

# MELHORAMENTO GENÉTICO DE MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E QUÍMICOS RENOVÁVEIS:

INTEGRAÇÃO DE ABORDAGENS DE BIOLOGIA MOLECULAR, BIOLOGIA SISTÊMICA, BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA

Por: Léia Cecília de Lima Fávoro\*

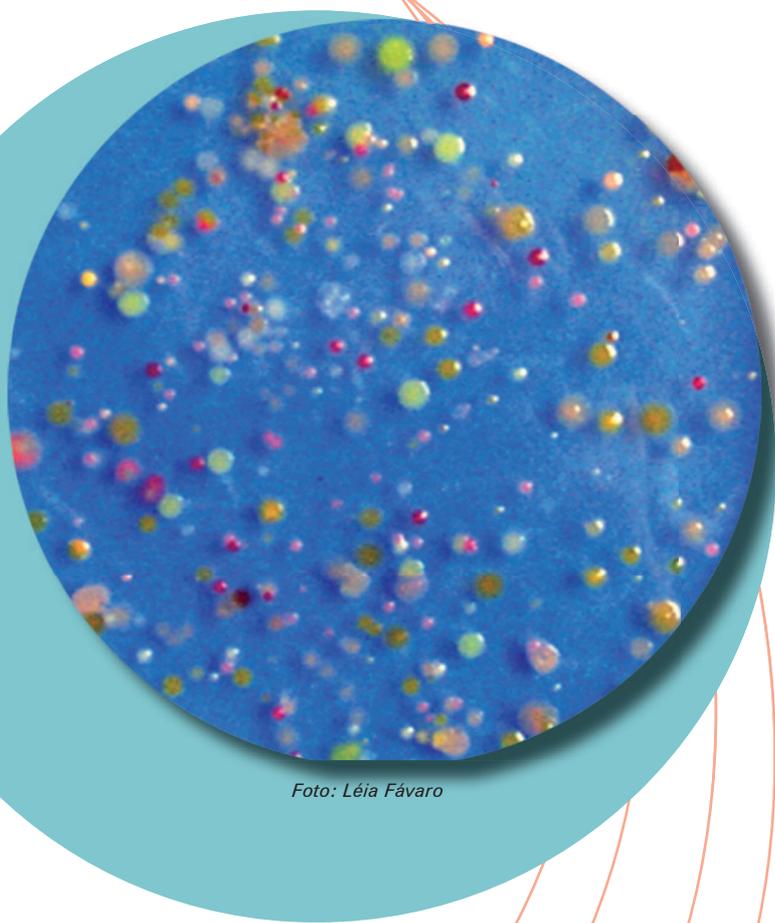
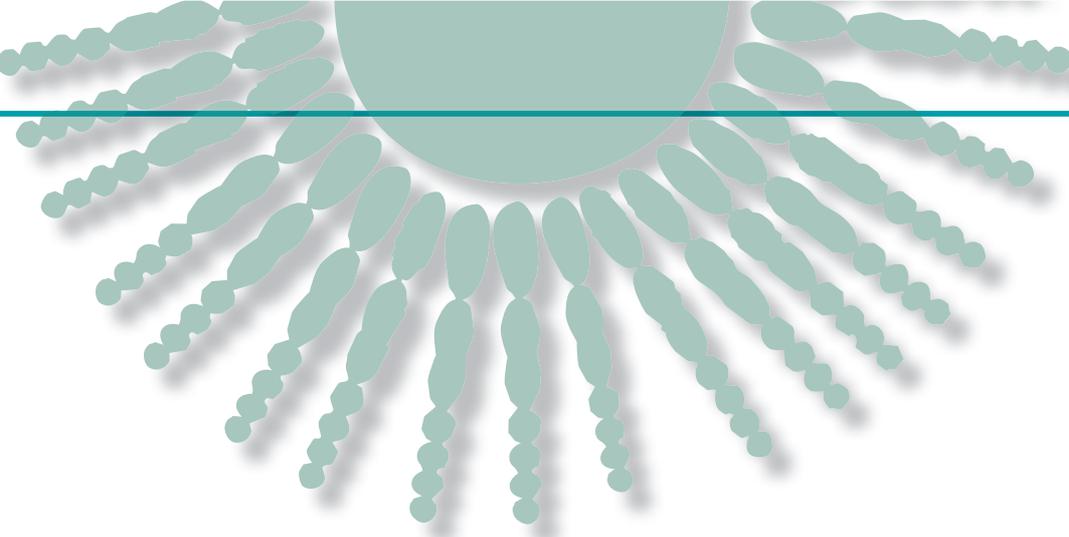


