



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG



2

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO

3

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAq

4

5

6

7

PROJETO DE DISSERTAÇÃO

8

9

10

A MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii* COMO PLATAFORMA PARA

11

EXPRESSÃO E SECREÇÃO DE β -GLICOSIDASES RECOMBINANTES

12

ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

13

14

15

16

Biol. RAÍZA DOS SANTOS AZEVEDO

17

Orientador: Dr. Luis Fernando Marins

18

19

20

Rio Grande/RS

21

Agosto – 2013

22 RESUMO

23 O consumo elevado de combustíveis fósseis é considerado o fator responsável por
24 grande parte das crises ambientais. Pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novas
25 tecnologias de produção de energia a partir de biomassa surgem como alternativa ao uso
26 desses tipos de combustíveis. Diante do cenário atual, a produção de energia a partir de
27 biomassa lignocelulósica (bagaço e palha) vem ganhando destaque frente ao problema
28 de entressafra da cana de açúcar, onde a produção de etanol é zero. A utilização de
29 biofábricas de proteínas recombinantes, baseadas em microalgas, para produção de
30 grandes quantidades de β -glicosidases, poderá permitir o aproveitamento da biomassa
31 lignocelulósica proveniente dos resíduos gerados na produção de etanol. Para tornar a
32 produção de proteína recombinante mais eficiente, é possível melhorar sua tradução
33 ribossomal por meio da otimização de códons, aumentando as taxas de tradução da
34 proteína de interesse. Para tanto, o trabalho propõe a utilização de *Chlamydomonas*
35 *reinhardtii* como plataforma de produção juntamente com a otimização de códons para
36 potencializar a produção e secreção de β -glicosidases recombinantes, em grandes
37 quantidades, que degradem o bagaço da cana de açúcar para produção de etanol
38 lignocelulósico. Os principais objetivos deste estudo são: (i) Produzir construções
39 genéticas para a expressão e secreção de duas β -glicosidases de origem procarionte; (ii)
40 Transformar geneticamente a microalga *C. reinhardtii* através de eletroporação e
41 selecionar os clones altamente produtivos; (iii) Determinar a atividade das β -
42 glicosidases produzidas pelos clones geneticamente modificados de *C. reinhardtii*
43 visando selecionar aqueles mais produtivos; e (iv) Testar a eficiência das β -glicosidases
44 recombinantes na degradação da celobiose proveniente da celulose do bagaço da cana
45 de açúcar. Esse modelo poderá funcionar como uma biofábrica de baixo custo, além de
46 diminuir o impacto ambiental causado pela emissão de carbono das usinas
47 sucroenergéticas já que o cultivo de microalgas poderia aproveitar as emissões de
48 carbono geradas pela própria usina.

49

50 **PALAVRAS CHAVE:** *Chlamydomonas reinhardtii*, β -glicosidases, etanol
51 lignocelulósico, proteína recombinante, otimização de códons.

52

53 1. INTRODUÇÃO

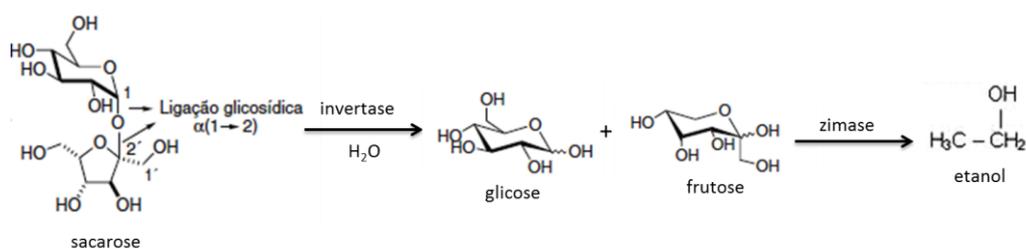
54 O consumo elevado de combustíveis fósseis é considerado o fator responsável
55 por grande parte das crises ambientais, seja pela emissão de gases de efeito estufa
56 durante a combustão, pelo descarte de resíduos ou pelos derramamentos acidentais que
57 ocorrem nos mares e oceanos (dos Santos 2012). Pesquisas relacionadas ao
58 desenvolvimento de novas tecnologias de produção de energia a partir de biomassa
59 surgem como alternativa ao uso de combustíveis fósseis como o petróleo (Blottnitz &
60 Curran 2006). O termo biocombustível refere-se às fontes de energia produzidas a partir
61 de biomassa, destinadas ao setor de transporte e a geração de energia elétrica por meio
62 de motores, turbinas ou células, podendo ser líquidos como o álcoois e biodiesel, ou
63 gasosos como hidrogênio e metano (Demirbas 2008).

64 Os biocombustíveis apresentam várias vantagens quando comparados aos
65 combustíveis fósseis, dentre elas podemos citar: (i) fonte de energia renovável e
66 facilmente disponível, (ii) baixo custo de produção, (iii) segurança no manuseio e
67 armazenamento (iv) utilização de rejeitos como matéria prima para sua produção
68 (Vasudevan *et al.* 2005), (v) contribuem para a estabilização da concentração do gás
69 carbônico (CO₂) na atmosfera, (vi) são biodegradáveis, (vii) contribuem para a
70 sustentabilidade, (viii) geram empregos na zona rural (Puppan 2002). Além disso, o uso
71 de combustíveis renováveis é uma alternativa para a diminuição do aquecimento global,
72 uma vez que o teor de carbono que faz parte da sua constituição é derivado do carbono
73 que foi retirado da atmosfera para o crescimento da biomassa vegetal, através da
74 fotossíntese, e só está sendo relançado na atmosfera. Dessa forma, permite a ciclagem
75 do carbono, e conseqüentemente o equilíbrio consumo-liberação de CO₂ (Difiglio
76 1997). Com os combustíveis fósseis esse equilíbrio não acontece, pois o petróleo é
77 composto de carbono imobilizado, que, no refinamento, libera CO₂ retirado da
78 atmosfera do planeta há milhões de anos; não havendo nenhum mecanismo para
79 recapturá-lo (Dal Soglio & Kubo 2009).

