

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALLAN HENRIQUE FÉLIX DE MÉLO

DEVELOPMENT OF THERMOTOLERANT STRAIN OF S. CEREVISIAE FOR THE SACRIFICATION AND SIMULTANEOUS FERMENTATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS TERMOTOLERANTES DE S. CEREVISIAE VISANDO A SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Campinas 2019

ALLAN HENRIQUE FÉLIX DE MÉLO

DEVELOPMENT OF THERMOTOLERANT STRAINS OF S. CEREVISIAE FOR THE SACRIFICATION AND SIMULTANEOUS FERMENTATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS TERMOTOLERANTES DE S. CEREVISIAE VISANDO A SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Dissertation presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in food engineering

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof.^a **Dr.**^a **Rosana Goldbeck**

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO ALLAN HENRIQUE FÉLIX DE MÉLO E ORIENTADA PELA PROFESSORA DRA. ROSANA GOLDBECK

Campinas 2019

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

 Mélo, Allan Henrique Félix de, 1993-Desenvolvimento de linhagens termotolerantes de *S. cerevisiae* visando a sacarificação e fermentação simultânea da biomassa lignocelulósica / Allan Henrique Félix de Mélo. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.
 Orientador: Rosana Goldbeck. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.
 1. Bioetanol. 2. Saccharomyces cerevisiae. 3. Termotolerancia. 4.

1. Bioetanol. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Termotolerancia. 4. Fermentação. 5. Sistema CRISPR/Cas9. I. Goldbeck, Rosana. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of thermotolerant strain of S. cerevisiae for the sacrification and simultaneous fermentation of lignocellulosic biomass Palavras-chave em inglês: Bioethanol Saccharomyces cerevisiae Thermotolerant Fermentation CRISPR/Cas9 system Área de concentração: Engenharia de Alimentos Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos Banca examinadora: Rosana Goldbeck [Orientador] Liliana de Oliveira Rocha Osmar Vaz de Carvalho Netto Data de defesa: 04-04-2019 Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-4606-249

- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/6019915498736389

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosana Goldbeck Presidente - FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Liliana de Oliveira Rocha Membro titular - FEA/UNICAMP

Dr. Osmar Vaz de Carvalho Netto Membro titular – BIOINFOOD

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da pesquisa (Projeto 2015/20630-4; 2016/04602-3). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao laborabório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (LEMEB) pelo suporte estrutural e tecnológico de toda a pesquisa. Assim como a todos os colegas de pesquisa que partilharam seus conhecimentos e vivencia durante esse período. Em especial, a Priscila Hoffmann que não somente foi um suporte imprescindível na realização das análises, mas também, uma amiga de todas as horas, sempre compreensiva e prestativa.

À Universidade Estadual de Campinas no âmbito da Faculdade de Enegnharia de Alimentos e do Departamento de Engenharia de Alimentos (FEA-DEA) por fornecer todo o aporte necessário para o desenvolvimento da pesquisa científica.

À Prof.^a Dr^a Rosana Goldbeck, agradeço a confiança, zelo e orientações durante todo o mestrado.

Ao Dr^o Gleidson Texeira pelas contribuições durante a pesquisa e pelas palavras de motivação e animo. Sempre positivo e alegre, mesmos nas adversidades dos experimentos.

À Nicole Dezotti que me recebeu no laboratório e foi uma parceira na realização deste trabalho. Seu modo sincero, alegre e calmo contribuiu para o bom andamento da pesquisa.

À Arhtur Kael que se tornou família em Campinas. Pela vivencia diária, e por me inspirar com seu amor a pesquisa e ao conhecimento acadêmico.

À minha vó Joana Amélia (in memoriam) e Iraci Félix por serem motivo de inspiração que mesmo na singeleza de seus conhecimentos, oferecem o que têm de mais puro, amor e carinho.

Aos meus pais, Ildaci e Carlos e a minha irmã Karlla, por quem são, pois tudo o que eu sou é reflexo deles. Todos os dias, todas as experiências, ensinamentos e vivencias que partilhamos moldaram o cerne do meu ser.

À Deus por ser um pai tão bondoso, zeloso e luz das minhas ações.

RESUMO

Uma estratégia promissora para aumentar a eficiência do processo e reduzir os custos na produção de etanol de segunda geração é fermentar em temperaturas acima de 35 ° C, principalmente em configurações otimizadas de processo, como a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) da biomassa lignocelulósica. No entanto, Saccharomyces cerevisiae não cresce eficientemente a altas temperaturas, nem produz naturamente as enzimas do complexo celulolítico. Portanto, neste estudo, utilizamos a evolução laboratorial adaptativa e a expressão heterologa baseada em CRISPR/Cas9 para selecionar linhagens industriais de S. cerevisiae capazes de crescer e produzir etanol em temperaturas ≥ 40 ° C e que possam expressar endoglucanase e β-glicosidase para a suplementação da sacarificação enzimática da biomassa. Em comparação com as cepas parentais, as linhagens SA-1E e PE-2E tiveram, respectivamente, crescimento celular superior em 63% e 61% a 40 ° C, produzindo um rendimento de etanol de 0,44 g.g⁻¹. A eficiência de transformação variou de 20 a 100%, e as atividades máximas de endoglucanase e β-glicosidase foram 8,05 U.mL⁻¹ e 17,68 U.L⁻¹, respectivamente. As estirpes editadas com CRISPR / Cas9 mostraram uma actividade de β-glicosidase 3 vezes mais elevada em compação com as cepas transformadas com plasmideo. A sacarificação e fermentação simultânea de celulose microcristalina e do bagaço de cana pela cepa AGY005 resultaram em rendimentos de etanol de 47,53 g L-1 e 9,73 g L-1, demonstrando que a engenharia evolutiva e o método CRISPR/Cas9 podem ser usados para desenvolver linhagens termotolerantes recombinantes de S. cerevisiae industriais (diploides) com potencial para fermentar e sacarificar a biomassa lignocelulósica.

ABSTRACT

A promising strategy to increase process efficiency and reduce costs in the production of second generation ethanol is to carry out the fermentation step at temperatures above $35 \,^{\circ}$ C, especially in optimized process configurations such as simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of the lignocellulosic biomass. However, Saccharomyces cerevisiae does not grow efficiently at high temperatures, nor does it naturally express the enzymes of the cellulolytic complex. Therefore, in this study, we used adaptive laboratory evolution and heterologous expression based on CRISPR / Cas9 to select industrial strains of S. cerevisiae capable of growing and producing ethanol at temperatures $\geq 40 \circ C$ and that could express endoglucanase and beta-glycosidase for the supplementation of enzymatic saccharification of biomass. Compared to parental strains, SA-1E and PE-2E had, respectively, 63% and 61% growth at 40 °C, yielding an ethanol yield of 0.44 gg -1. Transformation efficiency ranged from 20 to 100%, and maximal activities of endoglucanase and β -glycosidase were 8.05 U mL -1 and 17.68 UL -1, respectively. The CRISPR / Cas9 edited strains showed 3-fold higher β -glucosidase activity compared to the plasmid-transformed strains. Simultaneous saccharification and fermentation of microcrystalline cellulose and sugarcane bagasse by AGY005 resulted in ethanol yields of 47.53 g L-1 and 9.73 g L-1, demonstrating that evolutionary engineering and the CRISPR / Cas9 method can be used to develop industrial thermotolerant S. cerevisiae (diploid) strains with potential to ferment and saccharify the lignocellulosic biomass.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL	
1.1 Introdução	
2.2 Referências bibliográficas	
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Revisão Bibliográfica	15
2.1.1 Biomassa lignocelulósica	15
2.1.2 Bioetanol e o Brasil	16
2.1.3 Produção de Bioetanol 2º Geração	17
2.1.4 Hidrólise e Fermentação separada (SHF)	19
2.1.5 Sacarificação e Fermentação simultânea (SSF)	20
2.1.6 Saccharomyces cerevisiae	21
2.1.7 Engenharia Evolutiva e Genética aplicada a S. Cerevisiae	22
2.2 Referências Bibliográficas	24
CAPITULO 3. ARTIGO 1. EVOLUTIONARY ENGINEERING OF THERMOT INDUSTRIAL STRAINS OF <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> FOR GENERATION ETHANOL PRODUCTION	OLERANT SECOND- 31
ABSTRACT	
3.1 Introduction	
3.2 Materials and Methods	
3.2.1 Yeast strains and culture medium	
3.2.2 Evolutionary engineering	
3.2.3 Selection of individuals from the final mutant population	
3.2.4 Kinetic evaluation of evolved strains	
3.2.5 Determination of cell concentration and metabolite production	
3.2.6 Determination of intracellular trehalose accumulation	
3.2.7 Statistical treatment of experimental quantitative data	
3.3 Results	
3.3.1 Evolutionary engineering	
3.3.2 Selection of thermotolerant mutants	
3.3.3 Cell growth of thermotolerant mutant colonies in liquid medium	
3.3.4 Kinetic profile and physiological parameters of thermotolerant strains	40
3.3.5 Trehalose accumulation in response to thermal stress	43
3.4 Discussion	43
3.5 Conclusions	44

SUMÁRIO

3.6 Acknowledgments	.45
3.7 References	.45
CAPITULO 4 – ARTIGO 2. HETEROLOGOUS EXPRESSION OF ENDOGLUCANA AND B-GLUCOSIDASE IN INDUSTRIAL STRAINS OF SACCHAROMYCES CEREVISI BY CRISPR/CAS9 GENOME EDITING FOR SACCHARIFICATION LIGNOCELLULOSIC BIOMASS	.SE 'AE OF .48
ABSTRACT	.49
4.1. Introduction	.50
4.2 Materials and Methods	.51
4.2.1 Strains and culture media	.51
4.2.2. Yeast transformation	.51
4.2.3 Extraction of genomic DNA, polymerase chain reaction (PCR), and confirmation AsENDO-AsBGL-positive transformants	of .52
4.2.4 Determination of cellulolytic activity	.53
4.2.5 Kinetics of cellulose hydrolysis by a commercial enzyme preparation	.53
4.2.6 SSF, partial simultaneous saccharification and fermentation (SSFp), and SHF	.54
4.2.7 Statistical treatment of experimental quantitative data	.54
4.3 Results	.54
4.3.1 Confirmation of CRISPR/Cas9 genome editing	.54
4.3.2. Confirmation of plasmid transfer	.56
4.3.3 Determination of cellulolytic activity and cell growth of transformed industrial strains	.58
4.3.4 Evaluation of the hydrolysis of cellulosic substrates by a commercial enzyme preparation	. 59
4.4 Discussion	.61
4.5 Conclusion	.63
4.6 acknowledgments	.63
4.7 References	.64
CAPITULO 5. DISCUSSÃO GERAL	.68
5. Discussão Geral	.68
CAPITULO 6. CONCLUSÃO GERAL	.71
6. Conclusão Geral	.71
CAPITULO 7. REFERÊNCIAS GERAIS	.72
7. Referências Gerais	.72

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Introdução

A suficiência energética desempenha um papel primordial no desenvolvimento socioeconômico de um país. No contexto global, os combustíveis fósseis são os principais representantes da matriz energética (OECD/IEA, 2016). No entanto, o caráter não renovável e os efeitos deletérios que eles causam sobre o meio ambiente, clima e a própria saúde humana, fomentam a necessidade de novas fontes de energia mais limpas e inesgotáveis, como o bioetanol (BANDARA; WIJEWARDHANA, 2011).

O Brasil possui uma consolidada tecnologia para a produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar (primeira geração 1G), a qual lhe confere o status de segundo maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos. Entretanto, a cadeia produtiva do etanol não supri sua demanda, a qual foi potencializada nos últimos anos, devido ao aumento das exportações de bioetanol, das vendas de carros "flex-fuel" e dos pactos internacionais pela redução na emissão de carbono, fazendo-se necessário sua expansão (NIGAM; SINGH, 2011).

O aumento da produção de bioetanol vinculado a expansão de áreas dedicadas à produção de energia é uma problemática, uma vez que a médio e longo prazo poderá ocorrer uma disputa de espaço entre produção de alimentos e energia, a qual terá impacto direto nos custos de processo (insumo) e poderá desestabilizar toda a viabilidade dos biocombustíveis (MORAES, MELLO, TOPPA, 2017).

Uma estratégia que vem sendo discutida no âmbito energético é a produção de bioetanol de segunda geração (2G), a qual difere do processo convencional (1G) devido ao uso de biomassa lignocelulósica ao invés de matérias-primas ricas em açucares monoméricos como por exemplo o caldo de cana (SAINI, et al., 2015).

O bagaço e a palha são os dois tipos de resíduos fibrosos obtidos após o processamento da cana de açúcar. A proximidade desses resíduos às usinas, e a consequente redução de custos com transporte, contribui para que os mesmos sejam os materiais lignocelulósicos mais atraentes no Brasil (FERREIRA-LEITAO et al., 2010). Para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca (HASSUANI et al., 2005). Dessa maneira é estimado que o bagaço e a palha da cana-de-açúcar contêm dois terços da energia armazenada na planta (PIPPO et al., 2011).

Para a produção de bioetanol de 2G, a biomassa lignocelulósica primeiramente precisa ser pré-tratada e em seguida hidrolisada por um complexo enzimático, liberando açúcares fermentescíveis. As etapas de hidrólise e fermentação podem ocorrer em vasos reacionais distintos SHF (hidrólise e fermentação separada) ou em um processo simultâneo SSF (sacarificação e fermentação simultânea). O primeiro processo é o convencional, no entanto, o mesmo apresenta problemas de inibição que limitam o rendimento final, pois conforme a biomassa lignocelulósica é hidrolisada os açúcares se acumulam no meio, de modo que as enzimas (celulases) são inibidas por um efeito de *feedback* (HASUNUMA; KONDO, 2012).

Já o processo SSF permite a diminuição dos custos de processo e elimina problemas de inibição, uma vez que no processo simultâneo (um único reator), à medida que os açúcares são liberados, os mesmos são convertidos em etanol, sem acúmulo no vaso reacional. Tal efeito gera ganhos em rendimento, menores custos com enzimas e maior produtividade (ÖHGREN et al., 2007).

Apesar dos ganhos no mecanismo SSF, alguns desafios são encontrados quando se trata de otimizar o processo. A temperatura ótima de hidrólise, em que as celulases têm máxima atividade ocorre em torno de 50° C, enquanto que nessa faixa os micro-organismos fermentadores são inibidos ou perdem viabilidade. Assim, faz-se necessário a atuação de cepas termotolerantes que atuem numa faixa de temperatura maior ou igual a 40° C, em que a atividade celulolítica é superior a 80% (ASK et al., 2012).

Uma problemática também a ser mitigada na produção de bioetanol 2G, refere-se aos elevados custos com a aplicação de celulases no processo de sacarificação, os quais podem representar cerca de 25% do custo final do bioprocessos (AGENCIA USP, 2017). Os coquetéis celulolíticos empregados na sacarificação da biomassa apresentam, em muitos casos, deficiência de uma ou mais enzimas que compõem o complexo celulolítico, esta deficiência limita a velocidade das reações de hidrólise, ocasionando efeitos de inibição mesmo em um mecanismo SSF, fazendo-se necessário ou o aumento da carga enzimática utilizada (o que acarreta em custos) ou o emprego de um microrganismo capaz de secretar celulases endógenas para suplementação (BERLIN et al., 2005; WICKRAMASINGHE et al., 2017).

