



Projeto de Iniciação Científica – Programa PIBIC

Genética de micro-organismos para a produção de biocombustíveis

Pesquisador Responsável: Dr. Leandro Vieira dos Santos

Instituição sede: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE; Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM

Introdução e estado da arte

Tornou-se um consenso mundial a necessidade de substituir o uso de fontes fósseis (petróleo, gás e carvão) por alternativas renováveis de energia. Em 2016, os níveis de CO₂ na atmosfera ultrapassaram a marca de 400 ppm, uma condição considerada alarmante, segundo o Instituto Scripps de Oceanografia da Universidade da Califórnia, nos Estados Unidos (Scripps Institutions of Oceanography, 2018; Abas et al. 2015). Visando limitar o aumento da temperatura global, alguns países anunciaram metas para reestruturar a matriz energética mundial, com o emprego de tecnologias que usam energia renovável (Brazil's INDC – UNFCCC, 2015).

Nesse contexto, o etanol de segunda geração (2G) surge com um grande potencial de produção de energia a partir de uma matriz renovável e mais limpa (Canilha *et al.* 2012; Santos *et al.* 2016). O etanol 2G é produzido a partir dos polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal, uma matriz renovável e com capacidade de ser utilizada em larga escala pela indústria. Um dos maiores desafios na implementação dessa tecnologia é o desenvolvimento de linhagens de micro-organismos capazes de utilizar os açúcares provenientes desse material e converter em etanol.

Diante do problema exposto, esse projeto visa a modificação genética da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a eficiente conversão do açúcar renovável xilose em etanol 2G. Linhagens selvagens de *S. cerevisiae* são incapazes de converter a pentose xilose em etanol. Tendo em vista a significativa parcela desse açúcar na constituição da biomassa lignocelulósica (25-30%), é imprescindível o desenvolvimento de uma cepa capaz de utilizar esse grupo de açúcar a fim de tornar o processo economicamente viável (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

A etapa inicial do processo envolve a assimilação desse açúcar por transportadores localizados na membrana celular da levedura (figura 1). Após internalizado, a levedura desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa possui os genes e vias metabólicas necessários para converter a xilose em etanol. Apesar da grande importância dessa etapa para o aumento na eficiência do processo 2G, nenhum transportador de grande eficiência foi desenvolvido para solucionar esse desafio tecnológico. Dessa maneira, o desenvolvimento de um transportador eficiente no carregamento de xilose para o ambiente intracelular, aumentará a eficiência do processo fermentativo. Alguns trabalhos prévios na literatura relatam melhorias em transportadores endógenos de açúcar através de engenharia evolutiva (Farwick et al. 2014) e mutações sítio específica (Farwick et al. 2014; Nijland et al. 2016). Dessa forma, este projeto tem como objetivo caracterizar novas sequências de transportadores de xilose e desenvolver uma linhagem modificada geneticamente para eficiente produção de etanol 2G.

O CTBE integra o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Organização Social qualificada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC)

Campus: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 - Polo II de Alta Tecnologia - Caixa Postal 6192 - 13083-970 - Campinas/SP
Fone: +55.19.3512.1010 | Fax: +55.19.3518.3164 | www.bioetanol.org.br

