhecida
YNL020C	ARK1				8.5	22.4	13.8	Proteína quinase envolvida na regulação do citoesqueleto de actina
YEL069C	HXT13				-234.4	-454.3	-482.2	Transportador de hexose
YNR072W	HXT17				-126.7	-141.1	-199.0	Transportador de hexose
YOR279C	RFM1				-6.6	-401.5	-193.3	Proteína que interage com DNA, reprime genes da esporulação
YOR237W	HES1			-306.5	-32.0	-138.1	-177.3	Biossíntese de ergosterol
YBR097W	VPS15				-5.8	-138.7	-174.7	Proteína quinase envolvida no transporte por vacúolos
YLL012W	YEH1				-220.3	-221.3	-139.0	Éster hidrolase envolvida no metabolismo de esteróis
YJL147C						-127.3	-117.0	Proteína mitocondrial de função desconhecida
YPL029W	SUV3					-300.9	-108.4	RNA helicase
YDL036C	<i>PUS9</i>				-13.3	-45.2	-101.0	Pseudouridina sintase
YNR044W	AGA1				-48.3	-163.8	-98.8	Subunidade de α -aglutinina
YBR072C-A					-17.4	-120.8	-33.3	Função desconhecida
YKL187C					-165.7	-112.7	-50.8	Função desconhecida
YOL097W-A						-109.3	-86.2	Função desconhecida
YLR056W	ERG3				-164.5	-83.2	-40.7	C-5 esteroide desaturase, biossíntese de ergosterol
YOL101C	IZH4			-33.4	-133.2	-9.9		Proteína de membrana envolvida no metabolismo de esteróis
YMR015C	ERG5				-130.5	-80.4	-42.4	C-22 sterol desaturase, biossíntese de ergosterol
YPL272C				-60.8	-118.3	-48.0	-46.5	Função desconhecida
YJR150C	DAN1			-1270.4	-117.5	-25.7	-25.6	Manoproteína da parede celular
YOR009W	TIR4			-124.8	-29.8	-23.2	-26.8	Manoproteína da parede celular

Entre os genes reprimidos, a família de transportadores de hexoses (HXT) apresentou dois membros com repressões maiores que este valor no final da fermentação, HXT16 (YJR158W) e HXT17 (YNR072W) (tabela 9). No entanto, estes genes apresentam no mínimo 90% de identidade de sequência entre si, o que impossibilita o alinhamento correto de muitos dos *reads* correspondentes ao RNAm de cada gene e torna os valores de expressão pouco confiáveis. Só é possível concluir que pelo estes dois genes desta família estão sendo fortemente reprimidos no final da fermentação com estímulo bioelétrico, mas outros genes

com sequências muito similares podem ter escapado da detecção por causa de reads com alinhamentos ambíguos. Como a glicose se esgota mais rapidamente na fermentação com estímulo bioelétrico, essa repressão pode estar relacionada a mudanças no metabolismo para iniciar o consumo de etanol pela via respiratória.

A situação oposta é observada para os genes YJR150C e YOR009W, que pertencem à família Srp1p/Tip1p de manoproteínas ricas em serina e alanina da parede celular. Esses genes também estão entre os genes com valores altos de repressão, mas não apresentam similaridade de sequência entre si. Portanto, os *reads* correspondentes ao RNAm de cada gene não podem alinhar nos demais genes da família, o que torna o valor de expressão individual de cada gene mais confiável.

Um outro grupo de genes que teve uma grande redução na expressão na condição tratada está relacionado ao metabolismo de lipídios, como ergosterol (YLL012W, YOR237W, YLR056W, YOL101C e YMR015C na tabela 9). Este é um resultado inesperado, já que o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática é importante para a resistência da *S. cerevisiae* a altas concentrações de etanol no meio externo (Aguilera et al. 2006). Portanto, se a síntese de lipídios de membrana está sofrendo uma repressão, esperaria-se uma menor resistência das células a etanol quando elas estão na condição de estímulo bioelétrico, mas a concentração final de etanol produzida na fermentação é a mesma que no controle. Uma possível explicação é que o teor de etanol alcançado nos experimentos aqui descritos não foi suficiente para causar danos às células e, por isso, uma redução no teor de ergosterol na membrana não gerou consequências deletérias para as células.

Fazendo a mesma análise de genes induzidos e reprimidos nas bibliotecas do experimento com a linhagem de laboratório S288c a magnitude das alterações de expressão observadas é menor do que para as bibliotecas da linhagem JAY270, mas ainda é possível destacar três genes que se encaixaram nos critérios utilizados para a análise anterior (tabela 10)

Neste experimento, o gene que teve o maior fator de indução foi YBR072C-A, que codifica uma proteína hipotética de função desconhecida. No entanto, o

mesmo gene está entre aqueles que foram reprimidos na condição bioelétrica da linhagem JAY270, logo esse pode ser um gene que é diferencialmente regulado nas duas linhagens quando as leveduras são submetidas ao estímulo bioelétrico. Esse padrão de regulação oposto nas duas linhagens sugere que este gene pode ser importante para gerar as respostas fenotípicas ligeiramente diferentes entre as duas linhagens. Portanto, gene é um candidato para investigações futuras sobre as diferenças entre as repostas das duas linhagens ao estímulo bioelétrico.

Também houve um gene que apresentou variações similares de expressão nas duas linhagens, indicando respostas em comum ao estímulo, o gene YJR150C que codifica uma manoproteína da parede celular da família Srp1p/Tip1p. Este gene teve sua transcrição reprimida nos pontos finais das fermentações bioelétricas da linhagem JAY270 e também foi reprimido fortemente no terceiro ponto da fermentação bioelétrica da linhagem S288c.

Uma outra diferença marcante entre as respostas das duas linhagens é o fato de que os genes da família HXT, de transportadores de hexose, não tiveram alterações significativas de expressão na linhagem S288c. Como a repressão dessa família foi muito forte ao final da fermentação com estímulo bioelétrico pela linhagem JAY270, esta pode representar uma importante diferença na resposta das duas linhagens ao estímulo bioelétrico.

Tabela 10. Genes selecionados do experimento com a linhagem S288c. Valores de fold change inferiores a 2 foram omitidos.

Nome sistemático	Sinônimos	Fold change						Descrição
		0h	4h	18,5h	27,5h	42,5h	48,5h	
YBR072C-A						46.7	28.0	Função desconhecida
YPR157W	TDA6				2.0	24.8	7.1	Função desconhecida
YJR150C	DAN1			-142.1	-6.9			Manoproteína da parede celular

Também foi feita uma busca nas bibliotecas por genes selecionados *a priori* por seu papel no metabolismo fermentativo, tanto na via de síntese de etanol quanto nas vias que levam aos subprodutos acetato e glicerol. Todos os genes

que codificam enzimas da via glicolítica foram analisados e nenhum apresentou variações consistentes na sua expressão. Os genes envolvidos na produção de etanol e dos subprodutos acetato e glicerol também foram buscados e não apresentaram mudanças de expressão de acordo com os critérios utilizados nesta análise.

Finalmente, foram buscados outros genes que podem afetar o balanço redox das células, como o que codifica NADH-desidrogenase citocromo b5-dependente de membrana plasmática Nqr1p. Em S288c, não houve alterações na expressão do gene NQR1 ou de CYB5, que codifica um citocromo b5 (tabela 11). Já em JAY270, ambos os genes tiveram repressões significativas ao final da fermentação, o que poderia indicar que a atividade da enzima NQR1 não é mais necessária para as células após o consumo completo da glicose sob o estímulo bioelétrico.

Tabela 11. Alterações na expressão dos genes NQR1 e CYB5. Valores de fold change inferiores a 2 foram omitidos.