Saccharomyces cerevisiae é o micro-organismo mais indicado para a produção de bioetanol 2G, uma vez que à mesma já possui robustez conhecida no processo de 1G, com títulos de 12% em 48-72 horas, rendimento de 95% do valor teórico máximo e alta tolerância ao seu produto (<15%). Entretanto, a grande maioria das cepas de *S. cerevisiae* não são

termotolerantes, crescendo em temperaturas entre 30 e 35°C, e também não secretam celulases, sendo necessário o desenvolvimento de linhagens termotolerantes modificadas geneticamente para a expressão heteróloga de enzimas do complexo celulolítico (REIS et al., 2012).

Em abordagens em que o fenótipo desejável é complexo e envolve muitos genes, como na termotolerância, a engenharia evolutiva é uma estratégia que vem sendo aplicada em microorganismos para gerar diversidade e promover alterações fenotípicas desejadas. No processo, uma pressão seletiva é aplicada em degraus, até que a característica almejada seja alcançada e mantida na população (TURANLI-YILDIZ et al., 2017).

Enquanto a expressão heteróloga é a técnica mais aplicada em situações onde um DNA heterólogo deve ser inserido em um micro-organismo hospedeiro a fim de obter uma alteração pontual no genoma que retorne em uma funcionalidade desejada. Uma ferramenta que vem ganhado destaque no melhoramento de cepas com aplicação industrial é a metodologia de edição do DNA CRISPR/Cas9, a qual faz uso de um mecanismo nativo do micro-organismo e por isso tem maior especificidade, diminuindo problemas de rearranjo no genoma e perda de função (CEASAR et al., 2016).

Em face disto, o objetivo do trabalho foi desenvolver linhagens termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* industriais; expressar celulases heterólogas (AsENDO e AsGLI) nestas linhagens a partir do método de edição genômica CRISPR/Cas9 e plasmídeo epissomal, construindo assim uma cepa com potencial de atuar na sacarificação e fermentação simultânea da biomassa lignocelulósica para a produção otimizada de etanol 2G.

2.2 Referências bibliográficas

AGENCIA USP, 2017. // Disponível em: http://www.usp.br/agen/?p=206384 Acesso em: 15 novembro de 2017.

ASK, M.; OLOFSSON, K.; DI FELICE, T.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M.; LIDÉN, G.; OLSSON, L. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated Arundo donax revealed by a comparison between SHF and SSF. **Process Biochemistry**, [s. 1.], v. 47, n. 10, p. 1452–1459, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.016>

BANDARA, J. M. R. S.; WIJEWARDHANA, H. V. P. Butanol a total substitute for gasoline from agricultural residue. [s.l: s.n.].

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.;
OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER,
J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates
Evidence for the role of accessory enzymes. Enzyme and Microbial Technology, [s. 1.], v.
37, n. 2, p. 175–184, 2005.

CEASAR, S. A.; RAJAN, V.; PRYKHOZHIJ, S. V.; BERMAN, J. N.; IGNACIMUTHU, S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1863, n. 9, p. 2334–2344, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009

FERREIRA-LEITAO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 65–76, 2010.

HASSUANI, S. J.; VERDE LEAL, M. R. L.; MACEDO, I. C. Biomass power generation: sugarcane bagasse and trash. Project BRA/96/G31 PNUD – CTC. Piracicaba: Unipress Disc Records do Brasil, Série Caminhos para Sustentabilidade, 2005.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 1287–1294, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.004

MORAES, M. C. P. D.; MELLO, K. D.; TOPPA, R. H. Protected areas and agricultural expansion: Biodiversity conservation versus economic growth in the Southeast of Brazil. **Journal of Environmental Management**, [s. 1.], v. 188, 2017.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress** in Energy and Combustion Science, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>

ÖHGREN, K.; BURA, R.; LESNICKI, G.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, [s. 1.], v. 42, n. 5, p. 834–839, 2007.

PIPPO, W. A.; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. A. M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current

situation and environmental aspects. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–16, 2011.

REIS, V. C. B.; NICOLA, A. M.; DE SOUZA OLIVEIRA NETO, O.; BATISTA, V. D. F.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of Saccharomyces cerevisiae JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1673–1683, 2012.

SAINI, J. K.; AGRAWAL, R.; SATLEWAL, A.; SAINI, R.; GUPTA, R.; MATHUR, A.; TULI, D. Second generation bioethanol production at high gravity of pilot-scale pretreated wheat straw employing newly isolated thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus DBTIOC-35. **RSC Adv.**, [s. 1.], v. 5, n. 47, p. 37485–37494, 2015. Disponível em: ">http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA05792B>

TURANLI-YILDIZ, B.; BENBADIS, L.; ALKIM, C.; SEZGIN, T.; AKŞIT, A.; GÖKÇE, A.; ÖZTÜRK, Y.; BAYKAL, A. T.; ÇAKAR, Z. P.; FRANÇOIS, J. M. In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of Saccharomyces cerevisiae haploid cells triggers diploidization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 309–318, 2017.

WICKRAMASINGHE, G. H. I. M.; RATHNAYAKE, P. P. A. M. S. I.; CHANDRASEKHARAN, N. V.; WEERASINGHE, M. S. S.; WIJESUNDERA, R. L. C.; WIJESUNDERA, W. S. S. Trichoderma virens β -glucosidase i (BGLI) gene; Expression in Saccharomyces cerevisiae including docking and molecular dynamics studies. **BMC Microbiology**, [s. 1.], v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica abrange uma ampla gama de resíduos de composição similar, os quais em sua maioria são provenientes do processamento de matérias-primas, como a cana-de-açúcar (palha e bagaço) e o milho (palha). No entanto, qualquer composto vegetal é fonte de material lignocelulósico, uma vez que este, é derivado da parece celular característica da estrutura vegetal (PAULOVA et al., 2015).

O bagaço da cana-de-açúcar representa um dos principais materiais lignocelulósicos gerados durante o processo de produção de etanol de 1º geração, visto que a cada tonelada de cana moída, são produzidos cerca de 250 kg deste resíduo (MARTÍN et al., 2006). Esse material lignocelulósico tem sido alvo de muitos estudos para a produção de etanol de segunda geração. Já a palha da cana-de-açúcar, tem ganhado destaque como fonte de biomassa, visto que possui basicamente os mesmos componentes do bagaço (Santos et al., 2016). Além disso, tem sido desenvolvido e aperfeiçoado cultivares mais produtivas como a cana energia, rica em fibras e de altíssima produtividade em termos de biomassa (CARVALHO-NETO et al., 2014). Assim, pesquisas que se propõem a produzir bioetanol a partir de dejetos industriais – como é o caso do bagaço e da palha de cana – são extremamente promissoras, uma vez que possibilitam utilizar resíduos subaproveitados para fins mais nobres, aumentando seu valor agregado (BALAT, 2011).

A composição majoritária da biomassa é formada por arranjos de polissacarídeos complexos em celulose e hemicelulose, estruturados em um fenil propanóide reticulado, denominado de lignina, como pode ser visualizado na Figura 1 (ALTHURI; GUJJALA; BANERJEE, 2017). Na forma bruta, a biomassa não apresenta biodisponibilidade, uma vez que a lignina forma uma barreira física entre os açúcares e o meio externo, de modo que um pré-tratamento se faz necessário (BANOTH et al., 2017).



Figura 1: Estrutura da Biomassa Lignocelulósica

Fonte: Adaptado de (TOMME; WARREN; GILKES, 1995)

O Pré-tratamento visa a deslignificação da biomassa, uma vez que tal processo permite a separação dos constituintes, aumentando a área superficial e porosidade da biomassa, tornando-a própria para o processo de hidrolise e obtenção de açúcares fermentescíveis (BUNDHOO; MOHEE, 2018). Métodos físicos, químicos e biológicos são empregados como formas de pré-tratamento, dos quais se destacam o uso de ácidos diluídos (OROZCO et al., 2013), métodos biológicos (ASAD et al., 2017) e o método de explosão a vapor (SUN, et al., 2014). A estratégia de pré-tratamento pode envolver um ou mais métodos, sendo considerada adequada quando atende aos requisitos de baixo custo, eficiência de separação dos constituintes (disponibilização) e baixa formação de inibidores (EBRAHIMI et al., 2017).

2.1.2 Bioetanol e o Brasil

O bioetanol derivado da cana-de-açúcar é o principal biocombustível produzido no Brasil, o mesmo foi incentivado no país, devido à grande crise energética mundial da década de 70, em que foi lançado o Programa Nacional do Álcool – Proálcool (CANTERLE et al., 2016). Tal medida visava reduzir a dependência dos combustíveis derivados do petróleo, como a gasolina, e permitir uma maior autonomia energética, reduzindo a instabilidade econômica (MORAES; MELLO; TOPPA, 2017).

Esforços em pesquisa permitiram o desenvolvimento de tecnologias robustas para a produção do bioetanol de cana-de-açúcar, de modo a tornar o Brasil uma referência em produção de biocombustíveis, sendo o bioetanol, um potencial *commodity* global similar a gasolina, mas com menor efeito poluidor e sem projeções de escassez futuras, o que lhe garante um status de combustível atual as novas demandas (SANTOS et al., 2017).

Os Estados Unidos e o Brasil dominam o mercado com a produção de 85% de todo o bioetanol consumido no mundo, tendo como substratos principais o milho e a cana, respectivamente (DE CARVALHO; ANTUNES; FREIRE, 2016). No entanto, para atender à crescente demanda de bioetanol, faz-se necessário a expansão de áreas de cultivo dedicadas a produção de energia, as quais concorrem diretamente com a produção de alimentos. Além disso, a expansão de monoculturas energéticas enfrenta duras críticas dos ambientalistas, uma vez que elas causam o empobrecimento do solo, escassez hídrica e alteram os ciclos biogeoquímicos, o que mitiga a consciência ambiental atrelada aos biocombustíveis (PAPPALARDO et al., 2015).

Grandes expectativas são condicionadas ao potencial Brasileiro quanto a demanda energética vinculada ao bioetanol, tendo em vista que projeções já apontam que o bioetanol americano não será viável, devido a insuficiência de milho para atender ambos os mercados (alimentação e energia). Além disso, o bioetanol brasileiro tem um efeito poluído inferior a gasolina e ao etanol americano. O índice de intensidade do carbono (IC), o qual mede a emissão de CO₂ para cada unidade de energia gerada, mostra que para cada megajoules (MJ) de energia gerada a partir da gasolina são emitidos 95,86 g de CO₂, enquanto para o etanol de milho e de cana-de-açúcar os valores são de 75,97 e 56,66 g de CO₂/MJ, respectivamente. O que representa uma significativa redução da emissão de gases do efeito estufa, sem afetar o consumo energético mundial (SANTOS et al., 2016); (AVANTHI; SRINIVAS; BANERJEE, 2017).

2.1.3 Produção de Bioetanol 2º Geração

A produção de bioetanol de segunda geração (2G) é uma estratégia para aumentar a produção de bioetanol, sem a necessidade de ampliar as áreas de cultivo, em que os resíduos (palha e bagaço) da primeira geração (1G) e outras biomassas são empregues como matériaprima, mediante tecnologia adequada de processamento (ROSBURG; MCFADDEN; MIRANOWSKI, 2017).

Além de aumentar a produção de bioetanol, o etanol 2G é uma forma de agregar valor, aproveitando a disponibilidade de biomassas lignocelulósicas, as quais em geral, são subaproveitadas e tem seu potencial negligenciado, sendo aplicadas na alimentação animal, aquecimento de caldeiras, compostagem ou até consideradas rejeitos e passiveis de custos para destinação final (MANOCHIO et al., 2017); (HEGDE; LODGE; TRABOLD, 2018).

A primeira planta de bioetanol 2G começou a operar em outubro de 2013 na Itália com capacidade de produção de 60 mil toneladas/ano e autossuficiência energética (BETA

RENEWABLES, 2017). Enquanto no Brasil foi instalada em setembro de 2014 no estado de Alagoas a planta Bioflex I mediante tecnologia licenciada pela Beta Renewables com capacidade de 82 milhões de litros/ano (GRANBIO, 2017). Em novembro de 2014 a empresa Raízen iniciou no seguimento com uma planta com capacidade de produção de 42 milhoes de litros de etanol e projeta que até 2024 tenha mais sete novas plantas que serão instaladas próximas as unidades produtoras de etanol de primeira geração. Acumulando uma capacidade máxima produtiva de um bilhão de litros de etanol por ano (RAÍZEN, 2019)

O processo de produção do bioetanol de segunda geração utiliza biomassa lignocelulósica como substrato para a fermentação, ao passo que a primeira geração faz uso de matérias-primas ricas em açúcares monoméricos, como a cana e o amido de milho. Apesar da vantagem econômica pelo uso de substratos de baixo valor agregado, faz-se necessário adicionar um mecanismo de hidrolise antes da fermentação, de modo que os açúcares complexos obtidos no pré-tratamento sejam convertidos em açúcares fermentescíveis (Figura 2) derivados da celulose (glicose) e da hemicelulose (xilose, arabinose, manose e glicose) (HIJOSA-VALSERO; PANIAGUA-GARCÍA; DÍEZ-ANTOLÍNEZ, 2017).

Figura 2: Principais açúcares obtidos na hidrolise da biomassa lignocelulósica



Fonte: (BRANDT et al., 2013)

O protagonismo da etapa de hidrólise é assumido por um complexo enzimático de ação específica e sinérgica, caracterizado como celulases, as quais são descritas como glicosil hidrolase (GH) e subdivididas em três classes de acordo com a porção de atuação na cadeia polimérica. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) atuam nas ligações internas da cadeia, iniciando o processo de hidrolise e reduzindo o grau de polimerização. Enquanto as exoglucanases ou celobio-hidrolases (EC 3.2.1.9.1) clivam as extremidades da celulose, liberando celobiose (dímero de glicose) que por sua vez são quebrados em glicose pela ação das β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (OGEDA; PETRI, 2010).

Tradicionalmente, pensava-se que as enzimas hidrolíticas eram as únicas responsáveis pela degradação da celulose. No entanto, uma mudança fundamental neste modelo foi

desencadeada pela descoberta das enzimas redox dependente de cobre, hoje conhecidas como monoxigenases de polissacarídeo líticas (LPMOs) (AGGER et al., 2014). LPMOs estão abundantemente presentes em micro-organimos que degradam a biomassa e fazem uso de oxigênio molecular e de um doador externo de eletróns para a clivagem dos polissacáridos por hidroxilação dos átomos de carbono na ligação glicosídica (FORSBERG et al., 2014). Entretanto, apenas um pequeno número de LPMOs de origem microbiana foi caracterizado até o momento, o que dificulta sua aplicação biotecnológica e incentiva a busca por novos microorganismos produtores de monoxigenases de polissacarídeo líticas com elevada atividadade oxidativa, bem como especificidade catalítica.

Após a etapa de hidrólise, o processo segue para a fermentação, onde a glicose advinda da sacarificação da biomassa lignocelulósica é convertida em etanol. Sem prejuízo de conotação, pode-se dizer também que a etapa de hidrolise e fermentação estão diretamente associadas, sendo necessária a primeira para que a segunda possa existir, seja em condição sequencial (hidrólise e fermentação separada – SHF) ou de modo simultâneo (sacarificação e fermentação simultânea – SSF).

2.1.4 Hidrólise e Fermentação separada (SHF)

O mecanismo de produção de bioetanol 2G mais comum é a Hidrólise e Fermentação separada - SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*) em que a hidrolise e a fermentação são realizadas em etapas consecutivas. Primeiro ocorre a sacarificação do material celulósico, mediante enzimas hidrolíticas de alta especificidade e depois, em outro reator, a fermentação propriamente dita com o produto da sacarificação (HASUNUMA; KONDO, 2012).