80 Contudo, apesar das vantagens, a produção de combustíveis renováveis
81 representa apenas 13,2% da produção energética mundial (EPE 2013). Neste sentido, o
82 Brasil é reconhecido mundialmente por seu pioneirismo na introdução do
83 biocombustível em sua matriz energética, devido ao programa Proálcool lançado na
84 década de 1970 que incentivou a produção de etanol com o objetivo de reduzir a

85 importação de petróleo (Bertelli 2005). A produção bioenergética do país é de 42,4%,
 86 sendo 15,4% a partir da cana de açúcar como matéria prima para obtenção de etanol
 87 (EPE 2013).

88 O etanol é um composto orgânico oxigenado, também denominado álcool
 89 etílico, de fórmula química C_2H_5OH , empregado, principalmente, na forma de
 90 combustível veicular, sendo que para carros a álcool ou “flex fuel” é utilizado o álcool
 91 hidratado (com 5% de água), enquanto o álcool anidro (puro) é misturado à gasolina
 92 (Petrobrás 2007). Para a produção de etanol, a cana de açúcar é moída para a obtenção
 93 do caldo (garapa) com alto teor de sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), que posteriormente é tratado.
 94 O bagaço e a palha, provenientes da moagem da cana, não são aproveitados diretamente
 95 na produção. Esses resíduos são utilizados nas caldeiras, onde são queimados e
 96 fornecem energia elétrica que é utilizada pela própria usina sucroenergéticas (Alcarde
 97 2007). A fermentação alcoólica (Figura 1) é um processo anaeróbico onde, em presença
 98 da enzima invertase, a sacarose é convertida em glicose e frutose que, sob a ação da
 99 enzima zimase, fornecem etanol (etanol de primeira geração) e dióxido de carbono
 100 (Rocha 2012). Esse processo envolve diversas reações que são catalisadas por enzimas
 101 glicolíticas específicas encontradas principalmente na levedura *Sacaromices cerevisiae*,
 102 com o objetivo de produzir energia para seu crescimento e reprodução (Lima *et al.*
 103 2001).



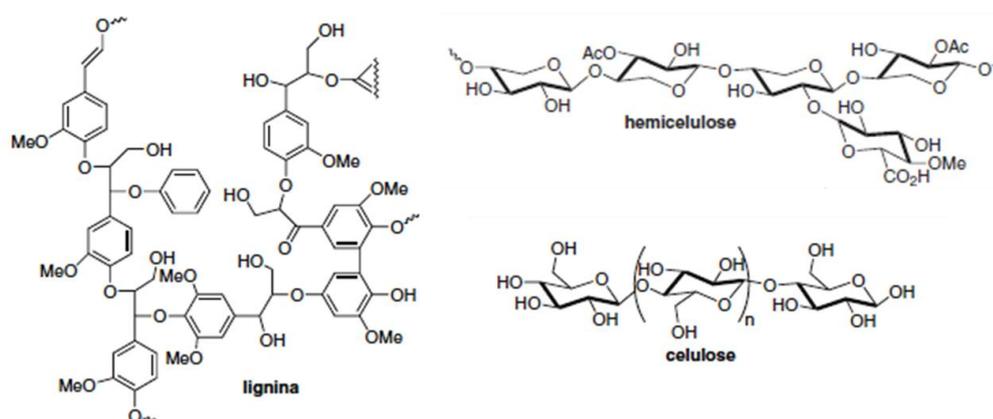
105 Figura 1: Obtenção de etanol de primeira geração através da hidrólise enzimática. Modificado de Ferreira
 106 e Rocha (2009).

107

108 As vantagens do uso do etanol em relação aos outros biocombustíveis são: baixo
 109 custo de implementação, pois a infraestrutura é a mesma para a produção de açúcar, a
 110 tecnologia de automóveis com motor a álcool ou flex já está estabelecida, a biomassa de
 111 cana de açúcar produzida por unidade de área é superior às outras biomassas vegetais, a
 112 quantidade de biocombustível produzido por unidade de área é superior a qualquer outra

113 cultura e a razão entre a produção de energia e o consumo de energia para produção é
 114 positiva (Leite & Cortez 2008). No entanto, essa produção bioenergética vem
 115 enfrentando problemas, principalmente em relação ao período de entressafra da cana de
 116 açúcar, de dezembro a abril, onde a produção de etanol é zero, gerando aumento do
 117 preço do produto (Santos 2011). Para isso, pesquisas vêm sendo realizadas com o
 118 intuito de reaproveitar a biomassa lignocelulósica (bagaço e palha), proveniente do
 119 etanol de primeira geração, para produção de etanol de segunda geração. Neste
 120 contexto, estima-se que o aproveitamento integral da cana de açúcar, aumentaria a
 121 produção de etanol dos atuais 7.000 L para aproximadamente 14.000 L por hectare, não
 122 havendo necessidade de expansão da área cultivada (Santos *et al.* 2012).

123 A biomassa lignocelulósica é formada por cadeias de celulose que são ligadas
 124 entre si por pontes de hidrogênio, constituindo microfibrilas; lignina que envolve a
 125 celulose, e hemicelulose que proporciona a ligação entre a celulose e a lignina (Bidlack
 126 *et al.* 1992). Esses três componentes (Figura 2) formam uma rede fibrosa, apresentando
 127 dificuldades para a hidrólise da celulose, pois a lignina funciona como uma barreira
 128 física para a ação enzimática; a interação intra e intermolecular e a ausência de água na
 129 estrutura da microfibrila, confere à celulose uma estrutura, em sua maior parte,
 130 cristalina, sendo difícil de ser quebrada, aumentando, assim, o custo da produção de
 131 etanol de segunda geração (Fengel & Wegener 1989).



