

PROJETO 2 (PIBIC - 2017)

Título: Estudo uma xilose isomerase psicrófila (fria) visando sua aplicação na combinação com uma quimera (hemicelulase) para conversão da xilose de hidrolisados e licores de biomassas vegetais.

Responsável: Dr. Roberto Ruller (Pesquisador)

Área de pesquisa: Bioquímica, Microbiologia, Biologia Molecular

Laboratório de desenvolvimento: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)

Introdução: Sabe-se que as leveduras industriais (*Saccharomyces cerevisiae*) não metabolizam xilose em processos fermentativos convencionais até álcool. Um dos grandes desafios da tecnologia do etanol 2G é o reaproveitamento eficiente das frações de pentoses presentes nos licores proveniente do bagaço pré-tratado de cana de açúcar. Dentre várias alternativas estudadas, destaca-se uma via importante e promissora, que é a busca e utilização de uma xilose isomerase psicrófila (XIP) que possa atuar na xilose dos licores, formando xilulose que por sua vez, pode ser fermentado a bioetanol ou outros compostos. Esta atuação enzimática em baixas temperaturas possibilitaria uma atuação concomitante com a levedura em um mesmo processo, diminuindo assim, etapas de resfriamento para o posterior crescimento e fermentação.

Desafio tecnológico: O presente projeto visa explorar algumas xiloses isomerases que foram identificadas em micro-organismos isolados de amostras bacterianas de solos da Antártica e deserto do atacama. Alguns destes isolados bacterianos (*Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*, *Exiguobacterium antarcticum* B7, dentre outros) são microrganismos que poliextremófilos e que são importantes “celeiros” de genes de novas e importantes enzimas psicrófilas. Após a análise *in silico* de seus genomas foram identificados alguns genes promissores (GHs e xiloses isomerases) que deverão ser explorados futuramente. Para esta frente de trabalho foi escolhida uma XI que será estudada neste trabalho. Para isso, após a clonagem, expressão, produção e estudos estruturais destas enzimas, uma delas será utilizada em estudos de sinergia na atuação com uma quimera (xilanase-xilosidase) que foi desenvolvida e patenteada pelo CTBE, a qual apresentou ótimos resultados de hidrólise até xilose de licores ricos em xilo-oligomero em hidrolisados de biomassas pré-tratada.

Proposta: Este complexo enzimático (quimera + XIP) deverá ser testado quanto a eficiência de conversão de xilo-oligomeros do licor até xilose e a conversão a xilulose em etapas fermentativa específicas (baixas temperaturas) utilizando leveduras que estão sendo estudadas nos laboratórios da equipe de colaboradores do CTBE. Este projeto é uma iniciativa que terá uma colaboração dos Laboratórios do CTBE (laboratório de fermentação 2G), Microbiologia e Biologia Molecular e Laboratório de Bioprocessos além da integração ao Laboratório de Biologia Estrutural do LNBIO.

Descrição das atividades:

1. Treinamento na Preparação de meios de cultivo e Microbiologia Básica
2. Treinamento em Biologia Molecular e Bioquímica Básica – Preparação de cepas e manipulação de DNA recombinante
3. Clonagem XI em vetor de expressão após preparação de células hospedeira.
4. Expressão de Enzimas Microbianas em linhagens de *Escherichia coli* (otimização da expressão).
5. Purificação e caracterização Bioquímica das enzimas (xilanase bifuncional e xilose isomerase)
6. Testes de atividade enzimática contra substratos (pH, temperatura) e licores ricos em xilo-oligomeros
7. Caracterização biofísica por difração circular e desnaturação térmica (monitoramento da estrutura secundária).
8. Testes de hidrólise do licor (com xilanase bifuncional), isomerização e testes iniciais fermentação alcoólica