Gene	Sinônimo	S288c						Fold Change	JAY270					
		0h	4h	18,5h	27,5h	42,5h	48,5h		0h	5h	10,5h	21,25h	27h	31h
YNL111C	CYB5										-34.8	-25.4	-12.9	
YML125C	NQR1										-7.4	-20.9	-10.1	

Os *reads* que não alinharam nos genes de S288c, para determinar se algum dos gene exclusivos da linhagem JAY270(Argueso et al. 2009) teve sua expressão alterada. No entanto, nenhum destes genes apresentou mudanças em sua expressão consideradas significativas pelo pacote DESeq ou que atendam aos critérios utilizados na análise anterior.

I.4 Conclusões e Perspectivas

O sistema bioelétrico construído foi capaz de gerar respostas em ambas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho, mas não foi

observada nenhuma alteração no rendimento final de etanol, que é o produto desejado. Ao contrário do que foi observado por Nakanishi e colaboradores (1998), somente os subprodutos glicerol e ácido acético tiveram a sua concentração final alterada na cultura com a linhagem de laboratório. Na linhagem industrial, foi observada uma manutenção da densidade celular por longos períodos, mas os subprodutos não foram afetados. A capacidade de manipular o balanço dos subprodutos e o crescimento celular são de grande interesse para aplicações industriais.

Na análise de expressão gênica, ficaram evidentes grandes diferenças na resposta global das duas linhagens ao estímulo bioelétrico. A linhagem de laboratório respondeu com alterações de expressão em poucos genes e em magnitude menor. Já a linhagem industrial apresentou uma repressão de uma grande porção de seus genes e um padrão global de transcrição diferente quando submetida ao reator bioelétrico. Essas diferenças na escala global para a linhagem industrial também foram observadas para genes individuais, que chegaram a apresentar fatores de repressão ou indução de três ordens de magnitude.

Entre os genes com diferenças de expressão, estavam enriquecidas classes funcionais diretamente relacionadas ao desempenho fermentativo das leveduras, além de genes desconhecidos ou pouco caracterizados. Estudos futuros sobre estes genes podem levar a um maior conhecimento sobre o estímulo bioelétrico e também a possíveis linhagens capazes de responder de forma mais eficiente a esta condição de cultura.

No entanto, todos os resultados de expressão gênica deste trabalho foram obtidos com conjuntos de dados sem réplicas biológicas, que não foram feitas por dificuldades experimentais. Estudos futuros serão necessários para confirmar o papel dos genes identificados durante o processo, utilizando sistemas bioelétricos mais refinados que permitam isolar os efeitos de oxidação e redução que aconteciam simultaneamente no sistema construído durante este trabalho. A influência dos genes também poderá ser avaliada utilizando ensaios em larga escala baseados no método desenvolvido no capítulo II deste trabalho.

Capítulo II – Evolução de linhagens por seleção de em larga escala

II.1 Introdução

II.1.1 Engenharia Evolutiva no desenvolvimento de microrganismos industriais

Os fenótipos desejados para linhagens de microrganismos industriais, como tolerância a condições adversas, alta produtividade e rendimento otimizado do produto final, frequentemente são determinados por interações entre múltiplos genes. Portanto, para se obter um fenótipo superior utilizando desenho racional, é necessário conhecimento prévio sobre a contribuição de cada gene para a característica de interesse. Muito esforço já foi dedicado para possibilitar este tipo de melhoramento de microrganismos, especialmente para a levedura *S. cerevisiae*, desde sequenciamento de genoma (Goffeau et al. 1995), passando por análise funcional de genes (Velculescu et al. 1997; Giaever et al. 2002), até análises de Biologia de Sistemas que buscam entender a forma como os genes de um genoma interagem entre si (Papp et al. 2004; Tong et al. 2004; Costanzo et al. 2010). Porém, ainda não é possível prever com precisão os efeitos fenotípicos da mutação de um gene ou da expressão de um gene heterólogo.

Uma forma de evitar o pré-requisito de conhecimento profundo sobre o sistema de interesse é uma estratégia conhecida como engenharia evolutiva, que consiste em cultivar o microrganismo sob condições que favoreçam o crescimento de linhagens que possuam o fenótipo desejado (Sauer 2001). Este processo é análogo à seleção natural, porque leva à predominância de genótipos superiores a partir de um *pool* inicial contendo variabilidade genética. Os desafios para a implementação de uma estratégia de engenharia evolutiva são o desenvolvimento de ensaios que apliquem a pressão seletiva no sentido de maximizar o fenótipo de interesse e a obtenção de populações com variabilidade herdável para este mesmo fenótipo.

O princípio mais utilizado nas estratégias de seleção para engenharia evolutiva é o crescimento diferencial das linhagens sob as condições estabelecidas para o ensaio. Se o tamanho da população é mantido aproximadamente constante durante o experimento, as linhagens com capacidade

de crescimento superior na condição de interesse terão sua proporção aumentada na população total e as linhagens inferiores serão gradualmente eliminadas. As condições de crescimento utilizadas podem ser meios de cultura contendo uma única fonte de carbono, para otimizar o crescimento do microrganismo utilizando apenas o substrato desejado. Outra condição que pode ser utilizada como critério para seleção é a presença de uma substância tóxica ou inibitória, em uma concentração que seja suficiente para diminuir a taxa de crescimento de uma linhagem selvagem (Sauer 2001). Este processo é comumente utilizado pois não requer passos adicionais para avaliação do fenótipo após cada ensaio. Após o tempo, ou número de ciclos de crescimento, desejado a população resultante já pode ser submetida a avaliação das linhagens obtidas ou uma rodada seguinte do experimento de evolução.

Também é possível realizar a seleção de linhagens dentro da população através de ensaios *in vitro* para medir o fenótipo de interesse. Para *S. cerevisiae*, pode-se medir a produção de etanol de linhagens isoladas de uma população através de ensaios colorimétricos *in vitro* (Seo et al. 2009). Durante um processo de seleção somente por crescimento diferencial, é possível que um mutante isolado tenha uma excelente capacidade de crescimento mas que produza etanol de forma pouco eficiente. Se o objetivo final do experimento de Engenharia Evolutiva é obter linhagens de levedura capazes de consumir um substrato não-usual, como um açúcar derivado da hidrólise da biomassa vegetal, é importante garantir que as linhagens selecionadas ainda sejam capazes de produzir etanol. No entanto, o custo e o tempo necessários para a realização desses ensaios em micro-placas são maiores em comparação com os experimentos de crescimento diferencial, o que os torna inviáveis para aplicação em um processo longo ou com número muito grande de amostras.

O segundo fator que deve ser avaliado no planejamento de um experimento de Engenharia Evolutiva é a fonte de variabilidade genética herdável que será selecionada durante o ensaio. A partir de uma população inicial homogênea, duas estratégias principais são geralmente empregadas: indução de mutações por métodos físicos ou químicos e longos ciclos de crescimento para acúmulo de mutações espontâneas (Sauer 2001). As mutações induzidas por radiação ou

agentes mutagênicos são capazes de gerar uma grande variabilidade genética em espaços curtos de tempo, mas as condições de tratamento devem ser previamente estabelecidas para evitar a criação de linhagens inferiores portadoras de múltiplas mutações simultâneas e medidas de segurança são necessárias para evitar exposição acidental dos pesquisadores ao tratamento. As mutações espontâneas são obtidas, em taxas relativamente baixas, após muitas gerações de cultura, o que limita a utilização deste método a organismos com curtos ciclos de vida como a bactéria *E. coli* e a levedura *S. cerevisiae*. Como as mutações benéficas são raras em relação às mutações deletérias e neutras (Ohta & Gillespie 1996), um grande número de mutantes deve ser descartado pela metodologia de seleção para que linhagens superiores sejam isoladas.

