

ROMINNE KARLA BARROS FREIRE

Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2012

ROMINNE KARLA BARROS FREIRE

Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Freire, Rominne Karla Barros.

Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar / Rominne Karla Barros Freire. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Produção de bioprodutos

Versão do título para o inglês: Engineering bacterias to produce ethanol and biopolymers using sugar derived from sugarcane bagasse hydrolysate.

1. Etanol 2. Plásticos biodegradáveis 3. Xilose 4. Bagaço de cana-de-açúcar 5. Repressão catabólica 6. Resíduos lignocelulósicos I. Silva, Profa. Dra. Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB043/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rominne Karla Barros Freire.

Título da Dissertação: Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

Orientador(a): Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

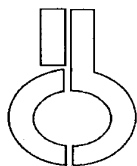
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 337/09, referente ao projeto intitulado: “*Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar*” sob a responsabilidade de **Rominne Karla Barros Freire**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de agosto de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

**Aos meus pais, que sempre
me proporcionaram a longa
caminhada pelo saber.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sustentar-me em minha caminhada.

Agradeço a meus pais que sempre colocaram meus estudos em primeiro lugar e permitiram minha vinda para São Paulo. Obrigada pelo carinho e incentivo! Aos meus irmãos Radha Krishna e Endrigo Stêfanos pelo apoio e incentivo.

Agradeço à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro que auxiliou na minha pesquisa.

Agradeço à orientação da Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva e à co-orientação do Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez a quem devo boa parte do aprendizado adquirido ao longo do meu trabalho. Agradeço também à Marilda Keiko Taciro pela orientação nas questões de engenharia bioquímica.

Agradeço a meu companheiro André Luis Lopes Neves pelo apoio, paciência e carinho que me ajudaram na conclusão deste trabalho. Obrigada por compartilhar comigo noites a fio de experimentos infundáveis no laboratório.

Agradeço aos que me ajudaram ao longo da caminhada: à equipe do laboratório, especialmente Daniela, pelas análises no HPLC e CG; Karen, Kelli, Karinna, Thatiane, Débora, Amanda e Rogério, que me auxiliaram nos experimentos e colaboraram com meu aprendizado. Obrigada pela disposição, paciência e amizade.

Agradeço à equipe da Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa, do Prof. Dr. Gabriel Padilla, do Prof. Dr. Beny Spira, do Prof. Dr. René Schneider e à equipe da Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pela colaboração.

Agradeço aos amigos que deixei em Natal, mas que até hoje guardo no coração: Larissa Klemig, Elizângela, Keith e Aleida. Agradeço também a Leonardo Nobre a quem devo em parte minha vinda a São Paulo e início do mestrado. Obrigada pelo apoio e incentivo!

Diante do desafio de apreender uma pequena parte da realidade longínqua aqui investigada, mergulhei na tentativa de condensar a vida em placas de Petri e me vi presa em minha própria rede de (im)prováveis hipóteses a cerca da vida e de seus mistérios.

Peixe preso dentro do vento

Tu me perguntas

O que uma lagosta tece lá embaixo com seus pés dourados?

Respondo que o oceano sabe.

E por quem a medusa espera em sua veste transparente?

Está esperando pelo tempo, como tu.

'Quem as algas apertam em seu abraço...'perguntas

'mais firme que uma hora e um mar certos?' Eusei.

Perguntas sobre a presa branca do narval

E eu respondo contando como o unicórnio do mar, arpadado, morre.

Perguntas sobre as plumas do rei-pescador

Que vibram nas puras primaveras dos mares do sul.

Quero te contar que o oceano sabe isto:

que a vida, em seus estojos de jóias,

é infinita como a areia incontável, pura;

e o tempo, entre uvas cor de sangue

tornou a pedra dura e lisa encheu a água-viva de luz,

desfez o seu nó, soltou seus fios musicais

de uma cornicópia feita de infinita madrepérola.

Sou só a rede vazia diante dos olhos humanos na escuridão
e de dedos habituados à longitude do tímido globo de uma laranja.

Caminho como tu, investigando a estrela sem fim

E em minha rede, durante a noite, acordo nu.

A única coisa capturada é um peixe preso dentro do vento.

Pablo Neruda.