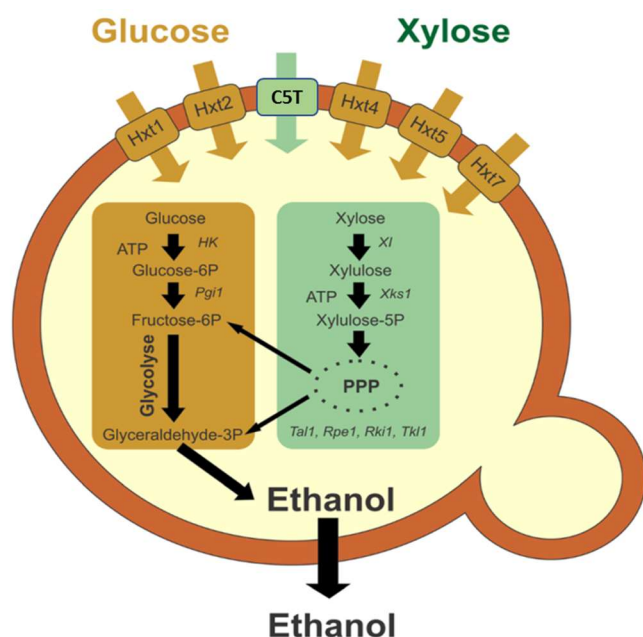


Figura 1| Transportadores de açúcares *S. cerevisiae*. Os retângulos em laranja representam transportadores de açúcar convencionais de *S. cerevisiae*. O retângulo em verde representa um transportador (C5T) que foi modificado geneticamente, apresentando maior afinidade por xilose. A maior velocidade de assimilação dos açúcares impacta diretamente no processo de produção industrial do etanol 2G (Modificado de Nijland *et al.* 2014).

Objetivos

O objetivo desse projeto é a caracterização e desenvolvimento de transportadores de xilose que possuam uma alta capacidade de assimilar esse açúcar intracelularmente, diminuindo o tempo final de fermentação e produção do etanol 2G.

Ao longo do projeto, o candidato selecionado desenvolverá os seguintes passos:

- Geração de mutações sítio-específica em transportadores de açúcar;
- Construção de cassetes de expressão gênica;
- Transformação genética da levedura *S. cerevisiae* para introdução do transportador;
- Ensaio fermentativo das linhagens desenvolvidas e análise dos resultados.

Metodologia

O candidato selecionado será capacitado em técnicas tradicionais de biologia molecular, como: reações de PCR, extração de DNA plasmidial e genômico, eletroporação bacteriana, clonagem, construção de cassetes de expressão gênica, transformação da levedura modelo *S. cerevisiae*, ensaios de fermentação, entre outros (Gibson *et al.* 2009; Joska *et al.* 2014)(Gietz and Schiestl 2008)(Sambrook *et al.* 1989).

