



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA BACTÉRIA ANAERÓBICA
TERMOFÍLICA ISOLADA DO RÚMEN DE CAPRINO
E ANÁLISE DAS ENZIMAS DO SEU COMPLEXO
CELULOLÍTICO**

Vanessa Oliveira Leitão

Brasília-DF
2015

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA BACTÉRIA ANAERÓBICA
TERMOFÍLICA ISOLADA DO RÚMEN DE CAPRINO
E ANÁLISE DAS ENZIMAS DO SEU COMPLEXO
CELULOLÍTICO**

Vanessa Oliveira Leitão

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Carlos Roberto Félix

Co-Orientador: Dr. Cirano José Ulhoa

Brasília-DF
2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília;

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Bioquímica e Proteômica da Universidade de Brasília;

Profª Drª Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Bioquímica e Proteômica da Universidade de Brasília;

Profª Drª Fabrícia Paula de Faria
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Laboratório de Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Goiás.

Suplente:

Prof. Dr. Ricardo Henrique Kruger - Departamento de Biologia Celular/Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília;

Profª Drª Valdirene Neves Monteiro - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Félix - Departamento de Biologia Celular/Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

Co-Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás.

Brasília-DF
2015

Aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias. Correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.
(Isaías 40:31)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o suporte necessário para ir sempre em frente nos momentos difíceis e por todas as bênçãos realizadas ao longo desses anos.

Aos meus pais, Aparecida e Zenon, por todo o esforço em me proporcionar uma educação de qualidade e serem um exemplo de caráter, princípio e honestidade. Obrigada por todo incentivo, amor e carinho. Às minhas irmãs, Danielle e Raianne por estarem ao meu lado em todos os momentos, pelos conselhos, pelas risadas, por todo o cuidado e complicidade.

Ao meu esposo Humberto, pelo companheirismo, por acreditar no meu potencial e me alegrar com uma palavra de incentivo nos momentos mais difíceis e entender a minha ausência para a realização de algumas etapas do trabalho. À minha filha Maria Luísa que mesmo tão pequena já me ensina tanto e me transforma em uma pessoa melhor. Amo muito vocês!

Ao meu orientador Dr. Carlos Roberto Felix, por acreditar em mim e me motivar desde o início das atividades desse projeto, pela paciência, atenção e educação demonstrada em todas as nossas reuniões. Ficam o meu respeito e admiração!

Ao meu co-orientador Dr. Cirano José Ulhoa, por todo apoio e ensinamentos desde o início da minha formação no mestrado e por ter-me incentivado a continuar o aperfeiçoamento dos meus estudos e proporcionar a realização desse projeto com os demais professores. Minha amizade e admiração!

A professora Dr^a Eliane Noronha pelos ensinamentos e parceria em todas as etapas do trabalho, principalmente na finalização. Sua ajuda foi fundamental. Meus sinceros agradecimentos!

Aos meus colegas e amigos de bancada do laboratório de enzimologia da UFG, Marcelo, Andrei, Pabline, Rogério, Marcela, Renata, Patrícia, João Paulo, Suelen, Gabriela, Lorena, Juliana e Rachel pela ajuda, convivência e momentos de descontração. Em especial ao Marcelo e Andrei pela ajuda, comprometimento e ensinamentos sobre algumas etapas fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos Fabiano, Amanda Rafaela e Amanda Araújo, pela amizade, companheirismo nos experimentos de fim de semana e de madrugada, pelos conselhos, desabafos e ensinamentos! Jamais esquecerei o apoio que me deram!

Aos meus colegas do laboratório de enzimologia da UnB, Fernanda, Karen, Franciele, Priscila, Juliana, Brenda, Helder, Caio, Paula, Liana, Jaqueline, por todo apoio e atenção em todas as minhas idas a Brasília e pela convivência agradável.

Às técnicas Marísia e Margarete pela convivência agradável e prontidão em me ajudar sempre que foi necessário. Obrigada!

Ao prof^o Dr. Marcelo Valle do laboratório de Bioquímica e ao seu aluno Jaques Souza e ao prof^o Dr. André Murad do Cenargem – EMBRAPA pelos ensinamentos e apoio técnico nas análises de espectrometria de massa.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1 Bioetanol de Segunda Geração (2G).....	19
1.2 Biomassas Lignocelulósicas	22
1.3 Produção de Bioetanol.....	25
1.3.1 Pré-tratamento	25
1.3.2 Sacarificação e fermentação.....	26
1.4 Resíduo Agroindustrial – Palha de Cana de Açúcar	29
1.5 Resíduo Agroindustrial – Piolho de Algodão.....	30
1.6 Rúmen como Fonte de Microorganismos	31
1.7 <i>Clostridium thermocellum</i>	32
1.7.1 Estrutura do complexo multienzimático –celulossoma.....	34
1.7.2 Produção de celulases por <i>C. thermocellum</i>	39
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVO	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Isolamento e Manutenção.....	43
4.2 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo no Crescimento de <i>C. thermocellum</i> B8	44
4.3 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo na Produção de CMCase e Avicelase por <i>C. thermocellum</i> B8	45
4.4 Condições de Cultivo de <i>C.thermocellum</i> B8 para Obtenção de Amostras Protéicas para Determinação de Atividades Enzimáticas e Mapeamento de Proteínas.....	46
4.5 Determinação da Concentração Total de Proteínas e Atividades Enzimáticas.....	47
4.6 Comparação entre a Produção de CMCase e Avicelase de <i>C. thermocellum</i> B8 e <i>C. thermocellum</i> JW20 Cultivados em Celulose e Piolho de Algodão	48
4.7 Cultivo e Obtenção das Células de <i>C. thermocellum</i> B8 para Extração de RNA Total.....	49
4.8 Eletroforese Bidimensional – 2DE	49
4.9 Análise do Secretoma	50
4.9.1 Espectrometria de massa - MALDI TOF/TOF	50
4.9.2 Espectrometria de massa - nanoUPLC-MSE	51
4.10 Extração RNA total e RT-qPCR.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo no Crescimento de <i>C. thermocellum</i> B8	55
5.2 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo na Produção de CMCase e Avicelase por <i>C. thermocellum</i> B8	57
5.3 Influência do pH Inicial do Meio de Cultura na Produção de Proteínas de <i>C. thermocellum</i> B8	58
5.4 Avaliação da Produção de CMCase, Avicelase, β -Glicosidade e FPase por	

<i>C. thermocellum</i> B8.....	59
5.5 Avaliação da Produção de CMCase, Avicelase, FPAse e Xilanase de <i>C. thermocellum</i> B8 Cultivado em Diferentes Substratos Lignocelulósicos.....	60
5.6 Comparação entre a Produção de CMCase e Avicelase por <i>C. thermocellum</i> B8 e <i>C. thermocellum</i> JW20 Cultivados em Celulose e Piolho de Algodão.....	61
5.7 Análise do Secretoma.....	63
5.8 RT-qPCR.....	71
CONCLUSÃO.....	77
PERSPECTIVA.....	78
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	79
ANEXO.....	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de ação das celulasas na fibra de celulose (Santana, 2010) 16
- Figura 2.** Estrutura da biomassa lignocelulósica (Santos *et al.*, 2012) 23
- Figura 3.** Representação esquemática da molécula de celulose 23
- Figura 4.** Estrutura das hemiceluloses glucoronoxilana e galactomanana (Sheller *et al.*, 2010) 24
- Figura 5.** Constituintes da lignina (Boerjan *et al.*, 2003) 24
- Figura 6.** Células de *C. thermocellum* colonizando a celulose (Islam *et al.*, 2015) 32
- Figura 7.** Células de *C. thermocellum* YS cultivadas em celobiose: **A)** Células *C. thermocellum* YS com protuberâncias ao redor de toda extensão das células, **B)** Células *C. thermocellum* mutante AD2 sem as protuberâncias e **C)** Células de *C. thermocellum* YS com a presença de: **M-** monocamada; **F-** estruturas fibrosas; **P-** protuberâncias nobular (Adaptado de Bayer e Lamed, 1986) 35
- Figura 8.** Organograma das etapas realizadas para obtenção das amostras obtidas após cultivo de *C. thermocellum* B8 em meio líquido pH 7,0 a 60°C por 48 horas sob condições anaeróbicas tendo como substratos celulose cristalina, piolho de algodão e palha de cana de açúcar ambos a 2% 36
- Figura 9.** Mecanismo de montagem do celulosoma. A) Celulasas e hemicelulasas produzidas por microorganismos anaeróbicos contêm domínios não catalíticos doquerinas tipo I e módulo de ligação a carboidratos CBMs ligados aos domínios catalíticos (enzima). B) Proteína estrutural CipA formada por nove domínios não catalíticos coesinas tipo I, um domínio doquerina tipo II e um módulo de ligação a carboidrato CBM. C) Complexo Celulosoma formado pela interação dos domínios coesina tipo I da CipA e os domínios doquerinas tipo I das enzimas celulosomais (Adaptado de Fontes e Gilbert, 2010) 37
- Figura 10.** Complexo coesina-doquerina: doquerina I da Xyn10B de *C. thermocellum* ligada a segunda coesina I de CipA (Adaptado de Fontes e Gilbert, 2010) 38
- Figura 11.** Organização do complexo celulosoma de *C. thermocellum*. A doquerina tipo II da extremidade C-terminal da proteína estrutural CipA se liga especificamente a domínios coesina tipo II encontrados em proteínas da superfície celular (SdbA, OlpB, Orf2) ou na Cth_0736. Devido a ancoragem das escalfodinas, OlpB, Orf2 e Cth_0736 contêm mais de um tipo de domínio coesina tipo II que contribuem para a montagem de policelulosomas com até 63 subunidades catalíticas. As enzimas celulosomais podem também se ligar diretamente à superfície da célula da bactéria por meio de domínios coesina tipo I encontrados em OlpA e OlpC (Fontes e Gilbert, 2010) 47

- Figura 12.** Crescimento de *C. thermocellum* B8 cultivado em meio líquido contendo 2% de celulose cristalina, como fonte de carbono, sob condições anaeróbicas - (A): crescimento em meio com pH 7,0 em diferentes tempos: 24, 34, 48 e 72 horas; (B) crescimento por 48 horas a 60°C em meio com pH inicial de: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0; (C) meio com pH 7,0 em diferentes temperaturas: 35, 45, 60 e 75°C por 48 horas56
- Figura 13.** Efeito do tempo, pH e temperatura na produção de CMCCase (A, B e C) e Avicelase (D, E e F) por *C. thermocellum* B8, cultivada em meio líquido contendo 2% de celulose como fonte de carbono sob condições anaeróbicas. (A, D): crescimento em meio pH 7,0 em diferentes tempos: 24, 34, 48 e 72 horas; (B, E) crescimento por 48 horas a 60°C em meio com pH inicial de: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0; (C, F) meio pH 7,0 em diferentes temperaturas: 35, 45, 60 e 75°C por 48 horas. (traço cinza) FEC (fração eluída da celulose residual) e (traço preto) sobrenadante da cultura.....57
- Figura 14.** Avaliação da produção de CMCCase, Avicelase, β -Glicosidade e FPase da FEC (fração eluídas da celulose residual) e do sobrenadante de *C. thermocellum* B8 cultivado em meio líquido pH 7,0 contendo 2% de celulose cristalina a 60°C por 48 horas sob condições anaeróbicas....60
- Figura 15.** Atividade enzimática ($U \cdot mL^{-1}$) de CMCCase, Xilanase, Avicelase e FPase de FEC, FEP e FEPA (frações eluídas dos substratos residuais: celulose, piolho de algodão e palha de cana de açúcar respectivamente) obtidas após o cultivo de *C. thermocellum* B8 em meio líquido pH 7,0 por 48 horas a 60°C sob condições anaeróbicas .61
- Figura 16.** Comparação da produção de CMCCase e Avicelase da FEC (fração eluída da celulose residual) e FEP (fração eluída do piolho de algodão residual) após cultivo de *C. thermocellum* B8 e *C. thermocellum* JW20 em meio líquido contendo 2% de celulose e 2% de piolho de algodão a 60°C, pH 7,0 por 48 horas sob condições anaeróbicas.* $p < 0,05$ 62
- Figura 17.** Perfil protéico em gel de poliacrilamida bidimensional (2DE) a 10% das proteínas obtidas do sobrenadante da cultura de *C. thermocellum* isolado B8 cultivado em meio líquido contendo 2% de celulose cristalina a 60°C por 48 horas. Foram utilizadas 500 μg de proteínas. MM: marcador molecular; 1, 2 e 3 (em verde) spots de referência "landmark". Variação da faixa de pH 4-763
- Figura 18.** Perfil protéico em gel de poliacrilamida bidimensional (2DE) a 10% das proteínas da FEC (fração eluída da celulose residual) da cultura de *C. thermocellum* isolado B8 cultivado em meio líquido contendo 2% de celulose cristalina a 60°C por 48 horas. Foram utilizadas 500 μg de proteínas. MM: marcador molecular; 1, 2 e 4 (em verde) spots de referência "landmark". Variação da faixa de pH 4-7. Setas pretas: proteínas identificadas64
- Figura 19.** Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas na análise de imagem dos géis (Programa Image Master Platinum). No sobrenadante (A) foram identificadas 167 proteínas e na fração eluída da celulose (B) foram identificadas 227 proteínas.....64