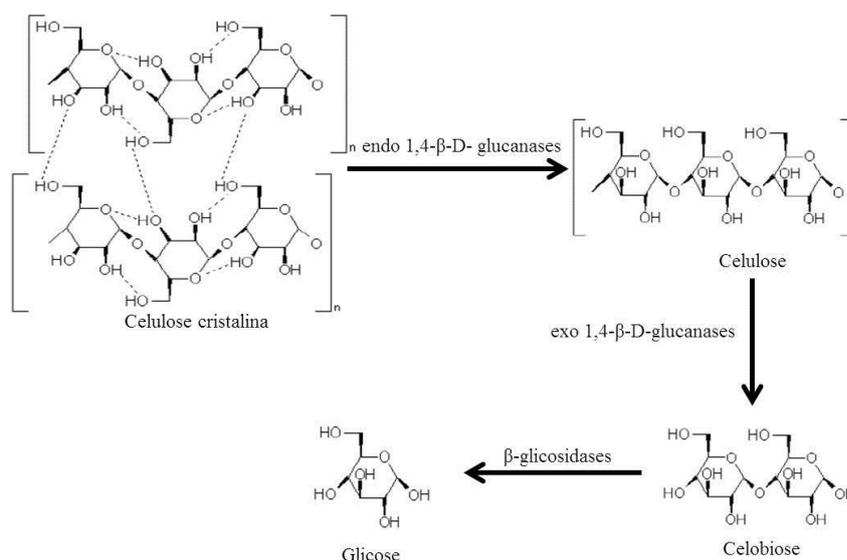
138 Figura 2: Estruturas dos componentes lignocelulósicos. Modificado de Ferreira e Rocha (2009).

139

140 Para a obtenção de etanol celulósico, é necessária a realização de um pré-
 141 tratamento que tem por finalidade remover a lignina e a hemicelulose, e diminuir o grau

142 de cristalização da celulose, facilitando a hidrólise enzimática. Esse pré-tratamento pode
 143 ser físico, químico ou biológico (Canilha *et al.* 2010). As enzimas envolvidas na
 144 hidrólise da biomassa lignocelulósica são denominadas celulases. As celulases poder ser
 145 classificadas em endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades. As exo 1,4- β -D-
 146 glucanases possuem afinidade pela extremidade da cadeia de glicose e as endo 1,4- β -D-
 147 glucanases com afinidade no interior da cadeia (Aro *et al.* 2005). As β -glicosidades não
 148 atuam diretamente na degradação da celulose, elas hidrolisam as ligações glicosídicas
 149 da celobiose, formando glicose. Essa enzima é encontrada em baixa concentração em
 150 coquetéis enzimáticos e sofre inibições em altas concentrações de glicose (Duff &
 151 Murray 1996).

152 Durante a hidrólise enzimática, as endo-(1,4)- β -D-glucanases irão quebrar as
 153 ligações internas (β -1,4) reduzindo o grau de polimerização da celulose, expondo as
 154 microfibrilas à hidrólise enzimática e liberando oligossacarídeos com extremidades
 155 redutoras e não-redutoras livres. As exo-(1,4)- β -D-glucanases irão atuar nas
 156 extremidades da cadeia, liberando glicose e celobiose. As β -glicosidades irão hidrolisar
 157 a celobiose e os oligossacarídeos a glicose (Aro *et al.* 2005). Após a ação do complexo
 158 celulósico enzimático, a glicose obtida será transformada, através da fermentação
 159 alcoólica, em etanol celulósico (Figura 3).



160

161 Figura 3: Obtenção de etanol de segunda geração através da hidrólise enzimática. Modificado de
 162 Bortolazzo (2011).

163 A produção de enzimas celulósicas ocorre, principalmente, por microrganismos
164 como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Wilson 2008). Atualmente, são
165 produzidos comercialmente coquetéis enzimáticos, como AcceleraseTM 1000,
166 Novozyme 188, Celluclast 1.5 L e Multifect CX 10L. Esses compostos de celulasas e
167 hemicelulasas são produzidos à partir dos fungos filamentosos *Trichoderma reesi* e
168 *Aspergillus niger* (Castro *et al.* 2010; Maeda *et al.* 2011; Bauer & Gibbons 2012).
169 Entretanto, a obtenção dessas enzimas por meio de microrganismos representa,
170 aproximadamente, 50% do custo total de produção do etanol lignocelulósico,
171 encarecendo o produto (Wyman 2001). Além disso, os produtos comerciais apresentam
172 baixa quantidade de β -glicosidases, e, como consequência, baixa conversão de celobiose
173 em glicose, e retro-inibição pelo produto final (Sun & Cheng 2002). Estudos
174 demonstram que coquetéis enzimáticos produzidos por *Penicillium funiculosum*
175 apresentam melhor atividade enzimática na conversão de celulose em glicose do que os
176 disponíveis comercialmente (Singh *et al.* 2009).

177 Diante do cenário atual, uma alternativa que vem ganhando destaque são as
178 biofábricas que, através do melhoramento e manipulação genética de determinados
179 organismos com elevada capacidade energética, produzem grandes quantidades da
180 substância de interesse, permitindo a integração entre a agroenergia e a biorrefinaria
181 (Faleiro & Farias Neto 2008). A modificação genética de um organismo pela introdução
182 de sequências de DNA exógenas em seu genoma que irá direcionar a produção de
183 proteínas recombinantes permitindo um aumento na produtividade de uma determinada
184 substância ou a síntese de novas. Essa técnica baseada na tecnologia do DNA
185 recombinante difere da recombinação genética, pois as alterações não ocorrem através
186 de processos naturais dentro da célula, e sim por manipulação humana.