Segundo Pathania; Sharma; Handa, (2017), o processo SHF possibilita otimizar as condições ótimas de cada etapa, uma vez que estas divergem na hidrolise e fermentação. No processo de hidrolise, altas temperaturas (50°C) favorecem a atividade das enzimas hidrolíticas que clivam as ligações poliméricas, enquanto a temperatura ideal para a fermentação é mais amena (30-35°C), uma vez que os micro-organismos responsáveis por esse processo são mesófilos.

Em contrapartida, o fato de todos os açúcares hidrolisados serem acumulados no vaso de reação, pode ocasionar inibição pelo produto, em que a liberação de glicose e celobiose causam um efeito de feedback, de modo que nem toda a celulose é aproveitada, implicando em menores rendimentos do processo (YAO et al., 2017).

Balat, (2011) sugere que para impedir o efeito de inibição, o processo deve ocorrer com uma menor carga de sólidos em relação ao volume operacional, uma vez que isso resulta na diminuição de produtos inibitórios. Todavia, essa redução de sólidos afeta a produtividade, tendo em vista que menos biomassa estará presente no reator para ser convertida em açúcares fermentescíveis numa mesma unidade de tempo. Outra estratégia citada é aumentar a concentração de enzimas para compensar o efeito inibitório, no entanto isso torna o processo ainda mais oneroso, sendo necessário buscar alternativas de maior viabilidade.

2.1.5 Sacarificação e Fermentação simultânea (SSF)

A Produção de bioetanol de 2G apresenta o potencial de ser um dos melhores mecanismos de produção de energia renovável. Apesar disso, sua produção em plantas industrias é pontual por meio de industrias pioneiras. Isso reflete a existência de gargalos tecnológicos que limitam a viabilidade econômica do bioetanol 2G, os quais devem ser mitigados por pesquisas de otimização para melhorar a conjuntura técnica atual (CAVALETT et al., 2017).

Um processo de produção de bioetanol 2G que vem sendo difundido é o SSF-Sacarificação e Fermentação Simultânea, o qual foi descrito pela primeira vez em uma patente de Gauss et al. (1976), visando a integração das etapas de hidrolise e fermentação no mesmo meio reacional e de modo simultâneo. O método permite não só a incorporação de duas etapas em um mesmo espaço físico (reator) e temporal, o que já permite a redução de custos em 20% (WINGREN et al., 2003). Mas também, permite a solução de problemáticas que inferem diretamente sobre o rendimento e produtividade do processo, como os efeitos de inibição pelo produto. No método SSF ao mesmo tempo em que as celulases hidrolisam a biomassa, produzindo açúcares monoméricos, estes são convertidos em etanol por meio de microorganismos fermentativos, de modo que não há acúmulo de produto (hidrolise) no meio (GAO et al., 2014).

Chen et al. (2017) avaliaram a produção de bioetanol mediante SSF de pó de madeira pré-tratada, onde estes citam como vantagens do método: a redução da inibição e da carga enzimática celulolítica requerida, maior rendimento, menor volume de reator e tempo de processamento. Já Ask et al. (2012) fizeram uma comparação entre os principais métodos de produção de bioetanol utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Os melhores resultados foram obtidos a partir do sistema SHF frente ao SSF, com um rendimento de bioetanol de 0,24 g/g e 0,20 g/g, respectivamente. No entanto, o próprio autor faz uma ressalva que muitos fatores

não foram considerados nesta comparação como, por exemplo, tempo de processo e custo, não sendo possível ter uma afirmação definitiva.

Apesar das vantagens apresentadas pelo método de SSF alguns desafios de processos são encontrados, o principal deles refere-se as condições ótimas do processo. A variável pH não é um aspecto preocupante, uma vez que tanto as enzimas quanto os micro-organismos produtores de álcool atuam bem na mesma faixa de trabalho (4,5 -5,0). Em contraponto, a temperatura é uma variável de extrema importância. Em altas temperaturas (50°C) a atividade das celulases é máxima, favorecendo a hidrolise da biomassa. Contudo, nessa mesma temperatura os micro-organismo fermentadores (em sua maioria leveduras) tem sua atividade limitada e morte celular (BALLESTEROS et al., 2004).

Saini et al. (2015) afirmam que estruturar o processo SSF com a variação da temperatura em função do tempo é uma alternativa para melhorar a viabilidade do processo, fazendo uma pré-sacarificação na temperatura ótima de hidrolise, seguida de arrefecimento até a temperatura ótima de fermentação. No entanto, apesar dessa configuração melhorar o rendimento final de bioetanol, a mesma também ocasiona o aumento do tempo total de processo, inferindo sobre a produtividade.

Uma melhor alternativa é a busca por micro-organismos termotolerantes que consigam fermentar os açúcares do meio em condições de temperatura próxima as condições ótimas do complexo celulolítico, uma vez que alterar as condições ótimas das celulases é muito mais complexo (CHU; ZHANG; BAO, 2012).

2.1.6 Saccharomyces cerevisiae

A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura mais difundida para aplicação industrial, fazendo parte da vivência humana desde os tempos remotos, com citação na antiguidade na fabricação de vinho e pão. Não obstante, ainda hoje ela mantém sua expressividade, ganhando conotação especial com a bioenergia, na produção de etanol (TOOGOOD; SCRUTTON, 2018).

A hegemonia da *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol não é por acaso, seu destaque entre os outros micro-organismos fermentadores ocorre devido a sua alta capacidade de metabolizar glicose em etanol, obtendo uma concentração final de cerca de 12% em 48-72 horas (REIS, 2012). Além disso, apresenta altas taxas de conversão, com rendimento em etanol de 0,45-0,50 g para cada g de glicose, atingindo cerca de 95% do rendimento teórico (0,51 g/g).

Outro fator favorável e alta tolerância ao seu produto (<15% de etanol) o que lhe consolida como o micro-organismo mais robusto para a produção de etanol de cana-de-açúcar (IVANČIĆ ŠANTEK, 2016)

Apesar disso, alguns desafios precisam ser contornados a medida que a demanda por bioetanol cresce, principalmente no que diz respeito ao etanol de 2G. A *S. cerevisiae* não apresenta pronta disponibilidade para fazer uso da celulose – componente majoritário da biomassa lignocelulósica, fazendo-se necessário uma previa etapa de hidrolise mediante adição de celulases, o que encarece o processo produtivo. Além disso, as condições ótimas das celulases diferem da faixa ótima da *Saccharomyces*, inviabilizando a redução de custos em um processo simultâneo (LEE et al., 2013).

A problemática apresentada podia inviabilizar o uso de *S. cerevisiae* na produção de etanol 2G, no entanto os avanços da engenharia genética, bem como, o completo sequenciamento do genoma da *S. cerevisiae* permitem o desenvolvimento de pesquisas para a construção de cepas mais adaptadas as novas demandas do processo tecnológico (REIS et al., 2012).

2.1.7 Engenharia Evolutiva e Genética aplicada a S. Cerevisiae

Uma das teorias mais elucidadas e aceitas pela comunidade cientifica é atrelada a Charles Darwin que propôs a teoria da seleção natural, em que os organismos mais adaptados ao meio ambiente sobrevivem, enquanto os demais são extintos. Tomando esse pressuposto, a engenharia evolutiva foi desenvolvida como uma estratégia de seleção natural das melhores linhagens, onde uma pressão seletiva é exercida a fim de alterar um fenótipo desejado. Na prática, os micro-organismos são submetidos a situações de estresse que os forcem a desenvolver uma característica desejada para sua sobrevivência. Ao final, a característica alcançada tende a ser mantida na população onde a condição foi imposta (TURANLI-YILDIZ et al., 2017).

Um fenótipo desejado às cepas de *S. cerevisiae* na produção de etanol 2G é a termotolerancia, uma vez que esta característica permiti a atuação desta levedura em faixas mais amplas de trabalho e em sistemas mais otimizados, como o SSF. Choudhary et al. (2017) avaliaram cepas de leveduras termotolerantes para produção de etanol 2G mediante o processo SSF, obtendo crescimento significativo a 40°C para a cepa *Saccharomyces Cerevisiae* (JRC6)

com rendimento em etanol de 88,3% do referencial teórico nesta temperatura. Esse resultado denota a boa resposta da *Saccharomyces* ao processo de evolução frente a termotolerancia.

Wallace-Salinas e Gorwa-Grauslund (2013) também aplicaram engenharia evolutiva em busca da termotolerancia de uma cepa de *Saccharomyces* industrial (ISO12) com rendimentos significativos na temperatura de 39°C. Toda via, o resultado obtido mais interessante foi uma correlação sinérgica entre a tolerância a temperatura e aos inibidores advindos do prétratamento da biomassa, destacando um ponto interessante a ser avaliado, uma vez que a presença de inibidores como: o ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural é uma problemática persistente na viabilidade do etanol 2G.

No entanto, muitas vezes é desejado que um determinado micro-organismos tenha um perfil ou habilidade de outra espécie, de modo que somente alterações no seu fenótipo não são suficientes. Um dos maiores gargalos relacionados a viabilidade do etanol de 2G pode ser diretamente associado a incapacidade da *S. Cerevisiae* metabolizar açúcares complexos (CAVALETT et al., 2017). Neste caso, a engenharia genética avança como um suporte indispensável para o desenvolvendo de linhagens modificadas que agreguem uma ou mais características não encontradas nas cepas selvagens/parentais (KAR et al., 2017).

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura com alta predisposição ao processo de modificação genética, tendo em vista que ela foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma totalmente sequenciado, além de ser um organismo unicelular não patogênico (GRAS) com consolidada aplicação industrial. Logo, as ferramentas de engenharia genética podem ser cruciais no melhoramento das cepas indústrias para a produção de bioetanol 2G em títulos significativos e boa produtividade, tornando-o competitivo frente aos combustíveis fosseis e ao etanol de 1G (GOLDBECK et al, 2013).

A expressão heteróloga é a técnica mais utilizada na modificação de *S. cerevisiae* para aplicação em bioprocessos, a mesma pode ser dividida em expressão heteróloga ou homóloga de acordo a origem do material genético agregado ao hospedeiro (HAAN, et al., 2007). Além da inserção do material genético, um parâmetro relevante é a manutenção estável deste nas gerações futuras, sendo um ponto crucial à expressão de alto nível. A melhora da estabilidade está associada ao método de edição de genes empregado. Nesse sentido, o sistema CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) compõe um importante avanço desenvolvido, uma vez que ele permite a edição mais precisa do material

genético mediante um sistema nativo e consequentemente, evita rearranjos sequenciais e perda da codificação/função desejada (CEASAR et al., 2016).

Diversos trabalhos estão sendo realizados no âmbito da modificação genética de *S*. *cerevisiae* para aplicação na produção de bioetanol 2G, dentre os quais uma vertente se destaca: a Super expressão heteróloga de celulases em *S. cerevisiae* visando a SSF. Khramtsov et al. (2011) adicionaram genes que codificam β -glicosidase, exoglucanase e endoglucanase na região cromossômica do DNA de uma levedura de vinho K1-V1116, a qual passou a excretar tais celulases sem necessidade de complementação exógena, permitindo a sacarificação e fermentação simultânea da biomassa lignocelulósica para produção de etanol.

Song et al. (2016) construíram um vetor de expressão integrada pHBM368-pgk, contendo genes de β -glicosidase, exoglucanase e endoglucanase heterólogas, obtendo uma concentração final de etanol 3 vezes superior ao obtido com a cepa parental, tendo espigas de milho como única fonte de carbono.

Fujita et al. (2002) obtiveram um rendimento em etanol de 0,48 g/g de glicose através de uma cepa de *S. cerevisiae* modificada por engenharia de superfície celular, em que a expressão de genes codificantes de endoglucanases e β -glicosidases apresentaram sinergia suficiente para sacarificar a celulose, permitindo a SSF sem a necessidade da inserção de mais um gene (exoglucanase) o que reduz a complexidade e a possibilidade de rearranjos que mitigam a eficiência da modificação.

2.2 Referências Bibliográficas

ALTHURI, A.; GUJJALA, L. K. S.; BANERJEE, R. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, p. 530–539, 2017. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417314542>. Acesso em: 18 out. 2017.

ASAD, M.; MENANA, Z.; ZIEGLER-DEVIN, I.; BERT, V.; CHALOT, M.; HERZIG, R.; MENCH, M.; BROSSE, N. Pretreatment of trace element-enriched biomasses grown on phytomanaged soils for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 107, n. May, p. 63–72, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669017303412> ASK, M.; OLOFSSON, K.; DI FELICE, T.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M.; LIDÉN, G.; OLSSON, L. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated Arundo donax revealed by a comparison between SHF and SSF. **Process Biochemistry**, [s. 1.], v. 47, n. 10, p. 1452–1459, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.016>

AVANTHI, A.; SRINIVAS, G. L. K.; BANERJEE, R. Partially Consolidated Bioprocessing of Mixed Lignocellulosic feedstocks for Ethanol Production. **Bioresource Technology**, [s. l.], 2017. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417314542

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, [s. 1.], v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Kluyveromyces marxianus CECT 10875. **Process Biochemistry**, [s. 1.], v. 39, n. 12, p. 1843–1848, 2004.

BANOTH, C.; SUNKAR, B.; TONDAMANATI, P. R.; BHUKYA, B. Improved physicochemical pretreatment and enzymatic hydrolysis of rice straw for bioethanol production by yeast fermentation. **3 Biotech**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 334, 2017. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s13205-017-0980-6

BRANDT, A.;GRASVIK, J.;HALLET, J.P.; WELTON, T. Green Chemistry. Green Chemistry, [s. l.], n. 207890, p. 2438–2442, 2013.

BUNDHOO, Z. M. A.; MOHEE, R. Ultrasound-assisted biological conversion of biomass and waste materials to biofuels: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 40, n. December 2016, p. 298–313, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.066

CANTERLE, J. O. B.; MORAES, P. M.; STROHAECKER, T. R.; KWIETNIEWSKI, C. E. F.; PIMENTA, G. S.; BAPTISTA, I. P. Evaluation of the steel API X70 embrittlement in different ethanol environments. [s.l: s.n.]. v. 4

CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D. B.; BONOMI, A. Environmental impacts of technology learning curve for cellulosic ethanol in Brazil. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 106, p. 31–39, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.025>

CEASAR, S. A.; RAJAN, V.; PRYKHOZHIJ, S. V.; BERMAN, J. N.; IGNACIMUTHU, S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1863, n. 9, p. 2334–2344, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009

CHEN, W. C.; LIN, Y. C.; CIOU, Y. L.; CHU, I. M.; TSAI, S. L.; LAN, J. C. W.; CHANG, Y. K.; WEI, Y. H. Producing bioethanol from pretreated-wood dust by simultaneous saccharification and co-fermentation process. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, [s. 1.], v. 79, p. 43–48, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2017.04.025>

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. 1.], v. 123, n. 3, p. 342–346, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.10.007

CHU, D.; ZHANG, J.; BAO, J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Corn Stover at High Temperature and High Solids Loading by a Thermotolerant Strain Saccharomyces cerevisiae DQ1. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1020–1026, 2012.

DE CARVALHO, A. L.; ANTUNES, C. H.; FREIRE, F. Economic-energy-environment analysis of prospective sugarcane bioethanol production in Brazil. **Applied Energy**, [s. l.], v. 181, p. 514–526, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.122

DEN HAAN, R.; MCBRIDE, J. E.; GRANGE, D. C. La; LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H. Functional expression of cellobiohydrolases in Saccharomyces cerevisiae towards one-step conversion of cellulose to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1291–1299, 2007.