- Figura 20.** Função das proteínas identificadas dos secretomas de *C. thermocellum* B8 com 48h de crescimento a 60°C: A) FEC (fração eluída da celulose residual); B) FEP (fração eluída do piolho de algodão residual); C) FEPA (fração eluída da palha de cana de açúcar).....70
- Figura 21.** Cinética da expressão gênica de *C. thermocellum* isolado B8 cultivado em meio líquido por 12, 34 e 48 horas a 60°C sob agitação constante tendo como substrato 2% de celulose cristalina (A), piolho de algodão (B) e palha de cana de açúcar (C). Os dados do cultivo em glicose foram utilizados como padrão. Genes avaliados: *celS* (exoglucanase), *manA* (mananase), *celob* (celobiohidrolase), *sdbA* (proteína com domínio doquerina), *cbp* (celbiose fosforilase), *ldh* (lactato desidrogenase), *hydA* (hidrogenase), *crpZ* e *crp* (proteína ligada ao (cAMP)) *hprK*, *hprY* e *hprX* (serina quinases). O gene *recA* foi utilizada como normalizador72
- Figura 22.** Comparação da expressão relativa de genes envolvidos na formação do complexo celulosoma, fermentação de carboidratos e repressão catabólica por *C. thermocellum* isolado B8 após crescimento em meio líquido pH 7,0 contendo 2% de celulose cristalina, piolho de algodão e palha de cana de açúcar por 24 hora a 60°C. Os dados do cultivo em glicose foram utilizados como padrão. Genes avaliados: *cipA* (escafoldina), *celS* (exoglucanase), *manA* (mananase), *celob* (celobiohidrolase), *sdbA* (proteína com domínio doquerina), *olpA* (proteína âncora), *cbp* (celbiose fosforilase), *adhY* (álcool hidrogenase), *ldh* (lactato desidrogenase), *hydA* (hidrogenase), *crpZ* e *crp* (proteína ligada a AMPc) *hprK*, *hprY* e *hprX* (serina quinases). O gene *recA* foi utilizada como normalizador. * $p < 0,05$ 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Bactérias e Fungos produtores de celulosoma.....	17
Tabela 2.	Comparação balanço energético e o nível de mitigação das emissões de gases efeito estufa (EGF) das diferentes matérias primas para a produção de Bioetanol	22
Tabela 3.	Composição dos diferentes materiais lignocelulósicos	25
Tabela 4.	Principais estratégias utilizadas para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	26
Tabela 5.	Lista dos “primers” utilizados q-PCR	54
Tabela 6.	Avaliação do efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de proteínas por <i>C. thermocellum</i> B8 após 48 horas de cultivo a 60°C tendo como fonte de carbono 2% de celulose cristalina	58
Tabela 7.	Proteínas identificadas por MALD/TOFTOF obtidas da FEC (fração eluída da celulose residual) após o cultivo de <i>C. thermocellum</i> isolado B8 em meio contendo celulose a 2% (m/v) como fonte de carbono.....	65
Tabela 8.	Identificação das proteínas obtidas da FEC (fração eluída da celulose residual) após o cultivo de <i>C. thermocellum</i> B8	91
Tabela 9.	Identificação das proteínas obtidas da FEP (fração eluída do piolho de algodão residual) após o cultivo de <i>C. thermocellum</i> B8.....	93
Tabela 10.	Identificação das proteínas obtidas da FEPA (fração eluída da palha de cana de açúcar residual) após o cultivo de <i>C. thermocellum</i> B8.....	95
Tabela 11.	Proteínas do complexo celulosoma da FEC (fração eluída da celulose residual) identificadas por nanoUPLC-MSE obtidas após o <i>C. thermocellum</i> isolado B8 em meio contendo celulose a 2% (m/v) como fonte de carbono	66
Tabela 12.	Proteínas do complexo celulosoma da FEP (fração eluída do piolho de algodão residual) identificadas por nanoUPLC-MSE após o <i>C. thermocellum</i> isolado B8 em meio contendo piolho de algodão a 2% (m/v) como fonte de carbono.....	66
Tabela 13.	Proteínas do complexo celulosoma da FEPA (fração eluída da palha de cana residual) identificadas por nanoUPLC-MSE após o <i>C. thermocellum</i> isolado B8 em meio contendo palha de cana de açúcar a 2% (m/v) como fonte de carbono	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA** Albumina sérica bovina
- CBM** Módulo de ligação aos carboidratos
- CBP** Bioprocesso consolidado
- CMC** Carboximetilcelulose
- DHB** Ácido 2,5-di-hidroxibenzóico
- GEE** Gases do efeito estufa
- LC-MS/MS** Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
- MALDI** Desorção e ionização e laser assistida por matriz
- MS** Espectrometria de massa
- PCR** Reação em cadeia da polimerase
- RT-PCR** Reação de transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real
- SDS** Dodecil sulfato de sódio
- SHF** Sacarificação e fermentação separadas
- SSCF** Sacarificação e co-fermentação simultâneas
- SSF** Sacarificação e fermentação simultâneas
- TFA** Ácido Trifluoroacético
- TOF** Tempo de voo
- 2G** Segunda geração
- cipA*** scaffoldina
- celS*** exglucanase
- manA*** mannanase
- sdbA*** proteína com domínio doquerina
- celob*** celobiohidrolase
- olpA*** proteína âncora
- cbp*** celobiose fosforilase
- ack*** acetato quinase
- adhY*** álcool desidrogenase
- ldh*** lactato desidrogenase
- hydA*** hidrogenase
- hprK / hprZ / hprY***: serina quinase
- crp / crpZ*** proteínas ligadas a cAMP)

RESUMO

A possibilidade de produzir etanol de resíduos lignocelulósicos tem se tornado cada vez mais atrativo. Dentre os diferentes tipos de resíduos o piolho de algodão gerado na indústria têxtil e a palha de cana de açúcar proveniente das lavouras de cana de açúcar podem ser uma alternativa viável em processos fermentativos para a produção do bioetanol. *Clostridium thermocellum* possui alta capacidade de hidrólise de diferentes biomassas pela presença do complexo multienzimático celulosoma. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as melhores condições de cultivo de *C. thermocellum* isolado (B8), obtido a partir do material do rúmen de caprino da raça Moxotó e mapear as proteínas secretadas na presença de piolho de algodão, palha de cana de açúcar e celulose cristalina, além de avaliar a expressão de alguns genes envolvidos na formação do complexo celulosomal. *C. thermocellum* B8 apresentou melhor condição de crescimento a 60°C, pH 7,0 e após 48 horas de incubação. Nas amostras do sobrenadante da cultura e nas frações eluídas dos substratos residuais: celulose (FEC), piolho de algodão (FEP) e palha de cana (FEPA) foi registrada atividade enzimática de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase. A taxa de expressão de genes quantificados por RT-qPCR, envolvidos na formação do celulosoma mostrou diferentes perfis de expressão em relação ao tempo de cultivo e ao tipo de substrato utilizado. A espectrometria por meio de nanoUPLC-MSE foi capaz de identificar 80 proteínas nas frações eluídas dos substratos residuais sendo que destas 32 em FEC, 25 em FEP e 23 em FEPA. Estavam presentes proteínas responsáveis pela formação da estrutura do celulosoma, proteínas do metabolismo de carboidratos, proteínas estruturais, de transporte de solventes e íons e de defesa. Os resultados apresentados podem ajudar a conceber estratégias para a otimização do cultivo de *C. thermocellum* B8 em piolho de algodão e palha de cana em grande escala para a hidrólise enzimática desses resíduos e possível produção de etanol.

Palavras-chave: *C. thermocellum*, piolho de algodão, palha de cana, biocombustível.

ABSTRACT

The possibility of producing ethanol from lignocellulosic waste has become increasingly attractive. Among the different types of waste cotton louse generated in the textile industry and sugar cane straw from the sugar cane fields can be a viable alternative fermentation processes for the production of bioethanol. *Clostridium thermocellum* has high capacity hydrolysis of biomass by different complex multienzymatic cellulosome presence. The objective of this study was to characterize the best growing conditions of *C. thermocellum* isolated B8, obtained from Moxotó of goat rumen materials and map the proteins secreted in the presence of cotton louse, sugarcane straw and crystalline cellulose, and to evaluate the expression of genes involved in the formation of celulosomal complex. *C. thermocellum* B8 showed better growth condition of 60° C, pH 7.0 and after 48 hours of incubation. Samples of the culture supernatant, and eluted in the fractions of residual substratos: cellulose (FEC), cotton louse (FEP), and sugarcane straw (FEPA) was recorded enzymatic activity of Avicelase, CMCCase, and FPase Xylanase. The level of gene expression quantified by RT-qPCR involved in the formation of cellulosome showed different profiles of expression in relation to culture time and the type of substrate used. The spectrometry using nanoUPLC-MSE was able to identify 80 the proteins eluted fractions of residual substrates among these FEC 32, FEP 25 and 23 FEPA. Were present proteins responsible for the formation of cellulosome structure, carbohydrate metabolism of proteins, structural proteins, transport of ions and solvents and defense. These results can help develop strategies to optimize the cultivation of *C. thermocellum* B8 cotton louse and sugarcane straw on a large scale for the enzymatic hydrolysis of these residues and possible production of ethanol.

Keywords: *C. thermocellum*, cotton louse, sugarcane straw, biofuel.

INTRODUÇÃO

A partir da criação e lançamento do programa do governo brasileiro “Proálcool” por volta de 1975, iniciou-se a fabricação de duas versões de veículos por parte das montadoras presentes no País: os movidos a álcool hidratado e os movidos à gasolina. O programa tinha como objetivo substituir combustíveis derivados do petróleo, como a gasolina, por uma fonte alternativa e renovável, o álcool etílico proveniente da sacarose da cana de açúcar devido a uma grave crise do petróleo, que na época fez com que o preço do barril aumentasse de US\$2,91 para US\$12,45, um aumento de 428%. Isso fez com que o governo fortalecesse os investimentos no programa (Andrade *et al.*, 2009).

Entretanto, no início dos anos 90, houve alta dos preços do açúcar, o fim dos subsídios do governo às usinas de açúcar e álcool, e o preço do petróleo fez com que os preços da gasolina se estabilizassem. Esses acontecimentos levaram à redução na produção de etanol combustível e o Brasil diminuiu o interesse no aperfeiçoamento da cadeia produtiva de álcool. Só em 2000, com as pressões sobre a necessidade da redução de gases do efeito estufa (GEE), pela queima de combustíveis fósseis, e em reação às constantes oscilações do suprimento e preços dos combustíveis fósseis, as montadoras instaladas no Brasil investiram e lançaram o automóvel com motor flexível, movido tanto à gasolina quanto a etanol. A partir desse momento houve uma explosão da produção e aquisição destes automóveis bem como o consumo do álcool combustível (Lot, 2013).

Apesar do sucesso técnico do Proálcool para a produção do etanol derivado da cana de açúcar, etanol de primeira geração, ocorreram muitas críticas à sua implantação. Tais críticas baseavam-se no fato de que as áreas de cultivo de cana-de-açúcar aumentaram muito, enquanto as de cultivo de alimentos mativeram-se inalteradas (Andrade *et al.*, 2009).

A busca por fontes energéticas renováveis fez com que a biomassa celulósica tomasse espaço como matéria-prima e o desenvolvimento de tecnologias para a produção de novos combustíveis, como o bioetanol lignocelulósico ou bioetanol de segunda geração (2G) ganhassem espaço na comunidade científica e grande atenção global (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006; Gray *et al.*, 2006; Wyman, 2007; Demain, 2009; Maki *et al.*, 2009, Wanderley, *et al.* 2013).

O bioetanol 2G, é produzido a partir de biomassas lignocelulósicas que são fonte de carboidratos muito abundantes no Brasil, produzidas, principalmente, em função da intensa atividade agrícola. São exemplos de biomassas lignocelulósicas os resíduos agroindustriais tais como os resíduos derivados de atividades das indústrias de papel e celulose (sepilho, maravalhas e cavacos desclassificados de eucalipto e pinus), serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana-de-açúcar) e, de um modo geral, unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas como a palha de cereais, de milho, de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros (Ramos, 2000).

Grande parte dos resíduos citados acima é acumulada no ambiente e quando em grande quantidade podem impactar os biomas de solos e de corpos hídricos em função de sua lixiviação, acarretando também em problemas de saúde pública. O elevado custo associado ao tratamento, ao transporte e à disposição final destes resíduos tem efeito direto sobre o preço do produto final o que acaba desestimulando as empresas a darem a destinação correta.

Em razão disso, atenção especial tem sido voltada à minimização ou reuso destes resíduos e ao estabelecimento de novos usos de produtos e subprodutos agropecuários, visando não somente a redução do impacto ambiental causado pelo seu acúmulo, como também minimizar a perda de biomassa e de nutrientes (Rosa *et al.*, 2011).

Países como EUA, Canadá, Suécia, Finlândia, Rússia e Japão e especialmente o Brasil tem investido no desenvolvimento de processos biotecnológicos que permitam a utilização dos materiais agroindustriais, como palha de milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar, engaço de bananeira, piolho de algodão e resíduos da indústria de celulose, para a produção de bioetanol 2G (Santos *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2013).

Os resíduos lignocelulósicos de forma geral possuem diferenças em sua constituição com relação aos teores diferentes de celulose, lignina, xilana, e arabinana que podem influenciar no rendimento final de produção do combustível. A celulose é um polímero linear de até 10.000 resíduos de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando assim a celobiose, a subunidade repetitiva do polímero. A sua uniformidade química favorece a formação de uma estrutura rígida e cristalina, mantida por ligações de hidrogênio intracadeia e entre filamentos

paralelos resultando na formação de microfibrilas bem agrupadas. A hemicelulose encontra-se em associação com a celulose na parede das células vegetais. É um polímero heterogêneo constituído por pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e ácidos urônicos. Contém principalmente xilanas e glicomananas e normalmente é formada por 2 a 6 açúcares diferentes, unidos na maioria por ligações do tipo β -1,4 (Schwarz, 2001; Lynd *et al.*, 2002; Kumar, *et al.*, 2008).

A bioconversão da celulose presente nos resíduos agroindustriais é considerada uma das mais promissoras estratégias para produção de bioetanol, porém a natureza recalcitrante desses resíduos pode dificultar esse processo, sendo necessária uma etapa inicial de pré-tratamento (Lynd *et al.*, 2002). O processo como um todo consiste de três etapas: uma etapa de pré-tratamento que pode remover a lignina e a hemicelulose ou apenas aumentar a porosidade das fibras de celulose, com a finalidade de auxiliar o acesso das enzimas; uma etapa de sacarificação, no qual a celulose é hidrolisada a monômeros de glicose por meio de hidrólise ácida ou enzimática; e por último, uma etapa de fermentação alcoólica na qual a glicose é convertida a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Souza *et al.*, 2013).

A hidrólise enzimática da celulose é feita pela ação sinérgica de um conjunto de enzimas: endo- β -1,4-glicanase (EC 3.2.1.4, catalisa randomicamente a hidrólise da região interna amorfa da celulose), celobiohidrolase 1 e 2 (EC 3.2.1.91, remove unidades de celobiose das extremidades redutora e não-redutora da cadeia) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21, hidrolisa celo-oligossacarídeos a glicose) (figura 1) e pela ajuda das hemicelulases como as β -1,4-endoxilanase, β -xilosidase (hidrolisa a xilana) e a α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139 hidrolisa as ligações α -1,2 entre os resíduos de ácido glucurônico e de xilose em glucuroxilana) . As hemicelulases facilitam a hidrólise da celulose expondo suas fibras e tornando-as mais acessíveis para a ação das celulases (Filho e Félix, 1989; Turner *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

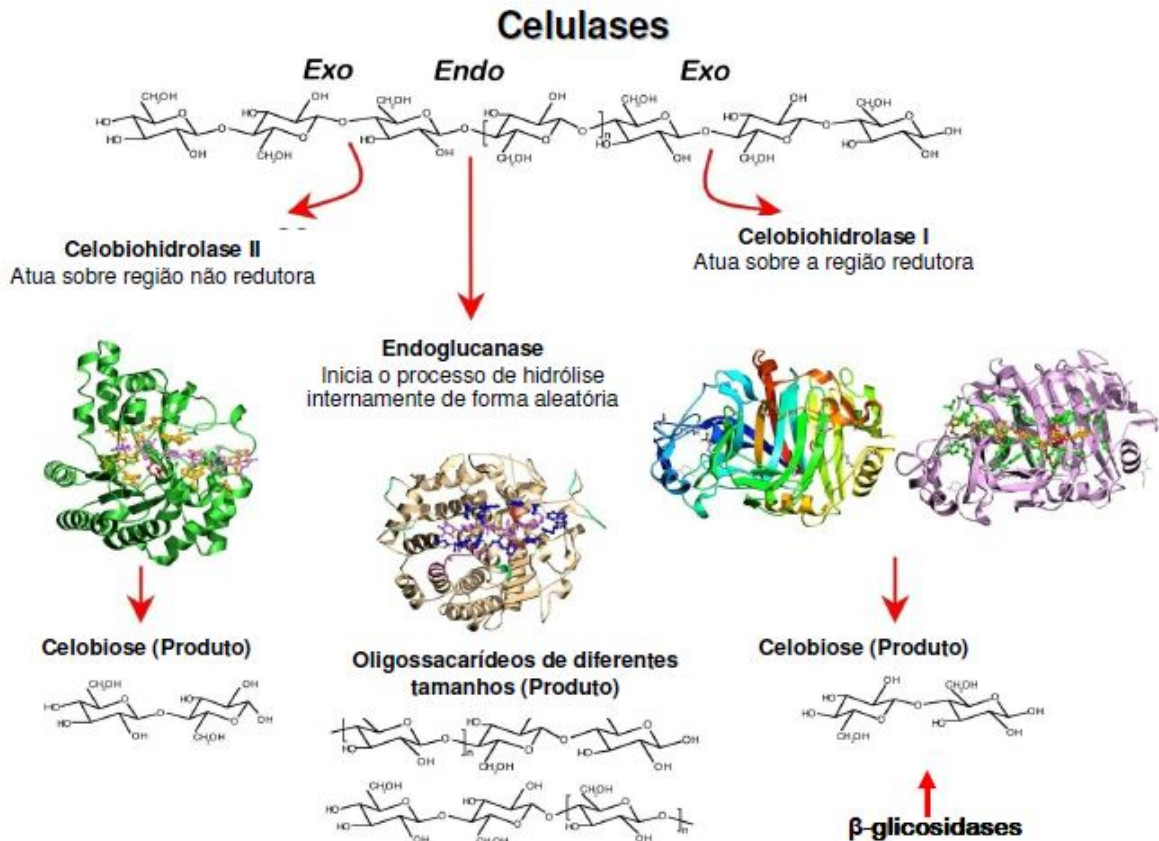


Figura 1. Mecanismo de ação das celulases na fibra de celulose (Santana, 2010).