Foto: Léia Fávoro

Os microrganismos (bactérias, arqueias, fungos) são uma fonte prolífica de diversas moléculas, algumas das quais são usadas como combustíveis, especialidades químicas, polímeros, fármacos, nutracêuticos, antibióticos e enzimas industriais, apenas para citar alguns exemplos. Em função disso, os microrganismos são cada vez mais considerados atores importantes da bioeconomia. O interesse na produção de combustíveis e químicos a partir de fontes renováveis tem catalisado numerosas pesquisas que focam no desenvolvimento de sistemas microbianos para produção de uma série de bioprodutos. Por exemplo, a Dupont desenvolveu um processo de produção de 1,3 propanodiol (usado na produção de polímeros), utilizando *Escherichia coli* recombinante; a DSM desenvolveu uma rota biotecnológica completa para produção do antibiótico cefalexina, em substituição a conversão química da penicilina; a BASF desenvolveu uma rota biotecnológica completa para produção de riboflavina, em substituição a síntese química; a ExxonMobil e a Synthetic Genomics uniram-se para desenvolver um processo baseado em microalgas para produção de biodiesel; a Novozymes e a Cargill uniram-se com o objetivo de desenvolver uma rota biotecnológica para produção de ácido 3-hidroxi propiônico (usado na produção de acrilatos); a Gevo desenvolveu um processo bioquímico para produção de isobutanol; a Amyris desenvolveu um processo baseado em leveduras para produção de farneseno, o qual pode ser convertido em farnesano (combustível) e em esqualeno (usado em cosméticos). Estes exemplos demonstram que diversas empresas líderes de diferentes setores estão utilizando soluções biotecnológicas baseadas



em microrganismos para o desenvolvimento de processos sustentáveis de produção de combustíveis e químicos diversos.

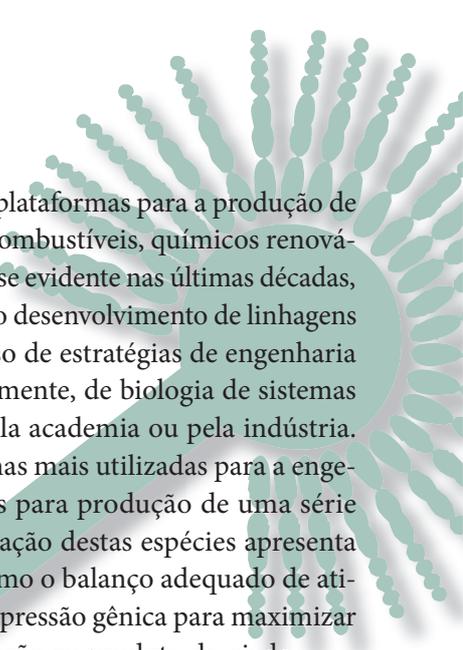
Para o desenvolvimento de fábricas celulares microbianas robustas e eficientes, é necessário escolher o microrganismo que será usado como base para a produção de determinado composto de interesse. A seleção do microrganismo pode ser baseada em diversos critérios, por exemplo, seleção a partir da biodiversidade. Como é comum na área de microbiologia industrial, muitas vezes o caminho entre a seleção de um microrganismo e a produção industrial de um bioproduto pode ser bastante longo e custoso. Nesse aspecto, muitas vezes são escolhidas espécies microbianas para as quais um grande corpo de conhecimento de fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular está disponível. Exemplos de espécies microbianas geralmente utilizadas como plataformas industriais (ou chassis) incluem a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, as bactérias *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* e *Bacillus subtilis*, os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *Trichoderma reesei*, entre outros.