RESUMO

FREIRE, R. K. B. **Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 132f. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Resíduos lignocelulósicos são substratos proeminentes para a produção sustentável de biocombustíveis, como o etanol, e de biopolímeros, como os polihidroxialcanoatos (PHAs). No Brasil o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado a matéria-prima mais promissora em razão da crescente produção de cana-de-açúcar nesse país. A xilose é um dos principais componentes da lignocelulose, mas o aproveitamento eficiente desse açúcar ainda representa uma barreira técnica. Assim, o objetivo desse trabalho foi obter linhagens bacterianas mais eficientes no consumo desse açúcar. Para isso, foi inserido maior número de cópias dos genes responsáveis pelo metabolismo (*xylAB*) e transporte (*xylFGH*) de xilose em *Escherichia coli* KO11, produtora de etanol, e em *Burkholderia sacchari* LFM 101, produtora de poli-3-hidroxibutirato (PHB). As linhagens recombinantes foram analisadas quanto à capacidade de consumo de xilose e de produção em cultivos contendo esse açúcar na ausência e presença de glicose. Em *E. coli* KO11, a inserção de maior número de cópias de *xylAB* reduziu o tempo de consumo de xilose e aumentou até 30% na produção final de etanol, mas esse efeito foi reduzido na presença de glicose em consequência da repressão catabólica. Assim, em *E. coli* KO11, além da repressão catabólica, o baixo nível de expressão dos genes *xylAB* também contribui para a utilização ineficiente de xilose. Por outro lado, *xylFGH* teve um efeito deletério ao reduzir para quase zero o crescimento e produção de etanol por essa linhagem, mesmo na presença de glicose. Em *B. sacchari* LFM 101 a inserção de maior número de cópias desses genes não resultou em qualquer efeito positivo ou negativo. O plasmídeo pBBR1MCS-5, no entanto, prejudicou o crescimento e a metabolização de xilose por essa linhagem. Um fenômeno interessante observado foi o consumo de xilose com maior velocidade na presença de glicose quando comparado a cultivos em que esse carboidrato estava ausente, sugerindo que a glicose exerce um efeito contrário à repressão catabólica em *B. sacchari*. A capacidade de *xylAB* e *xylFGH* complementarem um mutante *xyl* de *B. sacchari* LFM 101 também foi avaliada. O operon *xylFGH* foi capaz de restituir completamente à capacidade desse mutante de crescer em xilose, enquanto *xylAB* não foi capaz de fazê-lo. Concentrações de IPTG até 6,0 mM foram testadas para avaliar se a quantidade de indutor era o fator que limitava a expressão dos genes alvo, mas não foi observada melhora no consumo de xilose e produção pelas linhagens alvo.

Palavras-chave: Xilose. Bactérias. Resíduos lignocelulósicos. Bagaço de cana-de-açúcar. Etanol. Polihidroxialcanoatos. Repressão catabólica.

ABSTRACT

FREIRE, R. K. B. **Engineering recombinant bacteria to produce ethanol and biopolymers using sugars derived from sugarcane bagasse hydrolysate.** 2012. 132f. [Masters thesis (Microbiology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Lignocellulosic residues are remarkable substrates for biofuels production such as ethanol and for biopolymers such as polyhydroxyalkanoates (PHAs). The sugarcane bagasse has been indicated as the most promising raw material in Brazil due to increasing sugarcane production in this country. Xylose is one of the most important lignocellulose component, but its efficient utilization still represents a technical barrier. The aim of this work was to obtain bacterial strains more efficient in the xylose consumption. Multiple copies of the catabolism (*xylAB*) and transport (*xylFGH*) genes of xylose were introduced in the ethanol producer *Escherichia coli* KO11 strain and the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) producer *Burkholderia sacchari* LFM 101. The recombinant strains were analysed for ability of xylose consumption and production in cultures containing xylose in the absence and presence of glucose. The inclusion of multiple copies of *xylAB* in *E. coli* KO11 reduced the rate of xylose consumption and increased the final ethanol production by 30% although this effect was decreased in the glucose presence as a result of catabolite repression. This indicates that the low level of *xylAB* expression in *E. coli* KO11 also contribute to the inefficient xylose consumption for this strain, in addition to catabolite repression. Moreover *xylFGH* induce a deleterious effect to decrease to nearly zero the growth and ethanol production by this strain, even in glucose presence. The multiple copies inclusion of these genes in *B. sacchari* LFM 101 didn't result in any positive or negative effect. However pBBR1MCS-5 plasmid affected the growth and metabolism of xylose by this strain, probably because of inhibition by gentamycin. An interesting phenomenon was the faster rate of xylose consumption in the presence of glucose when compared to cultures in which this carbohydrate was missing, suggesting that glucose has an opposite effect to catabolite repression in *B. sacchari*. The ability of *xylAB* and *xylFGH* in complement a *xyl* mutant from *B. sacchari* 101 was also evaluated. The *xylFGH* operon was able to completely restore growth and PHB production in xylose, whereas *xylAB* was unable to do it. Concentrations of IPTG until 6,0 mM were tested to assess if this inducer was the limiting factor in expression of target genes but improvement in xylose consumption and production were not noticed.

Key words: Xylose. Bacteria. Lignocellulosic residues. Sugarcane bagasse. Ethanol. Polyhydroxyalkanoates. Catabolite repression.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