Eubactérias e fungos, encontrados em microbiota onde se acumulam resíduos de celulose, produzem enzimas capazes de degradar materiais lignocelulósicos. Poucos são, entretanto, os que produzem e secretam um conjunto de enzimas, cuja natureza ou atividade total seja capaz de degradar eficiente e completamente celulose a glicose (Pang *et al.*, 2009, Akinosho *et al.*, 2014).

Algumas bactérias anaeróbicas apresentam a capacidade de produzir e secretar celulases e hemicelulases livres ou na forma de um complexo multienzimático denominado celulosoma. Os celulosomas são eficientes quanto à desestruturação de celulose microcristalina, isto porque a ação sinérgica entre as enzimas que compreendem o complexo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparada à velocidade de ação isolada destas enzimas (Félix e Ljungdahl, 1993; Schwarz, 2001; Desvaux, 2005; Kumar *et al.*, 2008; Nordon *et al.*, 2009).

Por muito tempo acreditou-se que apenas as bactérias anaeróbicas eram capazes de produzir celulosomas, entretanto alguns fungos anaeróbicos também foram identificados como formadores desse complexo de enzimas (tabela 1).

Tabela 1. Bactérias e Fungos produtores de celulossoma.

Microorganismo	Fonte
Bactérias anaeróbicas	
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Esgotos
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Esgotos
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Rúmen
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Solo
<i>Clostridium cellubioparum</i>	Compostados
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Madeira
<i>Clostridium josui</i>	Compostados
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Fabricação de papel
<i>Clostridium thermocellum</i>	Lodos
<i>Ruminococcus albus</i>	Rúmen
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Rúmen
Fungos anaeróbicos	
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Rúmen
<i>Orpinomyces joyonii</i>	Rúmen
<i>Orpinomyces PC-2</i>	Rúmen
<i>Piromyces equi</i>	Rúmen
<i>Piromyces E2</i>	Fezes

Fonte: Doi e Kosugi, 2004

Um exemplo de fonte de microrganismos conversores de biomassa vegetal é o rúmen por caracterizar-se como um fermentador natural, sendo responsável por uma rápida conversão de material lignocelulósico (Flint *et al.*, 2008). O rúmen é um sistema complexo que abrange um número ainda indeterminado de espécies de bactérias, protozoários, fungos e archaea (Edwards, 2004). Bactérias e fungos que compõem este ecossistema são responsáveis pelo processamento em larga escala das fibras vegetais (Whitford *et al.*, 1998).

Vários estudos visando a caracterização da diversidade microbiana do rúmen de diversos animais, incluindo bovinos (Ferrer *et al.*, 2007; Hattori e Matsui, 2008; Hook *et al.*, 2009), veados (Sundset *et al.*, 2009) e caprinos (Cheng *et al.*, 2009), foram realizados. No entanto, poucos são os trabalhos de isolamento ou caracterização desta microbiota do ponto de vista funcional (Cheng *et al.*, 2009; Moon, *et al.*, 2010; Cunha, 2010; Quirino *et al.*; Leahy, *et al.*, 2013).

Considerando o potencial de amostras de rúmen como fonte de microrganismos produtores de celulasas o grupo de pesquisa do laboratório de enzimologia da UnB tem trabalhado no isolamento de bactérias anaeróbicas a partir de amostras de rúmen de caprino da raça Moxotó. A coleção conta com 10 isolados

que apresentam características morfológicas diferentes quando crescidos em meio sólido e meio líquido anaeróbico. Entre estes, o isolado B8, identificado como *Clostridium thermocellum*, apresentou crescimento em meio líquido contendo celulose cristalina ou resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Este trabalho dá continuidade à caracterização deste isolado e foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a produção de holocelulases pelo isolado B8 quando cultivado em meio contendo celulose, piolho de algodão e palha de cana como fonte de carbono. Assim como, mapear as proteínas do secretoma desta bactéria.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Bioetanol de Segunda Geração (2G)

A perspectiva da escassez das reservas de petróleo e a crescente preocupação mundial com a preservação ambiental têm levado os governos a buscarem estratégias para uma maior produção e maior consumo de combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis, desta forma os biocombustíveis tem ganhado espaço na matriz energética mundial.

Biocombustível de acordo com a definição técnica da Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, é todo combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna; ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. Várias culturas têm sido propostas ou estão sendo testadas para sua produção: a cana-de-açúcar; plantas oleaginosas - como a soja, o milho, a canola, o babaçu e a mamona, ou, de biomassa florestal. Em geral, as características da cultura de energia ideal incluem alta produtividade (produção máxima de matéria seca por hectare), baixo custo de produção, baixos níveis de contaminantes, e uma baixa exigência de nutrientes. Devido à sua capacidade excepcional para produzir biomassa, a cana de açúcar tem sido a cultura mais utilizada para a fabricação do biocombustível mais difundido no Brasil, o bioetanol (Souza *et al.*, 2013).

O Brasil encontra-se em uma posição favorável no que se refere à produção de etanol de primeira geração, ou seja, partir da sacarose da cana de açúcar, pois apresenta vantagens na tecnologia de produção, possibilidade de liderança na agricultura de energia sem ampliar a área desmatada ou reduzir a área destinada à produção de alimentos devido à diversidade de matérias-primas em diferentes biomas (Konishi *et al.*, 2014)

De acordo com os dados disponíveis no *site* da UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar (<http://www.unicadata.com.br>), o mundo se depara com a perspectiva de um significativo aumento na demanda por etanol seja pelo esgotamento das reservas de petróleo, prevista para as próximas décadas, seja pelas consequências acumuladas do consumo de combustíveis fósseis sobre o meio ambiente, ou seja, por pressões de apelo econômico. Esse aumento na demanda de

etanol atualmente tem sido comandado pelo aumento do preço do petróleo e consequentemente aumento no valor da gasolina.

Para evitar que haja limite da oferta ou competição pelo uso da terra para a geração de energia e produção de alimentos, especialmente em locais que não dispõem de clima favorável ou extensão territorial para cultivo, investimentos no desenvolvimento de tecnologias alternativas para a produção de etanol tem sido crescentes (Pacheco, 2011; Souza *et al.*, 2013).

O bioetanol 2G produzido a partir de resíduos agroindustriais (bagaço e palha de cana de açúcar, piolho de algodão, engaço de bananeira, etc.) vem impulsionando uma série de pesquisas e inovações (Dias *et al.*, 2012). O Brasil em função da intensa atividade agrícola apresenta vantagens competitivas em relação aos outros países, pois tem capacidade de produzir o bioetanol 2G com o menor custo devido à facilidade de disponibilização de grandes quantidades de matéria-prima.

De acordo com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - INCTBioetanol (2013), a produção de bioetanol 2G a partir da palha e do bagaço da cana em escala industrial é bastante promissora. A proposta é gerar a oferta do produto sem que seja necessário aumentar a área plantada de cana-de-açúcar. Calcula-se que, com essa tecnologia, seja possível elevar em até 50% a produção nacional atual de 20 bilhões de litros de álcool combustível. Entretanto, tornar viável o preço de comercialização desse produto ainda é um desafio.

Uma projeção feita por Milanez *et al.*, (2012) alertou sobre a necessidade de maiores investimentos no setor sucroalcooleiro, pois a evolução do mercado brasileiro de etanol na época da pesquisa vinha apresentando descompasso entre os crescimentos de demanda potencial e de oferta. Estimava-se que o investimento necessário para produção de etanol corresponderia à ordem de R\$ 30 bilhões até a safra de cana de açúcar de 2015 - 2016. A partir desses dados, o autor reforçou a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias que fossem capazes não somente de realizar o aproveitamento integral da cana, incluindo o bagaço e a palha para a produção do bioetanol 2G, como também de obter novos produtos derivados da biomassa canavieira, tais como: diesel, butanol, químicos etc.

Atualmente, com o aumento do consumo interno do etanol devido à aprovação da quantidade de álcool anidro na gasolina (25% para 27%) e o alto preço da gasolina, a necessidade de investimentos no setor superam as

expectativas propostas por Milanez (2012). Segundo o Ministério da Agricultura (2015), o consumo interno de etanol no Brasil está projetado para 2019 em 50 bilhões de litros e as exportações em 8,8 bilhões. O setor terá que investir cerca de R\$50 bilhões até 2022 para atender a demanda de etanol. A partir dessas perspectivas e com a crescente preocupação mundial com a sustentabilidade, o desenvolvimento de tecnologias para a produção do bioetanol 2G com baixos custos torna-se cada vez mais necessário.

A matéria-prima representa, tipicamente, entre 60% e 70% do custo final do bioetanol e a busca de alternativas de baixo custo é fundamental. A existência de co-produtos e subprodutos, de valor alimentício, industrial ou energético, é igualmente importante, na medida que pode conferir alternativas na produção bioenergética, associando a disponibilidade de biocombustíveis a outras fontes de valor econômico. Outro ponto relevante para a adequada seleção de biomassas com potencial para produção do bioetanol 2G é o balanço energético de cada uma delas (BNDS, 2008).

A tabela 2 apresenta valores para o balanço energético e o nível de mitigação das emissões de GEE para os cultivos e resíduos lignocelulósicos de interesse para a produção de bioetanol. Como pode ser visto, além da cana, que já tem sido demonstrado vantagens energéticas e ambientais como fonte de bioenergia e, particularmente, de bioetanol, para o médio-longo prazo, a esperança está efetivamente depositada também na produção de bioetanol 2G com base em materiais lignocelulósicos tendo em vista tanto os critérios ambientais quanto o potencial de produção.

Tabela 2. Comparação balanço energético e o nível de mitigação das emissões de gases efeito estufa (EGF) das diferentes matérias primas para a produção de Bioetanol

MATÉRIA PRIMA	RELAÇÃO DE ENERGIA*	EMISSIONES EVITADAS*
Cana	9,3	89%
Milho	0,6 - 2,0	30 a 38%
Trigo	0,97 - 1,11	19 a 47%
Beterraba	1,2 - 1,8	35 a 56%
Mandioca	1,6 - 1,7	63%
Resíduos lignocelulósicos	8,3 - 8,4	66 a 73%

* A relação de energia representa a energia renovável produzida na cadeia produtiva do biocombustível, dividida pela quantidade de energia não-renovável requerida para sua produção, e as emissões evitadas correspondem à redução percentual das emissões com relação às emissões do ciclo de vida da gasolina, indicando, respectivamente, a consistência energética e ambiental de cada rota tecnológica para a produção de bioetanol.

Fonte: BNDS (2008)

Para se entender os desafios do domínio dessas tecnologias e os esforços em se abaixar os custos de produção são necessários conhecer a composição, o processamento dos resíduos agroindustriais e a produção do bioetanol de 2G.

1.2 Biomassas Lignocelulósicas

Biomassas lignocelulósicas são formadas por uma complexa cadeia de carboidratos, proteínas, sais minerais e compostos fenólicos, sendo que os polissacarídeos correspondem cerca de 90% do seu peso seco, organizados na parede celular vegetal (figura 2). A parede celular vegetal é formada por uma primeira camada de filamentos de celulose justapostos, formando um conjunto de fibras impermeáveis. Esse complexo de fibras se liga à hemicelulose através de ligações de hidrogênio e interações não-covalentes. As frações de celulose/hemicelulose encontram-se envolvidas pela lignina, polímero aromático heterogêneo (Kondo, 1997).

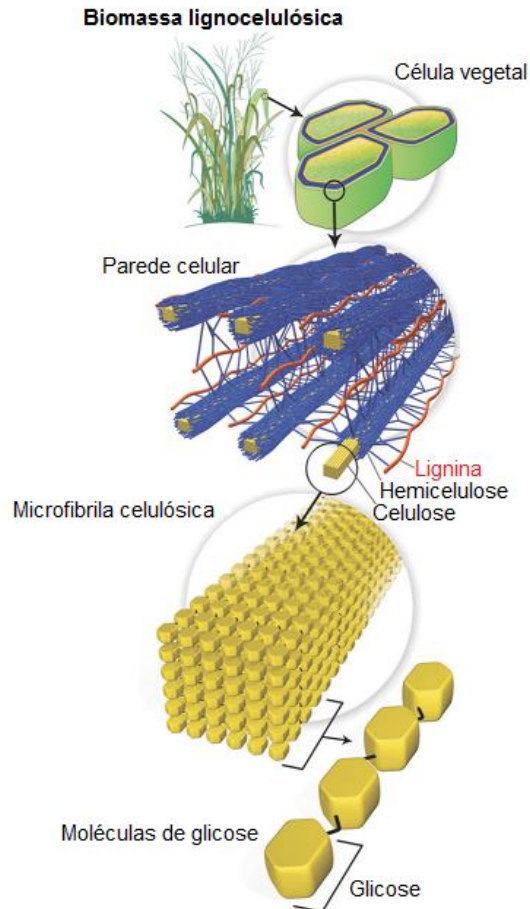


Figura 2. Estrutura da biomassa lignocelulósica(Santos *et al.*, 2012).

A estrutura da celulose é formada por uma sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ organizados por meio de unidades repetitivas. Cada resíduo tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente. As cadeias lineares são reforçadas por ligações de hidrogênio inter e intracadeias e por forças de Van-der-Waals (Lynd *et al.*, 2002).

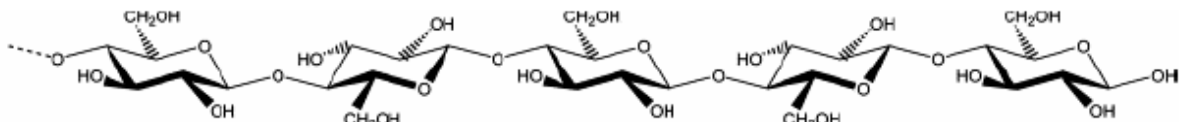


Figura 3. Representação esquemática da molécula de celulose.

As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, compostos por *D*-glucose, *D*-galactose, *D*-manose, *D*-xilose, *L*-arabinose, ácido *D*-glucurônico e ácido 4-*O*-metil-glucurônico, que se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e

mantendo ligações cruzadas, via ligações de hidrogênio, em uma rede complexa (figura 4). De acordo com os seus monômeros, as hemiceluloses podem ser classificadas como xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinanas (Ogeda e Petri, 2010).