II.1.2 Seleção de linhagens por crescimento em celobiose

O sistema escolhido para seleção neste trabalho foi uma via de *Neurospora crassa* para metabolismo de celobiose e celodextrinas mais longas, que são os oligômeros de glicose unidos por ligações β 1-4 que formam as cadeias de celulose (Ha et al. 2011; Galazka et al. 2010). A via consiste de um transportador de celodextrinas situado na membrana plasmática e uma β -glicosidase intracelular que cliva as ligações β 1-4, liberando glicose para ser usada no metabolismo fermentativo da levedura. As linhagens de levedura expressando os genes desta via foram construídas pela aluna de Iniciação Científica Marina Gabriel Pessoa, utilizando os haplóides derivados da linhagem industrial diplóide JAY270. Como as leveduras selvagens da espécie *S. cerevisiae* não são capazes de metabolizar celodextrinas, a capacidade de crescimento em celobiose pode ser utilizada como critério de seleção para a evolução das linhagens transformadas.

Uma outra vantagem do sistema escolhido para o desenvolvimento do ensaio é a elevada grau de polimorfismo presente entre cromossomos homólogos da linhagem JAY270, cerca de 2.6 polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) a cada 1000 pares de base (Argueso et al. 2009). Como esta linhagem foi isolada de processos industriais de produção de etanol, ela já foi selecionada por ter um desempenho fermentativo excelente sob as condições adversas encontradas nas usinas (Basso et al. 2008). Portanto, os polimorfismos presentes em seu genoma

devem ser em sua maioria neutros, fracamente deletérios ou favoráveis. Qualquer mutação fortemente deletéria que surge em um ambiente industrial seria rapidamente eliminada da população. Inversamente, uma nova mutação que favorece claramente a predominância da linhagem portadora na população da dorna de fermentação seria eventualmente fixada em uma população, já que os processos industriais brasileiros trabalham com reciclo de células e as células mortas são substituídas por multiplicação dentro da própria população (Basso et al. 2008).

As mutações que não são eliminadas ou fixadas porque tem efeitos pequenos ou nulos na aptidão das células nos processos industriais atuais se tornam polimorfismos na população. No entanto, quando linhagens são submetidas a condições de crescimento distintas tais polimorfismos podem apresentar efeitos de magnitudes diferentes, tornando-se visíveis para a seleção natural ou em laboratório.

Para verificar a viabilidade deste conceito, o crescimento em celobiose das linhagens transformadas foi acompanhado em uma plataforma automática para ensaios em larga escala. Como o tempo necessário para o crescimento das linhagens em celobiose até a saturação é aproximadamente uma semana (Marina Pessoa, comunicação pessoal) e o custo da celobiose é elevado, não é possível realizar estes ensaios utilizando métodos tradicionais de cultivo em *shakers*. O sistema automático permite uma redução de escala de cultura, um aumento no número de culturas que são simultaneamente acompanhadas e também a realização de medidas periódicas sem intervenção humana.

II.1.3 Objetivos

Nessa etapa do trabalho, o objetivo foi avaliar a viabilidade de ensaios de engenharia evolutiva em linhagens industriais de *S. cerevisiae* utilizando apenas a variabilidade genética já existente nessas linhagens.

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

1. Desenvolver e validar o ensaio de crescimento em larga, utilizando celobiose como única fonte de carbono.

2. Comparar a capacidade de crescimento de diplóides e seus derivados haploides portando os genes da via de metabolismo de celobiose

II.2 Materiais e métodos

II.2.1 Construção das linhagens diplóides

Foram construídos três cassetes integrativos distintos contendo os genes NCU00801 (β -glicosidase intracelular) e NCU00130 (transportador de celodextrinas) de *Neurospora crassa* (Galazka et al. 2010), além do gene URA3 como marcador para seleção de transformantes. Os cassetes foram denominados de acordo com os genes presentes em cada um (Tabela 12). As linhagens utilizadas foram mutantes pontuais para o gene URA3, derivadas dos esporos JAY289 e JAY292 da linhagem JAY270 e os cassetes foram inseridos no loco URA3 do cromossomo V destas linhagens, reestabelecendo uma cópia funcional do gene após a transformação (Marina Pessoa, comunicação pessoal).

Tabela 12. Nomenclatura utilizada para os cassetes integrativos.

Cassete	Genes
C	β -glicosidase e transportador
B	β -glicosidase
T	Transportador

Ambas as linhagens foram transformadas com os três cassetes, gerando seis linhagens portando apenas um ou os dois genes da via de metabolismo de celobiose. Esses haploides transformados foram, então, cruzados para obtenção de linhagens diplóides com número de cópias variável para cada gene, de acordo com a tabela 13. Os cruzamentos foram realizados ressuspensando uma colônia de cada linhagem em 100 μ L de meio YEPD e misturando 15 μ L de cada suspensão de células em um novo tubo. Após uma hora de incubação a 30°C, 5 μ L desta mistura foram plaqueados em meio YEPD sólido e as placas foram mantidas a 30°C por um dia para obtenção de colônias isoladas (Zeidler 2010).

Tabela 13. Cruzamentos realizados e linhagens diplóides obtidas

Cruzamento	Diplóide	Número de cópias do transportador	Número de cópias da β -glicosidase
289C x 292C	CC	2	2
289C X 292T	CT	2	1
289C X 292B	CB	1	2
289T X 292C	TC	2	1
289T X 292B	TB	1	1
289B X 292C	BC	1	2
289B X 292T	BT	1	1

O sucesso de cada cruzamento foi confirmado por meio de PCR para os genes que determinam os tipos sexuais Mat a e Mat α , sendo que uma linhagem diplóide deve possuir um loco MAT portanto cada um dos alelos distintos. A presença do número esperado de cópias para cada linhagem diplóide também foi confirmada por PCR, esporulando as linhagens e observando o número de bandas obtido para cada haploide (Marina Pessoa, comunicação pessoal).

II.2.2 Desenvolvimento de método para cultivo e ensaio de crescimento

Todos os ensaios foram desenvolvidos na plataforma de pipetagem automática Microlab STARlet (Hamilton Robotics, EUA). Este sistema conta com 8 pipetas independentes, capazes de realizar transferências de líquidos em volumes entre 1-1000 μ L entre microplacas e recipientes especificamente desenhados para o sistema. As microplacas utilizadas foram SpectraPlate 96 (Perkin-Elmer, EUA) para volumes até 250 μ L e Nunc DeepWell-2mL (ThermoFisher Scientific, EUA) para volumes maiores, até 2mL.

Além da plataforma de pipetagem, o sistema conta com uma incubadora Cytomat 2 C-LIN (ThermoFisher Scientific, EUA) e um espectrofotômetro para microplacas SpectraMax Plus384 (Molecular Devices, EUA). A incubadora foi mantida a 30°C durante todas as etapas de cultivo dos ensaios e o espectrofotômetro foi utilizado para acompanhar o crescimento das culturas nas

microplacas pela absorvância em 600nm, como descrito na seção I.2.2 para as culturas feitas em escala de bancada.

O controle de todo o sistema é feito por meio do software Venus Two (Hamilton Robotics), que permite a programação de todos os passos de pipetagem e movimentação de placas. As condições da incubadora e a coleta de dados pelo espectrofotômetro também são integrados por este software.

II.2.3 Condições de cultivo para seleção

Para os ensaios na plataforma de pipetagem, foram utilizadas as mesmas composições básicas de meio de cultura para leveduras selvagens, mas substituindo glicose por celobiose na mesma concentração quando necessário. Além dos meios YEPD (glicose 2%) e YEPC (celobiose 2%), que são meios complexos, foi utilizado um meio de cultura definido. Este meio, chamado de YNB (Yeast Nitrogen Base), contém todos os compostos necessários para o crescimento de leveduras, mas não contém uma fonte de carbono. Sua composição é 1,7 g/L de YNB (without aminoacids and ammonium sulfate, Difco, EUA), 5g/L de sulfato de amônio (Sigma-Aldrich), 0,7g/L de Yeast Synthetic DropOut Medium Supplement (Sigma), 0,001% uracila, 0,002% histidina, 0,006% leucina, 0,002% triptofano. Glicose (YNBD) ou celobiose (YNBC) foram adicionadas na concentração de 2% (w/v). Este meio definido foi utilizado exclusivamente após a padronização, pois os meios complexos contendo extrato de levedura possuem traços de fontes de carbono, que interferem nos resultados quando se avalia a capacidade de crescimento em uma nova fonte de carbono como a celobiose. Quando necessário, foi adicionado 25ppm de Antifoam 204 (Sigma-Aldrich) aos meios de cultura, para prevenir a formação de bolhas.