187 Para tornar a produção de proteína recombinante mais eficiente, é possível
188 melhorar sua tradução ribossomal por meio da otimização de códons que possibilita
189 aumentar a expressão de determinada proteína alterando os códons do gene alvo para
190 que se assemelhem ao padrão de utilização de códons do hospedeiro (Kink *et al.* 1991).
191 Esse ajuste ocorre por uma substituição de um códon de baixa frequência por outro de
192 alta frequência, conforme a distribuição de frequência da espécie desejada (Kane 1995).
193 Para genes heterólogos, a otimização do códon é um passo essencial para aumentar a
194 eficiência de expressão e, conseqüentemente, as taxas de tradução. Além disso, a
195 otimização de códon deve diminuir a suscetibilidade do gene heterólogo de ser

196 silenciado (Heitzer *et al.* 2007). Outros meios são usados para melhorar a manipulação
197 genética, como desenvolvimento de sequências promotoras mais adequadas,
198 acentuadores de expressão gênica e sinais de secreção de proteínas.

199 Nesse contexto, o cultivo de microalgas vem ganhando destaque nas pesquisas.
200 Esses microrganismos são amplamente empregados na aquicultura, através da sua
201 utilização para alimentação de moluscos, peixes e camarões (Muller-Feuga 2000), em
202 sistemas de bioflocos (bio-flocs technology – BFT) (De Schryver *et al.* 2008) e no
203 tratamento de efluentes de cultivo (Sivakumar *et al.* 2009). Além disso, destaca-se o seu
204 potencial biotecnológico para produção de produtos com alto valor comercial (Derner *et*
205 *al.* 2006). A utilização de microalgas modificadas geneticamente para a produção e
206 secreção em grandes quantidades de β -glicosidases resistentes à inibição por glicose
207 poderá permitir o aproveitamento de resíduos gerados do etanol de primeira geração
208 para a produção de etanol de segunda geração (Natércia *et al.* 2006).

209 As biofábricas de proteínas recombinantes baseadas em microalgas têm
210 despertado grande interesse, pois possui baixo custo de produção, menor tempo de
211 cultivo, crescimento fotoautotrófico, capacidade de sintetizar proteínas multiméricas
212 complexas, pode expressar genes recombinantes no genoma nuclear, plastidial e
213 mitocondrial e algumas espécies podem acumular até 70% de sua biomassa na forma de
214 proteínas. Além de todas essas vantagens, as proteínas produzidas são consideradas
215 seguras devido à ausência de contaminação viral ou por endotoxina bacteriana e podem
216 ser cultivadas em ambientes fechados, reduzindo assim a possibilidade de fluxo gênico
217 horizontal (Rasala *et al.* 2010).

218 A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* é uma espécie unicelular flagelada
219 com o genoma nuclear, de aproximadamente 121 Mb, com 64% de conteúdo de GC,
220 totalmente sequenciado. Também estão disponíveis as sequências para o genoma
221 mitocondrial (~15.8 Kb) e do cloroplasto (~200 kb) (Merchant *et al.* 2007). Esse
222 microrganismo tem capacidade de produzir proteínas de secreção quando a expressão
223 gênica ocorre no núcleo e seu cloroplasto contém uma grande quantidade de proteínas
224 chaperonas e dissulfeto isomerases que auxiliam na configuração funcional das
225 proteínas recombinantes, quando é expressa no cloroplasto (Levitan *et al.* 2005). Alguns
226 pesquisadores demonstraram em seus trabalhos que é possível a produção de proteínas

227 recombinantes em *C. reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont 1991; Fuhrmann *et al.* 1999;
228 Ishikura *et al.* 1999; Minko *et al.* 1999; Franklin *et al.* 2002; Mayfield *et al.* 2004).

229 Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias para a
230 obtenção de etanol celulósico a baixo custo, o Laboratório de Biologia Molecular do
231 Instituto de Ciências Biológicas (ICB/FURG) em parceria com a EMBRAPA
232 Agroenergia (Brasília – DF) propõem a utilização de *Chlamydomonas reinhardtii* como
233 uma plataforma para produção de β -glicosidases recombinantes. A aplicação de técnicas
234 de manipulação genética associadas à otimização de códons para potencializar a
235 expressão de genes heterólogos poderia funcionar como um modelo de biofábrica a
236 baixo custo, além de diminuir o impacto ambiental causado pela emissão de carbono
237 das usinas sucroenergéticas já que o cultivo de microalgas poderia aproveitar as
238 emissões de carbono geradas pela própria usina.

239

240 **2. OBJETIVOS**

241 2.1. OBJETIVO GERAL

242 Produzir microalgas transgênicas capazes de produzir e secretar β -glicosidases,
243 em grandes quantidades, que degradem o bagaço da cana de açúcar para produção de
244 etanol celulósico.

245 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

246 – Produzir construções genéticas para a expressão e secreção de duas β -
247 glicosidases de origem procarionte;

248 – Transformar geneticamente a microalga *C. reinhardtii* através de eletroporação
249 e selecionar os clones geneticamente modificados altamente produtivos;

250 – Determinar a atividade das β -glicosidases produzidas pelos clones
251 geneticamente modificados de *C. reinhardtii* visando selecionar aqueles mais
252 produtivos;

253 – Testar a eficiência das β -glicosidases recombinantes na degradação da
254 celobiose proveniente da celulose do bagaço da cana de açúcar.

255 3. MATERIAL E MÉTODOS

256 Os experimentos serão conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do
257 Instituto de Ciência Biológicas (ICB/FURG).

258 3.1. OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE B-GLICOSIDASES

259 As sequências de β -glicosidases serão provenientes do banco de dados das
260 bibliotecas metagenômicas obtidas no projeto INSUMICRO, Embrapa Agroenergia.

261 3.2. OTIMIZAÇÃO DE CÓDONS

262 As sequências da enzima β -glicosidase, provenientes da Embrapa Agroenergia,
263 serão otimizadas usando o software OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>)
264 de acordo com a tabela de frequência de códon de *C. reinhardtii* para a expressão
265 nuclear proveniente do trabalho de Ramos 2013 (em preparação). As construções
266 genéticas serão sintetizadas pela GeneArt (Life Technologies) através do anelamento de
267 oligonucleotídeos.