DOS SANTOS, L. V.; DE BARROS GRASSI, M. C.; GALLARDO, J. C. M.; PIROLLA, R. A. S.; CALDERÓN, L. L.; DE CARVALHO-NETTO, O. V.; PARREIRAS, L. S.; CAMARGO, E. L. O.; DREZZA, A. L.; MISSAWA, S. K.; TEIXEIRA, G. S.; LUNARDI, I.; BRESSIANI, J.; PEREIRA, G. A. G. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, [s. 1.], v. 12, n. 1, p. 40–57, 2016. Disponível em: ">http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ind.2015.0017>

EBRAHIMI, M.; CAPARANGA, A. R.; ORDONO, E. E.; VILLAFLORES, O. B.; POURIMAN, M. Effect of ammonium carbonate pretreatment on the enzymatic digestibility,

structural characteristics of rice husk and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation process with Saccharomyces cerevisiae Hansen 2055. **Industrial Crops and Products**, [s. 1.], v. 101, p. 84–91, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.006

FUJITA, Y.; TAKAHASHI, S.; UEDA, M.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y.; ARAI, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A.; TANAKA, A.; KAWAGUCHI, T. Direct and Efficient Production of Ethanol from Cellulosic Material with a Yeast Strain Displaying Cellulolytic Enzymes Direct and Efficient Production of Ethanol from Cellulosic Material with a Yeast Strain Displaying Cellulolytic Enzymes. Applied and environmental microbiology, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 668–673, 2002.

GRANBIO, 2017 // Disponível em: http://www.granbio.com.br/conteudos/conheca-a-granbio Acesso em: 15 novembro de 2018.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Z.; LIANG, C.; YUAN, Z.; ZHANG, Y. Bio-ethanol production by high temperature simultaneous saccharification and fermentation of bagasse. **Taiyangneng Xuebao/Acta Energiae Solaris Sinica**, [s. 1.], v. 35, n. 4, 2014.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 1287–1294, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.004

HEGDE, S.; LODGE, J. S.; TRABOLD, T. A. Characteristics of food processing wastes and their use in sustainable alcohol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 81, n. January 2017, p. 510–523, 2018.

HIJOSA-VALSERO, M.; PANIAGUA-GARCÍA, A. I.; DÍEZ-ANTOLÍNEZ, R. Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 101, n. 21, p. 8041–8052, 2017. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8522-z

IVANČIĆ ŠANTEK, M. Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. **Kemija u** industriji, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 25–38, 2016. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84957650840&partnerID=tZOtx3y1> KAR, B.; VERMA, P.; DEN HAAN, R.; SHARMA, A. K. Characterization of a recombinant thermostable β-glucosidase from Putranjiva roxburghii expressed in Saccharomyces cerevisiae and its use for efficient biomass conversion. **Process Biochemistry**, [s. l.], n. April, p. 0–1, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.005>

KHRAMTSOV, N.; MCDADE, L.; AMERIK, A.; YU, E.; DIVATIA, K.; TIKHONOV, A.; MINTO, M.; KABONGO-MUBALAMATE, G.; MARKOVIC, Z.; RUIZ-MARTINEZ, M.; HENCK, S. Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 17, p. 8310–8313, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.075>

LEE, W. H.; NAN, H.; KIM, H. J.; JIN, Y. S. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered Saccharomyces cerevisiae without supplementing extracellular β -glucosidase. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 167, n. 3, p. 316–322, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.016

MANOCHIO, C.; ANDRADE, B. R.; RODRIGUEZ, R. P.; MORAES, B. S. Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 80, n. February, p. 743–755, 2017.

MORAES, M. C. P. D.; MELLO, K. D.; TOPPA, R. H. Protected areas and agricultural expansion: Biodiversity conservation versus economic growth in the Southeast of Brazil. **Journal of Environmental Management**, [s. 1.], v. 188, 2017.

OGEDA, T. L.;PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 33, p. 1549–1558, 2010.

OROZCO, A. M.; AL-MUHTASEB, A. H.; ROONEY, D.; WALKER, G. M.; AHMAD, M. N. M. Hydrolysis characteristics and kinetics of waste hay biomass as a potential energy crop for fermentable sugars production using autoclave parr reactor system. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 44, p. 1–10, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.018

PAPPALARDO, S. E.; PROSDOCIMI, M.; TAROLLI, P.; BORIN, M. Assessment of energy potential from wetland plants along the minor channel network on an agricultural floodplain. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. 1.], v. 22, n. 4, p. 2479–2490, 2015.

PATHANIA, S.; SHARMA, N.; HANDA, S. Immobilization of co-culture of Saccharomyces

cerevisiae and *Scheffersomyces stipitis in sodium alginate* for bioethanol production using hydrolysate of apple pomace under separate hydrolysis and fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. 1.], v. 35, n. 6, p. 450–459, 2017. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10242422.2017.1368497

PAULOVA, L.; PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; RYCHTERA, M.; MELZOCH, K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, [s. 1.], v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.002

RAIZEN, 2019. Disponível em: https://www.raizen.com.br/pt/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

REIS, V. C. B.; NICOLA, A. M.; DE SOUZA OLIVEIRA NETO, O.; BATISTA, V. D. F.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of Saccharomyces cerevisiae JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1673–1683, 2012.

ROSBURG, A.; MCFADDEN, J.; MIRANOWSKI, J. Managing Feedstock Supply Risk for the Development of a US Stover Biofuel Industry. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 671–687, 2017.

SAINI, J. K.; AGRAWAL, R.; SATLEWAL, A.; SAINI, R.; GUPTA, R.; MATHUR, A.; TULI, D. Second generation bioethanol production at high gravity of pilot-scale pretreated wheat straw employing newly isolated thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus DBTIOC-35. **RSC Adv.**, [s. 1.], v. 5, n. 47, p. 37485–37494, 2015. Disponível em: ">http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA05792B>

SANTOS, C. I.; SILVA, C. C.; MUSSATTO, S. I.; OSSEWEIJER, P.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; POSADA, J. A. Integrated 1st and 2nd generation sugarcane bio-refinery for jet fuel production in Brazil: Techno-economic and greenhouse gas emissions assessment. **Renewable Energy**, [s. 1.], 2017.

SONG, H. T.; LIU, S. H.; GAO, Y.; YANG, Y. M.; XIAO, W. J.; XIA, W. C.; LIU, Z. L.; LI, R.; MA, X. D.; JIANG, Z. B. Simultaneous saccharification and fermentation of corncobs with genetically modified Saccharomyces cerevisiae and characterization of their microstructure during hydrolysis. **Bioengineered**, [s. 1.], v. 7, n. 3, p. 198–204, 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2016.1178424>

SUN, S. L.; WEN, J. L.; MA, M. G.; SUN, R. C. Enhanced enzymatic digestibility of bamboo by a combined system of multiple steam explosion and alkaline treatments. **Applied Energy**, [s. l.], v. 136, p. 519–526, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.09.068>

TOMME, P.; WARREN, R. a; GILKES, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. [s.l: s.n.]. v. 37

TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. Retooling microorganisms for the fermentative production of alcohols. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 50, p. 1–10, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.010

TURANLI-YILDIZ, B.; BENBADIS, L.; ALKIM, C.; SEZGIN, T.; AKŞIT, A.; GÖKÇE, A.; ÖZTÜRK, Y.; BAYKAL, A. T.; ÇAKAR, Z. P.; FRANÇOIS, J. M. In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of Saccharomyces cerevisiae haploid cells triggers diploidization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 309–318, 2017.

WALLACE-SALINAS, V.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Adaptive evolution of an industrial strain of Saccharomyces cerevisiae for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**, [s. 1.], v. 6, n. 1, p. 151, 2013. Disponível em: http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-151

YAO, D.; DONG, S.; WANG, P.; CHEN, T.; WANG, J.; YUE, Z. B.; WANG, Y. Robustness of Clostridium saccharoperbutylacetonicum for acetone-butanol-ethanol production: Effects of lignocellulosic sugars and inhibitors. **Fuel**, [s. 1.], v. 208, p. 549–557, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.07.004

CAPITULO 3. ARTIGO 1. EVOLUTIONARY ENGINEERING OF THERMOTOLERANT INDUSTRIAL STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR SECOND-GENERATION ETHANOL PRODUCTION

Allan Henrique Felix de Melo¹, Alberto Moura Mendes Lopes¹, Nicole Dezotti¹, Gleidson Silva Teixeira¹, Rosana Goldbeck^{1*}

¹Bioprocess and Metabolic Engineering Laboratory, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author: Rosana Goldbeck, e-mail: goldbeck@gmail.com, Phone: +55 19 35214038, Fax +55 19 35214025, Monteiro Lobato n. 80, Cidade Universitária, Campinas, São Paulo 13083-862, Brazil.

Artigo submetido para publicação no periódico FEMS Yeast Research, 2019

ABSTRACT

A promising strategy for increasing process efficiency and reducing costs in second-generation ethanol production is to carry out the fermentation step at temperatures above 35 °C. In addition to minimizing cooling costs, this approach decreases the viscosity and oxygen solubility of the medium, which facilitates homogenization and the maintenance of anaerobic conditions and enables simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of the lignocellulosic biomass. However, *Saccharomyces cerevisiae* does not grow efficiently at high temperatures. Therefore, in this study, we used adaptive laboratory evolution to select industrial *S. cerevisiae* strains able to grow and produce ethanol at temperatures \geq 40 °C. Compared with their parental strains, SA-1E and PE-2E had respectively 63% and 61% higher cell growth at 40 °C, giving an ethanol yield of 0.44 g g⁻¹. Our results showed that evolutionary engineering can be used to evolve diploid industrial *S. cerevisiae* strains, as has been achieved with haploid laboratory strains. The selected strains showed great potential for high-temperature fermentation.

Keywords: thermotolerance, yeast, Saccharomyces cerevisiae, bioethanol.

3.1 Introduction

There is a global consensus on the value of bioethanol as a partial or total substitute for fossil fuels. No other gasoline-like material holds a greater promise of becoming a commodity fuel than bioethanol (Santos *et al.* 2017). However, to meet worldwide demand, biorefineries will have to reinvent themselves in order to achieve higher yield and productivity (Madeira-Jr and Gombert 2018).

As research advances and new fermentation processes emerge, the need for a robust microorganism that performs well under stressful conditions becomes evident. Although several bacteria and yeasts are capable of converting fermentable sugars into ethanol, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the most widely used microorganism in industrial applications because of its ability to produce and tolerate high ethanol concentrations and its resistance to fermentation inhibitors derived from the hydrolysis of lignocellulosic biomass (Reis *et al.* 2012).

The optimal temperature range for fermentation processes using *S. cerevisiae* is 25–35 °C (Edgardo *et al.* 2008). However, there are several advantages to fermenting at temperatures above 35 °C. Medium viscosity and oxygen solubility decrease with increasing temperature, facilitating agitation and the maintenance of anaerobic conditions during fermentation (Talukder *et al.* 2016). Increased temperatures also help prevent mesophilic microbial contamination and can reduce cooling costs by decreasing water and energy consumption. Yet another advantage of high-temperature fermentation for the production of second-generation ethanol is the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass, an alternative that is less costly and more efficient than separate hydrolysis and fermentation (Choudhary, Singh and Nain 2016).

Thermotolerance is not a common trait of *S. cerevisiae* strains. At high temperatures, the cytoplasmic membrane of these yeasts becomes disorganized, which results in lower tolerance to ethanol and, consequently, lower ethanol yields (Choudhary *et al.* 2018). There are numerous studies the seletion of or isolation of thermotolerant strains for ethanol production, including strains of *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis* (Talukder *et al.* 2016), *S. cerevisiae* (Auesukaree *et al.* 2012; Tavaria *et al.* 2013) and *Kluyveromyces marxianus* (Kiran Sree *et al.* 2000; Limtong, Sringiew and Yongmanitchai 2007; Arora *et al.* 2017). However, most studies found that the isolates had unsatisfactory characteristics compared with those of industrial *Saccharomyces* strains, showing either low yield or low recycling viability.

Although thermotolerance is not intrinsic to *S. cerevisiae*, this trait can be developed under evolutionary pressure. Evolutionary engineering, also known as adaptive engineering, is a strategy that allows inducing specific phenotypic changes through random mutations under selective pressure, creating mutants that differ from their parental strains (Turanlı-Yıldız *et al.* 2017). This technique has been used with success to induce thermotolerance in *S. cerevisiae* (Çakar *et al.* 2005; Caspeta *et al.* 2014). However, most studies conducted so far have been centered on elucidating the random mutations associated with thermotolerance and their metabolic implications in laboratory strains (Çakar *et al.* 2012). Few studies have focused on well-established industrial strains that are used in biorefineries (Yi *et al.* 2018).

The aim of this study was to apply evolutionary engineering to develop thermotolerant *S. cerevisiae* strains from two Brazilian industrial strains used for second-generation ethanol production and evaluate the kinetic and physiological parameters of selected strains.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Yeast strains and culture medium

Two Brazilian industrial strains of *S. cerevisiae* were subjected to evolutionary engineering, Pedra-2 (PE-2; isolated from the Pedra Plant) and Santa Adélia-1 (SA-1; isolated from the Santa Adélia Plant) (Basso *et al.* 2008). The thermotolerant industrial strain AZJ001, kindly provided by Professor Anderson (Federal University of São Carlos, UFSCAR, SP, Brazil), was used as a positive reference. The diploid strain CEN.PK122 was used as a negative control. YPD medium containing 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone and 2% (w/v) dextrose was used to grow cells and as a negative control in fermentation assays.

3.2.2 Evolutionary engineering

Adaptive evolution was conducted separately for each strain following the steps described by Alkım, Turanlı-yıldız and Çakar (2014): spontaneous mutagenesis, batch selection, random selection of individuals from the final population of mutants and thermotolerance testing. Consecutive batch cultures were grown for 24 h in 100 mL Schott flasks filled to 80% of the total volume. After each Cycle (24 h) a sample of each strain was analyzed under the microscope to evaluate the behavior of the cultures, while cell growth was evaluated by optical density at 600 nm (OD₆₀₀). After 100 generations, parallel tests were performed on the strains, increasing the fermentation temperature by 2° C. Assays with stable cell growth (OD600 <2.8)

for 3 days were considered to be able to continue the evolutionary process at the new temperature.

3.2.3 Selection of individuals from the final mutant population

The final population of each strain was pooled, serially diluted and plated at 200 colonies per plate. Ten YPD plates (2% agar) were prepared and incubated at 40 °C, totaling 2000 colonies for each strain. Large and fast-growing colonies were selected (84 colonies), transferred to a 96-well plate and incubated for 24 h. Twelve randomly distributed wells (to avoid position effects) received the addition of the controls: 3 wells were filled with YPD medium (blank), 3 with the thermotolerant strain AZJ001 (positive control), 3 with the diploid laboratory strain CEN.PK122 (negative control) and 3 with the corresponding parental strain. Inocula were stamped onto two Petri dishes (150 × 15 mm) containing YPD agar using a Boekel microplate replicator. One plate was incubated at 40 °C and the other at 30 °C for 24 hor. Plates were photographed, and ImageJ was used to calculate the number of pixels of each colony to determine which had the best growth at 40 °C. The experiment was performed separately for each strain, in duplicate.