De fato, na indústria existe interesse na utilização de um número limitado de plataformas microbianas para a produção de diversos tipos de combustíveis e químicos, o que permite flexibilidade das linhas de produção, as quais demandam alto investimento. Um exemplo claro desta situação é a produção de enzimas industriais, as quais são produzidas por um número limitado de espécies de bactérias e fungos. De modo geral, entre as espécies microbianas que são alvo constante de intensa modificação genética para produção de biocombustíveis e químicos renováveis podemos citar *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*.

A importância destas duas plataformas para a produção de bioprodutos diversos (biocombustíveis, químicos renováveis, fármacos, etc.) tornou-se evidente nas últimas décadas, especialmente em função do desenvolvimento de linhagens produtoras por meio do uso de estratégias de engenharia metabólica, e mais recentemente, de biologia de sistemas e biologia sintética, seja pela academia ou pela indústria. Embora sejam as plataformas mais utilizadas para a engenharia de vias metabólicas para produção de uma série de bioprodutos, a manipulação destas espécies apresenta desafios intrínsecos tais como o balanço adequado de atividades enzimáticas e de expressão gênica para maximizar o fluxo metabólico em direção ao produto desejado.

Diversos tipos de biocombustíveis (ou precursores) e químicos renováveis têm sido produzidos por microrganismos geneticamente modificados. As linhagens geneticamente modificadas podem ser capazes de converter não somente açúcares simples tais como glicose ou sacarose, mas também os demais açúcares da biomassa lignocelulósica em compostos de interesse. Os combustíveis (ou precursores) produzidos por microrganismos geneticamente modificados são moléculas derivadas de álcoois, de ácidos graxos, de isoprenóides e de policetídeos. Entre os químicos renováveis que têm sido produzidos por rota microbiana, destacam-se uma série de intermediários químicos (1,3-propanodiol; 1,2-propanodiol; ácido 3-hidroxipropiônico; ácido lático; ácido succínico; polihidroxialcanoatos, etc), os quais servem como blocos construtores para produção de compostos de alto valor agregado.

Entre os combustíveis derivados de álcoois, além do etanol (2 carbonos), podemos citar a produção microbiana de álcoois de cadeia mais longa (3 a 5 carbonos), tais como



isopropanol, 1-propanol, 1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, isopentenol. Estes álcoois podem ser misturados com a gasolina, ou modificados de diversas maneiras para produção de compostos para uso como combustíveis, aditivos, ou químicos diversos. Butanol e isobutanol merecem destaque, pois têm alcançado as fases mais avançadas de comercialização, por exemplo, por empresas tais como Gevo, Butalco e Butamax Advanced Biofuels. O butanol é naturalmente produzido por bactérias do gênero *Clostridium*, mas a produção nestes hospedeiros nativos é limitada, o que tem levado ao desenvolvimento de novas fábricas celulares para produção desse álcool. O organismo de escolha das três empresas foi a levedura *S. cerevisiae*, a qual também possui a capacidade natural de produzir butanol. No entanto, as estratégias de engenharia metabólica empregadas por estas empresas para síntese de butanol e isobutanol são distintas. Por exemplo, há casos em que a via biossintética de C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> de *Clostridium* foi transferida para *Saccharomyces* seguida de diversos ajustes, e também há casos em que se optou pelo redirecionamento de vias biossintéticas de aminoácidos específicos, uma vez que álcoois de cadeia mais longa podem ser derivados de intermediários das vias de formação de aminoácidos em *Saccharomyces*.