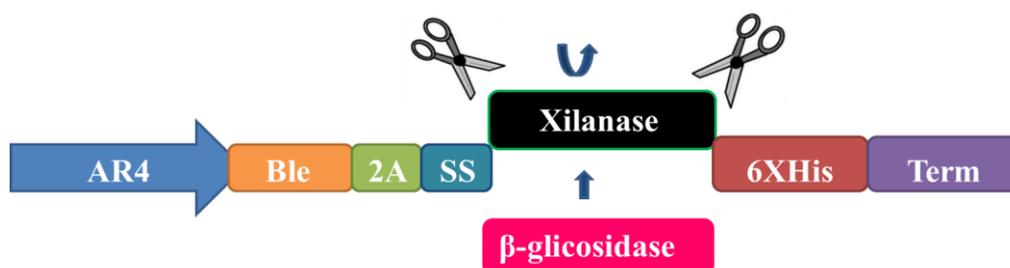
268 3.3. CONSTRUÇÕES GENÉTICAS

269 Recentemente, Rasala *et al.* (2012) construíram um transgene nuclear (pBle2A-
270 SP-Xyn1) em *C. reinhardtii* para a produção e secreção de proteínas recombinantes. A
271 metodologia desenvolvida permite que as proteínas recombinantes produzidas pelas
272 microalgas sejam secretadas para o meio de cultivo, o que facilita a extração e a
273 purificação das proteínas produzidas.

274 O vetor de expressão (pBle2A-SP-Xyn1) usa um sinal de clivagem do vírus de
275 mão-pé-boca (FMDV 2A), permitindo fusionar o transgene de expressão ao de seleção
276 das cepas transgênicas (Fig. 4). Assim, quando FMDV 2A é fusionado, após a tradução,
277 duas proteínas são produzidas (a proteína de interesse e a proteína de seleção de cepas
278 transgênicas). No transgene pBle2A-SP-Xyn1, a sequência do FMDV 2A uniu o gene
279 de resistência da zeocina/bleomicina (*sh-ble*) com o gene da enzima xilanase, o qual
280 continha o sinal de secreção *ars1* da própria *C. reinhardtii*. O uso de um sinal de
281 secreção direciona a proteína produzida para o meio extracelular evitando a sua quebra
282 durante a extração. Além disso, há um marcador, cauda de histidina (6XHis), no final
283 do gene da xilanase que permite que a proteína seja recuperada do meio, facilitando a
284 sua purificação através de cromatografia (Lauersen *et al.* 2012). O gene *sh-ble* confere

285 resistência aos antibióticos que atuam fragmentando as moléculas de DNA, assim, as
 286 cepas transgênicas que possuem alta expressão do transgene de interesse serão
 287 selecionadas pelo antibiótico. Para dirigir a expressão do gene *sh-ble* e da xilanase, o
 288 plasmídeo pBle2A-SP-Xyn1 contém a sequência promotora do gene da proteína de
 289 choque térmico 70 (*hsp70*) que foi modificada para conter quatro cópias do primeiro
 290 íntron da *rbsc2* e, posteriormente, o promotor da *rbsc2* (AR4).

291 Na presente proposta, a construção genética (pBle2A-SP-Xyn1) será avaliada
 292 como vetor de expressão para a produção de β -glicosidases em *C. reinhardtii*. Dessa
 293 forma, a sequência do gene da xilanase no transgene pBle2A-SP-Xyn será substituída
 294 pelo gene da β -glicosidase (Figura 4).



295

296 Figura 4. Vetor de expressão pBle2A-SP-Xyn1. A sequência do gene da xilanase será substituída pelo
 297 gene da β -glicosidase. (SS): sinal de secreção; (6xHis) cauda de histidina; (Term) região de terminação;
 298 (AR4) região promotora; (Ble) gene de resistência a zeocina/bleomicina; (2A) sinal de clivagem.

299

Modificado de Rasala et al. (2012).

300

301 3.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE MICROALGAS 302 TRANSGÊNICAS

303 As microalgas serão cultivadas no meio TAP (Tris-acetato-fosfato; Gibco)
 304 suplementadas com 200 μ g/ml de arginina com iluminação constante a 25°C. A cepa de
 305 *Chlamydomonas reinhardtii* utilizada será a CC3395 que apresenta parede atenuada,
 306 facilitando a eletroporação e a secreção da proteína recombinante para o meio de
 307 cultivo. As microalgas serão transformadas por eletroporação usando o protocolo
 308 descrito no GeneArt *Chlamydomonas* Engineering Kits (Life Technologies).

309

310 3.5. SELEÇÃO DAS MICROALGAS TRANSGÊNICAS

311 Após a eletroporação, as microalgas serão cultivadas durante 18 horas em 5 ml
312 de meio TAP contendo 40 mM de sacarose. Posteriormente, as microalgas serão
313 centrifugadas a 2500 x g por 10 min e serão ressuspensas em 150 µl de TAP contendo
314 40 mM de sacarose. As microalgas serão plaqueadas em placas contendo àgar, arginina
315 (200 µg/ml) e o antibiótico zeocina (10 µg/ml). As colônias que crescerem nas placas
316 contendo antibiótico serão transferidas para o cultivo no meio líquido (TAP + arginina).

317 Para identificar as cepas com altas taxas de transcrição do gene da β-glicosidase,
318 o RNA será extraído e o cDNA será sintetizado usando o High-Capacity cDNA Reverse
319 Transcription Kit (Applied Biosystems) conforme as sugestões do fabricante. O cDNA
320 será usado como molde para as reações de PCR em tempo real. Primers específicos
321 serão desenhados para cada gene da β-glicosidase selecionado usando o software
322 Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>). Genes de expressão constitutiva
323 serão usados como normalizadores. Os dados de expressão serão analisados usando o
324 software geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002).

325 As cepas transgênicas com alta expressão do gene da β-glicosidase serão
326 submetidas a testes de crescimento para verificar se a construção genética transferida
327 não está produzindo nenhum efeito colateral negativo sobre as microalgas.