3.2.4 Kinetic evaluation of evolved strains

The kinetic parameters of evolved strains were evaluated under semi-anaerobic conditions against that of parent strains. YPD medium was supplemented with glucose concentrations of 20 g L⁻¹ or 60 g L⁻¹. Fermentation was carried out at 30 °C or 40 °C under constant agitation (200 rpm). Kinetic parameters (specific growth rate, ethanol yield and productivity) were calculated according to Stanbury, Whitaker and Hall (2016).

3.2.5 Determination of cell concentration and metabolite production

Cell growth was measured as optical density (OD₆₀₀) and converted to dry weight using a standard curve. Glucose, ethanol and other metabolites (glycerol and acetic acid) were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a refractive index (IR) detector. A HyperREZ XP Organic Acids 100×7.7 mm column was used at 35 °C with a flow rate of 0.6 µL min⁻¹. Chromoquest software was used to integrate and quantify results with a limit of quantification of 0.05 to 10 g.L⁻¹.

3.2.6 Determination of intracellular trehalose accumulation

Intracellular trehalose was determined using the modified anthrone method (Benjaphokee et al., 2012). Cells in the log phase were resuspended in 400 μ L of 0.5 M trichloroacetic acid and mixed at room temperature for 40 min in an ultrasonic bath. The crude extract was separated by centrifugation at 18 000 × *g* for 2 min. Aliquots (200 μ L) were mixed with 1 mL of cold anthrone reagent and incubated for 10 min at 100 °C. Absorbance was read at 620 nm.

3.2.7 Statistical treatment of experimental quantitative data

All fermentations and experimental analyzes were performed in duplicates. The Sisvar software version 5.6 was used to perform the ANOVA and the mean comparison test (Turkey test) with confidence interval of 95%.

3.3 Results

3.3.1 Evolutionary engineering

Although evolutionary engineering of the two strains was carried out simultaneously, SA-1 was passaged for 156 days and PE-2 for 183 days (Figs. 3 and 4, respectively). This difference was a function of the better response in the evolution of the SA-1 strain compared to the PE-2 strain that required a longer adaptation period at the initial temperature.

At the end of the evolutionary process, SA-1 and PE-2 mutants exhibited stable growth at 40 °C, showing a clear increase in thermotolerance.



Figure 2. Follow-up of the evolution profile of the strain PE-2, in relation to growth at high temperature – Thermotolerance at 38 and 40° C
Capítulo 3 – Artigo1.



Figure 3. Follow-up of the evolution profile of the strain SA-1, in relation to growth at high temperature – Thermotolerance at 38 °C and 40 °C

3.3.2 Selection of thermotolerant mutants

Selection of thermotolerant mutants involved two steps. First, 2000 colonies of each strain were qualitatively evaluated for growth. Then, the 84 best performing colonies were reevaluated and compared with controls in a semi-quantitative procedure using ImageJ (Fig. 5). It was observed that the strains at 30 °C presented saturated growth in all individuals, while at 40 °C there was a diverse growth between the individuals analyzed



Figure 4. Screening of thermotolerant mutants - Evaluation of colony size and comparison of growth at reference temperature (30 $^{\circ}$ C) and at 40 $^{\circ}$ C. Images treated with the Image J software for the quantification of the colony size. Cell growth of strain SA-1 at 30 $^{\circ}$ C (a) and 40 $^{\circ}$ C (b) and strain PE-2 at 30 $^{\circ}$ C (c) and 40 $^{\circ}$ C (d).

All colonies were grown at 40 °C. A frequency distribution graph of colony size (in pixels) was generated (Fig. 6). Both strains showed a normal distribution of colony size; i.e. the majority of colonies exhibited intermediate growth, and a low percentage of the population exhibited poor or excellent growth. SA-1 showed better growth than PE-2: the mean colony size of SA-1 was 0.2583 pixels, and the mean colony size of PE-2 was 25% lower than that of SA-1. However, these results concern SA-1 and PE-2 populations. Results of individual colonies are discussed below.



Figure 5. Frequency distribution of colonies size of the evolved strains - Evaluation of the individual evolutionary profile of the population of each strain and among the strains.

The colony size of SA-1 mutants and controls is shown in Fig. 6. Notably, the colony size of three mutants, 21, 28 and 43, did not differ statistically from that of the positive control (4, strain AZJ001), and the colony size of one mutant, 36, was 13% and 63% greater than that of the positive control and the parental strain, respectively. Thus, colony 36 was chosen as the thermotolerant representative of the SA-1 strain and is hereafter referred to as SA-1E.

Capítulo 3 – Artigo1.



Figure 6. Colony size of SA-1 mutants and controls. Blank (1); CEN.PK122 (2); SA-1 (3); AZJ001 (4)

Although the mean colony size of PE-2 was smaller than that of SA-1, the evolution of the PE-2 strain (Fig. 7) also resulted in a thermotolerant representative, colony 13, hereafter referred to as PE-2E. The colony size of PE-2E did not differ from that of the positive control but was 61% higher than that of the parental strain.



Figure 7. Colony size of PE-2 mutants and controls. Blank (1); CEN.PK122 (2); PE-2 (3); AZJ001 (4)

3.3.3 Cell growth of thermotolerant mutant colonies in liquid medium

For validation purposes, we evaluated the cell growth of thermotolerant colonies and controls in liquid medium at the reference temperature (30 °C) and at the target temperature (40 °C) (Fig. 8). All strains, regardless of being thermotolerant or not, exhibited the same cell growth profile at 30 °C, whereas, at 40 °C, two distinct curve profiles were observed. SA-1E, PE-2E and the positive control had the highest growth rates (μ_{max}), 0.532, 0.530 and 0.560 h⁻¹, respectively. The negative control and the parental strains, SA-1 and PE-2, exhibited similar growth profiles, with μ_{max} of 0.39, 0.49 and 0.31 h⁻¹, respectively.



Figure 8. Evaluation of cell growth in liquid medium of the evolved, parental and control strains at (a) 30 °C and (b) 40 °C.

3.3.4 Kinetic profile and physiological parameters of thermotolerant strains

The cell growth and ethanol production of SA-1, SA-1E, PE-2 and PE-2E were evaluated at 40 °C using two substrate concentrations, 20 and 60 g L⁻¹. In 20 g L⁻¹ glucose (Fig. 9), the cell growth of PE-2E did not differ significantly from that of the positive control nor from that of the parental strain. However, PE-2 exhibited a longer adaptation period (lag phase) than PE-2E. SA-1 showed the lowest ethanol yield (0.324 g g⁻¹), and ethanol production did not differ between thermotolerant strains (Table 1).

Productivity was the parameter that differed the most among yeast populations, as all strains were able to synthesize ethanol at 40 °C but at different rates. Thermotolerant strains completely converted glucose into ethanol in 10 h, whereas parental strains required 12 h to do the same. SA-1E and PE-2E had a productivity of 2.624 g L h⁻¹ and 2.562 g L h⁻¹, respectively, which was 23% and 24% higher than that of the parental strains, respectively.



Figure 9. Kinetic profile of (a) cell growth and (b) ethanol production at 40 $^{\circ}$ C in synthetic medium containing 20 g.L⁻¹ glucose.



Figure 9. Kinetic profile of (a) cell growth and (b) ethanol production at 40 $^{\circ}$ C in synthetic medium containing 60 g.L⁻¹ glucose.

Table 1	. Kinetic parameter	rs of cell	growth an	d ethanol	l production	of the evolve	d (thermotole	rant), parental	l and	control
strains.										

Stains	Specific Growth Rate (h ⁻¹)		Ethanol Yield (g.g ⁻¹)			$\Pr(\mathbf{g}.\mathbf{L}\mathbf{h}^{-1})$			
	30°C	40° C		30° C	40	° C	30° C	40° (C
	(20g.L ⁻¹)	(20g.L ⁻¹)	(60g.L ⁻¹)	(20g.L ⁻¹)	(20g.L ⁻¹)	(60g.L ⁻¹)	(20g.L ⁻¹)	(20g.L ⁻¹)	(60g.L ⁻¹)
AZJ001	0.4930 aA	0.5772 aB	0.5042 aC	0.359 aA	0.434 aB	0.453 aC	0.646 aA	0.851 abB	2.608 aC
SA-1E	0.4945 aA	0.5741 aB	0.4924 abA	0.399 bA	0.443 abB	0.438 bB	0.718 bA	0.842 abB	2.624 aC
SA-1	0.4428 bA	0.5310 bB	0.4529 cA	0.389 bA	0.324 bB	0.401 cC	0.699 bA	0.626 cB	2.025 bC
PE-2E	0.4300 bA	0.5918 cB	0.5216 dC	0.395 bA	0.440 bB	0.428 dC	0.712 bA	0.882 bB	2.562 aC
PE-2	0.5163 cA	0.4741 dB	0.4916 bC	0.483 cA	0.417 cB	0.410 B	0.646 aA	0.822 dB	1.958 bC

*Prp - ethanol productivity; *Numbers accompanied by lowercase letters in the same column do not differ significantly, while the numbers followed by uppercase letters on the same line do not differ significantly, both cases being (p > 0.05) significance level (Tukey test).

3.3.5 Trehalose accumulation in response to thermal stress

In general, trehalose accumulation was higher in parental strains than in evolved strains. In addition, accumulation was about 50% higher at 40 $^{\circ}$ C than at 30 $^{\circ}$ C.

Strain	Trehalose (mg mL $^{-1}$)				
	30 °C	40 °C			
AZJ001	0.034 (±0.001) aA	0.040 (±0.001) aB			
SA-1E	0.016 (±0.001) bA	0.026 (±0.001) bB			
SA-1	0.022 (±0.001) cA	0.036 (±0.001) cB			
PE-2E	0.019 (±0.001) dA	0.036 (±0.001) cB			
PE-2	0.035 (±0.002) aA	0.061 (±0.001) dB			

Table 2. Trehalose accumulation in Saccharomyces cerevisiae strains.

*Numbers accompanied by lowercase letters in the same column do not differ significantly, while the numbers followed by uppercase letters on the same line do not differ significantly, both cases being (p > 0.05) significance level (Tukey test).

3.4 Discussion

The process of evolutionary engineering adopted in this study was time consuming and costly, which are expected characteristics because the method simulates a natural process that occurs over several yeast generations. An alternative to optimize this process is the use of chemical or physical mutagens. Yi et al. (2018) analyzed the effects of UV radiation and diethyl sulfate (DES) as mutagens on multiple-stress tolerance in *S. cerevisiae*. Various negative mutations occurred under DES treatment. Thus, the use of mutagens might not be favorable, considering the additional costs with reagents, handling and residue disposal as well as the uncertainty of achieving the specific mutations desired. Therefore, mutagens were not used in this work.

We were not able to identify colonies carrying a specific mutation associated with thermotolerance for either of the *S. cerevisiae* strains (Figs. 6 and 7); i.e. an expressive increase in cell growth was not obtained and maintained in subsequent passages. Instead, small improvements in cell growth were observed throughout cycles until an optimal plateau was reached in relation to the reference temperature (30 °C). These results suggest the occurrence of adaptations or mutations, although they were not evident. Thus, although selective pressure favored individuals that exhibited thermotolerance, the mutation was not expressive in the

population. Isolation of the most thermotolerant individuals in the final population was necessary.

Population diversity is a common feature in the evolutionary process. It was observed in our study and in other works on evolutionary engineering (Çakar *et al.* 2005; Baselga *et al.* 2017; Turanlı-Yıldız *et al.* 2017). Heterogeneity might be associated with asynchronous growth in individual colonies (Çakar *et al.* 2012). Whereas on the one hand, this factor hinders the observance of positive mutations, on the other hand, it is a driving force that promotes genetic heterogeneity and allows for phenotypic changes of interest. Thus, we emphasize the importance of isolating positive mutants from the final population in order to obtain the most evolved individuals.

In general, the increase in temperature favored the specific growth rate (μ_{max}) and ethanol yield of thermotolerant strains but had the opposite effect on the growth rate and ethanol yield of parental strains, which showed a longer lag phase. The increase in glucose concentration slowed the growth of all strains. According to Talukder et al. (2016), at high temperatures, metabolic and fermentative activities are favored by the greater availability of energy until saturation is reached, after which a decline in these activities is observed. Because parental strains were not adapted to high temperatures, they required a longer adaptation period for the production of metabolites that confer resistance to thermal stress. Long reaction times and high substrate concentrations negatively affect the yield and productivity of strains.

Edgardo et al. (2008) used thermotolerant *S. cerevisiae* strains for the conversion of glucose to ethanol at 40 °C and obtained yields of 50–80% of the theoretical yield. In the present study, PE-2E and SA-1E achieved yields of 86.2% and 86.9% of the theoretical yield, respectively.

Accumulation of intracellular trehalose is one of the response mechanisms to thermal stress (Erdei *et al.* 2011; Caspeta *et al.* 2014; Kitichantaropas *et al.* 2016). According to Saini *et al.* (2018) trehalose accumulation in *S. cerevisiae* correlates strongly with the induction of stress tolerance factors and is an important marker for heat resistance in yeasts. Trehalose accumulation was higher in all strains at 40 °C than at 30 °C. However, PE-2E and SA-1E had lower trehalose levels than their parental strains at 30 and 40 °C. Nwaka *et al.* (1994) suggested that increased production of trehalose is an initial response to thermal stress and that better adapted individuals have other response mechanisms.

3.5 Conclusions

The results showed that mutagen-free evolutionary engineering methods can be used for the evolution of diploid industrial *S. cerevisiae* strains, as has been carried out for haploid laboratory strains. SA-1E and PE-2E exhibited high specific growth rates (0.5741 and 0.5918 h^{-1}) and high ethanol yields (0.44 g g⁻¹) at 40 °C. The evolved strains showed potential for high-temperature fermentation processes.

3.6 Acknowledgments

This work was supported in part by FAPESP [grantsn. 04602-3/2016; 20630-4/2015]. This study was financed in part by CAPES finance code 001.

3.7 References

- Alkım C, Turanlı-yıldız B, Çakar ZP. Yeast Metabolic Engineering. 2014;**1152**, DOI: 10.1007/978-1-4939-0563-8.
- Arora R, Behera S, Sharma NK *et al.* Augmentation of ethanol production through statistically designed growth and fermentation medium using novel thermotolerant yeast isolates. *Renew Energy* 2017;**109**:406–21.
- Auesukaree C, Koedrith P, Saenpayavai P et al. Characterization and gene expression profiles of thermotolerant Saccharomyces cerevisiae isolates from Thai fruits. J Biosci Bioeng 2012;114:144–9.
- Baselga I, Zafra O, Pérez Lago E *et al.* An AFLP based method for the detection and identification of indigenous yeast in complex must samples without a microbiological culture. *Int J Food Microbiol* 2017;**241**:89–97.
- Basso LC, De Amorim H V., De Oliveira AJ *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 2008;**8**:1155–63.
- Çakar ZP, Seker UOS, Tamerler C *et al.* Evolutionary engineering of multiple-stress resistant Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res* 2005;**5**:569–78.
- Çakar ZP, Turanli-Yildiz B, Alkim C *et al.* Evolutionary engineering of Saccharomyces cerevisiae for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Res* 2012;**12**:171– 82.
- Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P *et al.* Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science* (80-) 2014;**346**:75–8.
- Choudhary J, Singh S, Nain L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous

saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electron J Biotechnol* 2016;**21**:82–92.

