

## Projeto de Iniciação Científica – Programa PIBIC

### Genética de microrganismos visando a produção de biopolímeros

**Pesquisador Responsável:** Dr. Leandro Vieira dos Santos

**Instituição sede:** Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR); 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 CO<sub>2</sub> 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 utilizam energia renovável (Brazil's INDC – UNFCCC, 2015).

Em uma refinaria petroquímica, o petróleo bruto pode ser fracionado e convertido em diversos compostos com aplicações específicas. Como exemplo de compostos que podem ser produzidos, destacam-se os polímeros sintéticos, também conhecidos como plásticos. Por serem extremamente estáveis e recalcitrantes, os seus ciclos de degradação no meio ambiente são duradouros e causam sérios problemas ambientais, como a poluição do solo e de cursos d'água, e o comprometimento da fauna aquática (Rao et al., 2014; Erni-Cassola et al., 2019; Schwarz et al., 2019). Os polímeros sintéticos como o poliestireno, policloreto de vinila (PVC), polietileno tereftalato (PET) e polipropileno (PP) são derivados de fontes fósseis e são polimerizados por vias químicas.

Em contrapartida, os biopolímeros podem ser produzidos a partir dos polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal, sendo uma matriz renovável e com capacidade de ser utilizada em larga escala pela indústria. E microrganismos podem ser modificados geneticamente e utilizados como plataformas microbianas na conversão de açúcares da biomassa vegetal em diversos biocompostos de interesse biotecnológico, reduzindo a dependência de derivados do petróleo para a fabricação de produtos do dia-a-dia (George et al., 2020).

Biopolímeros tem ampla aplicação no mercado, abrangendo desde a indústria de bioplásticos (eg.: PLA e PHB) quanto a geração de dispositivos médicos avançados para drug delivery, sendo um material com maior biodegradabilidade. Essa versatilidade possui relação com características de reaproveitamento, biocompatibilidade e durabilidade, apesar de que algumas propriedades relacionadas à resistência e termoestabilidade serem relativamente baixas em comparação com os polímeros análogos de origem fóssil (Sadasivuni et al., 2020).

Um dos maiores desafios na implementação dessa tecnologia é o desenvolvimento de linhagens microbianas robustas capazes de utilizar eficientemente os açúcares provenientes da biomassa vegetal e converter em biocompostos. O avanço de técnicas de biologia sintética e engenharia metabólica forneceram o know-how para o design de plataformas microbianas e integração de vias metabólicas otimizadas para a produção de diversos compostos de interesse.

Diante do problema exposto, esse projeto visa a modificação genética da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a eficiente conversão de açúcares da biomassa como glicose (C6) e xilose (C5) em ácidos carboxílicos precursores de biopolímeros. Linhagens selvagens de *S. cerevisiae* são incapazes de consumir a pentose xilose. 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 (Bueno et al., 2020).

A etapa inicial do projeto envolve a construção de modelos metabólicos em escala genômica para a identificação dos melhores alvos a serem modificados racionalmente. A levedura base a ser utilizada foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa e possui todos os genes e vias metabólicas necessários para converter a xilose em etanol. Assim sendo, é necessário minimizar a produção de etanol e redirecionar o fluxo de metabólitos para a produção do composto de interesse. A levedura será modificada utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para a deleção de genes específicos e novas vias metabólicas heterólogas serão integradas no microrganismo de interesse. Ferramentas ômicas serão utilizadas para identificar gargalos metabólicos a fim de propor novas modificações genéticas. A cinética fermentativa das cepas recombinantes será avaliada em biorreator a fim de quantificar o rendimento e produtividade do composto de interesse produzido.