328 3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS B-GLICOSIDASES

329 **3.6.1. A atividade das β-glicosidases baseada na concentração de proteínas solúveis** 330 **totais**

331 As microalgas transgênicas e não-transgênicas (controle negativo) serão
332 cultivadas até a fase log. Posteriormente, serão coletadas por centrifugação em 5000 x g
333 por 10 min. As células serão lisadas por sonificação e centrifugadas em 12000 x g por 10
334 min. A concentração de proteína solúvel total será medida por fluorescência usando o
335 fluorímetro Qubit e o Quant-iT® Protein Assay Kit (Life Technologies). A atividade
336 das β-glicosidases será medida usando o β-Glucosidase Assay Kit (Abnova).

337 Esse kit contém p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG) que é hidrolisado
338 especificamente por β-glicosidases, liberando p-nitrofenol (pNP) que será quantificado
339 através da absorbância medida a 405 nm. Uma unidade de β-glicosidase corresponde a

340 quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de p-nitrofenol por minuto, a
341 45°C .

342 **3.6.2. Atividade das β -glicosidases no meio de cultivo**

343 Para avaliar a atividade da enzima no meio de cultivo, os meios serão
344 gentilmente centrifugados em $2500 \times g$, para evitar a lise das células. A atividade das β -
345 glicosidases será avaliada no meio de cultivo sem células usando o β -Glucosidase Assay
346 Kit.

347 **3.7. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS B-GLICOSIDASES** 348 **RECOMBINANTES**

349 Para avaliar a estabilidade térmica, o meio de cultivo, contendo β -glicosidase,
350 será incubado em várias temperaturas (30 a 80°C) por 10 min e, posteriormente, após o
351 período de incubação a atividade da β -glicosidase será determinada usando o β -
352 Glucosidase Assay Kit.

353 A estabilidade ao pH será determinada através da incubação do meio de cultivo
354 contendo β -glicosidase em diferentes faixas de pH (3 - 10) por 10 minutos a 50°C e,
355 posteriormente, a atividade será avaliada usando o β -Glucosidase Assay Kit.

356 **3.8. EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICOSE SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

357 Para avaliar os efeitos da glicose sobre a β -glicosidase recombinante, será
358 incubado $50 \mu\text{L}$ da enzima purificada, $250 \mu\text{L}$ de tampão ácido acético/NaOH $0,1\text{M}$ em
359 pH 5 , $250 \mu\text{L}$ de 4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo (PNPG) 4 mM e glicose em
360 concentrações crescentes (0 a 100 mM) por 10 minutos em banho termostático a
361 temperatura e pH ótimos. As concentrações serão ajustadas de acordo com o volume
362 final do meio reacional. A reação será interrompida pela adição 2 mL de NaCO_3 2M e o
363 nitrofenol liberado quantificado em espectrofotômetro a 410 nm .

364

365 **3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

366 A análise estatística para testar as diferenças dos parâmetros analisados dentro
367 dos grupos de linhagens de transgênicos será a “one-way” ANOVA seguida por testes
368 de múltiplas comparações.

369 **3.10. BIOSSEGURANÇA**

370 Para o desenvolvimento de pesquisa com organismos geneticamente
 371 modificados (OGM) a legislação brasileira (Lei 11.105, de 24 de março de 2005)
 372 determina a necessidade de requisição de um CQB (Certificado de Qualidade em
 373 Biossegurança) da instituição interessada junto a Comissão Técnica Nacional de
 374 Biossegurança (CTNBio). A comissão interna de Biossegurança da FURG encaminhou
 375 um pedido de CQB em dezembro/1998 à CTNBio, visando o desenvolvimento do
 376 trabalho de pesquisa em contenção com OGM. O CQB foi aprovado em maio/1999
 377 (CQB No. 0112/99), seguindo as normas determinadas pela Instituição Normativa no.
 378 12 (DOU 28/05/98).

379

380 **4. CRONOGRAMA DE TRABALHO**

Atividades	Março 2013 – Março 2015							
	Trimestre							
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Disciplinas do PGAq	X	X	X	X				
Estágio de docência					X			
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X
Obtenção das sequências de β -glicosidases		X						
Preparação das construções genéticas			X					
Produção das microalgas transgênicas				X				
Seleção das cepas altamente produtivas				X	X			
Avaliação da atividade das β -glicosidases recombinantes				X	X			

Caracterização bioquímica das β -glicosidases recombinantes					X	X		
Análise dos dados obtidos						X	X	
Preparo do artigo para publicação							X	X
Redação da dissertação							X	X
Apresentação da Dissertação								X

381

382 **5. REFERÊNCIAS**

383 ARO, N; T. PAKULA; M. PENTTILÄ. 2005. Transcriptional regulation of plant cell
384 wall degradation by filamentous fungi. FEMS microbiology reviews, 29(4), 719-739.

385 ALCARDE, A.R. 2007. Processamento da cana-de-açúcar. Empresa Brasileira de
386 Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Brasília, DF. Anais.

387 BAUER, N. A., & W. R. GIBBONS. 2012. Saccharification versus simultaneous
388 saccharification and fermentation of kraft pulp. International Journal of Agricultural and
389 Biological Engineering, 5(1), 48 – 55.

390 BERTELLI, L. G. 2005. A verdadeira história do Proálcool. O Estado de Sao Paulo.
391 Sao Paulo, 16.

392 BIDLACK, J.; M. MALONE; R. BENSON. 1992. Molecular structure and component
393 integration of secondary cell walls in plants. Proc. Okla. Acad. Sci, 72: 51 – 56.

394 BLOTTNITZ, HV & M.A. CURRAN. 2006. A review of assessments conducted on
395 bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and
396 environmental life cycle perspective. Journal of Cleaner Production, 15: 07 – 19.

