

PROJETO 1 (PIBIC - 2017)

Projeto 1: Clonagem, expressão e estudos de proteínas recombinantes aplicadas na otimização de um coquetel enzimático termofílico (*Thermoascus aurantiacus*) para hidrólise 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: A degradação enzimática do material lignocelulósico pode ser realizada por uma mistura complexa de enzimas, entre as quais celulasas e hemicelulasas se destacam, para a obtenção de licores açucarados contendo hexoses (C6) e pentoses (C5). A hemicelulose está situada entre a lignina e as fibras de celulose das plantas e representa a segunda matéria-prima mais abundante do planeta e até 40% dos constituintes dos resíduos agro-industriais. Para a degradação total das hemiceluloses há a necessidade de uma série de enzimas de diferentes especificidades devido a natureza heteropolissacarídica ramificada da xilana. O complexo enzimático responsável pela hidrólise das hemiceluloses é composto pelas enzimas endo-1,4- β -xilanas e β -xilosidase, podendo ainda ter a participação das enzimas desramificadoras dos grupos laterais ligados a cadeia principal, destacando-se destas principalmente as arabinofuranosidas. Para a hidrólise da celulose são necessárias 3 tipos de enzimas, as endoglucanases, que atacam as cadeias curtas de cellulose, as celobiohidrolases, que atuam nas extremidades não redutores e redutoras dos cello-oligômeros e as b-glicosidasas são as enzimas finais que hidrolizam a celobiose em glucose (C6) que podem ser fermentados até bioetanol por leveduras. Dois dos principais problemas dos coquetéis fúngicos e comerciais utilizados na hidrólise de biomassa vegetal pré-tratada (cana de açúcar) é a baixa atividade de endo-xilanas e de b-glicosidase, que torna o processo de hidrólise com baixa eficiência e mais demorado.

Desafio tecnológico: Sabe-se que a hidrólise enzimática (sacarificação) é uma das etapas mais onerosas do processo de produção do etanol de segunda geração (~20% do valor total). Este projeto é uma iniciativa importante que poderá contribuir significativamente nas atividades focadas em tecnologias de otimização de um complexo enzimático para uma hidrólise eficiente e mais barata do material lignocelulósico objetivando a obtenção de açúcares fermentescíveis (xilose e glucose). Desta forma, o estudo e desenvolvimento de coquetéis enzimáticos são extremamente importantes para diminuição do custo de produção tornando o biocombustível economicamente viável.

Proposta: O presente projeto tem como objetivo, caracterizar bioquimicamente e avaliar o potencial de suplementação de um coquetel termofílico desenvolvido no CTBE (TA.V01) produzido pelo fungo *T. aurantiacus*, utilizando enzimas recombinantes produzidas por *Escherichia coli*. As enzimas recombinantes escolhidas serão; b-glicosidasas (GH1/GH3), celulase GH5/GH12, uma endo-xilanas recombinantes (GH10/GH11). Durante o desenvolvimento deste projeto o aluno efetuará técnicas de microbiologia básica (cultivo, transformação bacteriana), Bioquímica e Biologia Molecular (expressão recombinante, cultivo e purificação enzimática), testes de caracterização enzimática (pH, temperatura e atividade em diferentes substratos).

Descrição das atividades:

1. Treinamento na Preparação de meios de cultivo e Microbiologia Básica
2. Treinamento em Biologia Molecular, Bioquímica Básica, Preparação de cepas e manipulação de DNA recombinante
4. Clonagem e manipulação de vetor de expressão após preparação de células hospedeira.
5. Expressão de Enzimas Microbianas em linhagens de *Escherichia coli* (otimização da expressão).
6. Purificação e caracterização Bioquímica das enzimas recombinantes
7. Testes de atividade enzimática contra substratos comerciais e bagaço de cana de açúcar pre-tratado.
8. Caracterização biofísica por difratação circular e desnaturação térmica (monitoramento da estrutura secundária).
9. Produção do coquetel e testes de suplementação e otimização do coquetel fúngico produzido por *Thermoascus aurantiacus*.