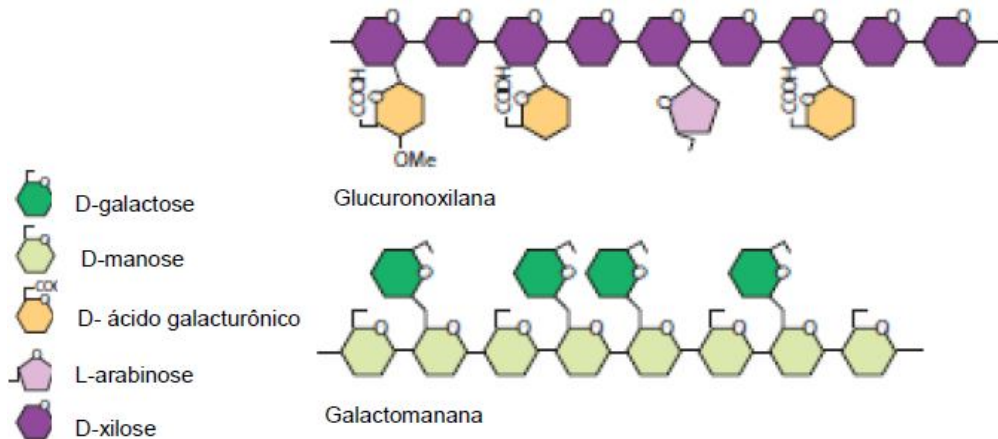


Figura 4. Estrutura das hemiceluloses glucuronoxilana e galactomanana (Sheller *et al.*, 2010)

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas, compõe até 20% da parede celular. É um heteropolímero amorfo que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico, unidos por ligações do tipo éter e apresenta uma conformação tridimensional e amorfa, mais hidrofóbica que a celulose e a hemicelulose (Figura 5). Por causa do tipo de ligação química e de sua heterogeneidade, a lignina não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas como a maioria dos outros polímeros naturais (celulose, amido, proteínas etc) (Fukushima e Hatfield, 2003).

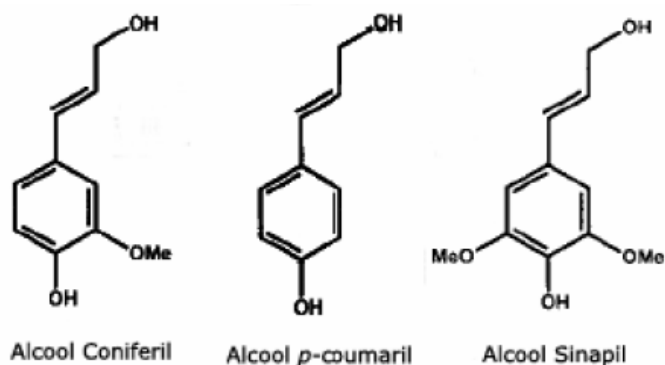


Figura 5. Constituintes da lignina (Boerjan *et al.*, 2003).

A composição das biomassas vegetais pode variar dependendo do tipo de

resíduo e com isso o seu teor de recalcitrância. Ou seja, o grau de resistência e/ou dificuldade de desestruturação das fibras de celulose e sua conversão a monossacarídeos fermentescíveis devido à sua interação intermolecular e completa ausência de água na estrutura da microfibrila. Além da quantidade de hemicelulose e lignina presente (Kondo, 1997). A tabela 3 mostra a composição dos diferentes materiais lignocelulósicos.

Tabela 3. Composição dos diferentes materiais lignocelulósicos

MATERIAL	COMPOSIÇÃO %			
	CELULOSE	HEMICELULOSE	LIGNINA	OUTROS
Bagaço de cana	36	28	20	16
Palha de cana	36	21	16	27
Palha de milho	36	28	19	7
Sabugo de milho	36	28	0	36
Palha de trigo	39	36	10	15
Palha de arroz	33	26	7	34
Casca de arroz	38	20	19	25
Palha de algodão	42	12	15	31
Madeira de pinheiro	44	26	29	1
Capim	32	20	9	39
Piolho de Algodão	65	10	6	19
Engaço de bananeira	52	17	9	22
Casca de soja	44	16	5	35

Fonte: Castro (2006) (modificado)

1.3 Produção de Bioetanol

1.3.1 Pré-tratamento

Promover a hidrólise das fibras de celulose e liberar açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol de forma eficiente e economicamente viável tem sido um desafio. Isso porque os valores de hemicelulose e lignina envolvendo as cadeias de celulose dificulta o acesso de reagentes e catalisadores, sendo necessário um tratamento prévio para a remoção destes componentes, a fim de facilitar o acesso das enzimas à celulose.

Os pré-tratamentos consistem em uma série de operações que aplicadas aos materiais lignocelulósicos, são capazes de quebrar as ligações que unem as macroestruturas com o objetivo de separar a lignina das fibras de celulose e hemicelulose tornando-as mais acessíveis para a ação das enzimas microbianas

nos processos de sacarificação e fermentação.

Os pré-tratamentos podem ser classificados em quatro categorias: físico, químico, biológico e combinado. Segundo Lynd (1996) um pré-tratamento ideal é aquele que produz fibras reativas, preserva a utilidade da fração hemicelulósica e não libera compostos que inibam significativamente a fermentação. A tabela 4 apresenta os processos mais utilizados para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Tabela 4. Principais estratégias utilizadas para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

PROCESSO	DESCRIÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO
Físicos	
Explosão a vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160°C - 260°C)
Termohidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação para hidrolisar a hemicelulose)
Químicos	
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico, ou nítricos, concentrados ou diluídos.
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases, como hidróxidos de sódio e cálcio
Organosolv	Uma mistura de solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H ₂ SO ₄ , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose.
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente é utilizada em combinação com outros processos.
Combinados	
Explosão de vapor catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ (ou SO ₄) ou CO ₂ na explosão de vapor pode aumentar a eficiência de hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose.
Afex (Ammonia fiber explosion)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por certo período de tempo
Explosão de CO ₂	Simula a explosão de vapor

Fonte: Embrapa (2009) (modificado).

1.3.2 Sacarificação e fermentação

Após o pré-tratamento, segue-se para a etapa de sacarificação, ou hidrólise das biomassas lignocelulósicas, que tem como objetivo a redução das macromoléculas de celulose e hemicelulose, através da adição de ácido sulfúrico aos resíduos, para que seja feita uma hidrólise ácida, ou através da ação de enzimas, hidrólise enzimática, para obter açúcares fermentescíveis.

A hidrólise ácida é bastante eficiente para a sacarificação, no entanto, apresenta desvantagens, tais como a modificação química da glicose formando, por exemplo, furfurais que além de inibirem as atividades das enzimas são tóxicos aos microrganismos (Saha *et al.*, 2005). Já a hidrólise enzimática consiste na utilização de enzimas para a hidrólise da biomassa a açúcares fermentescíveis que podem servir para a produção de etanol. Sendo assim possui a vantagem de não gerar derivados que podem ser tóxicos aos microrganismos na etapa de fermentação alcoólica (Wyman, 2007).

Um dos desafios para que este processo torne-se viável é a produção de enzimas celulolíticas eficientes na degradação de celulose cristalina em larga escala com menor custo, o que tem sido buscado através de estratégias tais como: seleção de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e programas de melhoramento genético de microorganismos (Park *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013).

Quatro estratégias têm sido desenvolvidas e consideradas para a produção do bioetanol 2G: Hidrólise e Fermentação em Separado Sacarificação, Fermentação Simultâneas, Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas e Bioprocesso consolidado:

- 1) **Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF)**: a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento é realizada em um processo separado da fermentação, bem como a produção de celulasas que são utilizadas na hidrólise da celulose. Neste tipo de estratégia os açúcares provenientes da hemicelulose, após o pré-tratamento, podem ser convertidos a etanol em um fermentador separado, sendo o sólido remanescente, denominado celulignina, encaminhado para a hidrólise da celulose. A principal vantagem dessa estratégia é permitir que a hidrólise e a fermentação possam ser conduzidas nas condições ótimas. Geralmente, a temperatura ótima para as celulasas está entre 45°C e 50°C, dependendo do microrganismo produtor. E a temperatura ótima para o crescimento da maior parte do crescimento dos produtores de etanol está entre 30°C e 37°C (Olsson *et al.*, 2006). Por outro lado, a principal desvantagem é a inibição de celulasas pelos açúcares liberados na hidrólise, principalmente celobiose e glicose que se acumulam no meio, conferindo uma hidrólise incompleta da celulose e rendimentos não muito altos.
- 2) **Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)**: a hidrólise enzimática

e a fermentação das hexoses (açúcares C6) são realizadas na mesma etapa, enquanto que a hidrólise da hemicelulose ocorre em etapa diferente, bem como a produção das celulasas. Essa estratégia apresenta inúmeras vantagens, dentre elas: a redução da inibição das celulasas pelos seus produtos de hidrólise, uma vez que os glicídios não se acumulam no meio; menor complexidade e custo do processo, comparado ao SHF, pois reduz o número de reatores; minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre no meio. Entretanto, apresenta a dificuldade de conduzir o processo dentro da faixa ótima de temperatura do microorganismo fermentador.

- 3) **Sacarificação e Co-fermentação Simultânea (SSCF):** a co-fermentação refere-se à fermentação de ambos açúcares, pentoses e hexoses, que ocorre no mesmo reator juntamente com a sacarificação da celulose. A hidrólise da hemicelulose e a produção de celulasas ocorrem separadamente.
- 4) **Bioprocesso consolidado (CBP):** Em todos os processos descritos anteriormente se faz necessária uma unidade separada dedicada à produção de enzimas, ou as enzimas devem ser adquiridas de um produtor externo. No CBP, tanto a hidrólise e fermentação e o etanol produzido a partir dos açúcares da hemicelulose e celulose são conduzidas em um único reator e realizadas pelo mesmo microorganismo. Entretanto não existem naturalmente microrganismos capazes de produzir celulasas nos níveis desejados e também produzir etanol com alta produtividade e altas concentrações.

Dois estratégias podem ser seguidas para a obtenção de organismos para o CBP. A primeira estratégia envolve a modificação de microrganismos naturalmente produtores de etanol, a fim de torná-los produtores eficientes também de celulasas e/ou xilanases, se a hidrólise da hemicelulose também for enzimática. Esta estratégia tem sido a mais empregada tendo como microorganismo modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A segunda estratégia segue o caminho oposto, ou seja, modificar excelentes produtores de celulasas com a finalidade de transformá-los também em eficientes produtores de etanol (Lynd *et al.*, 2005).

A transformação da levedura *Kluyveromyces marxianus* proposta por Chang

et al. (2013) é um exemplo de organismo produtor de etanol que teve em seu material genético a introdução de genes para celulases. Os pesquisadores utilizaram uma técnica de biologia sintética chamada “promoter-based gene assembly and simultaneous overexpression” (PGASO) onde simultaneamente, transformaram e expressaram múltiplos genes na levedura. Cinco genes de celulase, incluindo dois para celobiohidrolases, dois para endo- β -1,4-glucanase e um para beta-glucosidase de diferentes fungos. A cepa recombinante chamada de KR7 foi capaz de expressar os cinco genes heterólogos e converter celulose cristalina em etanol.

Outro exemplo é o da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na qual foram co-expressos genes de celulases e de uma proteína de ligação à parede celular vegetal chamada “swollenin” obtida de *Trichoderma reesei* capaz de afrouxar as fibras de celulose e torná-la mais facilmente hidrolisável pelas celulases. Neste estudo a levedura apresentou sinergismos entre as celulases e a proteína swollenin. Foi registrada uma atividade de degradação da celulose 2,9 vezes mais elevada do que para a estirpe de levedura com introdução de genes apenas de celulases. Além disso, foi capaz de produzir eficientemente 3,4 g / L de etanol após 96 h de fermentação, uma concentração 1,4 vezes mais elevada do que a conseguida pela estirpe sem a proteína swollenin (2,5 g / L) (Nakatani *et al.*, 2013).

1.4 Resíduo Agroindustrial – Palha de Cana de Açúcar

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial decana de açúcar e juntamente com os Estados Unidos lideram a produção mundial de bioetanol. O reaproveitamento dos resíduos sólidos resultantes das lavouras, em especial o bagaço e a palha de cana para a cogeração de bioetanol também tem ganhado destaque. Isso porque grandes quantidades de bagaço de cana e palha de cana são geradas durante a produção de etanol e açúcar (Pereira *et al.*, 2015).

A palha de cana tem sido utilizada para forrar a superfície do solo visando à proteção contra a erosão, para o fornecimento de nutrientes para o solo após a colheita do canavial e na maioria das vezes para geração de energia por meio da queima. Entretanto o fato da queima gerar para a atmosfera gases tóxicos e materiais particulados que conseqüentemente contribuem para o impacto ambiental, por meio do decreto nº47.700, Lei nº 11.241 de 19 de setembro de 2002 a eliminação dessa prática tem sido gradativa o que levará a um maior acúmulo desse resíduo.

Tecnologias para o recolhimento e enfardamento da palha tem se intensificado já que a retirada e aproveitamento da palha no setor sucroenergético para a geração de bioetanol 2G já tem apresentado demanda e a sua não utilização já é considerada um desperdício energético uma vez que apresentam 47,0% de celulose, 19,2% de hemicelulose e 5,5% de lignina (Siqueira, 2010).

1.5 Resíduo Agroindustrial – Piolho de Algodão

Alterações constantes no mercado consumidor mundial vêm determinando mudanças nas empresas, de forma que tem levado as indústrias de maneira geral à reflexão quanto à necessidade de modernização, o aumento da qualidade dos produtos, redução dos custos e a adoção de medidas sustentáveis nos processos de produção e destinação dos resíduos gerados.

Dentre uma gama de resíduos gerados pelas indústrias, os resíduos da indústria têxtil chamam a atenção. Os resíduos gerados durante a fiação e a tecelagem do algodão são constituídos por fibras curtas, imaturas, e impurezas denominadas piolho de algodão. Esse tipo de resíduo pode prejudicar a qualidade do fio e representa os maiores volumes de resíduos sólidos gerados dentro de todo o processo. Uma indústria de pequeno porte pode descartar por mês cerca de 60 toneladas de piolho de algodão. Grande parte deste resíduo é queimada como fonte de combustível em caldeiras ou é disposto para decomposição em aterros sanitários (Abreu, 2014).

Esse acúmulo de material lignocelulósico em locais indevidos resulta não apenas em degradação ambiental, mas também no desperdício de um material potencialmente valioso que pode ser utilizado na produção de biocombustíveis, pois apresenta a alta quantidade de celulose (Duarte, 2013).

Siqueira (2010), após realizar a análise bromatológica de alguns resíduos agroindustriais, constatou que o piolho de algodão limpo possui 73% da composição de celulose, 4% de hemicelulose e 4,8 de lignina. Esses percentuais fazem deste resíduo uma fonte promissora de açúcares fermentáveis para se gerar o bioetanol 2G.

1.6 Rúmen como Fonte de Microorganismos

O ecossistema microbiano do rúmen compreende cerca de 30 espécies bacterianas predominantes do líquido ruminal, cerca de 40 espécies de protozoários e cinco espécies de fungos (Miron *et al.*, 2001). Esta microbiota é altamente sensível às mudanças na dieta, idade e a saúde do animal hospedeiro, o qual varia de acordo com a localização geográfica, estação, e regime de alimentação (Singh *et al.*, 2014).

O rúmen pode ser considerado um biorreator altamente especializado, onde polissacarídeos da parede celular vegetal são eficientemente hidrolisados via inúmeras enzimas produzidas pelos microorganismos residentes. É microaerófilo ou anaeróbico. Microorganismos microaerófilos e anaeróbicos exigem técnicas especiais para sua manutenção e propagação e por isto são menos estudados que os aeróbicos. Baseado nestas características o rúmen pode ser uma rica fonte de microorganismos conversores de biomassa vegetal para serem utilizados em processos de sacarificação e fermentação.

Vários estudos visando a caracterização da diversidade microbiana do rúmen de diversos animais incluindo bovinos (Ferrer *et al.*, 2007; Hattori e Matsui, 2008; Hook *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Christopherson *et al.*, 2014), veados (Sundset *et al.*, 2009) e caprinos (Cheng *et al.*, 2009) vem sendo realizados na busca de microorganismos produtores de celulasas e hemicelulasas para obtenção de maior eficiência na utilização da ração animal, no ramo da pecuária, e na produção de biocombustível celulósico com custo competitivo.