Além dos álcoois de cadeia longa, compostos derivados de isoprenóides e de ésteres de ácidos graxos estão sendo desenvolvidos por rota microbiana, constituindo alternativas ao petrodiesel e ao combustível de aviação. Os isoprenóides constituem um grupo de compostos produzidos por diferentes organismos e possuem grande valor industrial como fármacos (artemisina, taxol) e nutracêuticos (carotenóides). A aplicação como combustível pode ser exemplificada por compostos tais como farnesano e bisabolano, os quais possuem características semelhantes ao diesel. Biocombustíveis derivados de isoprenóides podem ser produzidos a partir de precursores de 5 carbonos pelas vias do mevalonato ou 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. As plantas são fontes naturais de isoprenóides, mas a produção das mesmas não é suficiente para atender as quantidades necessárias para uso como biocombustíveis. Para aumentar as quantidades produzidas, as vias de 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato e mevalonato podem ser modificadas e expressas em *E. coli* e *S. cerevisiae*. Dos combustíveis derivados de isoprenóides, o farnesano é o que está mais próximo da comercialização. Ele tem sido produzido tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae*. A empresa Amyris Biotechnologies, Inc. utiliza a linhagem industrial brasileira PE-2 de *S. cerevisiae*, a qual foi desenvolvida por diferentes estratégias de engenharia metabólica, para produção de farneseno, que pode ser convertido quimicamente a farnesano. Bisabolano é outro combustível que

pode ser produzido por processo híbrido, por meio de catálise microbiana para obtenção de bisaboleno, seguida de catálise química para conversão em bisabolano. Por meio de uma série de modificações que envolveram expressão heteróloga de genes de plantas, otimização de códons e de promotores, bem como modificações da via do mevalonato, foi possível produzir bisaboleno em altas quantidades, tanto em *E. coli* como em *S. cerevisiae*.

Em relação aos combustíveis derivados de ácidos graxos, diversos compostos tais como ésteres de ácidos graxos, álcoois graxos, alcanos e olefinas, podem ser produzidos diretamente em *E. coli* a partir de carboidratos. A empresa LS9, Inc. escolheu *E. coli* para modificações e utilizou uma série de estratégias de engenharia metabólica, entre elas a superexpressão e nocaute de genes das vias de biossíntese e degradação de ácidos graxos, a introdução de vias de biossíntese de etanol, de enzimas modificadoras diversas, bem como de xilanases. Todas estas modificações culminaram em uma linhagem de *E. coli* capaz de produzir ésteres etílicos de ácidos graxos a partir da fermentação de açúcares resultantes da degradação de biomassa.

Estes exemplos foram escolhidos para ilustrar o poder de estratégias de engenharia metabólica de microrganismos para produção de uma série de compostos a partir de fontes renováveis. No entanto, os exemplos também demonstram que a otimização de vias metabólicas ou de um fenótipo é uma tarefa árdua, geralmente acompanhada de muitos ajustes (deleção ou superexpressão de vias biossintéticas, engenharia de proteínas para aumento da atividade, remoção de mecanismos regulatórios que impedem o fluxo metabólico desejado, etc.), de modo a maximizar a produção de um composto e diminuir o fluxo de carbono para vias indesejadas. Com o advento de ferramentas de biologia de sistemas e de biologia sintética espera-se que a engenharia metabólica de microrganismos para produção de compostos cada vez mais complexos seja feita de forma mais direcionada e rápida. Ou seja, sem a necessidade de tantos ajustes das vias metabólicas (endógenas ou heterólogas) de interesse.