II.3 Resultados e Discussão

II.3.1 Desenvolvimento do ensaio automatizado e padronização das condições de cultivo

A primeira etapa para a realização dos experimentos de evolução foi a padronização das condições de cultivo e coleta de dados a serem utilizados pela plataforma STARlet. Como a celobiose é um reagente de custo elevado, um dos objetivos principais era reduzir a escala de cultura para maximizar os resultados obtidos com as quantidades limitadas deste açúcar disponíveis para os experimentos. Portanto, tentou-se fazer todo o experimento em um volume total de 250µL nos poços de microplacas de fundo chato SpectraPlate Nunc, fazendo a incubação estática a 30°C na incubadora acoplada à plataforma. Todos os testes iniciais foram feitos com leveduras selvagens e utilizando meios de cultura contendo glicose.

As leveduras permanecem em suspensão no meio de cultivo por pouco tempo nestas condições, estando completamente sedimentadas no fundo dos poços depois de uma hora de incubação. Isto tornou necessário o uso das pipetas do sistema para ressuspender as culturas por ciclos repetidos de aspiração com alto fluxo. Por sua vez, esta solução levou ao surgimento de bolhas de gás no meio de cultura, provavelmente geradas por CO₂ liberado pelo metabolismo das leveduras.

A presença de bolhas dentro dos poços de cultura é indesejável, pois as bolhas interferem no caminho óptico utilizado pelo espectrofotômetro para a medição de crescimento celular, alterando drasticamente os valores medidos. Para evitar este novo problema, todos os meios de cultura utilizados nos demais experimentos em larga escala foram suplementados com 25ppm de Antifoam 204 (Sigma-Aldrich), um reagente que previne a formação de bolhas em soluções aquosas, não interfere negativamente no crescimento de microorganismos e é compatível com todos os meios de cultura utilizados durante este trabalho.

Uma vez estabelecidas as condições para a cultura e ressuspensão celular, o próximo passo foi verificar a capacidade do espectrofotômetro SpectraMax Plus384 para o monitoramento de crescimento. Como as medidas de crescimento por absorbância a 600nm já descritas neste trabalho foram todas feitas em cubetas com caminho óptico fixo de 10mm, as medidas obtidas nos poços das microplacas contendo um volume fixo de 250µL de meio de cultura foram sempre comparadas com valores obtidos pelo método anterior. A partir de uma cultura de

leveduras saturada, foi preparada uma curva-padrão por meio de diluições seriadas na proporção um volume de cultura para um volume de água. As mesmas diluições foram medidas no espectrofotômetro de cubetas e no espectrofotômetro de placas (Figura 13). O espectrofotômetro de cubetas utilizado no laboratório é capaz de realizar medidas confiáveis até um valor de absorvância igual a 1, então as diluições que tiveram medidas superiores a este valor foram diluídas mais uma vez em água MilliQ e medidas novamente com uma solução-branco apropriada. Através deste experimento, foi possível determinar que as medidas realizadas pelo espectrofotômetro de placas somente eram confiáveis em uma faixa de valores entre 0,03 e 0,4. Poços da placa com valores de absorvância acima do limite máximo teriam que ser diluídos em água e submetidos a uma nova medida, de forma análoga ao que foi feito para medidas em cubeta.

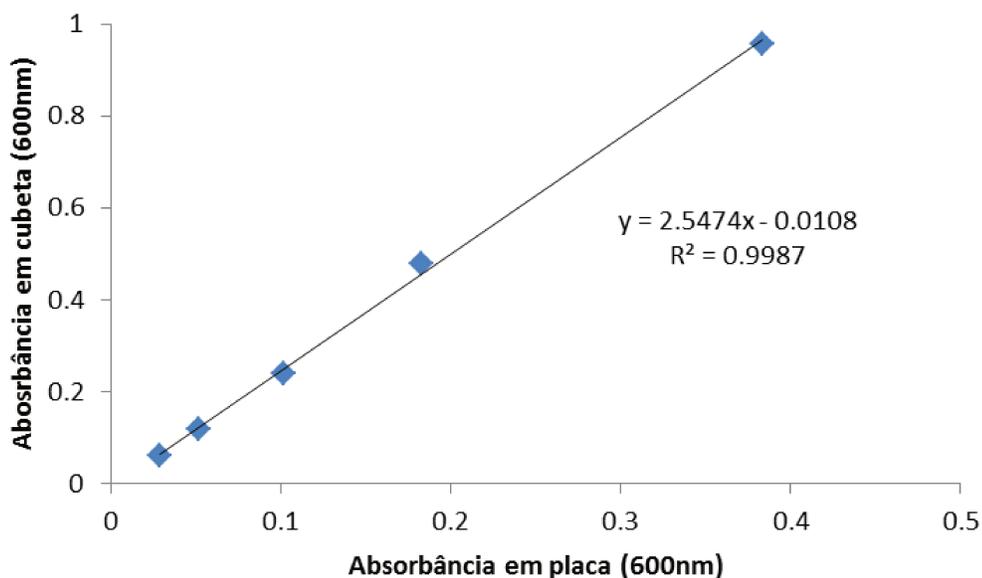


Figura 13 – Curva-padrão dos valores de absorvância obtidos em espectrofotômetros de cubetas e placas. Foi feito um fit linear e o valor de R^2 obtido está listado na figura. Os pontos da diluição situados fora da zona de comportamento linear foram omitidos.

Utilizando as condições estabelecidas nos experimentos anteriores, foi feita uma curva de crescimento utilizando a linhagem JAY270 crescida em triplicata, em

três poços distintos de uma microplaca, com meio YEPD (Figura 14). Até aproximadamente 4 horas de ensaio, os dados obtidos foram consistentes com o comportamento esperado para uma curva de crescimento para levedura. Porém, a partir deste ponto, o valor de absorbância máximo do espectrofotômetro foi atingido e as medidas subsequentes foram feitas com diluições de 10 vezes da cultura ressuspensa em água. Os valores apresentados na figura 14 já estão multiplicados pelo fator de correção necessário pela diluição. A partir deste ponto, as medidas para os três poços foram muito menores, mas voltaram a subir nos tempos subsequentes. A ressuspensão das células dentro dos poços já não estava sendo eficaz, pois o volume total de cultura já estava menor que o inicial e insuficiente para que a aspiração ocorra corretamente. Como nenhum volume foi retirado intencionalmente das culturas até este ponto do experimento, essa perda de volume provavelmente se deve à evaporação e a retenção de líquido nas paredes das ponteiras utilizadas para os passos de agitação. Também é possível notar na figura 14 que a dispersão entre os valores medidos para as triplicatas se tornou maior após o período de 4 horas, reforçando a falta de confiabilidade deste protocolo para a realização de culturas por períodos mais longos. Após 7 horas, o experimento foi interrompido por ausência de líquido suficiente para aspiração no poço, que causou um erro no software da plataforma de pipetagem.