- Choudhary J, Singh S, Sharma A *et al.* Complementary effect of thermotolerant yeast and cold active cellulase on simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production from rice straw. *J Renew Sustain Energy* 2018;10, DOI: 10.1063/1.5043322.
- Edgardo A, Carolina P, Manuel R *et al.* Selection of thermotolerant yeast strains Saccharomyces cerevisiae for bioethanol production. *Enzyme Microb Technol* 2008;**43**:120–3.
- Erdei É, Molnár M, Gyémánt G *et al.* Bioresource Technology Trehalose overproduction affects the stress tolerance of Kluyveromyces marxianus ambiguously. *Bioresour Technol* 2011;**102**:7232–5.
- Kiran Sree N, Sridhar M, Suresh K *et al.* Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating Saccharomyces cerevisiae for ethanol production. *Bioresour Technol* 2000;**72**:43–6.
- Kitichantaropas Y, Boonchird C, Sugiyama M *et al.* Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in Saccharomyces cerevisiae strains with potential use in high temperature ethanol fermentation. *AMB Express* 2016, DOI: 10.1186/s13568-016-0285-x.
- Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated Kluyveromyces marxianus. *Bioresour Technol* 2007;**98**:3367–74.
- Madeira-Jr JV, Gombert AK. Towards high-temperature fuel ethanol production using Kluyveromyces marxianus: On the search for plug-in strains for the Brazilian sugarcanebased biorefinery. *Biomass and Bioenergy* 2018;119:217–28.
- Nwaka S, Kopp M, Burget M *et al.* Is thermotolerance of yeast dependet on trehalose accumalation. *FEBS Lett* 1994;**344**:225–8.
- Reis VCB, Nicola AM, De Souza Oliveira Neto O *et al.* Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of Saccharomyces cerevisiae JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2012;**39**:1673–83.
- Saini P, Beniwal A, Kokkiligadda A *et al.* Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochem* 2018;**72**:1–12.
- Santos CI, Silva CC, Mussatto SI *et al.* Integrated 1st and 2nd generation sugarcane bio-refinery for jet fuel production in Brazil: Techno-economic and greenhouse gas emissions assessment. *Renew Energy* 2017, DOI: 10.1016/j.renene.2017.05.011.
- Talukder AA, Easmin F, Mahmud SA et al. Thermotolerant yeasts capable of producing

bioethanol: isolation from natural fermented sources, identification and characterization. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2016;**30**:1106–14.

- Tavaria FK, Costa EM, Gens EJ *et al.* Influence of abiotic factors on the antimicrobial activity of chitosan. *J Dermatol* 2013;**40**:1014–9.
- Turanlı-Yıldız B, Benbadis L, Alkım C *et al.* In vivo evolutionary engineering for ethanoltolerance of Saccharomyces cerevisiae haploid cells triggers diploidization. *J Biosci Bioeng* 2017;**124**:309–18.
- Yi S, Zhang X, Li H xin *et al.* Screening and Mutation of Saccharomyces cerevisiae UV-20 with a High Yield of Second Generation Bioethanol and High Tolerance of Temperature, Glucose and Ethanol. *Indian J Microbiol* 2018;**58**:440–7.

CAPITULO 4 – ARTIGO 2. HETEROLOGOUS EXPRESSION OF ENDOGLUCANASE AND B-GLUCOSIDASE IN INDUSTRIAL STRAINS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE BY CRISPR/CAS9 GENOME EDITING FOR SACCHARIFICATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS

Allan Henrique Felix de Melo¹, Gleidson Silva Teixeira¹, Rosana Goldbeck^{1*}

¹Bioprocess and Metabolic Engineering Laboratory, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author: Rosana Goldbeck, e-mail: goldbeck@unicamp.br, Phone: +55 19 35214038, Fax +55 19 35214025, Monteiro Lobato n. 80, Cidade Universitária, Campinas, São Paulo, ZIP Code: 13083-862, Brazil.

Artigo a ser submetido para o periódico Bioresource Technology, 2019

ABSTRACT

The high cost of lignocellulosic ethanol production is majorly credited to the process of saccharification because of the complexity of the enzymatic reactions involved and the occurrence of feedback inhibition. To optimize the process and reduce enzyme inhibition, we used CRISPR/Cas9 genome editing and multi-copy episomal plasmid transfection for heterologous expression of endoglucanase (As*ENDO*) and β -glucosidase (As*BGL*) genes isolated from *Acremonium strictum* in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The transformation efficiency ranged from 20 to 100%, and the maximum endoglucanase and β -glucosidase activities were 8.05 U mL⁻¹ and 17.68 U L⁻¹, respectively. CRISPR/Cas9-edited strains showed a 3-fold higher β -glucosidase activity compared with plasmid-transformed strains. Simultaneous saccharification and fermentation of microcrystalline cellulose and sugarcane bagasse by AGY005 resulted in ethanol yields of 47.53 g L⁻¹ and 9.73 g L⁻¹, respectively, demonstrating that the transformed *S. cerevisiae* strain shows potential for lignocellulosic ethanol production under optimized conditions.

4.1. Introduction

Production of ethanol from lignocellulosic biomass is considered the most promising strategy to minimize the emerging crisis of fossil fuels without impacting other market sectors, such as the food industry (NAKANISHI et al., 2017). However, current technology is still expensive, mainly because of the high enzyme loadings necessary to convert biomass into fermentable sugars (MOU et al., 2018; WI et al., 2015).

Synergistic activity between endoglucanases, cellobiohydrolases, and β -glucosidases is necessary to hydrolyze the crystalline structure of cellulose the major component of lignocellulosic biomass into fermentable sugars (MO et al., 2015). However, accumulation of glucose and its intermediates (cellooligosaccharides) in the reaction medium results in feedback inhibition; that is, the products affect the rate of the hydrolysis reaction (DE ARAUJO GUILHERME et al., 2019).

Optimized processes have been developed to mitigate this problem, such as simultaneous saccharification and fermentation (SSF), which differs from separate hydrolysis and fermentation (SHF). In SSF, glucose is released and readily converted into ethanol, without accumulating in the reaction medium (ZHANG et al., 2019). Other advantages of SSF include the low initial investment, as the process configuration is simpler and less costly than that of SHF, and the inhibition of contaminating microorganisms by ethanol, affording higher yields (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2017).

However, because cellulose saccharification depends on the action of cellulases in various steps, low levels of one or more enzymes might lead to accumulation of harmful metabolites (BERLIN et al., 2005). Several authors report the lack of cellulases, particularly β -glucosidase, which hydrolyzes cellobiose into glucose molecules, in commercial enzyme cocktails (SINGHANIA et al., 2017; WANG et al., 2016; WICKRAMASINGHE et al., 2017; YANG et al., 2015).

Saccharomyces cerevisiae is the most used microorganism for industrial ethanol production because of its robustness and ability to afford high ethanol yields, even under high levels of end products and fermentation inhibitors from lignocellulosic biomass (WI et al., 2015). It does not, however, have the ability to produce cellulases. Various filamentous fungi produce cellulases but do not have the robustness of the ethanologenic *S. cerevisiae* (TROLLOPE; NEL; VOLSCHENK, 2018). Thus, heterologous expression of cellulase genes

in *S. cerevisiae* has been suggested as an alternative to reduce saccharification costs (FENG et al., 2016; LIAN et al., 2018; TANG et al., 2013; YANG, ZHANG; JIANG, 2016).

Many studies use haploid laboratory strains; however, industrial strains are usually diploid or polyploid and thus have higher editing complexity (HOU et al., 2013). CRISPR/Cas9 genome editing methods allow the introduction of heterologous DNA with high precision and efficiency, making it possible to edit wild-type yeasts (CEASAR et al., 2016). High expression of exogenous genes can also be achieved using episomal plasmids, but auxotrophic mutations are necessary to guarantee that plasmids will remain in the host cell (KUIVANEN et al., 2018).

This study aimed to (i) express the endoglucanase (As*ENDO*) and β -glucosidase (As*BGL*) genes from *Acremonium strictum* in industrial diploid strains of *S. cerevisiae* using the CRISPR/Cas9 system and plasmid DNA, (ii) compare the efficiency of genome editing and plasmid transfection, and (iii) use the transformed strains for saccharification of lignocellulosic biomass under different conditions.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Strains and culture media

The industrial *S. cerevisiae* strains used in this study were Pedra-2 (PE-2) and Santa Adélia-1 (SA-1), isolated from the Pedra Plant and the Santa Adélia Plant in Brazil (BASSO et al., 2008). A haploid laboratory strain (CEN.PK113-5D) and two thermotolerant strains derived from SA-1 and PE-2 (SA-1E and PE-2E, respectively) were also used. Yeasts were cultured at 30 °C in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) and stored at -80 °C in 15% glycerol. Endoglucanase (As*ENDO*) and β-glucosidase (As*BGL*) genes were extracted from the fungus *A. strictum*, separately cloned into an expression cassette, and subsequently ligated (As*ENDO*-As*BGL*) into plasmid pRS426. These procedures were part of a Master's project (PROCÓPIO, 2017).

4.2.2. Yeast transformation

Insertion of the As*ENDO*-As*BGL* expression cassette was performed using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method, as described by (GIETZ; SCHIESTL, 2007). The plasmid pTEF1p-Cas9-CyC1t_KanMX (p_Cas9), which confers resistance to geneticin (KanMX), was used for the expression of the Cas9 enzyme, and the episomal plasmid pSNR52p-gRNA.GOI-SUP4t_natMX (p_gRNA) with a marker for nourseothricin resistance (natMX) was used for

the expression of guide RNA. In the CRISPR/Cas9 method, transformed cells were plated in YPDA (YPD plus 2% agar) and incubated at 30 °C overnight. Then, cells were stamped onto a YPDG plate (YPD plus 200 μ g mL⁻¹ geneticin G418). Plates were incubated at 30 °C until colony growth was apparent. The CRISPR/Cas9-based method was used to delete the *URA3* gene, creating auxotrophic (*URA3⁻*) strains. For episomal plasmid transfection, cells were plated directly onto minimal medium (MM) plates containing 0.67% yeast nitrogen base (YNB), 2% agar, 2% glucose, and no uracil. Plates were incubated at 30 °C until colonies were visible. The editing efficiency was calculated as the ratio of positive transformants to the total number of colonies and expressed as percentage.

4.2.3 Extraction of genomic DNA, polymerase chain reaction (PCR), and confirmation of AsENDO-AsBGL-positive transformants

CRISPR/Cas9 editing efficiency was confirmed by extracting genomic DNA (gDNA) from colonies that grew in YPDG medium, according to the protocol of Harju; Fedosyuk; Kenneth, (2004). gDNA was amplified by PCR in a final volume of 25 µL containing 10 mM dNTP, 10 μ M each primer (forward and reverse), 0.5 U of Phusion high-fidelity DNA polymerase, 10× Phusion HF buffer, 280 ng of DNA, and Milli-Q water. The reaction was incubated in a Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler and submitted to initial denaturation at 98 °C for 1 min; 35 cycles of 98 °C for 20 s, 48 °C for 20 s, and 72 °C for 6 min; final extension of 72 °C for 10 min; and cooling to 4 °C. Samples were stored at -20 °C. The primers used in this study are described in Table 1. First, the inserted fragment was amplified with primers internal and external to the target construct. After amplification, samples were submitted to 1% agarose gel electrophoresis in 1× TAE buffer (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA) containing SYBR Safe DNA gel stain (10,000×). PCR products (5 μ L) and loading buffer (2 μ L) were loaded in the wells of the gel and electrophoresed at 90 V for approximately 1 h. Confirmation of episomal plasmidtransfected transformants was performed by analyzing growth in selective media. First, URA3 deletion was confirmed by absence of growth in MM without uracil and growth in YPD medium. After insertion of the AsENDO-AsBGL expression cassette and URA3 gene, the positive transformants were selected by growth in uracil-deficient MM.

Code	Primer	Sequence $(5' \rightarrow 3')$	Figure
1	FMO_11	GCTGAAATATACGGGTTCCC	Fig. 2b
2	G1_Seq_R	TGGGGTGATGTTAGTCCATTC	Fig. 2a
3	G2_Seq_F2	GCAAACGCCAACGAAAAC	Fig. 2b
4	PBO_009	GCTATTTTATAAGATTCAGG	Fig. 1
5	PBO_010	ACCAAATATAAAGTGAGATG	Figs. 1 and 2a

Table 1. Primers used in this study.

4.2.4 Determination of cellulolytic activity

Fermentation reactions were carried out to determine the cellulolytic activity of transformed strains using cellobiose as carbon source in MM. Samples were stirred at 200 rpm and 40 °C, and aliquots were collected at 0, 12, 24, 36, 48, 60, and 96 h. Endoglucanase activity was determined using a solution of 10 g L⁻¹ carboxymethylcellulose in 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.8 as substrate. A 1:1 substrate/enzyme mixture was incubated at 50 °C for 10 min, according to the method of Ogawa et al. (1982). Released sugars were quantified according to Miller (1959). A blank (1:1 substrate/distilled water) was used for each sample.

β-glucosidase activity was determined by the hydrolysis reaction of *p*-nitrophenyl-β-Dglucopyranoside (*p*NPG), according to Afolabi (1997). A solution of *p*NPG (1 mg mL⁻¹) in sodium acetate buffer (0.2 M) pH 5.2 was incubated with enzyme extract at 50 °C for 30 min. To stop the reaction, 2% sodium carbonate was added. Released *p*-nitrophenol was determined by measuring the absorbance at 405 nm. A standard curve was constructed using *p*-nitrophenol.

One unit of endoglucanase and β -glucosidase activity was defined as the amount of enzyme needed to release 1 µmol min⁻¹ of glucose and *p*-nitrophenol, respectively, from the substrate.

4.2.5 Kinetics of cellulose hydrolysis by a commercial enzyme preparation

The hydrolysis kinetics of cellulose by a commercial enzyme preparation was evaluated using two sources of cellulose as substrate: microcrystalline cellulose (Avicel) and sugarcane bagasse. An enzyme loading of 20 filter paper units (FPU) g^{-1} substrate was added to each substrate solution (10% w/v). Samples were taken at 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h. The concentration of fermentable sugars (glucose and cellobiose) was determined using high-

performance liquid chromatography (HPLC) with refractive index detection. A HyperREZ XP Organic Acids 100×7.7 mm column was used at 35 °C with a flow rate of 0.6 µL min⁻¹.

4.2.6 SSF, partial simultaneous saccharification and fermentation (SSFp), and SHF

SSF, SSFp, and SHF were performed at 40 °C in 100 mL Schott flasks filled up to 80% of the useful volume and adapted for nitrogen supply and CO2 release. Liquid MM and a vitamin and trace element solution (0.001%) was used for inoculum production and fermentation supplementation, as described by Verduyn et al. (1992). The medium and other constituents were sterilized using a 0.22 µm membrane filter for inoculum production. Fermentation was performed without sterilization. Avicel and sugarcane bagasse at 10% (w/v) in sodium citrate buffer pH 4.8 were used as cellulose sources. Sugarcane bagasse pre-treated with dilute sulfuric acid was kindly provided by the Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Campinas, Brazil. The inoculum was prepared in two steps with 2% glucose as carbon source. First, samples were inoculated under aerobic conditions at 30 °C and 200 rpm overnight. Then, samples were submitted to semi-anaerobic conditions (nitrogen bubbling for 5 min) for 5 h at an initial OD_{600} of 1.0 and under the same conditions of temperature and shaking. Cells were centrifuged at 3000 rpm for 5 min and washed with distilled water. All fermentation processes lasted 96 h. An enzyme loading of 20 FPU g^{-1} substrate was used in all experiments. For SSFp and SHF processes, 24 and 72 h of hydrolysis at 50 °C, respectively, was carried out prior to inoculation.