No entanto, estima-se que mais de 85% dos membros de microorganismos presentes no rúmen ainda não tenham sido cultivados. Esta estimativa é baseada na diversidade filogenética de comunidades microbianas ruminais em cervos, ovelhas e gado, revelado por técnicas de sequenciamento rDNA 16S e 18S, eletroforese em gel com gradiente, biblioteca subtrativa, métodos de hibridização entre outras (Gong *et al.*, 2012).

Abordagens metagenômicas têm sido amplamente utilizadas para isolar novas hidrolases de várias amostras do meio ambiente, incluindo o rúmen. Brulc *et al.* (2009) ao analisar, por meio de pirosequenciamento, quatro diferentes porções do rúmen bovino, relatou que os microbiomas apresentaram uma variedade de glicosil hidrolases com módulos de ligação a carboidratos (CBM) com grande potencial para hidrolisar componentes da parede celular de plantas.

Amostras do rúmen de bovinos da raça Jersey também foram submetidas a um estudo de metagenômica para explorar a diversidade genética de glicosil hidrolases em especial celulasas e xilanases (Wang *et al.*, 2013). Neste estudo foram identificados 120 genes que codificam 575 enzimas ativas em carboidratos e proteínas supostamente relacionadas com a regulação da transcrição, transportadores e transdução de sinal, juntamente com a degradação de polissacarídeo e metabolismo. Além de uma nova subfamília de GH5 denominada de S-8 identificada a partir de sequências de um dos filos mais encontrados no rúmen, o *Firmicutes*.

1.7 *Clostridium thermocellum*

Clostridium thermocellum (figura 6) pertencente ao filo *Firmicutes*, principal grupo de bactérias registrados em rúmen de bovinos, é uma bactéria formadora de esporos, em forma de bastonetes, flageladas, anaeróbica, gram-positiva, tendo como temperatura ótima de crescimento 65°C (Freier *et al.*, 1988; Bayer *et al.*, 2008).

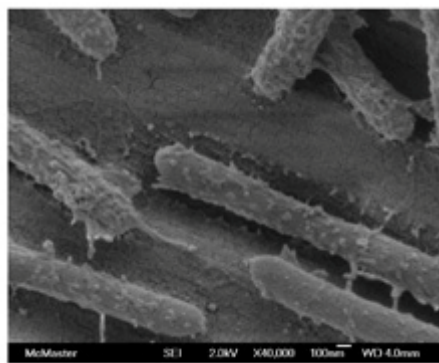


Figura 6. Células de *C. thermocellum* colonizando a celulose (Islam *et al.*, 2015).

Há algum tempo, *C. thermocellum* tem sido alvo de estudos devido ao seu potencial para ser utilizada comercialmente no CBP, já que apresenta condições favoráveis de crescimento para tal processo, secreta uma variedade de enzimas capazes de hidrolisar biomassa vegetal e produz produtos como acetato, etanol, formiato, lactato, H₂ e CO₂ dependendo do tipo de substrato fermentado (Demain *et al.*, 2005).

C. thermocellum da linhagem ATCC27405 foi primeiramente caracterizada em 1977 por conter atividade enzimática de Avicelase e CMCase quando cultivada em

celulose (Ng *et al.*, 1977; Johnson *et al.*, 1982). No início acreditava-se que este microorganismo degradava exclusivamente a celulose, no entanto descobriu-se que é capaz de degradar hemicelulose, uma vez que sua principal característica é formar um complexo multienzimático denominado celulosoma formado por celulases, hemicelulases, pectinases, liases e esterases de hidratos de carbono.

Pela capacidade em produzir uma variedade de enzimas quando cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos, genes que codificam mais de 30 endoglucanases, 4 exoglucanases, 4 celobio-hidrolases, mananases entre outras enzimas tem sido clonados e inseridos em vários microorganismos como, *Echerichia coli*, *S. cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillusstearothermophilus* e *Lactobacillus plantarum* a fim de melhorar os rendimentos e reduzir os custos do processo de hidrólise enzimática (Demain *et al.*, 2005; Fontes e Gilbert, 2010).

Quanto à forma de colonização dosubstrato,*C. thermocellum*por meio da formação de biofilmes quando cultivado em celulose, orienta-se de forma paralela às fibras do substrato, formando uma monocamada de células que se espalham gradativamente para fora a partir do local inicial da colonização. Esta orientação é mantida, a fim de facilitar a hidrólise extracelular do substrato. As monocamadas celulolíticas parecem ser uma adaptação funcional da bactéria devido à natureza recalcitrante do substrato (Dumitrache *et al.*, 2013).

Outra característica de *C. thermocellum* é a produção de grande quantidade de uma substância amarela durante a colonização da celulose. Essa propriedade foi observada pela primeira vez por Ng & Zeikus (1982) durante o crescimento de *C. thermocellum* sobre celobiose. Essa substância, um pigmento de estrutura carotenóide ($C_{52}H_{94}O_{19}N$) designado *yellow affinity substance* – YAS adere à fibra de celulose e parece facilitar a ligação do celulosoma ao substrato insolúvel. Como sua produção é iniciada pouco antes dos celulosomas começarem a se formar, acredita-se que sua função seja a de sinalizar a síntese/secreção das celulases (Felix e Ljungdahl, 1993).

A composição de sua membrana tem sido levada em consideração na produção de um dos seus principais produtos da fermentação, o álcool etílico. Concentrações acima de 5g/L de etanol podem influenciar negativamente o seu desempenho. Essa intolerância a concentrações de etanol foi atribuída a características da composição lipídica da sua membrana endógena. Os lipídios predominantes que compõem a parede celular de *C. thermocellum* são formados por

ácidos graxos de 16 carbonos ramificados e plasmalógenos de 16 carbonos que, junto com os outros componentes, exibem um teor de lipídios totais de ~ 82 µg / mg de peso seco celular. Níveis moderados de etanol elevam o grau de fluidez da membrana e ameaçam a sua integridade, por isso mudanças em sua membrana têm sido propostas a fim de diminuir a fluidez e torná-la mais resistente para a sua possível utilização em processos de produção de bioetanol 2G (Akinosho *et al.*, 2014).

1.7.1 Estrutura do complexo multienzimático –celulossoma

A eficiência da solubilização de celulose cristalina por *C. thermocellum* resulta da organização das enzimas que atuam na hidrólise desta biomassa na forma de um organizado complexo multienzimático, denominado celulossoma. Este complexo pode ser descrito como uma das nanomáquinas mais elaborada da natureza e altamente eficiente na hidrólise de materiais celulósicos. Ao se ligar à parede da célula vegetal o celulossoma direciona a desconstrução da celulose e hemicelulose. Essa desconstrução acontece porque o sinergismo entre as enzimas que compreendem o complexo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada destas enzimas (Félix e Ljungdahl, 1993; Schwarz, 2001; Desvaux, 2005; Kumar *et al.*, 2008; Nordon *et al.*, 2009).

A interação do complexo produzido por *C. thermocellum* YS com a sua superfície quando cultivada nos substratos celobiose e celulose foi descrita inicialmente por Bayer e Lamed em 1986. Utilizando técnicas de marcação imuno e histocitoquímica, estes autores compararam as células de *C. thermocellum* YS e de um mutante AD2 que teve o gene da unidade S1, maior componente do celulossoma com aproximadamente 210KDa silenciada. Quando cultivadas em celobiose as células do tipo selvagem eram tomadas por estruturas protuberantes ao contrário das mutantes que não apresentaram nenhum tipo de estrutura ao seu redor (figura 7). Acredita-se que essas protuberâncias contêm os celulossomas, os quais consistem de uma proteína fibrilar, denominada escafoldina, responsável pela organização das subunidades celulolíticas no complexo.

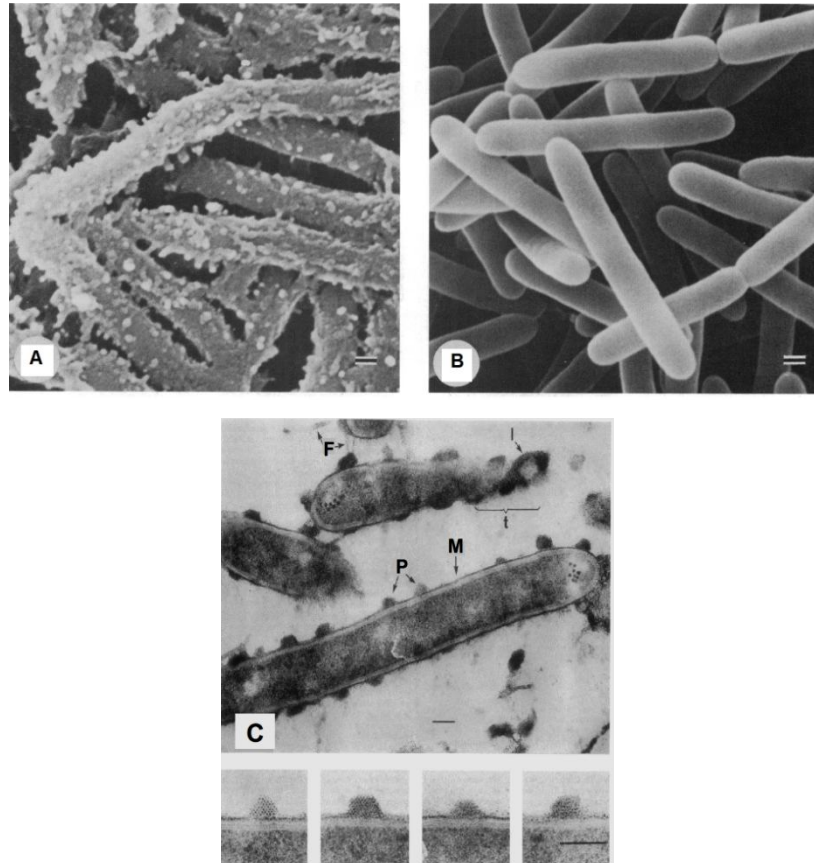


Figura 7. Células de *Clostridium thermocellum* YS cultivadas em celobiose: **A)** Células *C. thermocellum* YS com protuberâncias ao redor de toda extensão das células, **B)** Células *C. thermocellum* mutante AD2 sem as protuberâncias e **C)** Células de *C. thermocellum* YS com a presença de: **M-** monocamada; **F-** estruturas fibrosas; **P-** protuberâncias nobular (Adaptado de Bayer e Lamed, 1986).

*A e B imagens com processamento por microscopia eletrônica de transmissão

** C imagem por microscopia de varredura

O celulosoma secretado por *C. thermocellum* é o mais bem descrito e caracteriza-se por ter como estrutura principal uma subunidade não catalítica a proteína estrutural ou escafoldina - CipA com aproximadamente 220 KDa que ancora as subunidades catalíticas, organizando o complexo enzimático (Bayer, Morag e Lamed, 1994; Bayer *et al.*, 2007).

A proteína estrutural CipA é formada por nove domínios de aminoácidos repetidos denominados coesinas do tipo I (figura 8). Cada um desses domínios liga-se de forma complementar a domínios doquerinas do tipo I presentes em enzimas celulosomais. Em sua extremidade C-terminal apresenta um domínio doquerina tipo II que por sua vez se associa unicamente a domínios coesinas tipo II das proteínas “S-Layers” situadas na superfície celular bacteriana (SdbA, OlpB e Orf2), promovendo deste modo, a ligação entre o complexo celulosomal e a célula bacteriana. Outro componente importante presente em CipA é o domínio de

aminoácidos de ligação a carboidrato, denominado Módulo de Ligação à Carboidrato ou “Carbohydrate-Binding Modules” (CBM) (Olson, *et al.*, 2013; Vazana *et al.*, 2013).

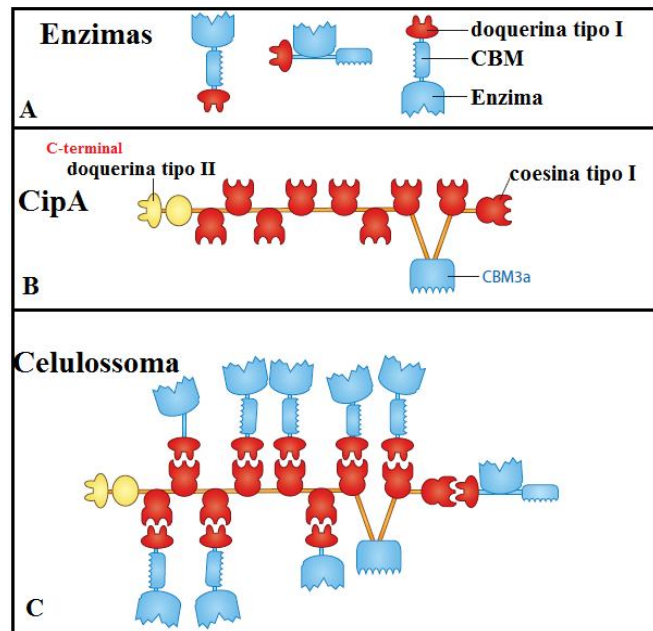


Figura 8. Mecanismo de montagem do celulosoma. A) Celulases e hemicelulases produzidas por microorganismos anaeróbicos contêm domínios não catalíticos doquerinas tipo I e módulo de ligação a carboidratos CBMs ligados aos domínios catalíticos (enzima). B) Proteína estrutural CipA formada por nove domínios não catalíticos coesinas tipo I, um domínio doquerina tipo II e um módulo de ligação a carboidrato CBM. C) Complexo Celulosoma formado pela interação dos domínios coesina tipo I da CipA e os domínios doquerinas tipo I das enzimas celulosomais (Adaptado de Fontes e Gilbert, 2010).

Os CBMs são classificados segundo o critério de similaridade de sequências de aminoácidos utilizado para classificação de famílias de glicosil hidrolases. Segundo este critério de classificação os CBMs foram dividido em 39 famílias. Alternativamente, os CBMs podem ser classificados também de acordo com sua afinidade ao carboidrato ligante, sendo classificados em tipo A quando são ligantes a estruturas de polissacarídeos, às cadeias de glicanas (tipo B) ou a pequenos açúcares (tipo C) (Boraston *et al.*, 2004; Cai, *et al.*, 2011).

As enzimas celulosomais, subunidades catalíticas, possuem uma sequência de aminoácidos repetidos que forma o domínio doquerina tipo I, que interage especificamente com o domínio coesina tipo I da escafoldina, estabelecendo, desta maneira, uma ligação das enzimas com a proteína estrutural CipA (Vazana *et al.*, 2013).

Os domínios coesina I e doquerinas I de *C. thermocellum* apresentam um alto nível de conservação nos resíduos envolvidos na montagem do celulosoma. A interação das doquerinas com as coesinas se dá normalmente entre os resíduos

Ser45-Thr46 envolvendo íons cálcio (figura 9). Essa conservação implica na montagem de uma forma não seletiva ou moderadamente seletiva, devido a incapacidade dos domínios coesinas I de CipA de discriminarem individualmente os domínios doquerinas I das enzimas celulosomais. Por isso, qualquer integrante do complexo celulosomal pode compreender um conjunto diferente de subunidades catalíticas ligadas à CipA (Carvalho *et al.*, 2003; Vazana *et al.*, 2013).

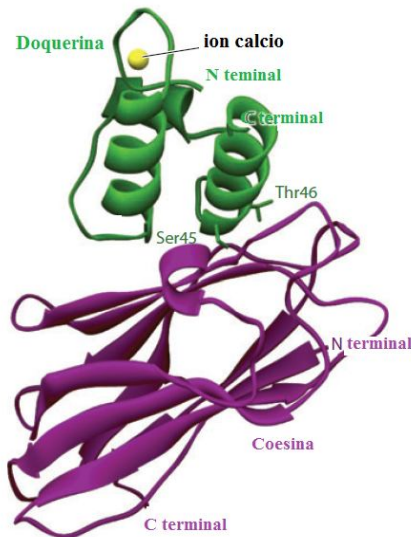


Figura 9. Complexo coesina-doquerina: doquerina I da Xyn10B de *Clostridium thermocellum* ligada a segunda coesina I de CipA (Adaptado de Fontes e Gilbert, 2010).