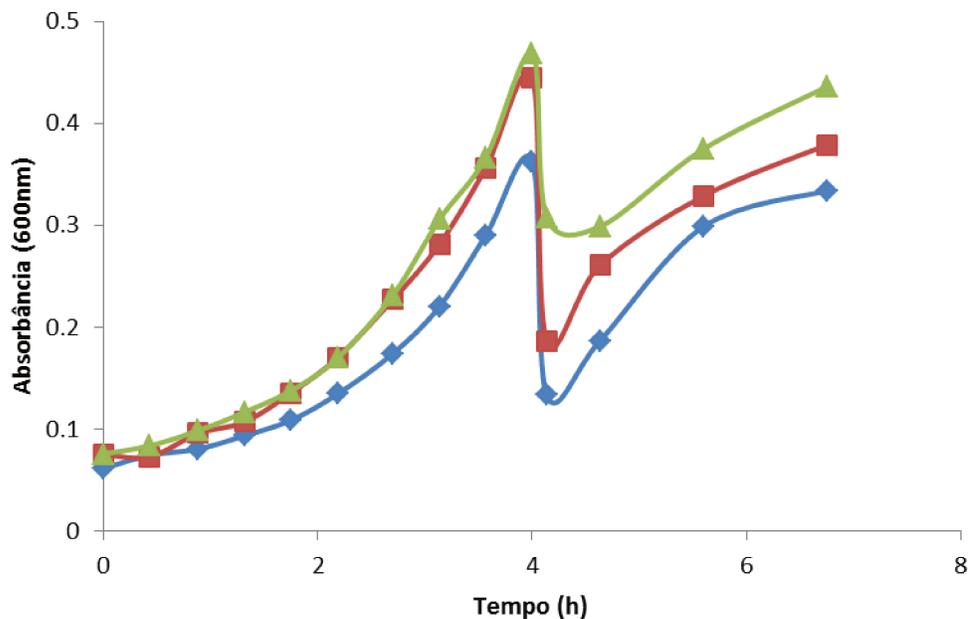


Figura 14 – Cultura da linhagem JAY270 selvagem em YEPD, realizada em microplaca. As três curvas representam os dados dos três poços distintos que foram feitos em triplicata.

Como estes problemas com as medidas se manifestaram em uma cultura curta com glicose, a cultura em volume de 250µL em microplacas seria completamente inviável para os experimentos com celobiose como única fonte de carbono, já que o crescimento utilizando este açúcar é muito mais lento do que o observado com glicose (Galazka et al. 2010). Portanto, o método de cultivo foi alterado para utilizar placas *deep-well* com um volume total de meio de cultura de 1mL. Estas placas não são compatíveis com o espectrofotômetro, então todas as medições desde o início do protocolo são realizadas por meio de diluições, transferindo 25µL de cada suspensão de células para uma microplaca apropriada contendo 225µL de água nos respectivos poços. Com esta mudança, foi possível obter curvas de crescimento satisfatórias para culturas de até uma semana de duração. Todos os resultados subsequentes para este capítulo foram obtidos com este novo método e com as culturas dispostas aleatoriamente nos poços da placa, para evitar efeitos de evaporação diferencial sobre os dados.

II.3.2 Crescimento das linhagens diplóides

O primeiro experimento realizado após a padronização de todos os parâmetros dos ensaios foi o crescimento simultâneo de todas as linhagens diplóides obtidas por cruzamento, em triplicata em meio YNBC. Com este ensaio, esperava-se determinar se um dos dois genes da via era limitante para o desempenho da célula em meio com celobiose, já que cada linhagem porta números de cópias diferentes para cada gene e, conseqüentemente, as concentrações das respectivas proteínas também serão diferentes. Os resultados obtidos (figura 15) sugerem que o nível de expressão do transportador de celodextrinas seja limitante para a performance da via, já que as linhagens CC e CT possuem duas cópias desse gene e cresceram mais rápido do que a linhagem CB, que possui apenas uma. Para facilitar as comparações entre as capacidades de crescimento de linhagens distintas, a taxa máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi estimada para cada curva, utilizando um pacote para MATLAB (Mathworks, EUA) desenvolvido no laboratório (André Prause, Tese de Doutorado em andamento). Somente as linhagens que chegaram até a fase estacionária de crescimento após cerca de 150 horas de experimento puderam ter este parâmetro calculado, enquanto o crescimento das demais linhagens não foi suficiente para se obter uma estimativa confiável da sua taxa máxima de crescimento (tabela 14).

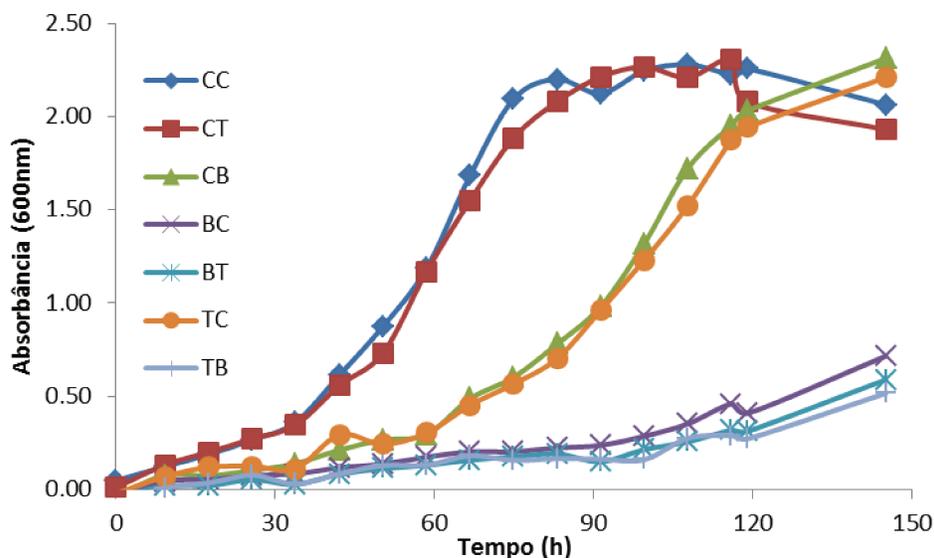


Figura 15 – Curvas de crescimento obtidas para as linhagens diploides em meio YNB contendo celobiose como única fonte de carbono. A nomenclatura das linhagens segue o padrão da tabela 13 e os pontos plotados representam a média das triplicatas.

Tabela 14 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos com base nos dados da figura 15, para o crescimento das linhagens diploides em celobiose. As linhagens sem um valor de $\mu_{\text{máx}}$ apresentaram um crescimento insuficiente para o cálculo deste parâmetro. Valores representam a média \pm erro padrão de 3 culturas separadas

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$
CC	0.062 \pm 0.002
CT	0.060 \pm 0.001
CB	0.045 \pm 0.002
BC	-
BT	-
TC	0.042 \pm 0.001
TB	-

A presença de uma segunda cópia do gene que codifica o transportador de celodextrinas aparentemente é capaz de tornar o metabolismo de celobiose mais eficiente. No entanto, a linhagem CB possui apenas uma cópia deste gene e cresce a uma taxa muito próxima da linhagem TC, que possui duas cópias. Uma outra contradição que decorre da visão simplista de número de cópias é o fato da linhagem TC possuir o mesmo número de cópias dos genes heterólogos que a linhagem CT e haver uma diferença evidente entre as taxas de crescimento dessas duas linhagens, tanto por observação direta da curva como por

comparação dos valores relativos de $\mu_{\text{máx}}$. Esta diferença fenotípica entre duas linhagens portando exatamente as mesmas construções, mas inseridas nos cromossomos homólogos opostos dos diplóides, aponta para alguma diferença genética existente entre as linhagens haplóides parentais JAY289 e JAY292. Portanto as condições necessárias para se obter um diplóide com a maior taxa de crescimento observada neste experimento foram: presença de duas cópias do gene que codifica o transportador de celobiose e a presença do cassete C no haplóide parental JAY289.

Uma hipótese possível para explicar este padrão genotípico seria a presença de algum alelo no cromossomo V da linhagem JAY289 que age em *cis* sobre os genes do cassete heterólogo C (contendo ambos os genes da via), aumentando a capacidade de crescimento das células portadoras em celobiose. A hipótese inversa, de que há um alelo na linhagem JAY292 influenciando negativamente o fenótipo, seria equivalente e igualmente parcimoniosa, mas a primeira forma será usada para esta discussão. A facilidade de manipulação do ciclo de vida de *S. cerevisiae*, alternando fases diplóides e haploides por meio de técnicas relativamente simples, possibilita um teste eficiente para esta hipótese utilizando o mesmo sistema de cultivo em larga escala já desenvolvido.