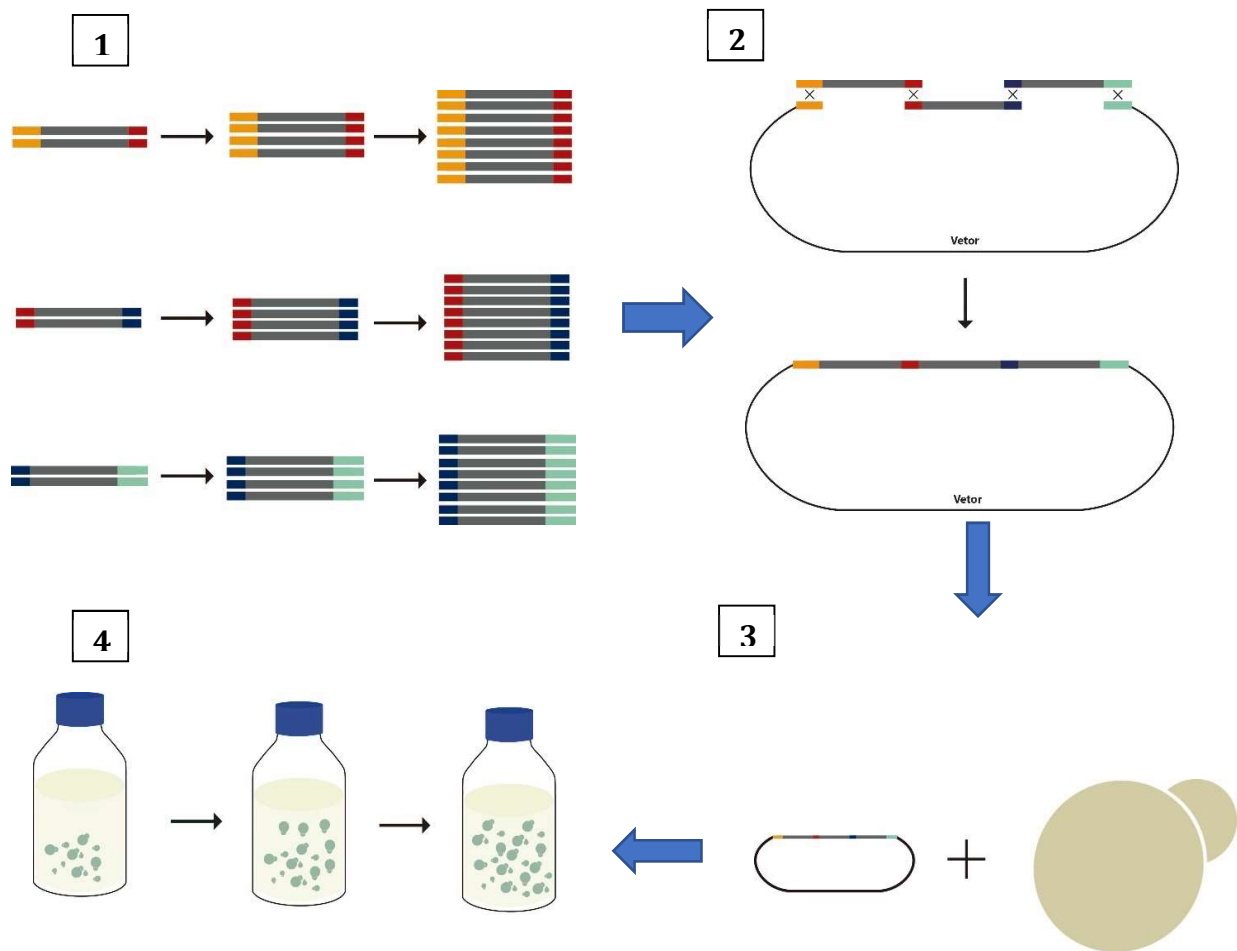


Figura 2 | Metodologia gráfica simplificada do projeto. Etapas de desenvolvimento inicial do projeto: reações de polimerase em cadeia (PCR) para inserção de mutações e amplificação de regiões específicas do DNA, como promotores, terminadores e regiões codificadoras, etapa 1; montagem de cassetes de expressão gênica, etapa 2; introdução do plasmídeo desenvolvido na levedura, etapa 3; e por fim, ensaio fermentativo para avaliar alterações fenotípicas das linhagens desenvolvidas e avaliar a produção do etanol 2G, etapa 4.

Referências

Abas N, Kalair A, Khan N. Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures* 2015;**69**:31–49.

Canilha L, Chandel AK, Suzane Dos Santos Milessi T *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J Biomed Biotechnol* 2012.

Farwick A, Bruder S, Schadeweg V *et al.* Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:5159–64.



Federative Republic of Brazil. Intended nationally determined contribution towards achieving the objective of the united nations framework convention on climate change (INDC). Disponível em:
<http://www4.unfccc.int/submissions/INDC/Published%20Documents/Brazil/1/BRAZIL%20iNDC%20english%20FINAL.pdf>. Acesso em abril de 2018.

Gibson DG, Young L, Chuang RY *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009;**6**:343–5.

Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc / SS carrier DNA / PEG method. *Nat Protoc* 2008;**2**:31–5.

Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 147-177, 2007.

Joska TM, Mashruwala A, Boyd JM *et al.* A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *J Microbiol Methods* 2014;**100**:46–51.

Nijland JG, Shin HY, de Jong RM *et al.* Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 2014;**7**:168.

Nijland JG, Vos E, Shin HY *et al.* Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 2016;**9**:158.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold.

Spring Harbor. (1989). Santos LV Dos, Grassi MCDB, Gallardo JCM *et al.* Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. *Industrial Biotechnology*, 12: 40-57, 2016a.

Scripps Institutions of Oceanography. The Keeling Curve. Disponível em
<https://scripps.ucsd.edu/programs/keelingcurve/>. Acesso em abril de 2018.