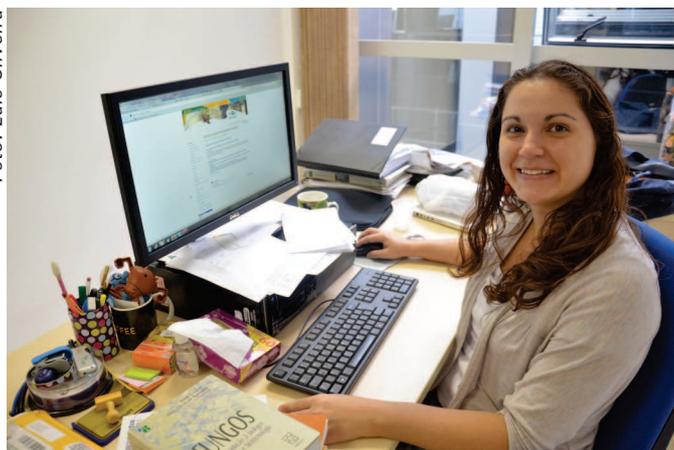
Neste aspecto, o uso de ferramentas de biologia de sistemas tem tornado possível o entendimento do impacto que uma modificação ou inserção de uma via biossintética pode ter no metabolismo global da célula microbiana, em condições de fermentação em biorreatores. Uma maneira de prever o impacto da inserção ou retirada de genes ou vias inteiras sobre o crescimento ou formação de um produto é através do uso de modelos metabólicos. Tais modelos metabólicos preditivos têm sido construídos com base na integração de dados de genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e fluxômica. O uso de abordagens de biologia de sistemas (p. ex. modelagem em escala

genômica de microrganismos *in silico*) tem permitido identificar alvos para melhoramento genético de modo mais racional e direcionado. Por meio do uso de modelos matemáticos robustos do metabolismo tem sido possível identificar alvos *in silico* e validar estes alvos para aumento da produção de etanol em *S. cerevisiae*, bem como para otimizar as vias biossintéticas de produção de 1,4-butanodiol e 1,3-propanodiol em *E. coli* a partir de fontes renováveis.

A biologia sintética é um campo multidisciplinar emergente que envolve princípios de engenharia, tais como modularização, para o desenvolvimento e manipulação de circuitos genéticos. Um dos objetivos da biologia sintética é facilitar a engenharia da biologia por meio da caracterização e padronização de partes biológicas, reduzindo o tempo necessário para fazer as construções genéticas e aumentando sua confiabilidade e previsibilidade. Seguindo alguns princípios bem definidos, tais coleções de partes biológicas padronizadas e reutilizáveis podem ser úteis para construção de dispositivos capazes de realizar funções biológicas complexas e previsíveis (um dispositivo consiste de uma ou mais partes combinadas para executar uma tarefa complexa). Os dispositivos de biologia sintética disponíveis (promotores ortogonais induzíveis, bibliotecas de sítio de ligação de ribossomos, sensores de estado, controladores espaço-temporais, osciladores, portas lógicas, etc.) devem facilitar os trabalhos de engenharia metabólica de microrganismos. De fato, alguns dispositivos de biologia sintética tais como sistemas sensores-reguladores dinâmicos têm sido utilizados para aumentar a produção de biocombustíveis em microrganismos, tais como éster etílico de ácido graxo em *E. coli*.

Neste cenário, fica evidente a existência de um estreito acoplamento entre biologia de sistemas, biologia sintética e engenharia metabólica em prol do desenvolvimento de rotas microbianas para produção de biocombustíveis e químicos renováveis. Apesar destas inovações, a produção de biocombustíveis e químicos por rota microbiana deve ser competitiva com os produtos existentes de origem fóssil ou originados por rotas químicas convencionais. Fatores importantes que devem ser considerados para a comercialização de biocombustíveis e químicos renováveis incluem o desenvolvimento de linhagens microbianas com altas taxas de produtividade (o objetivo é produzir os compostos desejados essencialmente na eficiência máxima permitida pela termodinâmica), o escalonamento do processo de produção sem perda do desempenho e a cadeia de fornecimento de matéria-prima para a indústria. ◆

Foto: Lais Oliveira



Léia Cecilia de Lima Fávoro

É pesquisadora da Embrapa Agroenergia, fez Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Brasil(2009).