Uma colônia da linhagem CC, portando cópias de ambos os genes de *N. crassa*, foi esporulada e tétrades contendo quatro esporos haplóides irmãos foram isoladas e dissecadas. Se a hipótese de que um único gene em *cis* é o responsável pelas diferenças de crescimento for verdadeira, esses quatro esporos irmãos deverão apresentar duas classes fenotípicas distintas, na proporção de 1:1 prevista pelas Leis de Mendel: uma de crescimento rápido e outra de crescimento lento (figura 16). Como as linhagens haploides contidas em uma tétrade são o equivalente dos gametas para um organismo com ciclo de vida predominantemente diplóide, não é necessário gerar uma população de diplóides para se obter a proporção fenotípica. Os quatro esporos de uma tétrade representam o resultado de uma única meiose e devem respeitar a proporção prevista de 1:1. Caso esta proporção não seja observada, pode-se concluir que existe pelo menos mais um gene polimórfico entre as linhagens JAY289 e JAY292

que é capaz de afetar a taxa de crescimento das linhagens portadoras em celobiose.

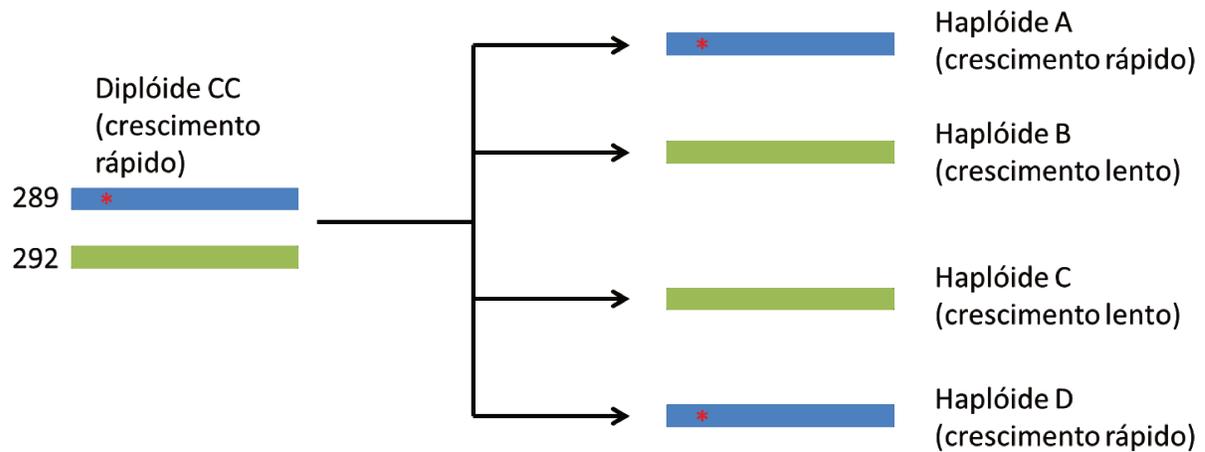


Figura 16 - Segregação prevista para o fenótipo de crescimento rápido, caso este seja determinado por um único gene. Cada barra colorida representa um haplótipo herdado da respectiva linhagem parental e o asterisco vermelho representa um alelo hipotético da linhagem JAY289, que confere o fenótipo de crescimento rápido nas linhagens portadoras.

II.3.3 Crescimento das linhagens haploides

Foram feitas curvas de crescimento com as linhagens haplóides de duas tétrades distintas derivadas da linhagem diplóide CC. As linhagens parentais 289C e 292C também foram incluídas nos experimentos, pois as suas taxas de crescimento em celobiose ainda não haviam sido caracterizadas e os resultados obtidos com estas também poderiam servir para corroborar a hipótese sobre a herança do fenótipo. Os resultados obtidos para as linhagens haploides estão na tabela 15. A primeira tétrade dissecada deu origem às linhagens CCA, CCB, CCC e CCD; a segunda tétrade gerou as linhagens CCE, CCF, CCG e CCH. As oito linhagens haplóides isoladas mantiveram a capacidade de crescimento em meio YNBC sólido, formando colônias, o que indica que não houve perda dos genes heterólogo durante as meioses.

Tabela 15 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos com base nos dados de crescimento das linhagens haplóides em celobiose. Nomenclatura utilizada para as linhagens de acordo com o texto. Ausência de um valor indica que o crescimento não foi suficiente para o cálculo do parâmetro. Valores representam a média \pm erro padrão de 3 culturas separadas

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$	Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$
289C	0.101 ± 0.001	289C	0.087 ± 0.007
292C	-	292C	-
CCA	0.088 ± 0.006	CCE	0.045 ± 0.001
CCB	0.119 ± 0.005	CCF	0.069 ± 0.003
CCC	0.089 ± 0.003	CCG	0.067 ± 0.001
CCD	-	CCH	-

Como previsto pela hipótese sobre a herança do fenótipo de crescimento rápido, a linhagem parental 289C cresceu a uma taxa muito maior que o outro parental 292C, sugerindo que há uma influência favorável em *cis* dos alelos da linhagem 289C sobre a eficiência no consumo da celobiose. No entanto, a segregação do fenótipo entre os esporos de cada tétrade não seguiu a proporção esperada de 1:1. Dentre os esporos da primeira tétrade, a linhagem CCD teve crescimento lento como o parental 292C, as linhagens CCA e CCC tiveram crescimento intermediário entre os parentais e a linhagem CCB teve uma taxa máxima de crescimento quase 18% maior que o parental 289C. Na segunda tétrade, o resultado foi novamente diferente: um haplóide teve crescimento igual à linhagem 292C e os outros três apresentaram taxas de crescimento intermediárias, mas não idênticas, entre os dois parentais.

Por ser possível observar diferenças entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos para a linhagem 289C nos dois ensaios (0.101 e 0.087), as culturas foram repetidas para verificar se o padrão de segregação não seria alterado. Os valores obtidos foram, novamente, diferentes mas o padrão observado ao se comparar as linhagens parentais com os esporos permaneceu o mesmo. As diferenças observadas entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ da mesma linhagem em ensaios diferentes podem ser causadas por diferenças nas condições iniciais de cada ensaio. Como todas as

culturas dentro de um ensaio são realizadas simultaneamente, os resultados dentro de um ensaio são consistentes e podem ser comparados entre si.

Em ambas as tétrades analisadas, não foi possível observar uma segregação 1:1 do fenótipo de crescimento em celobiose, como seria previsto em um regime de herança Mendeliana simples. Portanto, esta hipótese inicial deve ser descartada em favor de um modelo mais complexo para a determinação deste fenótipo. Provavelmente existe mais de um polimorfismo entre os haplóides parentais 289C e 292C que influencia a via heteróloga de metabolismo de celobiose. Os resultados também indicam que há variação genética favorável para o crescimento em celobiose na linhagem parental 292C, pois um dos haplóides obtidos (linhagem CCC) após a esporulação do diplóide CC apresentou uma taxa de crescimento superior àquela da linhagem 289C. Logo, dentre toda a variabilidade genética presente dentro do genoma da linhagem diplóide JAY270 (Argueso et al. 2009), existem alelos aparentemente neutros mas que apresentam um fenótipo favorável ou deletério quando submetidos a um regime de seleção diferente das fermentações industriais de onde a linhagem foi isolada (Basso et al. 2008).

II.4 Conclusões e Perspectivas

O método final desenvolvido para ensaios automatizados de crescimento de leveduras se mostrou bastante robusto e confiável, permitindo a realização de experimentos longos e com monitoramento constante do crescimento. Embora não tenha sido possível realizar os ensaios na escala de microplacas, a solução encontrada representa um equilíbrio entre o consumo de meio de cultura e a precisão das medidas obtidas.

As diferenças entre as taxas de crescimento das linhagens diplóides apontam para uma influência do número de cópias do gene que codifica o transportador de celodextrinas sobre a atividade final da via de metabolismo de celobiose. No entanto, um outro fator igualmente importante também foi identificado, que é o contexto genético no qual a via heteróloga foi inserida. O

cassete completo, contendo os dois genes da via, resultou em linhagens diplóides superiores quando foi inserido na linhagem JAY289.