4.2.7 Statistical treatment of experimental quantitative data

All fermentations and experimental analyzes were performed in duplicates. The Sisvar software version 5.6 was used to perform the ANOVA and the mean comparison test (Turkey test) with confidence interval of 95%.

4.3 Results

4.3.1 Confirmation of CRISPR/Cas9 genome editing

PCR products of gDNA extracted from 20 transformants of the haploid strain CEN.PK113-5D using primers 4 and 5 of Table 1 were analyzed by agarose gel electrophoresis. Only one transformant showed a positive band for As*ENDO*-As*BGL*, which corresponds to an editing efficiency of 5%. The sample was subjected to a second electrophoretic run for confirmation

(Fig. 1). No band was observed in the negative control lane (data not shown), whereas the test sample showed the expected band at 6899 bp (Fig. 1, duplicate lanes 2 and 3), confirming that the As*ENDO*-As*BGL* expression cassette was successfully inserted into the genome of *S. cerevisiae* CEN.PK113-5D.



Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR product confirmed the insertion of the As*ENDO*-As*BGL* expression cassette into the genomic DNA of haploid *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-5D. Lane 1, 1 kb DNA ladder. Lanes 2 and 3, genomic DNA of the positive transformant (duplicate).

Fig. 2 shows the agarose gel of parental and thermotolerant industrial strains of *S. cerevisiae* that were positive for the integration of the As*ENDO*-As*BGL* expression cassette. We carried out the confirmation in two steps to avoid performing PCR of the entire edited region (about 7737 bp), as detailed in Section 2.3. The electrophoretic bands had the expected size, confirming the successful integration of the cassette into the *S. cerevisiae* genome. Editing efficiencies for SA-1, SA-1E, PE-2, and PE-2E were respectively 20%, 33%, 100%, and 100%.



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products confirmed the insertion of the As*ENDO*-As*BGL* expression cassette into the genomic DNA of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Lane 1, 1 kb DNA ladder. Lane 2, gDNA of SA-1E. Duplicate lanes 3 and 4, gDNA of SA-1. Lane 5, gDNA of PE-2E. Lane 6, gDNA of PE-2. (A) G1_Seq_R and PBO_010; (B) FMO_11 and G2_Seq_F2.

4.3.2. Confirmation of plasmid transfer

Transformation of *S. cerevisiae* strains with plasmid DNA was performed in two steps, one to induce auxotrophy and the other to integrate the plasmid carrying As*ENDO*-As*BGL*. The *URA3* gene deletion process (Fig. 3, stage 1) was confirmed by inoculating transformed cells in YPD and MM. *URA3⁻* transformants were able to grow in YPD but not in uracil-deficient MM. These cells were transfected with a plasmid containing the As*ENDO*-As*BGL* expression cassette and a *URA3* gene. Colonies that were able to grow in unsupplemented MM were considered positive transformants. The deletion efficiency of *URA3* was 42%, 40%, 20%, and 30% for SA-1E, SA-1, PE-2E, and PE-2, respectively. Plasmid transfection was 100% efficient for all strains.



Fig. 3. Confirmation of plasmid transfer. In stage 1, cells able to grow in YPD but not in YNB after deletion of the *URA3* gene were selected. In stage 2, cells able to grow in uracil-deficient YNB after integration of the plasmid containing As*ENDO*-As*BGL* and *URA3* were considered successfully transfected.

The transformants obtained by CRISPR/Cas9 genome editing or plasmid transfection were named as shown in Table 2.

Strain designation Parent strain		Modification		
AGY001	SA-1E	Insertion of AsENDO-AsBGL via CRISPR/Cas		
AGY002	SA-1E	URA3 deletion and transfection with a plasmid		
		carrying AsENDO-AsBGL and URA3		
AGY003	SA-1	Insertion of AsENDO-AsBGL via CRISPR/Cas9		
AGY004 SA-1		URA3 deletion and transfection with a plasmid		
		carrying AsENDO-AsBGL and URA3		
AGY005	PE-2E	Insertion of AsENDO-AsBGL via CRISPR/Cas9		
AGY006	PE-2E	URA3 deletion and transfection with a plasmid		
		carrying AsENDO-AsBGL and URA3		
AGY007	PE-2	Insertion of AsENDO-AsBGL via CRISPR/Cas9		
AGY008	PE-2	URA3 deletion and transfection with a plasmid		
		carrying AsENDO-AsBGL and URA3		
AGY009	CEN.PK113-5D	Insertion of AsENDO-AsBGL via CRISPR/Cas9		

Table 2. Nomenclature adopted for AsENDO-AsBGL-positive transformants ofSaccharomyces cerevisiae.

As *ENDO*-As *BGL*, expression cassette encoding endoglucanase and β -glucosidase genes from *Acremonium strictum*.

4.3.3 Determination of cellulolytic activity and cell growth of transformed industrial strains

All transformed industrial strains showed endoglucanase and β -glucosidase activity, which confirmed that AsENDO and AsBGL were successfully inserted and actively expressed. Strains transformed by the CRISPR/Cas9 method did not differ in their maximum β -glucosidase activity (17.68 ± 0.88 U L⁻¹), but two thermotolerant strains exhibited significant differences in endoglucanase activity, AGY001 and AGY005. The maximum endoglucanase activity was 8.05 ± 0.16 U mL⁻¹, obtained with AGY005 (Fig. 4). Strains reached the stationary growth phase after 12 h of fermentation, when glucose depletion occurred. The highest β -glucosidase activity was detected 12 h after the beginning of fermentation for all strains except AGY002. During the first hours (<12 h), most parent strains showed lower cellulolytic activity than thermotolerant strains. CRISPR/Cas9-edited strains exhibited a 3-fold higher β -glucosidase activity than strains transformed with episomal plasmids. AGY002 showed the highest β -glucosidase activity among plasmid-transfected strains. Therefore, AGY002 and AGY005 were chosen for further investigation of their cellulose hydrolysis profile and ethanol production capacity.





Fig. 4. Cellulolytic activity of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* transformed via CRISPR/Cas9 genome editing (A, C, E, and G) or plasmid transfection (B, D, F, and H). A, AGY001; B, AGY002; C, AGY003; D, AGY004; E, AGY005; F, AGY006; G, AGY007; and H, AGY008.

4.3.4 Evaluation of the hydrolysis of cellulosic substrates by a commercial enzyme preparation The hydrolysis kinetics of Avicel and pre-treated sugarcane bagasse by a commercial enzyme preparation is presented in Fig. 5. In both reactions, cellobiose accumulated in the reaction medium. When Avicel was used as substrate, the concentration of cellobiose reached a plateau after 12 h of reaction, whereas, in the hydrolysis of sugarcane bagasse, the concentration of cellobiose remained practically constant throughout the reaction. These data indicate that the hydrolysis reaction was inhibited and a different cellulolytic route would be required to increase glucose yield.



Fig. 5. Kinetics of the hydrolysis of two cellulosic substrates by a commercial enzyme preparation. A, Avicel (microcrystalline cellulose); B, sugarcane bagasse.

Aware of the importance of β -glucosidase supplementation in ethanol production from lignocellulosic materials, we chose the strains with the highest β -glucosidase activity and evaluated their performance in SSF, SSFp, and SHF using Avicel or sugarcane bagasse as substrate (Table 3).

Lignocellulosic ethanol production using AGY005 and Avicel afforded different results according to the method of fermentation; the highest ethanol yield was obtained by SSF (47.53 \pm 0.59 g L-1). With sugarcane bagasse as substrate, higher yield (9.73 \pm 0.51 g L-1) was obtained by the SSFp method, but it did not differ from those obtained by SSF and SHF. Ethanol production by SSF of Avicel by AGY002 did not differ significantly from that by SSFp. SHF resulted in the lowest yield (30.70 \pm 0.57 g L-1). When AGY002 was used to hydrolyze sugarcane bagasse, the three fermentation processes afforded similar results; the highest ethanol yield was 4.33 \pm 0.51 g.L⁻¹.

Table 3. Lignocellulosic ethanol production by AGY002 and AGY005 from Avicel (microcrystalline cellulose) or sugarcane bagasse by partial simultaneous saccharification and fermentation (SSFp), simultaneous saccharification and fermentation (SSF), or separate hydrolysis and fermentation (SHF).

	Method	AGY002	AGY005			
Substrate	Wiethou	Ethanol production $(g.L^{-1})$				
	SSFp	32.27 ± 0.94 aA	39.95 ± 0.36 aB			
Avicel	SSF	32.50 ± 0.68 aA	$47.53 \pm 0.59 \text{ bB}$			
	SHF	30.70 ± 0.57 bA	36.52 ± 1.09 cB			
	SSFp	4.33 ± 0.51 aA	9.73 ± 0.51 aB			
Sugarcane	SSF	3.82 ± 1.41 aA	$9.40 \pm 0.47 \text{ aB}$			
Bagasse	SHF	4.14 ± 0.49 aA	$8.22 \pm 0.93 \text{ aB}$			

*Numbers accompanied by lowercase letters in the same column do not differ significantly, while the numbers followed by uppercase letters on the same line do not differ significantly, both cases being (p > 0.05) significance level (Tukey test).

4.4 Discussion

Although the focus of this study was the insertion of As*ENDO* and As*BGL* into industrial (diploid) strains of *S. cerevisiae*, gene integration into a haploid non-thermotolerant laboratory strain was investigated because it was expected to have higher chances of success. Genome editing induces double-stranded breaks in DNA, activating two primary repair mechanisms, non-homologous end joining and homology-directed repair (HDR), which operate independently and often competitively (PANDAY et al., 2017; SHAO et al., 2017). The greater the degree of homology between the ends of the expression cassette and the editing region of the yeast (HO locus), the greater the probability of HDR and heterologous integration. Each end of the As*ENDO*-As*BGL* expression cassette had only 40 homologous bp with the HO locus, but after integration into the haploid strain, a new fragment with 400 and 200 bp homologies was obtained in each end. The editing efficiency increased from 5% to 20% and then to 100% with the use of high-homology cassettes. This result underscores the relationship between homology and editing efficiency.

Transformation with episomal plasmid was 100% efficient. The greatest challenge was obtaining auxotrophic strains. These observations are in agreement with the results of Reis et al. (2012), who reported an efficiency of only 0.5% in the deletion of the *URA3* gene from the

genome of the industrial *S. cerevisiae* strain JP1. The authors attributed the low deletion efficiency to the diploid character of the strain. In this study, the deletion efficiency was higher (20–42%), probably as a result of the genome cutting efficiency of the Cas9-based method (LEE et al., 2017).

Most of the transformed strains reached maximum β -glucosidase production after 12 h of reaction, when glucose was depleted in the medium. Low glucose concentrations may induce As*BGL* expression, and high concentrations of this sugar may have the opposite effect. Huang et al. (2010) noted that glucose may act either as a promoter or as a suppressor of the expression of heterologous cellulases in *S. cerevisiae* depending on the availability of other carbon sources. Procópio (2017) observed that a minimum concentration of glucose is required to initiate the expression of cellulolytic enzymes in *S. cerevisiae*.

Interestingly, all transformed strains had higher endoglucanase activity and CRISPR/Cas9-edited strains had higher β -glucosidase activity than *A. strictum* grown by Goldbeck *et al.* (2013) in an optimized medium containing molasses (endoglucanase activity of 0.179 U mL⁻¹ and β -glucosidase activity of 13.21 U L⁻¹).

No significant differences were observed between the cellulolytic activities of thermotolerant and parent strains. This result is in contrast with the findings of Saini et al. (2018), who concluded that thermal stress stimulates the production of protective metabolites, such as glycerol and trehalose, in wild-type strains, resulting in metabolic overload and reduced ethanol yield.

Strains transformed by the CRISPR/Cas9 method showed higher overall endoglucanase and β -glucosidase activity than those transfected with multi-copy episomal plasmid. According to ZHANG; MOO-YOUNG; CHISTI, (1996), one of the major disadvantages of plasmid transformation is its unstable expression over time, as plasmids are inefficiently replicated and may not be passed from parent to daughter cells.

Enzymatic saccharification is highly complex because of its various reaction steps and inhibition mechanisms. An example of this complexity is given by the kinetic study of cellulose hydrolysis. It is possible to observe in Fig. 5a that cellobiose was hydrolyzed to glucose during the first 12 h of reaction. When a certain level of glucose accumulated in the medium, β -glucosidase was inhibited and cellooligosaccharide degradation was impaired. According to Murphy et al. (2013), the increase in cellobiose as a result of β -glucosidase inhibition causes the inhibition of endoglucanase and cellobiohydrolase, leading to an almost complete halt in the hydrolysis reaction, which translates into low ethanol yield and productivity.

Trollope; Nel; Volschenk (2018) claimed that a strategy to avoid yield loss in enzymatic saccharification is the supplementation of the reaction medium with β -glucosidase. However, the authors also pointed that, although effective, this strategy greatly increases costs and may affect the economic viability of the process. Therefore, the best alternative is the heterologous expression of the enzyme in an ethanologenic microorganism.

In the hydrolysis of sugarcane bagasse (Fig. 5b), cellobiose accumulation occurred at the beginning of the reaction. The pre-treatment used to delignify the biomass prior to saccharification reduces the crystallinity of cellulose molecules, releasing saccharide chains of different lengths, which may explain the results (BATISTA et al., 2019; GU et al., 2019; PAZ et al., 2019).

The lowest ethanol production was obtained with SHF, showing how feedback inhibition by glucose accumulation negatively affects saccharification. DE ARAUJO GUILHERME et al. (2019) used PE-2 to produce ethanol from sugarcane bagasse (pretreated in dilute acid) by SSF and obtained ethanol yields of 4.94 ± 0.12 g 100 g⁻¹ bagasse. In our study, AGY005, derived from PE-2, afforded a 97% higher yield, which demonstrates that the transformed strain performed better than the wild-type yeast.

4.5 Conclusion

Heterologous expression of As*ENDO* and As*BGL* in *S. cerevisiae* by the CRISPR/Cas9 method resulted in better cellulolytic activity than by multi-copy plasmid transfection, demonstrating that genomic integration and sustained expression of the target genes over generations are more important attributes than the number of copies inserted into the host. Ethanol production by SSF and SSFp was more efficient than by conventional SHF. The AGY005 strain showed the highest endoglucanase and β -glucosidase activities and has great potential in lignocellulosic ethanol production.

4.6 acknowledgments

This work was supported in part by FAPESP [grantsn. 04602-3/2016; 20630-4/2015]. This study was financed in part by CAPES finance code 001.

4.7 References

AFOLABI, O. A. Wastepaper hydrolysate as substrate and inducer forcellulase production. M.S. Thesis, The University of Akron, Akron, OH. 1997.

BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008. BATISTA, G.; SOUZA, R. B. A.; PRATTO, B.; DOS SANTOS-ROCHA, M. S. R.; CRUZ, A. J. G. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 275, n. November 2018, p. 321–327, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.073>

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.;
OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER,
J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates
Evidence for the role of accessory enzymes. Enzyme and Microbial Technology, [s. 1.], v.
37, n. 2, p. 175–184, 2005.

CEASAR, S. A.; RAJAN, V.; PRYKHOZHIJ, S. V.; BERMAN, J. N.; IGNACIMUTHU, S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1863, n. 9, p. 2334–2344, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. 1.], v. 123, n. 3, p. 342–346, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.10.007

DE ARAUJO GUILHERME, A.; DANTAS, P. V. F.; PADILHA, C. E. de A.; DOS SANTOS, E. S.; DE MACEDO, G. R. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 234, n. December 2018, p. 44–51, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030147971831524X>

FENG, C.; ZOU, S.; LIU, C.; YANG, H. Ethanol production from acid- and alkali-pretreated corncob by endoglucanase and b -glucosidase co-expressing Saccharomyces cerevisiae subject to the expression of heterologous genes and nutrition added. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. 1.], 2016.