Celulosomas bacterianos podem ser classificados em dois tipos principais, celulosomas complexos e celulosomas simples (Fontes e Gilbert, 2010; Vazana *et al.*, 2013). Os celulosomas complexos presentes em *C.thermocellum*, *R. flavefaciens*, *A. cellulolyticus*, e *B. cellulosolvans* são constituídos de uma única escalfodina primária e múltiplas escalfodinas âncoras (figura 10).

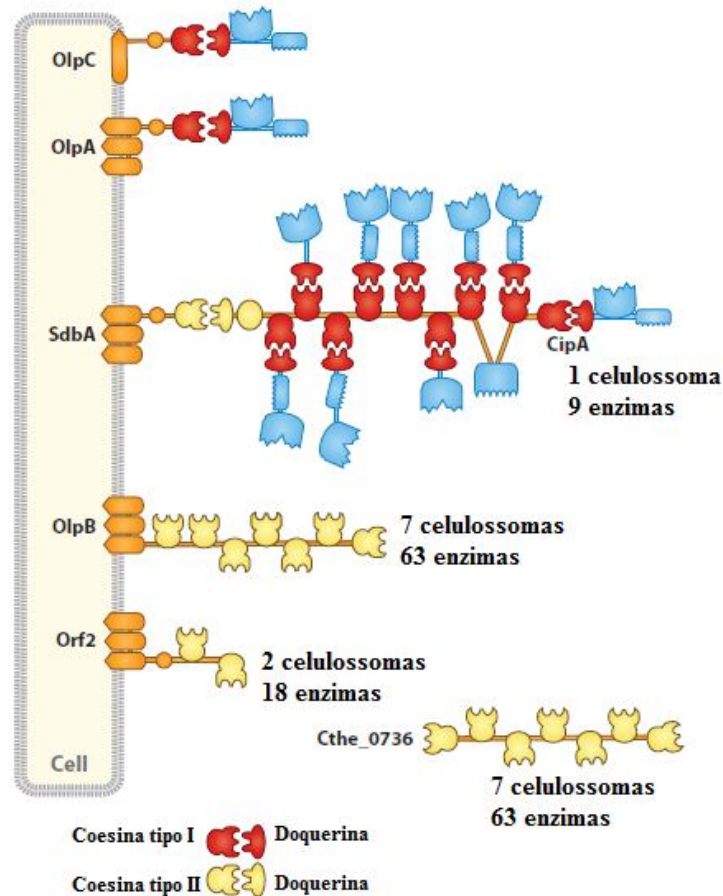


Figura 10. Organização do complexo celulosossoma de *C. thermocellum*. A doquerina tipo II da extremidade C-terminal da proteína estrutural CipA se liga especificamente a domínios coesina tipo II encontrados em proteínas da superfície celular (SdbA, OlpB, Orf2) ou na Cthe_0736. Devido a ancoragem das escalfodinas, OlpB, Orf2 e Cth 0736 contém mais de um tipo de domínio coesina tipo II que contribuem para a montagem de policelulosossomas com até 63 subunidades catalíticas. As enzimas celulosossomais podem também se ligar diretamente à superfície da célula da bactéria por meio de domínios coesina tipo I encontrados em OlpA e OlpC (Fontes e Gilbert, 2010).

Boa parte destas escalfodinas que ancoram na parede celular e/ou a escalfodina primária apresenta domínios SLH que geralmente estão presentes na maioria das proteínas S-layer. Os domínios SLH mediam a ligação das proteínas estruturais à superfície da célula bacteriana e podem se ligar a camada de peptidoglicano ou polissacarídeos da parede celular secundária (Bayer *et al.*, 2008)

Os celulosossomas simples apresentam uma única escalfodina primária que pode conter de seis a nove domínios catalíticos, o que reflete no número de coesinas da escalfodina primária. O celulosossoma simples é característico para a maioria dos Clostridia mesofílicos como *C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans*, *C. josui*, e *C. acetobutylicum*. A presença de coesinas do tipo II nas escalfodinas de ancoragem de *C. thermocellum* permite a formação de policelulosossomas com 63 unidades catalíticas atingindo um tamanho de até 100 MDa associadas a célula ou livres

extracelularmente (figura 11) (Gold e Martin, 2007; Fontes e Gilbert, 2010; Vazana *et al.*, 2013).

1.7.2 Produção de celulases por *C. thermocellum*

C. thermocellum secreta e contém em seu genoma sequências que codificam uma série de enzimas capazes de hidrolisar celulose e uma variedade de substratos lignocelulósicos. A sequência genômica de *C. thermocellum* mostra que grande parte de suas enzimas celulolíticas enquadra-se na família 9 das glicosil hidrolases (GH-9, 16 membros), seguida pela família 5 (8 membros). Além disso, existem dois genes que codificam celulases da família 48 e um gene que codifica uma endoglucanase da família 8. A CelA da família 48 de *C. thermocellum* foi a primeira subunidade catalítica que teve sua ação sinérgica com a subunidade *escafoldina*CipA demonstrada na degradação da celulose cristalina, indicando que esta enzima é um componente chave do celulosoma (Groposo, 2013) .

Trabalhos visando à caracterização do secretoma de *C. thermocellum* demonstram que a expressão de genes de enzimas celulosomais e não celulosomais varia de acordo com a fonte de carbono disponível, fase de crescimento e a produção de etanol (Zverlov *et al.*, 2005; Gold e Martin, 2007; Riederer *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2014).

C. thermocellum quando cultivado em meio de cultura contendo celulose e celobiose como fonte de carbono secreta uma variedade de proteínas celulosomais, entre estas as mais abundantes são as proteínas que ancoram na membrana OlpB, exoglucanases, glicosil hidrolases da família 9 (GH9), endoglucanases CelsJ para culturas em celulose e de GH8 endoglucanases CelA, GH5, endoglucanases CelB, CelE e CelG e hemicelulases XynA, XynC e XghA para culturas em celobiose (Gold, Martin, 2007).

Raman *et al.* (2009) ao investigar a composição do celulosoma de *C. thermocellum* ATCC 27405 cultivado em diferentes substratos como celulose cristalina (avicel), celulose amorfa, celobiose, combinações entre celulose/pectina, celulose/xilana e em uma gramínea “switchgrass” pré-tratada com ácido detectou, por espectrometria de massas (LC-MS/MS), 67 proteínas celulosomais entre as amostras. As famílias das quatro exoglucanases mais conhecidas em *C. thermocellum* GH48 (CelS), GH9 (CelK, CbhA) e GH5 (CelO) representaram 18-30%

das proteínas secretadas pela bactéria cultivada nas diferentes condições, sendo que em celobiose CelS e CelK representaram as menos abundantes. Já em celulose e gramínea pré-tratada CelK e CbhA, ambas foram secretadas em níveis mais elevados. As Endoglucanases GH5, Cthe0821, CelB, CelG, CelE, GH9, CelQ, CelF, CelT, CelR, CelW e CelJ e Xilanases XynA, XynC e XynZ identificadas também apresentaram produção diferenciada dependendo do substrato utilizado no cultivo.

A partir do cultivo de *C. thermocellum* DSM 1237 em celobiose Rydzak *et al.* (2012) identificou 7 proteínas pertencentes a estrutura do celulosoma, 31 glicosidades associadas ao celulosoma e 19 proteínas não celulosomais nas amostras do sobrenadante obtidas na fase exponencial e estacionária. Entre as proteínas celulosomais não foram registradas diferenças significativas da taxa de produção em relação às fases de cultivo sendo que as proteínas mais abundantes foram CipA, SdbA, OlpB, OlpA, Orf2p. Entre as glicosidades com domínio do querina do tipo I, as com maior taxa de produção foram CelS, XynC, CelA, XynA/U, CelG.

A partir do exposto, podemos observar que a produção de celulases e hemicelulases por *C. thermocellum* é variável não só pelas condições de cultivo, mas principalmente pela fonte de carbono utilizada. Sendo assim, estudos que envolvam a regulação da expressão de genes que codificam estas proteínas celulosomais podem contribuir, não só para o aproveitamento de resíduos agroindustriais como a palha de cana de açúcar e piolho de algodão como fonte para produção de etanol, mas também reduzir o impacto ambiental causado pelo armazenamento destes resíduos.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a quantidade de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes setores agrícolas, em especial a palha de cana e o piolho de algodão gerado pela indústria têxtil, a utilização destes resíduos para representa uma alternativa promissora para geração de biocombustíveis devido ao baixo custo e ao potencial celulolítico que estes resíduos possuem;

A bactéria anaeróbica *C. thermocellum* é caracterizada por formar um complexo de enzimas denominado celulosoma capaz de hidrolisar de maneira eficiente a celulose presente em uma variedade de substratos lignocelulósicos. No entanto ainda poucos são os estudos relacionados aos mecanismos envolvidos na regulação de genes celulosomais frente aos resíduos agroindustriais mencionados, bem como a caracterização das enzimas que são produzidas por esta bactéria;

A partir dos trabalhos de isolamento de bactérias anaeróbicas obtidas do rúmen de caprino da raça Moxotó realizados pelo grupo de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília-UnB o presente trabalho propôs a investigação da produção de enzimas lignocelulolíticas por uma das bactérias isoladas do rúmen de caprino da raça Moxotó denominada como Isolado B8, envolvendo estudos bioquímicos e proteômicos após o cultivo em piolho de algodão e palha de cana de açúcar.

3OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da bactéria anaeróbica termofílica *C. thermocellum*, isolado B8, de rúmen de caprino da raça Moxotó em produzir celulases quando cultivado com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de CMCase e Avicelase por *C. thermocellum* isolado B8 quando cultivado em meio contendo resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono;
- Comparar a produção de celulases entre *C. thermocellum* isolado B8 e *C. thermocellum* JW20 (ATCC 31549);
- Avaliar o perfil de expressão gênica de 16 genes envolvidos na formação do celulosoma e vias primárias da fermentação e repressão catabólica de *C. thermocellum* isolado B8 quando cultivado em meio líquido contendo celulose, piolho de algodão e palha de cana como fonte de carbono;
- Mapear as proteínas secretadas por *C. thermocellum* isolado B8 quando cultivado em meio líquido contendo celulose, piolho de algodão e palha de cana como fonte de carbono.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e Manutenção

Bactérias anaeróbicas foram isoladas de amostras sólidas e líquidas do rúmen de um caprino endêmico no nordeste do Brasil, da raça Moxotó, utilizando condições de crescimento anaeróbio, conforme descrito por Freier *et al.* em 1988. Um total de 10 bactérias isoladas foram inoculadas em meio de cultura redutor (extrato de levedura (3 g.L⁻¹), NH₂PO₄ (5 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (2.5 g.L⁻¹), NH₄Cl (0.5 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (0.5 g.L⁻¹), NaHCO₃ (0.5 g.L⁻¹), MgCl₂ (0.09 g.L⁻¹), solução mineral (5.0 mL), solução de vitaminas (0.5 mL), NaOH (0.04 g.L⁻¹), Na₂S₉H₂O (0.125 g.L⁻¹), cisteína (0.05 g.L⁻¹) suplementado com 1% de celulose microcristalina (m/v) como fonte de carbono, e incubadas a 60°C durante 48 horas.

Para o isolamento e identificação as amostras sólidas e líquidas do conteúdo do rúmen foram transferidas para frascos de cultura contendo 100 mL de meio líquido suplementado com 1% de celulose microcristalina (Sigma Aldrich^R) (w / v) como fonte de carbono. Após 48 horas de crescimento, uma alíquota de 1 mL de cada cultura enriquecida (amostras ruminais sólido e líquido), foi transferida para um novo frasco de cultura contendo 30 mL de meio de cultura, e usada em diluições em série (1:10; 1: 100 e 1: 1000). Subseqüentemente, 0,5 mL de cada amostra foram transferidos para placas de Petri contendo meio sólido suplementado com carboximetil celulose como fonte de carbono e incubados a 60°C sob condições anaeróbicas. Após 48 horas de crescimento as colônias foram coletadas e reaplicadas em placas de Petri. Este procedimento foi repetido três vezes.

As colônias isoladas foram recolhidas e re-inoculadas num frasco de cultura contendo 100 mL de meio de cultura suplementado com 1% de celulose microcristalina (w / v) como fonte de carbono, e incubadas a 60°C durante 48 horas. Um único isolado apresentou crescimento em celulose, e posteriormente foi identificado como da espécie *Clostridium thermocellum* utilizando análise da sequência 16SrDNA e comparação de genomas. Este isolado, denominado *C. thermocellum* B8, foi capaz de crescer sob estas condições e utilizar a celulose como fonte de carbono, razão pelo qual foi escolhido para ser utilizado neste trabalho. Culturas líquidas de *C. thermocellum* foram mantidas a 4°C e -80°C com

repiques semanais e a cada 6 meses, respectivamente

A fim de avaliar o potencial para cultivo e produção de enzimas celulolíticas em diferentes substratos lignocelulósicos do isolado *C. thermocellum* B8 isolado pelo grupo de pesquisa do laboratório de enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília - UnB foi realizado um estudo comparativo tendo como padrão o isolado *C. thermocellum* JW 20 (ATCC31549) isolado do algodão (Freier *et al.*, 1988) amplamente conhecido por sua capacidade de crescer em celulose e celobiose e secretar celulases. *C. thermocellum* JW20 foi gentilmente cedido pelo Dr. Lars G. Ljungdahl (Georgia Power Distinguished Professor of Biotechnology) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade de Georgia, nos Estados Unidos. Os isolados de estudo (B8 e JW20) foram cultivados em frascos contendo 100 mL de meio com 2% de fonte de carbono por 48 h a 200rpm a 60°C e depois armazenados em câmara fria e utilizados como pré-inóculo. Após o crescimento as culturas foram mantidas a 4°C por duas semanas ou a – 80°C por seis meses até a re-cultura.

Foram utilizados como fonte de carbono: glicose, celulose microcristalina fibra longa (Sigma Aldrich^R), resíduos de: piolho de algodão e palha de cana de açúcar. Os resíduos utilizados foram previamente autoclavados por 1 hora a 120°C e posteriormente lavados exaustivamente com água e levados para a estufa para serem secos por 12 horas a 60°C.

4.2 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo no Crescimento de *C. thermocellum*B8

Para avaliar o efeito do pH, da temperatura e tempo de cultivo no crescimento de *C. thermocellum* B8, o mesmo foi cultivado em triplicata em frascos de 50 mL contendo 30 mL de meio anaeróbico tendo como fonte de carbono celulose microcristalina fibra longa (Sigma Aldrich^R), conforme descrito no item 4.1. Para avaliação do efeito do pH o meio foi tamponado em diferentes pH utilizando os tampões acetato de sódio, fosfato de sódio e Tris-HCL com concentração final de 50 mM nos pHs de 4, 5, 6, 7 e 8. Em seguida *C. thermocellum* B8 foi cultivado por 48 horas com agitação de 200 rpm e a 60°C. Para avaliar o efeito da temperatura as culturas foram mantidas a 35, 45, 60 e 75°C a 200 rpm por 48 horas em meio anaeróbico pH 7,0. A influência do tempo de cultivo de B8 foi avaliada a partir do

cultivo da bactéria em meio anaeróbico pH 7,0 a 60°C e 200 rpm por 12, 24, 38, 48 e 60 horas. Posteriormente, alíquotas do sobrenadante das culturas foram retiradas e utilizadas para a quantificação do crescimento por meio do monitoramento da turbidez da cultura medindo a absorvância da cultura a 660 nm.

O efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de proteínas por *C. thermocellum* também é avaliado. Para tanto, alíquotas do sobrenadante dos meios de cultura com diferentes pHs utilizados para crescimento de *C. thermocellum*B8 conforme descrito no parágrafo anterior foram retiradas após o crescimento da bactéria por 48 horas a 60°C e submetidas a centrifugação a 10.000 rpm a temperatura ambiente. Após esse procedimento tiveram os pHs do meio aferidos e a dosagem de proteínas totais realizada conforme descrito por Bradford (Bradford, 1976).

4.3 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo na Produção de CMCase e Avicelase por *C. thermocellum*B8

Após o cultivo de *C. thermocellum* nas diferentes condições descritas no item 4.2, amostras do sobrenadante da cultura e da celulose residual foram obtidas da seguinte maneira: as triplicatas das culturas foram reunidas e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado, e a celulose residual e as células foram posteriormente ressuspensas em frascos com Tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e filtrado. O substrato residual retido no papel de filtro foi então lavado com 90 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 (3 lavagens com volume total de tampão de 90 mL). A fração de proteínas ligadas ao substrato foi eluída do substrato residual após lavagem com 90 mL de água Mili-Q (3 lavagens com volume total de água Mili-Q de 90 mL) e reservadas para serem concentradas. Estas amostras foram concentradas por liofilização e ressuspensas em 10 mL de água Mili-Q. Os sobrenadantes das culturas, por sua vez, foram fracionados em alíquotas de 30 mL e em seguida dialisados por 8 horas com trocas de água destilada a cada 2 horas, o processo ocorreu em câmara fria a 4°C sob agitação. Os sobrenadantes dialisados também foram concentrados por liofilização. As amostras das frações do sobrenadante e das frações eluídas da celulose residual foram reservadas para realização dos ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas totais.

4.4 Condições de Cultivo de *C.thermocellum*B8 para Obtenção de Amostras Protéicas para Determinação de Atividades Enzimáticas e Mapeamento de Proteínas

Para obtenção das amostras protéicas utilizadas na determinação enzimática e no mapeamento das proteínas *C. thermocellum* B8 foi cultivado em meio anaeróbico pH 7,0 (descrito no item 4.1) contendo 2% de fonte de carbono, por 48 horas, 200 rpm a 60°C.

As fontes de carbono utilizadas no meio foram celulose cristalina fibra longa (Sigma Aldrich^R), resíduos de piolho de algodão e palha de cana de açúcar. O resíduo de piolho de algodão foi adquirido da indústria de re-beneficiamento de algodão Hantex Resíduos Têxteis, em Gaspar, SC. O resíduo de palha de cana de açúcar foi obtido em fazendas de cidade em torno do Distrito Federal.

Os resíduos utilizados foram previamente autoclavados por 1 hora a 120°C e posteriormente lavados exaustivamente com água, peneirados e levados para a estufa para serem secados por 12 horas a 60°C. Logo após foram pesados e adicionados ao meio de cultura.

As culturas obtidas como acima descrito foram então utilizadas no preparo das duas amostras de proteínas: amostra do sobrenadante e amostra das proteínas eluídas do substrato residual. Para tanto, as culturas foram filtradas com papel de filtro á vácuo, o sobrenadante coletado após ter sido centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os substrato residuais da celulose, piolho de algodão e palha de cana de açúcar e as células foram posteriormente ressuspensas em frascos com Tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e filtrado. Os substrato residuais retidos no papel de filtro foram então lavados com 100 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 (3 lavagens com volume total de tampão de 100 mL). A fração de proteínas ligadas aos substratos residuais foi eluída após lavagem com 100 mL de água Mili-Q (3 lavagens com volume total de água Mili-Q de 100 mL) e reservadas para serem concentradas. As amostras da fração eluída da celulose (FEC), fração eluída do piolho de algodão (FEP) e fração eluída da palha de cana de açúcar (FEPA) foram dialisadas em membranas com poros de 10KDa e concentradas por liofilização e ressuspensas em 5 mL de água Mili-Q. Os sobrenadantes das culturas, por sua vez, foram fracionados em alíquotas de 40 mL e em seguida dialisados em membranas com poros de 10KDa por 8 horas com trocas de água destilada a cada 2 horas, o processo

ocorreu em câmara fria a 4°C sob agitação. Os sobrenadantes dialisados também foram concentrados por liofilização. As frações do sobrenadante e das frações eluídas dos substratos residuais foram reservadas para realização dos ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas totais. Para a identificação das proteínas secretadas na presença das fontes de carbono testadas foram utilizadas apenas as amostras eluídas dos substratos residuais. O organograma abaixo (figura 11) exemplifica os procedimentos realizados para obtenção das amostras:

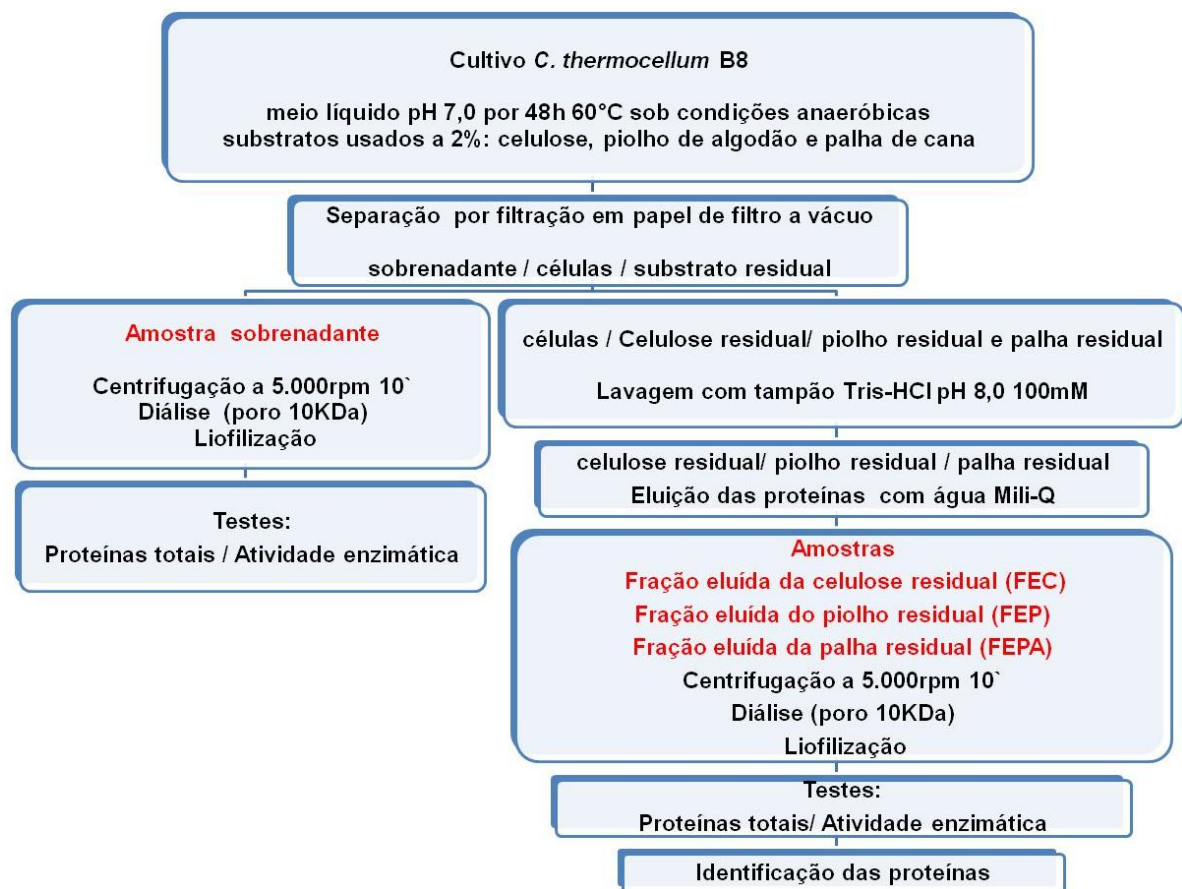


Figura 11. Organograma das etapas realizadas para obtenção das amostras obtidas após cultivo de *C. thermocellum* B8 em meio líquido pH 7,0 a 60°C por 48 horas sob condições anaeróbicas tendo como substratos celulose cristalina, piolho de algodão e palha de cana de açúcar ambos a 2%.

4.5 Determinação da Concentração Total de Proteínas e Atividades Enzimáticas

A concentração de proteínas nas amostras preparadas como acima descrito foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA como proteína padrão e a avaliação das atividades enzimáticas de CMCase, Avicelase, FPase e Xilanase foram determinadas utilizando o método de detecção de açúcar

reduzido descrito por Miller (1959). Os substratos utilizados foram carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (Avicel), xilana “oat spelt” (Sigma) ambos a 3% e preparados em tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0 e papel de filtro (Whatman 0,2 x 0,3 cm = 5mg).

Para o ensaio enzimático foram utilizados 50 µL de amostra, 50 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 50 µL do substrato incubados a 60°C por 30 minutos para o ensaio de CMCase e Xilanase e 60 minutos para FPase e Avicelase. A reação foi interrompida com a adição de 300 µL de DNS (Miller, 1959) e os tubos fervidos por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1050 µL de água destilada a reação e realizada a leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para obter 1 µmol de glicose ou xilose, por minuto de reação.

A atividade de β-glicosidase foi determinada utilizando como substrato o p-nitro-fenil-β-glicopiranosídeo (p-NPG) (Filho e Félix 1989). A mistura de reação continha 50 µL do extrato enzimático, 350 µL de tampão citrato fosfato 50 mM e 100 µL de substrato. O ensaio enzimático foi realizado em 10 minutos de incubação a 50 °C, sendo a reação interrompida com a adição de 1 mL de solução carbonato de sódio (0,5 M). A quantidade de p-nitro-fenil liberada foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de p-nitro-fenil por minuto da reação.

4.6 Comparação entre a Produção de CMCase e Avicelase de *C. thermocellum* B8 e *C. thermocellum* JW20 Cultivados em Celulose e Piolho de Algodão

C. thermocellum B8 e *C. thermocellum* JW20 foram cultivados em líquido (conforme descrito no item 4.1) pH 7,0 a 60°C por 48 horas sob condições anaeróbicas tendo como substratos celulose cristalina, piolho de algodão e palha de cana de açúcar a 2%. As amostras do sobrenadante das culturas e das frações eluídas dos substratos residuais, FEC e FEP foram obtidas conforme descrito no item 4.4 para que a atividade de CMCase e Avicelase fossem quantificadas (descrito no item 4.5).

4.7 Cultivo e Obtenção das Células de *C. thermocellum* B8 para Extração de RNA Total

A cultura obtida de *C. thermocellum*B8 foi cultivada em triplicata em frascos contendo 100 mL de meio em condições anaeróbicas contendo 2% de glicose, celulose microcristalina, pioho de algodão e palha de cana de açúcar a 60°C por 24, 36 e 48 horas sob agitação constante de 180 rpm. Para cada fonte de carbono foram utilizados 400 ml de meio. Após o crescimento, os sobrenadantes da cultura foram separados dos resíduos das fontes de carbono insolúveis, reunidos e centrifugados a 10.000 rpm por 3 vezes para obtenção das células.

4.8 Eletroforese Bidimensional – 2DE

Amostras com 500 µg de proteínas foram ressuspensas em 320 mL de tampão de re-hidratação composto por 7M de uréia, 2M de tiouréia, 2% (v/v) de CHAPS, 0,5% (m/v) de anfólitos e traços de azul de bromofenol. Estas misturas foram aplicadas em uma tira de gradiente de pH (“strips”) de 18 cm com faixa de pH não linear (4-7). A tira embebida com a amostra foi incubada por 12 horas a temperatura ambiente e posteriormente utilizada na focalização isoelétrica (primeira dimensão). A corrida da primeira dimensão foi realizada nas seguintes condições: 500 V 30 min, 1000 V por 1 h, 3500 V por 1h e 8000 V por 08h30min, com corrente elétrica de 50 µA e potencial de 5W, a 15°C totalizando 11 horas de corrida, seguindo instruções do fabricante (Amershan biosciences). Para segunda dimensão as tiras de gradiente de pH foram incubadas em tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM pH 8,8 contendo 6M de uréia, 30% (v/v) de glicerol, 2% (p/v) de SDS, 0,002% (m/v) de azul de bromofenol e 2,5% (m/v) de iodoacetona ou 1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,5% (m/v) de agarose e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. A corrida eletroforética sob-refrigeração a 20 °C foi realizada em 40 µA por gel aproximadamente 6 h e 30 min. O gel géis foram realizados em triplicatas e corados com comassie blue G-250 como descrito por Neufroff *et al.* (1988). Para detecção dos pontos protéicos “spots”, os géis foram digitalizados e as imagens resultantes analisadas utilizando-se o Software “Image Master Platinum” versão 6.0 com os seguintes parâmetros para detecção dos “spots” suavidade de 10 (*smooth*),

saliência: 40 e área mínima de 70. Os “spots” foram marcados inicialmente em modo automático, seguido de marcação manual. Os falsos “spots”, como manchas no gel, foram excluídos da análise. A análise das réplicas correspondentes ao mesmo tratamento e diferentes tratamentos foi realizada utilizando-se um “spot” como ponto de referência, e denominado “landmark”, bem como os marcadores de massa molecular.

4.9 Análise do Secretoma

4.9.1 Espectrometria de massa - MALDI TOF/TOF

Para a obtenção dos espectros de *Peptide mass fingerprinting* (PMF) em espectrômetro de massa (Henzel *et al.*, 1993) Ultraflex II (MALDI-TOF/TOF) (Bruker Daltonics Billerica, MA) os “spots” de maior massa molecular foram cortados do gel bidimensional e descolorados por incubação em uma solução de ferrocianeto de potássio a 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM por 10 minutos (Baghdady, *et al.*, 2006; Shevchenko *et al.*, (1996). Posteriormente, os fragmentos de gel foram lavados com NH_4HCO_3 100 mM, com água destilada e acetonitrila. Na última lavagem os fragmentos de gel foram macerados com pistilo e secados a vácuo por 20 minutos. Os géis secos foram re-hidratados com 5-10 μL de NH_4HCO_3 100 mM e com solução de CaCl_2 5 mM contendo tripsina (Promega) na concentração de 12,5 ng/mL. Estas misturas foram incubadas por 45 minutos e posteriormente foram adicionados 10 μL do tampão de digestão, e as amostras incubadas a 37°C durante a noite. Os peptídeos resultantes da digestão foram extraídos com 40 μL da mistura acetonitrila: água: ácido trifluoroacético (66:33:0.1 v/v/v) em sonicador durante 10 minutos. Após secagem ao vácuo, estas amostras foram solubilizadas com 4 μL TFA 0,1% e adicionados à matriz de ácido-ciano-4-hidroxinâmico (10 mg/mL em 50% acetonitrila, 0,1% TFA) (1 μL amostra + 1 μL matriz) e aplicado diretamente em placa de aço do espectrômetro (placa AnchorChip™ (600 nm, Bruker).

Os espectros resultantes foram analisados manualmente em ambos os programas Pepseq e FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics programs). As seqüências resultantes foram comparadas com as do banco de dados não redundante do NCBI. No caso de análise de mapas peptídicos foi utilizado o programa Mascot para a identificação das proteínas.

4.9.2 Espectrometria de massa - nanoUPLC-MSE

A preparação das amostras, a análise por NanoUPLC-MSE, o processamento de dados e a identificação das proteínas foram realizados de acordo com Murad e Rech, 2012. As proteínas analisadas foram obtidas das amostras FEC, FEP e FEPA conforme descrito no item 4.3.