Após a esporulação da melhor linhagem diplóide, CC, o fenótipo de crescimento em celobiose não se segregou entre os esporos como foi previsto pela hipótese Mendeliana simples. Portanto, há mais de um polimorfismo entre as linhagens haplóides parentais influenciando a eficiência da via heteróloga de metabolismo de celobiose. Além deste fato, foi obtida uma linhagem com uma taxa máxima de crescimento cerca de 18% maior do que a linhagem parental 289C, o que indica que a linhagem de desempenho inferior 292C também pode contribuir com alelos favoráveis.

Apenas um ciclo de cruzamento e esporulação, utilizando uma única linhagem industrial de levedura, foi capaz de gerar uma linhagem com fenótipo superior aos encontrados entre os haplóides transformados. Logo, a variabilidade genética existente dentro do genoma da própria linhagem diplóide industrial JAY270(Argueso et al. 2009) é suficiente para gerar novos fenótipos herdáveis para serem filtrados por métodos de seleção. Esta linhagem é apenas uma entre várias linhagens industriais de *S. cerevisiae* comumente utilizadas nas usinas de etanol brasileiras (Basso et al. 2008) e representa apenas uma pequena parcela de todos os polimorfismos que existem entre as linhagens desta espécie (Liti et al. 2009).

Realizando experimentos similares, mas com uma gama maior de linhagens parentais, seria possível acessar um espaço de sequência mais amplo, o que aumenta a probabilidade de se encontrar combinações genótipos que resultem em fenótipos otimizados. Utilizando os métodos desenvolvidos, cada ciclo de cruzamento e seleção de linhagens pode ser realizado em aproximadamente duas semanas. Este é um período de tempo extremamente curto, se comparado a experimentos de evolução em laboratório para obtenção de novos fenótipos a partir de populações clonais que podem durar de meses até décadas para a obtenção do mutante desejado(Blount et al. 2008; Wisselink et al. 2009)sse (Blount et al. 2008).

Porém, o método desenvolvido possui limitações que não podem ser ignoradas se o objetivo for a obtenção de uma linhagem otimizada para produção de etanol a partir de material lignocelulósico, por exemplo. A única pressão seletiva exercida pelo ensaio é no sentido de encontrar as linhagens com maiores capacidades de crescimento utilizando a fonte de carbono escolhida. A via de metabolismo de celobiose pode ter um custo energético para as células que impossibilite a linhagem de fermentar este açúcar, realizando metabolismo respiratório para manter o crescimento celular (Aeling et al. 2012). Para prevenir o isolamento de uma linhagem incapaz de realizar fermentação ao final do processo de evolução, deve ser também incorporado ao método um ensaio para medir o etanol produzido por essas linhagens durante as culturas. Este ensaio pode ser feito em larga escala utilizando um método simples e rápido (Seo et al. 2009).

O sistema de seleção desenvolvido representa uma ferramenta potencialmente muito útil no desenvolvimento de novas linhagens para fermentações industriais de etanol. Através dele, é possível obter linhagens otimizadas para fenótipos de interesse, aproveitando a variabilidade genética naturalmente existente na espécie *S. cerevisiae* para reduzir o tempo e esforço amostral que seriam necessários para atingir objetivos similares utilizando os métodos tradicionais.

Lista de Abreviações

DEPC: Dietilpirocarbonato

dNTPs: Desoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA: Ácido etilenodiaminatetraacético

JAY270: Linhagem industrial de *S. cerevisiae*, teve seu genoma sequenciado por Argueso e colaboradores (Argueso et al. 2009)

MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino)propanosulfônico

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

RNA-Seq: Sequenciamento em larga escala de RNA mensageiro

RNAm: RNA mensageiro

PCR: Reação em cadeia da polimerase

ORF: *Open Reading Frame* – sequência de DNA que pode codificar para uma proteína

S288c: Linhagem de laboratório de *S. cerevisiae*, primeira linhagem a ter seu genoma sequenciado (Goffeau et al. 1995).

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

YNB: Yeast Nitrogen Base

YEPD: Meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e glicose

YEPC: Meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e celobiose

YNBD: Meio de cultura definido contendo glicose como única fonte de carbono

YNBC: Meio de cultura definido contendo celobiose como única fonte de carbono

Referências Bibliográficas

- t Hoen, P. a C. et al., 2008. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic acids research*, 36(21), p.e141.
- Aeling, K. a et al., 2012. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(11), pp.1597–604.
- Aguilera, F. et al., 2006. Relationship between ethanol tolerance, H⁺ -ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International journal of food microbiology*, 110(1), pp.34–42.
- Anders, S. & Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10), p.R106.
- Argueso, J.L. et al., 2009. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*, 19(12), pp.2258–2270.
- Ausubel, F.M. et al., 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York - USA: John Wiley & Sons Inc.
- Babrzadeh, F. et al., 2012. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 287(6), pp.485–94.
- Basso, L. C et al., 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research*, 8(7), p.1155.
- Blount, Z.D., Borland, C.Z. & Lenski, R.E., 2008. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(23), pp.7899–906.
- Cohen, B., 1931. The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell. *Journal of Bacteriology*, 21(1), pp.18–19.
- Costanzo, M. et al., 2010. The genetic landscape of a cell. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5964), pp.425–31.
- Cunha, Anderson F. et al., 2006. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Research*, 6(2), pp.280–287.
- Ehrenreich, A., 2006. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(2), pp.255–73.
- Emde, R. & Schink, B., 1990a. Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), p.2771.
- Emde, R. & Schink, B., 1990b. Oxidation of glycerol, lactate, and propionate by *Propionibacterium freudenreichii* in a poised-potential amperometric culture system. *Archives of Microbiology*, 153(5), pp.506–512.

- Ensinas, A. V et al., 2007. Analysis of process steam demand reduction and electricity generation in sugar and ethanol production from sugarcane. *Energy Conversion and Management*, 48(11), pp.2978–2987.
- Galazka, J.M. et al., 2010. Celloextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), pp.84–6.
- Giaever, G. et al., 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), pp.387–91.
- Goffeau, A. et al., 1995. Life with 6000 Genes. *October*, 274, pp.546–567.
- Goldemberg, J., 2008. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels*, 1, p.6.
- Gunawardena, A., Fernando, S. & To, F., 2008. Performance of a Yeast-mediated Biological Fuel Cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(10), pp.1893–1907.
- Ha, S.-J. et al., 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), pp.504–9.
- Hardcastle, T.J. & Kelly, K. a, 2010. baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. *BMC bioinformatics*, 11, p.422.
- Himmel, M.E. et al., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), pp.804–7.
- Jiménez-Hidalgo, M. et al., 2009. NQR1 controls lifespan by regulating the promotion of respiratory metabolism in yeast. *Aging Cell*, 8(2), pp.140–151.
- Langmead, B. et al., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), p.R25.
- Li, B.-Z. et al., 2010. Genome-wide transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial bioethanol fermentation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(1), pp.43–55.
- Liti, G. et al., 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, 458(7236), pp.337–41.
- Maere, S., Heymans, K. & Kuiper, M., 2005. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(16), pp.3448–9.
- Marioni, J.C. et al., 2008a. comparison with gene expression arrays RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, pp.1509–1517.
- Marioni, J.C. et al., 2008b. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome research*, 18(9), pp.1509–17.
- Marsili, E. et al., 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), p.3968.