397 BORTOLAZZO, N.G. 2001. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise
398 enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de
399 Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

400 CANILHA, L., A. M. F. MILAGRES; S. S. SILVA; J. B. A. SILVA; M. G. A. FELIPE;
401 G. J. ROCHA; A. FERRAZ; W. CARVALHO. 2010. Sacarificação da biomassa

- 402 lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma
403 estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Revista Analytica*, 44: 48 – 54.
- 404 CASTRO, A.M.; M. L. ALBUQUERQUE DE CARVALHO; S. G. F. LEITE; N.
405 PEREIRA JR. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties
406 and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and*
407 *Biotechnology*, 37: 151 – 158.
- 408 DAL SOGLIO, F. & R. R. KUBO. 2009. Agricultura e sustentabilidade. PLAGEDER.
- 409 DE SCHRYYER, P., CRAB, R., DEFOIRDT, T., BOON, N., VERSTRAETE, W.
410 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*,
411 277(3), 125 – 137.
- 412 DEMIRBAS, A. 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global
413 biofuel projections. *Energy Conversion and Management*. 49(8): 2106 – 2116.
- 414 DERNER, R. B.; S. OHSE; M. VILELA; S. M. D. CARVALHO e R. FETT. 2006.
415 Microalgae, products and applications. *Ciência Rural*. 36(6): 1959 – 1967.
- 416 DIFIGLIO, C. 1997. Using advanced technologies to reduce motor vehicle greenhouse
417 gas emissions. *Energy Policy*. 25: 1173 – 1178.
- 418 DOS SANTOS, V. F. 2012. Biodiesel: O Combustível Ecológico. *Bolsista de Valor*,
419 2(1).
- 420 DUFF, S. J., & MURRAY, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry
421 waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55(1): 1 – 33.
- 422 EPE, Empresa de Pesquisa de Energética. 2013. Disponível em: < <https://ben.epe.gov.br>
423 >. Acessado em: 07/2013.
- 424 FALEIRO, F. G., & A. L. DE FARIAS NETO. 2008. Savanas: desafios e estratégias
425 para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Embrapa Cerrados.
- 426 FENGEL, D. & G. WEGENER. 1989. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*,
427 Walter de Gruyter: Berlin.
- 428 FERREIRA, V. F.; D. R. ROCHA; F. C. SILVA. 2009. Potencialidades e oportunidades
429 na química da sacarose e outros açúcares, *Química Nova*, 32(3): 623 – 638.

- 430 FRANKLIN, S.E.; B. NGO; E. EFFUET; S.P. MAYFIELD. 2002. Development of a
431 GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. The Plant Journal, 30:
432 733 – 744.
- 433 FUHRMANN, M.; W. OERTEL; P. HEGEMANN. 1999. A synthetic gene coding for
434 the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas*
435 *reinhardtii*. The Plant Journal, 19(3): 353 – 361.
- 436 GOLDS-CLERMONT, M. 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenine
437 transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of
438 *Chlamydomonas*. Nucleic acids research, 19: 4083 – 4089.
- 439 HEITZER, M, & B. ZSCHOERNIG. 2007. Short Technical Reports Construction of
440 modular tandem expression vectors for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*
441 using the Cre/lox-system Construction of Plasmids Short Technical Reports.
442 BioTechniques, 43: 324 – 332.
- 443 ISHIKURA, K.; Y. TAKAOKA; K. KATO; M. SEKINE; K. YOSHIDA; A.
444 SHINMYO. 1999. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*
445 chloroplast. Journal of bioscience and bioengineering, 87: 307 – 314.
- 446 KANE, J. F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of
447 heterologous proteins in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 6: 494 –
448 500.
- 449 KINK, J. A.; M. E. MALEY; K. Y. LING; J. A. KANABROCKI and C. KUNG. 1991.
450 Efficient expression of the *Paramecium calmodulin* gene in *Escherichia coli* after four
451 TAA-to-CAA changes through a series of polymerase chain reactions. Journal of
452 Eukaryotic Microbiology, 38: 441 – 447.
- 453 LAUERSEN, K.J.; H. BERGER; J.H. MUSSGNUM; O. KRUSE. 2012. Efficient
454 recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in
455 *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Biotechnology. P in press.
- 456 LEITE, R. C. & L.A. CORTEZ. 2008. O etanol combustível no Brasil. Revista
457 Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas, Ministério das Relações
458 Exteriores.

- 459 LEVITAN, A., T. TREBITSH; V. KISS; Y. PEREG; I. DANGOOR; A. DANON.
460 2005. Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the
461 endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17):
462 6225 – 6230.
- 463 LIMA, U. A.; L. C. BASSO; H. V. AMORIM. 2001. Produção de Etanol. *Biotecnologia*
464 *Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, Edgard Blücher.
465 *Biotecnologia Industrial*, 3:1 – 43.
- 466 MAEDA, R. N.; V. I. SERPA; V. A. L. ROCHA; R. A.A. MESQUITA; L. M. M.
467 SANTA ANNA; A. M. CASTRO; C. E. DRIEMEIER; N. PEREIRA JÚNIOR; I
468 POLIKARPOV. 2011. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using
469 *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*,
470 Oxford : Elsevier Science, 46(5): 1196 – 1201.
- 471 MAYFIELD, SP; J. SCHULTZ. 2004. Development of a Luciferase reporter gene,
472 luxCt, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*, 37: 449 – 458.
- 473 MERCHANT, S.S.; S.E. PROCHNIK; O. VALLON. 2007. The *Chlamydomonas*
474 genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318: 245 –
475 251.
- 476 MINKO, I; S.P. HOLLOWAY; S. NIKAIDO; M. CARTER; O.W. ODOM; C.H.
477 JOHNSON. 1999. Renilla luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression
478 in *Chlamydomonas*. *Molecular and General Genetics MGG*, 262: 421 – 425.
- 479 MULLER-FEUGA, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and
480 trends. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5): 527 – 534.
- 481 NATERCIA, F. 2006. Bioetanol: inovação para manter a liderança. *Inovação Uniemp*,
482 2(2): 32 – 37.
- 483 PETROBRAS. 2007. *Comunicação Institucional do Abastecimento da,*
484 *Biocombustíveis: 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado*. 1 ed., Ed. Setprint
485 Gráfica e Editora.
- 486 PUPPAN, D. 2002. Environmental evaluation of biofuels. *Social and Management*
487 *Sciences*, 10: 95 – 116.