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. PROTOCOL High-efficiency yeast transformation using the

LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 31-34, 2007.

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain Acremonium strictum isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 128, p. 797–803, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.034

GU, B. J.; DHUMAL, G. S.; WOLCOTT, M. P.; GANJYAL, G. M. Disruption of lignocellulosic biomass along the length of the screws with different screw elements in a twinscrew extruder. **Bioresource Technology**, [s. 1.], v. 275, n. October 2018, p. 266–271, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.033>

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; KENNETH R, P. Rapid isolation of yeast genomic DNA : Bust n ' Grab Rapid isolation of yeast genomic DNA : Bust n ' Grab Corresponding author : **BMC Biotechnology**, [s. 1.], v. 4:8, p. 1–6, 2004.

HOU, L.; LI, X.; WANG, C.; CAO, X.; WANG, H. Construction of ploidy series of Saccharomyces cerevisiae by the plasmid YCplac33-GHK. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, [s. l.], v. 40, n. 3–4, p. 393–397, 2013.

HUANG, X. M.; YANG, Q.; LIU, Z. H.; FAN, J. X.; CHEN, X. L.; SONG, J. Z.; WANG, Y. Cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase gene egVIII from trichoderma viride in saccharomyces cerevisiae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 103–115, 2010.

KUIVANEN, J.; HOLMSTRÖM, S.; LEHTINEN, B.; PENTTILÄ, M.; JÄNTTI, J. A High-Throughput Workflow for CRISPR/Cas9 Mediated Combinatorial Promoter Replacements and Phenotype Characterization in Yeast. Biotechnology Journal, [s. 1.], v. 13, n. 9, p. 1–10, 2018. LEE, Y.; JIN, Y.; CHA, Y.; SEO, J. Bioresource Technology Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial Saccharomyces cerevisiae. Bioresource 1.], Technology, [s. v. 228, p. 355-361, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.042>

LIAN, J.; BAO, Z.; HU, S.; ZHAO, H. Engineered CRISPR/Cas9 system for multiplex genome engineering of polyploid industrial yeast strains. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 115, n. 6, p. 1630–1635, 2018.

MO, C.; CHEN, N.; LV, T.; DU, J.; TIAN, S. Direct ethanol production from steam-exploded corn stover using a synthetic diploid cellulase-displaying yeast consortium. **BioResources**, [s. 1.], v. 10, n. 3, p. 4460–4472, 2015.

MOU, H.; WU, S.; HE, M.; LIU, H.; HUANG, H.; XU, C. Study of the difference between

enzyme adsorption onto hydrotropic and alkali lignin separated from eucalyptus and bamboo. **BioResources**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1441–1456, 2018.

MURPHY, L.; BOHLIN, C.; BAUMANN, M. J.; OLSEN, S. N.; SØRENSEN, T. H.; ANDERSON, L.; BORCH, K.; WESTH, P. Product inhibition of five Hypocrea jecorina cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 163–169, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.01.002>

NAKANISHI, S. C.; SOARES, L. B.; BIAZI, L. E.; NASCIMENTO, V. M.; COSTA, A. C.; ROCHA, G. J. M.; IENCZAK, J. L. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by Spathaspora passalidarum and Scheffersomyces stipitis. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.

PANDAY, A.; XIAO, L. J.; GUPTA, A.; GROVE, A. Control of DNA end resection by yeast Hmo1p affects efficiency of DNA end-joining. **DNA Repair**, [s. l.], v. 53, p. 15–23, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.03.002

PAZ, A.; OUTEIRIÑO, D.; PÉREZ GUERRA, N.; DOMÍNGUEZ, J. M. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. Bioresource Technology, [s. l.], v. 275,
n. November 2018, p. 402–409, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.082

PROCOPIO, D. P. Estudo da expressão heteróloga de celulases de *acremonium strictum* em linhagens de *saccharomyces cerevisiae* visando a produção de bioetanol de segunda geração. Campinas, 2017.

SAINI, P.; BENIWAL, A.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. **Process Biochemistry**, [s. 1.], v. 72, n. July, p. 1–12, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.001

SHAO, S.; REN, C.; LIU, Z.; BAI, Y.; CHEN, Z.; WEI, Z.; WANG, X.; ZHANG, Z.; XU, K. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing Saccharomyces cerevisiae Rad52. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. 1.], v. 92, n. January, p. 43–52, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.012>

SINGHANIA, R.; PATEL, A.; PANDEY, A.; GANANSOUNOU, E. Genetic modification : A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, p. 1352–1361, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.126>

TANG, H.; HOU, J.; SHEN, Y.; XU, L.; YANG, H.; FANG, X.; BAO, X. High β-glucosidase secretion in Saccharomyces cerevisiae improves the efficiency of cellulase hydrolysis and ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. 1.], v. 23, n. 11, p. 1577–1585, 2013.

TROLLOPE, K.; NEL, D. W.; VOLSCHENK, H. The heterologous expression potential of an acid-tolerant Talaromyces pinophilus β -glucosidase in Saccharomyces cerevisiae. Folia **Microbiologica**, [s. 1.], v. 63, n. 6, p. 725–734, 2018.

WANG, J.; MA, Y.; ZHANG, K.; YANG, H.; LIU, C.; ZOU, S.; HONG, J.; ZHANG, M. Mating type and ploidy effect on the β -glucosidase activity and ethanol-producing performance of Saccharomyces cerevisiae with multiple δ -integrated bgl1 gene. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 231, p. 24–31, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.028>

WI, S. G.; CHO, E. J.; LEE, D. S.; LEE, S. J.; LEE, Y. J.; BAE, H. J. Lignocellulose conversion for biofuel: A new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

WICKRAMASINGHE, G. H. I. M.; RATHNAYAKE, P. P. A. M. S. I.; CHANDRASEKHARAN, N. V.; WEERASINGHE, M. S. S.; WIJESUNDERA, R. L. C.; WIJESUNDERA, W. S. S. Trichoderma virens β -glucosidase i (BGLI) gene; Expression in Saccharomyces cerevisiae including docking and molecular dynamics studies. **BMC Microbiology**, [s. 1.], v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.

YANG, F.; YANG, X.; LI, Z.; DU, C.; WANG, J.; LI, S. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from T. aotearoense with high specific activity for cellobiose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. 1.], v. 99, n. 21, p. 8903–8915, 2015. YANG, P.; ZHANG, H.; JIANG, S. Construction of recombinant sestc Saccharomyces cerevisiae for consolidated bioprocessing, cellulase characterization, and ethanol production by in situ fermentation. **3 Biotech**, [s. 1.], v. 6, n. 2, p. 1–11, 2016.

ZHANG, Z; MOO-YOUNG, M; CHISTI, Y. PLASMID STABILITY IN RECOMBINAT SACCHAROMYCES CEREVISIAE. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 280, n. 14, p. 1270–1271, 1996.

ZHANG, C.; WEN, H.; CHEN, C.; CAI, D.; FU, C.; LI, P.; QIN, P.; TAN, T. Simultaneous saccharification and juice co-fermentation for high-titer ethanol production using sweet sorghum stalk. **Renewable Energy**, [s. 1.], v. 134, p. 44–53, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.005>

CAPITULO 5. DISCUSSÃO GERAL

5. Discussão Geral

A pesquisa bibliográfica apresentada no capítulo 2 compõe uma breve explanação sobre os conceitos pertinentes a temática da dissertação e alguns trabalhos relevantes já realizados na área.

O capítulo 3 apresenta todo o processo de engenharia evolutiva das cepas industriais SA-1 e PE-2, desde o processo até a seleção dos mutantes termotolerantes e avaliação cinética do crescimento celular e produção de etanol.

O processo evolutivo não demonstrou um perfil claro de mutação pontual, em que a partir daquele momento uma mudança brusca no perfil celular fosse observada. Ao invés disso, uma grande diversidade foi observada na população, com predominância de crescimento celular mediano na temperatura avaliada, seguindo uma distribuição de frequência normal.

Segundo Sauer (2001) em processos de engenharia evolutiva em batelada, a razão entre número de células adaptadas e o número total de células na cultura aumentará periodicamente, e as células ajustadas irão dominar a cultura. Durante o período avaliado, as células mutantes (termotolerantes) não se sobressaíram na população, de modo que a adoção de uma metodologia de seleção dos indivíduos termotolerantes foi crucial. Çakar et al. (2005) destacam que linhagens diploides ou poliploides são mais complexas que cepas haploides podendo ter um comportamento diferenciado em processos de adaptação laboratorial.

A velocidade especifica de crescimento (μ) e o rendimento em etanol das cepas termotolerantes foi favorecido pelo aumento da temperatura, enquanto o inverso ocorreu para as cepas parentais que apresentaram prolongamento da fase lag. As cepas parentais por não serem adaptadas necessitam de um maior tempo de latência para produção de metabolitos que lhe confiram resistência ao estresse térmico, como a trealose que apresentou maior produção nas linhagens parentais versus suas respectivas termotolerantes. O acumulo de trealose, associada por inúmeros autores como uma resposta direta a termotolerancia (EDGARDO et al., 2008; KITICHANTAROPAS et al., 2016), pode ser relacionada neste trabalho como uma resposta inicial da célula as altas temperaturas, não sendo um fator preponderante em linhagens evoluídas (termotolerantes).

Li et al. (2017) modificaram cepas de *S. cerevisiae* através da adição de oito genes atrelados a fatores termotolerantes extraídos de *Kluyveromyces marxianus*, obtendo conversão

de glicose em etanol à 40° C de 79% do rendimento teórico, enquanto neste trabalho as linhagens PE-2E e SA-1E obtiveram 86.2% e 86.9% do etanol teórico, respectivamente. Comprovando que os fatores envolvidos na termotolerancia são complexos e difíceis de serem contemplados mediante edição genética, sendo a engenharia evolutiva a melhor abordagem a ser seguida.

O capítulo 4 apresenta todo o processo para o desenvolvimento de linhagens modificadas de *S. cerevisiae* capazes de expressar endoglucanase e β-glicosidase (AsENDO e AsGLI), utilizando integração genômica via CRISPR/Cas9 e edição por plasmídeo epissomal. Assim como, a aplicação das melhores cepas transformadas na avaliação da produção otimizada de etanol de segunda geração (2G).

A estratégia de transformar primeiramente uma linhagem laboratorial haploide (CEN.PK113-5D) para aumentar a probabilidade de êxito da transformação das linhagens industriais foi favorável, aumentando a eficiência de edição (método CRISPR/Cas9) de 4 a 20 vezes, implicando que o aumento da extensão de homologia entre o cassete de expressão e a região de edição (locus HO) influencia no processo de reparação dirigida por homologia (HDR), incidindo diretamente no sucesso da transformação das linhagens.

As transformações via plasmídeo epissomal apresentaram como limitante a etapa de auxotrofia, em que o gene URA3 foi deletado para mediar a manutenção do plasmídeo contendo o cassete de expressão (*AsENDO-AsGLI*) e a complementação genica (URA3). Ainda assim, mediante o método de deleção baseado em CRISPR/Cas9 foi obtido uma eficiência de 20 a 42% neste processo.

A maioria das cepas transformadas apresentaram máxima produção de *AsGLI* no tempo de 12 horas, paralelamente ao esgotamento da glicose no meio, sugerindo que uma baixa concentração de glicose pode atuar como promotor para a produção de *ASGLI*, enquanto uma alta concentração resulta em um efeito repressor. Huang et al. (2010) cita que dependendo das fontes de carbono empregadas na composição do meio de cultura, a glicose pode atuar como indutor ou repressor na expressão de celulases heterológas em *S. cerevisiae*.

Em relação ao método de edição, as cepas transformadas via CRISPR/Cas9 apresentaram maior produção geral de As*ENDO* e As*GLI* do que as transformações via plasmídeo epissomal, mostrando que a integração genômica é mais relevante do que a inserção de múltiplas cópias em plasmídeo.

Os métodos de produção de etanol lignocelulósico SSF e SSFp apresentaram melhor produção de etanol do que o método SHF, demonstrando a relevância da inibição enzimática

pelo acúmulo de glicose na sacarificação. DE ARAUJO GUILHERME et al. (2019) aplicou o sistema SSF na produção de etanol a partir do bagaço da cana-de-açúcar (pré-tratado em ácido diluído), utilizando a linhagem PE-2, obtendo um rendimento de 4.94 ±0.12 (g de etanol/ 100 g de bagaço), enquanto neste trabalho a cepa AGY005 derivada da mesma linhagem (PE-2) apresentou um rendimento 97% superior, demonstrando a superioridade da cepa transformada frente a levedura selvagem.

CAPITULO 6. CONCLUSÃO GERAL

6. Conclusão Geral

A engenharia evolutiva demonstrou ser uma abordagem adequada para a obtenção de termotolerancia em cepas industrias de *Sacchamoryces cerevisiae* (diploides), uma vez que as linhagens evoluídas obtidas SA-1E e PE-2E apresentaram elevada velocidade de crescimento especifico (0.5741 e 0.5918 h-1) e alto rendimento (0,44 g.g-1) em etanol a 40°C, podendo estas serem aplicadas diretamente em fermentações a altas temperaturas ou servindo de matrizes para a modificação genética, a fim de serem inseridas em processos mais otimizados. Neste contexto, vale salientar que a abordagem via CRISPR/Cas9 para expressão heteróloga em *S. cerevisiae* apresentou melhor resposta em atividade celulolítica de *AsENDO* e *AsGLI* do que a edição via plasmídeo em múltiplas cópias, ressaltando que a integração genômica e a manutenção dos genes na célula durante as gerações se fazem mais importantes do que o número de cópias inseridos no hospedeiro. Ao final as linhagens transformadas, em especial a cepa AGY005, apresentaram alta performance na expressão de celulases (*AsENDO e AsGLI*), demonstrando potencial para a produção de etanol lignocelulósico em condições otimizadas de processo.

CAPITULO 7. REFERÊNCIAS GERAIS

7. Referências Gerais

ÇAKAR, Z. P.; SEKER, U. O. S.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant Saccharomyces cerevisiae. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 5, n. 6–7, p. 569–578, 2005.

DE ARAUJO GUILHERME, A.; DANTAS, P. V. F.; PADILHA, C. E. de A.; DOS SANTOS, E. S.; DE MACEDO, G. R. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 234, n. December 2018, p. 44–51, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030147971831524X>

EDGARDO, A.; CAROLINA, P.; MANUEL, R.; JUANITA, F.; BAEZA, J. Selection of thermotolerant yeast strains Saccharomyces cerevisiae for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 120–123, 2008.

HUANG, X. M.; YANG, Q.; LIU, Z. H.; FAN, J. X.; CHEN, X. L.; SONG, J. Z.; WANG, Y. Cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase gene egVIII from trichoderma viride in saccharomyces cerevisiae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 103–115, 2010.

KITICHANTAROPAS, Y.; BOONCHIRD, C.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; HARASHIMA, S. Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in Saccharomyces cerevisiae strains with potential use in high - temperature ethanol fermentation. **AMB Express**, [s. 1.], 2016.

LI, P.; FU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; LI, J.; LI, S. The transcription factors Hsf1 and Msn2 of thermotolerant Kluyveromyces marxianus promote cell growth and ethanol fermentation of Saccharomyces cerevisiae at high temperatures. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13068-017-0984-9

SAUER, U. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. [s.l: s.n.].