- Martinelli, L.A. & Filoso, S., 2008. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. *Ecological Applications*, 18(4), pp.885–898.
- Nakanishi, K. et al., 1998. Effect of Electric Current on Growth and Alcohol Production by Yeast Cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(2), pp.250–253.
- Neil, H. et al., 2009. Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature*, 457(7232), pp.1038–42.
- Ohta, T. & Gillespie, J., 1996. Development of Neutral and Nearly Neutral Theories. *Theoretical population biology*, 49(2), pp.128–42.
- Olesen, K. et al., 2002. The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation. *FEMS yeast research*, 2, pp.563–573.
- Oliveira, M. & Vasconcelos, Y., 2006. Revolução no canavial. *Pesquisa FAPESP*, 122, pp.62–68.
- Papp, B., Pál, C. & Hurst, L.D., 2004. Metabolic network analysis of the causes and evolution of enzyme dispensability in yeast. *Nature*, 429(6992), pp.661–4.
- Potter, M.C., 1911. Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character (1905-1934)*, 84(571), pp.260–276.
- Qiao, Yan et al., 2009. A time-course transcriptome analysis of *Escherichia coli* with direct electrochemistry behavior in microbial fuel cells. *Chemical Communications*, (41), p.6183.
- Rabaey, K., 2010. *Bioelectrochemical systems : from extracellular electron transfer to biotechnological application*, London: IWA Publishing.
- RFA, 2012. Ethanol Industry Overlook. <http://www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook>.
- Robertson, G.P. et al., 2008. AGRICULTURE: Sustainable Biofuels Redux. *Science*, 322(5898), p.49.
- Sauer, U., 2001. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 73, pp.129–69.
- Schaetzle, O., Barrière, F. & Baronian, K., 2008. Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. *Energy & Environmental Science*, 1(6), p.607.
- Seo, H.-B. et al., 2009. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(2), pp.285–92.
- Shin,, H., Zeikus, J.G. & Jain, M.K., 2002. Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), pp.476–481.

- Soccol, C.R. et al., 2009. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*.
- De Souza Liberal, a T. et al., 2005. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Letters in applied microbiology*, 40(1), pp.19–23.
- Stambuk, B. U. et al., 2009. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. *Genome Research*, 19(12), pp.2271–2278.
- Tanaka, F. et al., 2006. Functional genomic analysis of commercial baker's yeast during initial stages of model dough-fermentation. *Food Microbiology*, 23, pp.717–728.
- Thrash, J.C. & Coates, J.D., 2008. Review: Direct and Indirect Electrical Stimulation of Microbial Metabolism. *Environmental Science & Technology*, 42(11), pp.3921–3931.
- Tong, A., Lesage, G. & Bader, G., 2004. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* ..., 303, pp.808–813.
- Torres, T.T. et al., 2008. Gene expression profiling by massively parallel sequencing. *Genome research*, 18(1), pp.172–7.
- Varela, C. et al., 2005. Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. *Yeast (Chichester, England)*, 22(5), pp.369–83.
- Velculescu, V.E. et al., 1997. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, 88(2), pp.243–51.
- Wang, Y.-F. et al., 2008. Electrochemical regulation of the end-product profile in *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 with an endogenous mediator. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(3), pp.579–586.
- Wang, Y.-F. et al., 2007. Self-excreted mediator from *Escherichia coli* K-12 for electron transfer to carbon electrodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(6), pp.1439–1446.
- Wheals, A.E. et al., 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*, 17(12), pp.482–487.
- Wisselink, H.W. et al., 2009. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and environmental microbiology*, 75(4), pp.907–14.
- Xiang, K. et al., 2009. GldA overexpressing-engineered *E. coli* as superior electrocatalyst for microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 11(8), pp.1593–1595.
- Xu, Z. et al., 2009. Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature*, 457(7232), pp.1033–7.
- Ying, W., 2006. NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Frontiers in Bioscience*, 11, pp.3129–3148.
- Yu, L. et al., 2006. A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. *Molecular Biology of the Cell*, 17, pp.4736–4747.

- Zeidler, A.F.B., 2010. *Engenharia metabólica de leveduras industriais (Saccharomyces cerevisiae) para produção de glicerol*. Universidade Estadual de Campinas.
- Zhang, T. et al., 2008. The direct electrocatalysis of Escherichia coli through electroactivated excretion in microbial fuel cell. *Electrochemistry Communications*, 10(2), pp.293–297.
- Zhang, Tian et al., 2006. A novel mediatorless microbial fuel cell based on direct biocatalysis of Escherichia coli. *Chemical Communications*, (21), p.2257.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação de novas estratégias para fermentação de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*: análise de expressão gênica durante estímulo bioelétrico e seleção de linhagens por ensaios em larga escala"

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

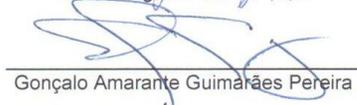
(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2011/03 (15/08/2011), Instituição: Instituto de Biologia - UNICAMP.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Pedro Augusto Galvão Tizei


Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido



Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Capítulo de livro publicado em co-autoria com demais membros do laboratório durante o Mestrado.

Carvalho Netto, OV; Rodrigues, A; Santos, LV; Carazzolle, MF; Sampaio, NMV; Tizei, PAG; Pereira, GAG. Biotecnologia em Leveduras. pp 371-400. *In:* Cançado, GMA & Londe, LN. Biotecnologia Aplicada à Agropecuária. EPAMIG, Caldas, MG.

BIOTECNOLOGIA EM LEVEDURAS

Osmar Vaz de Carvalho Netto¹

Aline Rodrigues²

Leandro Vieira dos Santos³

Marcelo Falsarella Carazzolle⁴

Nádia Maria Vieira Sampaio⁵

Pedro Augusto Galvão Tizei⁶

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira⁷

1. INTRODUÇÃO

O termo "levedura" se refere a espécies de fungos que apresentam uma forma de crescimento unicelular. Aproximadamente 1.500 espécies se enquadram neste critério, pertencendo aos mais diversos grupos de fungos. Algumas delas podem, inclusive, apresentar dimorfismo (dois estágios de vida), assumindo durante o crescimento um estágio unicelular que se altera para micelial sob certas condições ambientais.

Em geral, as leveduras são representadas por células que se reproduzem por brotamento (Figura 1) ou pela formação de uma parede celular, seguida de fissão em duas células. Diversas leveduras podem formar hifas ou pseudo-hifas (cadeias de brotos alongados) durante parte de seu ciclo de vida. As diferentes espécies podem crescer isoladamente ou agruparem-se em diferentes tipos de comunidades, como flocos, colônias e biofilmes. Essas comunidades são encontradas em ambientes naturais, clínicos ou industriais. Muitas espécies são encontradas em comunidades formadas por múltiplas espécies denominadas microbiomas, que incluem outros fungos e bactérias (HONIGBERG, 2011).

As leveduras são notavelmente conhecidas por possuírem grande aplicação como modelos biológicos. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo

¹Ciências dos Alimentos, Doutorando UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: osmar@lge.ibi.unicamp.br

²Bióloga, Doutoranda UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: arodrigues@lge.ibi.unicamp.br

³Biólogo, Doutorando UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: lsantos@lge.ibi.unicamp.br

⁴Físico, Doutorando UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: mcarazzo@lge.ibi.unicamp.br

⁵Bióloga, Mestranda UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: nadia@lge.ibi.unicamp.br

⁶Biólogo, Mestrando UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: tizei@lge.ibi.unicamp.br

⁷Engº Agrônomo, Ph.D., Professor UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: goncalo@unicamp.br

Pedido de patente depositado no INPI relacionado à linhagem portando uma superexpressão no gene NQR1.

INPI INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL MARCA		< Uso exclusivo do INPI >
20/08/2012	018120030681 UP17/08/2012	
		
BR 10 2012 020798 2		
Espaço reservado ao protocolo		Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
1.2 Qualificação:
1.3 CNPJ/CPF: 46068425/0001-33
1.4 Endereço Completo:
1.5 CEP: 13083-970 1.6 Telefone: 19 3521-5015 1.7 Fax: 19 3521-5210
1.8 E-mail: patentes@inova.unicamp.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

MÉTODO OTIMIZADO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO ATRAVÉS DE LINHAGEM MODIFICADA DE *Saccharomyces cerevisiae*