- 488 RAMOS, J. C. 2013. Otimização de códons para produção de proteínas recombinantes
489 na microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Monografia. Universidade Federal de Rio
490 Grande, Rio Grande.
- 491 RASALA, B. A.; M. MUTO; P. A. LEE; M. JAGER; R. M. CARDOSO; C. A.
492 BEHNKE e S. P. MAYFIELD. 2010. Production of therapeutic proteins in algae,
493 analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas*
494 *reinhardtii*. Plant biotechnology journal, 8(6): 719 – 733.
- 495 RASALA, B.A.; P.A. LEE; Z. SHEN; S.P. BRIGGS; M. MENDEZ; S.P. MAYFIELD.
496 2012. Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by
497 fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. PloS one, 7: 433
498 – 349.
- 499 ROCHA, L. P. 2012. Biocombustíveis: uma alternativa eficaz e menos agressiva ao
500 meio ambiente. Bolsista de Valor, 2(1).
- 501 SANTOS, G. S. 2011. Concorrência ampliada dos produtos do sorgo sacarino na
502 entresafra da cana-de-açúcar no Brasil. Embrapa.
- 503 SANTOS, F. A., J. H. de QUEIRÓZ; J. L. COLODETTE; S. A. FERNANDES; V. M.
504 GUIMARÃES e S. T. REZENDE. 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para
505 produção de etanol. Química Nova, 35(5): 1004 – 1010.
- 506 SINGH, R.; A. J. VARMA; R. S. LAXMAN; M. RAO. 2009. Hydrolysis of cellulose
507 derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with
508 commercial cellulose. Bioresource Technology, 100: 6679 – 6681.
- 509 SIVAKUMAR, G.; J. XU; R. W. THOMPSON; Y. YANG; P. RANDOL-SMITH e P.
510 J. WEATHERS. 2012. Integrated green algal technology for bioremediation and
511 biofuel. Bioresource Technology, 107: 1 – 9.
- 512 SUN, Y. e J. CHENG. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol
513 production: a review. Bioresource technology, 83(1): 1 – 11.
- 514 VANDESOMPELE, J.; K. DE PRETER; F. PATTYN; B. POPPE; N.V.ROY; A. DE
515 PAEPE; F. SPELEMAN. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-

516 PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*,
517 3(7), research0034.

518 VASUDEVAN, P.; S. SHARMA; A. KUMAR. 2005. Liquid fuel from biomass: an
519 overview. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64: 822 – 831.

520 WILSON, D.B. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals*
521 *of the New York Academy of Sciences*, 1125(1): 289 – 297.

522 WYMAN, C. E. 2001. Twenty years of trials, tribulations, and research progress in
523 bioethanol technology. *Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and*
524 *Chemicals*. Humana Press. 5 – 21.

525

526 6. ORÇAMENTO

Material de consumo			
Item	Quant.	Valor unitário	Valor total
Ágar (Sigma)	1kg	300,00	300,00
Cepa <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC3395	1tubo	100,00	100,00
Meio de cultivo TAP 1 L (Gibco)	2	250,00	500,00
L-Arginina 50 g (Sigma)	1	120,00	120,00
Higromicina B 50 mL (Invitrogen)	1	400,00	400,00
Síntese de oligonucleotídeos	-	-	1.500,00
Síntese das construções genéticas	-	-	5.000,00
SYBR Green 1x5 mL (Invitrogen)	3	660,00	1.980,00
Vidraria	-	-	500,00
Agarose (Invitrogen)	100g	800,00	800,00

Taq Platinum 100 U (Invitrogen)	2	443,00	886,00
Marcador 1KBplus DNA Ladder (Invitrogen)	1	800,00	800,00
Trizol 100 mL (Invitrogen)	2	604,00	1.209,00
High capacity cDNA reverse transcription kit	1	1.200,00	1.200,00
PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)	2	1.100,00	2.200,00
PCR DNA and Gel Band Purification Kit	2	450,00	900,00
Quant-iT® Protein Assay Kit (Life Technologies)	1	300,00	300,00
Sacarose 240g (Sigma)	1	199,00	199,00
4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo 100mg	1	302,00	302,00
β-Glucosidase Assay Kit (Abnova)	1	988,00	988,00
Glicose (Sigma)	1Kg	127,00	127,00
Zeocina 250 mg (Life Technologies)	1	259,00	259,00
Material plástico descartável	-	-	1.500,00
Orçamento total		R\$ 22.070,00	

527

528

529

530

531

532

533



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Rio Grande, 29 de agosto de 2013.

DECLARAÇÃO

Venho pela presente a declarar que o projeto de pesquisa a ser desenvolvido pela aluna **Raíza dos Santos Azevedo** será integralmente realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, do qual sou responsável.

Fico a disposição para responder qualquer dúvida ou consulta.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Fernando Marins
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Universidade Federal do Rio Grande-FURG

534

535

536

537

538

539



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Rio Grande, 29 de agosto de 2013.

DECLARAÇÃO

Venho pela presente a declarar que o projeto de pesquisa a ser desenvolvido pela aluna **Raíza dos Santos Azevedo** possui financiamento através de projetos apoiados pela CAPES, CNPq, e EMBRAPA AGROENERGIA, o que garante a viabilidade do projeto desde o ponto de vista financeiro.

Fico a disposição para responder qualquer dúvida ou consulta.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Fernando Marins
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Universidade Federal do Rio Grande-FURG

Ciência:

Raíza dos Santos Azevedo
Aluna Programa de Pós-graduação em Aquicultura