## Objetivos

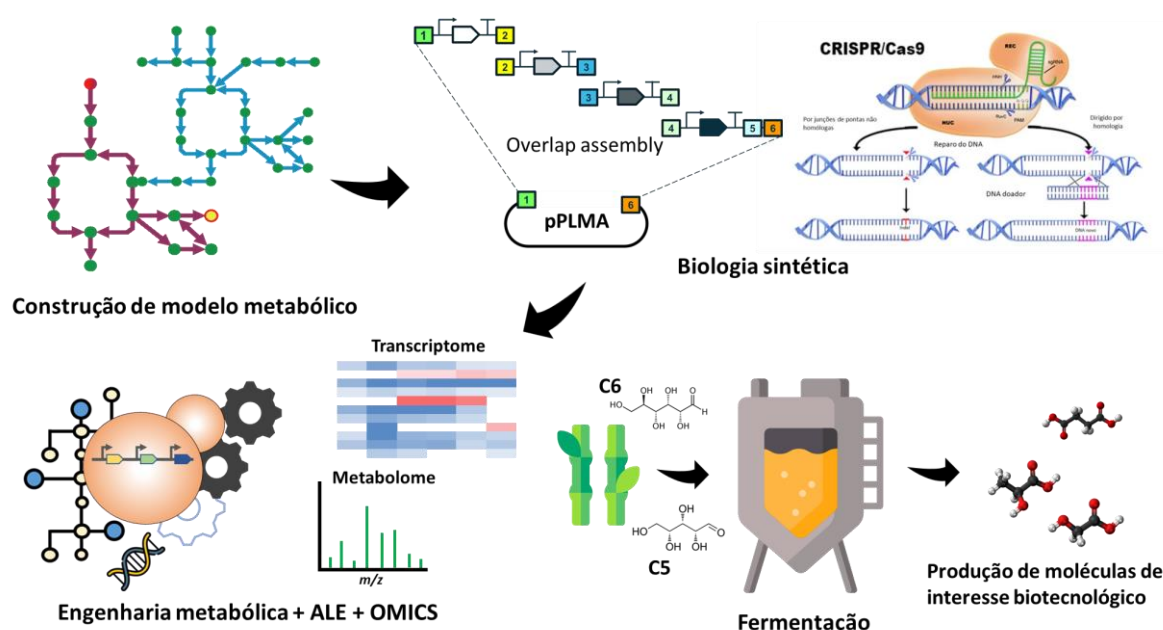
O objetivo desse projeto é a construção de linhagens geneticamente modificadas da levedura *S. cerevisiae* para a conversão de açúcares da biomassa em precursores de biopolímeros.

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

- Construção de modelos metabólicos em escala genômica;
- Uso de procedimentos de biologia sintética para a construção de cassetes de expressão gênica;
- Transformação genética do microrganismo utilizando o sistema CRISPR/Cas9;
- Engenharia metabólica visando aumento do composto de interesse;
- 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, CRISPR/Cas9, 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 1 | Metodologia gráfica simplificada do projeto.** Etapas de desenvolvimento inicial do projeto: 1. construção de modelos metabólicos em escala genômica; 2. Uso de procedimentos de biologia sintética para a construção de cassetes de expressão gênica; 3. Transformação genética do microrganismo utilizando o sistema CRISPR/Cas9; 4. Engenharia metabólica visando aumento do composto de interesse; 5. Uso de ferramentas ômicas para a identificação de gargalos metabólicos; 6. ensaio fermentativo das linhagens desenvolvidas e análise dos resultados.

## Referências

- Abas N, Kalair A, Khan N. Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures* 2015;69:31–49.
- Bueno, J.G.R., Borelli, G., Corrêa, T.L.R. et al. (2020) Novel xylose transporter Cs4130 expands the sugar uptake repertoire in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains at high xylose concentrations.
- Erni-Cassola, Gabriel et al. Distribution of plastic polymer types in the marine environment; A meta-analysis. *Journal of hazardous materials*, v. 369, p. 691-698, 2019.
- 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 2021.
- George, Ashish et al. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. *International journal of biological macromolecules*, v. 154, p. 329-338, 2020
- 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.
- 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.
- Rao, M. Gopal; BHARATHI, P.; AKILA, R. M. A comprehensive review on biopolymers. *Sci. Revs. Chem. Commun*, v. 4, n. 2, p. 61-68, 2014.
- Sadasivuni, Kishor Kumar et al. Recent advances in mechanical properties of biopolymer composites: A review. *Polymer Composites*, v. 41, n. 1, p. 32-59, 2020.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold. Spring Harbor. (1989).
- Schwarz, A. E. et al. Sources, transport, and accumulation of different types of plastic litter in aquatic environments: a review study. *Marine pollution bulletin*, v. 143, p. 92-100, 2019.
- Scripps Institutions of Oceanography. The Keeling Curve. Disponível em <https://scripps.ucsd.edu/programs/keelingcurve/>. Acesso em abril de 2021.