Um total de 50 μL de cada amostra (concentração final de proteína de 1 μg de proteína $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) foram adicionados a 10 mL de bicarbonato de amônio 50 mM. Em seguida, 25 mL de RapiGESTTM (Waters, EUA) (0,2% v/v) foram adicionados, e as amostras foram agitadas e incubadas num banho seco a 80°C durante 15 minutos. As amostras foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina, como descrito em Murad e Rech, 2012. Após as etapas de digestão e limpeza, os sobrenadantes foram transferidos para frascos de Waters Total Recovery vials (Waters, USA), onde 5 μL de Fosforilase B de coelho (Waters, número de peça 186002326) (com 1 mL contendo 3% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico) e 85 mL de acetonitrila a 3% e solução de ácido fórmico a 0,1% foram adicionados. A concentração final das amostras foi de 250 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, e a concentração final de Fosforilase B foi 25 $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ em um volume final de 200 μL (Murad *et al.*, 2011; Murad e Rech, 2012).

Um sistema nanoACQUITYTM™ (Waters Corp., EUA) com a tecnologia de diluição 2D, equipado com a pré-coluna Symmetry C18 5 μm , 5mm x 300 μm e a coluna analítica de fase reversa nanoEase™ BEH130 C18 1.7 μm , 100 μm x 100 mm (Waters, EUA) para a separação LC nanoscale de peptídeos tripticos de TPS. As amostras foram inicialmente transferidas para a pré-coluna, utilizando uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%. A fase móvel A consiste em ácido fórmico a 0,1% em água, e a fase móvel B consiste em ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila. Os peptídeos foram separados utilizando um gradiente de 3%-40% de fase móvel B durante 200 minutos, com um fluxo de 400 $\eta\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ou 600 $\eta\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, seguido por uma lavagem de 10 min com 85% ou 90%, respectivamente, de fase móvel B. A coluna foi reequilibrada para as condições iniciais durante 20 minutos. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Todas as amostras foram analisadas em três repetições.

Peptídeos tripticos foram analisados utilizando o espectrômetro de massa SYNAPT G2 HDMSTM (Waters, Manchester, Reino Unido) com uma geometria de tempo de voo ($\text{o}\alpha\text{-TOF}$) de um híbrido quadrupolo/mobilidade iônica/aceleração

ortogonal. Para todas as medições, o espectrômetro de massa foi operado em modo sensível de análise com um típico poder de resolução de pelo menos 10000 full-width half-maximum (FWHM). Todas as análises realizadas utilizaram os parâmetros descritos por Murad e Rech, 2012 e Murad, Souza et al, 2011. O processamento de dados e a identificação de proteínas foram feitas utilizando ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0 (Waters, Manchester, Reino Unido) processados e com os dados MS pesquisados, os quais foram obtidos a partir da análise LC-MSE. As proteínas foram identificadas com o algoritmo de contabilidade de íon incorporado no software, e a pesquisa pelo banco de dados de *Clostridium spp* do UniProt com os padrões de digestão MassPREP (MPDs) e com sequências UniProtKB/Swiss-Prot (Fosforilase - P00489 - PHS2_COELHO, Hemoglobina Bovina - P02070 - HBB_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1_YEAST, BSA - P02769 - ALBU_BOVIN) acrescentados ao banco de dados. Identificações e as embalagens de dados quantitativos foram gerados usando algoritmos dedicados e uma pesquisa contra um banco de dados espécies-específico do UniProt (para referência futura, por favor consulte Murad e Rech, 2012). Os parâmetros de pesquisa incluem a modificação fixa de carbamidometil-C, as modificações variáveis de acetilação do terminal-N, de desamidação de N, desamidação de Q oxidação de M e a permissão de uma clivagem perdida. Os componentes foram tipicamente agrupado com uma precisão de massa 10 ppm e uma tolerância de tempo 0,25 minutos contra o banco de dado gerado teórico de peptídeos íon massa com um mínimo de um peptídeo correspondido. Os critérios de identificação de proteínas também incluem a detecção de pelo menos três fragmentos de íon por peptídeo, 6 fragmentos por proteína e a determinação de pelo menos um peptídeo por proteína. A identificação da proteína permitida com um máximo de 4% de taxa de detecção de falsos positivos em pelo menos três injeções de replicadas técnicas. Informações adicionais como gene, tipo de CBM e informações mais detalhada da proteína foram complementadas com o auxílio de bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Carbohydrate Active Enzymes (Cazy).

4.10 Extração RNA Totale RT-qPCR

Às células obtidas conforme descrito no item 2.1, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol® (mantido a 4°C) e 200 µL de clorofórmio gelado, as misturas foram

agitadas por 15 min. e, após, incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min. a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 2 mL. Para precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol (mantido a -20°C) (1:2 v/v, isopropanol e Trizol® utilizado no início). Os tubos foram agitados cuidadosamente, por inversão, durante 2 minutos e mantidos a temperatura ambiente por 8 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm 10 minutos a 4°C e o RNA precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (mantido a 4°C) (1:1 v/v, etanol 75% e Trizol® utilizado no início). As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente descartado. O precipitado foi seco por cerca de 10 minutos a temperatura ambiente e depois eluído em 50 µL de H₂O DEPC.

A quantificação de RNA nas amostras foi realizada utilizando o equipamento NanoDrop® (Thermo)®. As amostras com valores considerados aceitáveis (razões 260/280 nm e 260/230 nm > 2,00) foram utilizadas na PCR quantitativa (RT – qPCR). Após a quantificação o RNA foi estocado em ultrafreezer (-80°C).

Foram investigados 5 classes de genes: 1ª classe – normalizador (*recA*); 2ª classe – envolvidos na formação do celulosoma (*cipA*: scaffoldina, *celS*: exglucanase, *manA*: mananase, *sdbA*: proteína com domínio doquerina, *celob*: celobiohidrolase, *olpA*: proteína âncora); 3ª classe – envolvidos na conversão de glicose em glicose-1-fosfato (*cbp*: celobiose fosforilase); 4ª classe – envolvidos na fermentação (*ack*: acetato quinase, *adhY*: álcool desidrogenase, *ldh*: lactato desidrogenase, *hydA*: hidrogenase) e 5ª classe – envolvidos com a repressão catabólica (*hprK* / *hprZ* / *hprY*: serina quinase, *crp* / *crpZ*: proteínas ligadas a AMPc).

Os pares de “primers” desenhados estão listados na tabela 5. Os iniciadores foram testados para os valores de T_m entre 58 e 60°C, com um tamanho total do fragmento amplificado entre 50 e 150 pb. Além disso, “primers” foram selecionados em regiões internas à estrutura de leitura aberta (ORF) do gene a ser investigado.

Tabela 5.Lista dos “primers” utilizados q-PCR

Gene or ORF	Forward primer	Reverse primer
<i>recA</i>	GTTGCGGTAAATCTCGATATTGTAAG	GGCCAATCTTCTGACCGTTG
<i>celS</i>	CGCAGAAGGCCGTATA	CAGAACCTTTACCCTGCTCCTTT
<i>cipA</i>	CAGTATGCTCTTAGTTGTGGCTATGC	TGATCCAACGGCTGCTGTAA
<i>manA</i>	ACCATGGCCAGAAGCTCAAG	CCTCATGGAGCGGTCTGAA
<i>celob</i>	AAAGGCCAGAACAATGGAGCGTG	ATCGCTCCAAATGGTAAAGCGCAC
<i>sdbA</i>	CGCCTTTGCTTCTCCTGTTGCATT	ATTCCGATATCCGACAATCCGGCA
<i>olpA</i>	AAGGCGGCTAGTGACGAACCAATA	TGGTGTGCGTTCATCTGATGGTGT
<i>cbp</i>	GCTGTAGTGAACGGCAAGTCAA	GCTGTGGGACGCAATCG
<i>adhY</i>	GACATTGAGGCACGGTCAAA	CTCCTGCGTTGGAATTGGTAA
<i>ldh</i>	TTGCAAATATTGCGGGAATTC	GAAATCTGCTCCTCGCACTGA
<i>ack</i>	CTCAGATGCTGGGCAAACCT	ACAATACTTGCTCCGTTTCCAA
<i>hydA</i>	GCCGTATGTGCGTTGTTGAG	CCTTCGGACACCGGATATACA
<i>crpZ</i>	ATTGCAAGGAAATACGGTAAAGA	CAATTCCCTCACGGCTTAGG
<i>hprX</i>	TGCCAAGAGCATAATGGGACTT	CTCCCTCAGCACCTATTACAACCT
<i>crp</i>	GCCATGGAACGCTTTTCG	AACCCTTTTGTCCGCTCTCA
<i>hprK</i>	TTGAGCGCTTTAATCAGCTACCT	CCTCGACAAGCACACCATGT
<i>hprY</i>	CCATCACTGATGTAAAGATTTTGTCA	TCAAGGCTGAAAATACCCATTATAGA

O RNA total extraído de cada amostra (células obtidas após o cultivo de *C. thermocellum* em glicose, celulose, piolho de algodão e palha de cana de açúcar conforme descrito no item 4.8) foram tratados com DNase I (Fermentas), em seguida foi realizada a transcrição reversa em cDNA na presença de oligo(dT), em um volume final de reação de 20µL usando o Kit Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). A síntese de cDNA foi realizada usando o Kit Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) conforme manual do fabricante. Ao cDNA sintetizado de cada amostra foram adicionados 80 uL de água Milli-Q. As reações foram realizadas utilizando o equipamento PCR iQ5 (Bio - Rad). Cada reação (20µL) continha 10µL de MAXIMA® SYBR-green PCR Master mix Kit (Invitrogen), “primers forward e reverse” (1 uL de cada), 2uL do cDNA, e 6uL de água Milli-Q. O protocolo de amplificação foi: 10 min. a 95°C (1 ciclo), 15 s a 95°C, seguido por 1 min. a 60°C (40 ciclos), e uma curva de fusão de 1 minuto a 95°C, seguido de 30s a 55°C e uma rampa final a 95°C, com a obtenção contínua dos dados (1 ciclo) para a verificação de amplificação não específica e dímeros de “primers”. As transcrições do “primer” *recA* foi utilizada como referência interna para normalizar a quantidade de RNA total presente em cada reação. O nível de expressão dos genes foi calculado a partir do ciclo limiar de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) software Step One Plus™ real-time PCR System da Applied Biosystems®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo no Crescimento de *C. thermocellum* B8

Segundo Groposo *et al.*, (2013) *C. thermocellum* é uma bactéria que possui todas as qualidades para o Bioprocesso Consolidado (CBP), uma estratégia que reúne três etapas da produção do etanol celulósico — produção de enzimas, sacarificação e fermentação. Entretanto a sua capacidade em hidrolisar e fermentar oligossacarídeos pode ser comprometida dependendo das condições pH, temperatura e características do substrato do meio de cultivo.

C. thermocellum B8 apresentou maior taxa de crescimento após 48 horas, em meio pH 7,0 contendo celulose cristalina como fonte de carbono a 60°C (Figura 12).

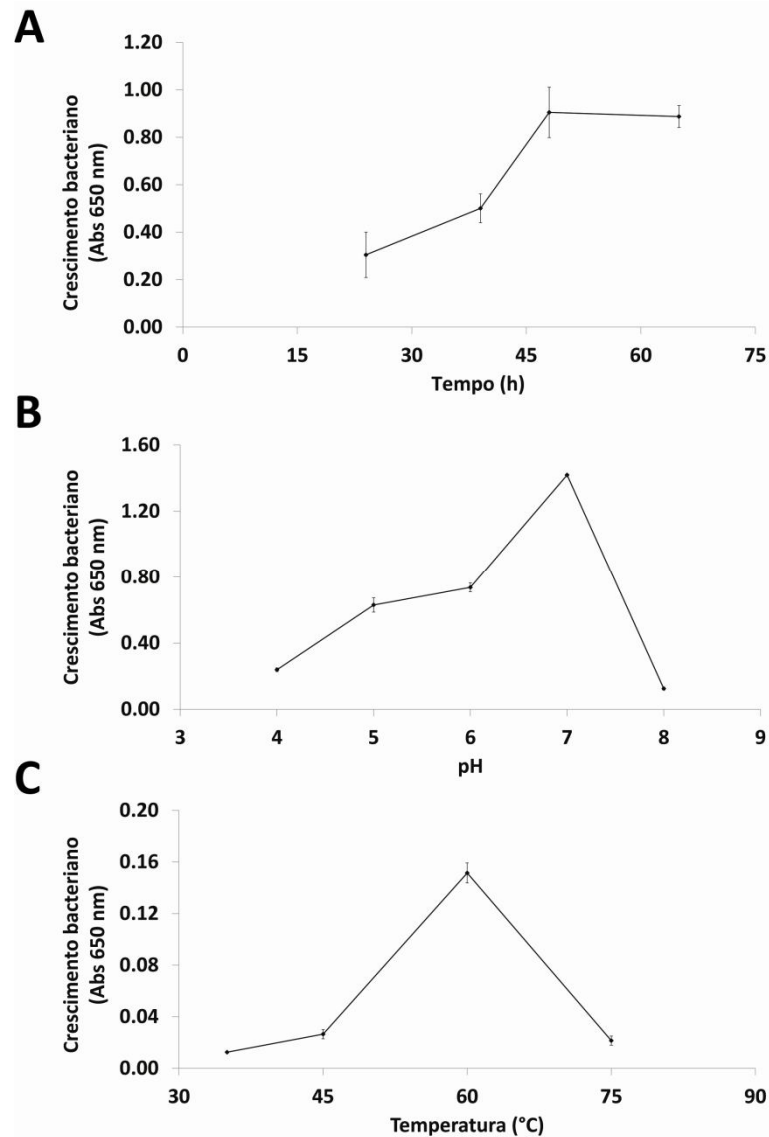


Figura 12. Crescimento de *C. thermocellum* B8 cultivado em meio líquido contendo 2% de celulose cristalina, como fonte de carbono, sob condições anaeróbicas - (A): crescimento em meio com pH 7,0 em diferentes tempos: 24, 34, 48 e 72 horas; (B) crescimento por 48 horas a 60°C em meio com pH inicial de: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0; (C) meio com pH 7,0 em diferentes temperaturas: 35, 45, 60 e 75°C por 48 horas.

As condições de cultivo de *C. thermocellum* B8 descritas nesse trabalho condizem com estudos anteriores onde cepas de *C. thermocellum* cultivadas em celulose ou celobiose apresentou uma temperatura mínima para crescimento acima de 37°C, máxima abaixo 69°C e um intervalo de pH para o crescimento entre 6,2 e 7,7 e com pH ótimo entre 6,7 e 7,0 (Freier *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 2004, Islam *et al.*, 2008; Chinn *et al.*, 2008; Groposo *et al.*, 2013; Blume *et al.*, 2013; Maki *et al.*, 2013).

5.2 Efeito do pH, Temperatura e Tempo de Cultivo na Produção de CMCCase e Avicelase por *C. thermocellum*B8

Os maiores valores de atividade enzimática de CMCCase e Avicelase foram obtidos nos valores de tempo, pH e temperatura onde observou-se a maior taxa de crescimento de *C. thermocellum*B8 (figura 12): 48 horas, pH 7,0a 60°C. O sobrenadante proveniente da cultura contendo celulose cristalina apresentou atividade de CMCCase, $2,47 \pm 0,136$ U.mL⁻¹ e Avicelase $0,529 \pm 0,003$ U.mL⁻¹. Para a FEC a atividade de CMCCase foi de $2,92 \pm 0,12$ U.mL⁻¹ e Avicelase de $0,709 \pm 0,001$ U.mL⁻¹ (Figura 13 AD).

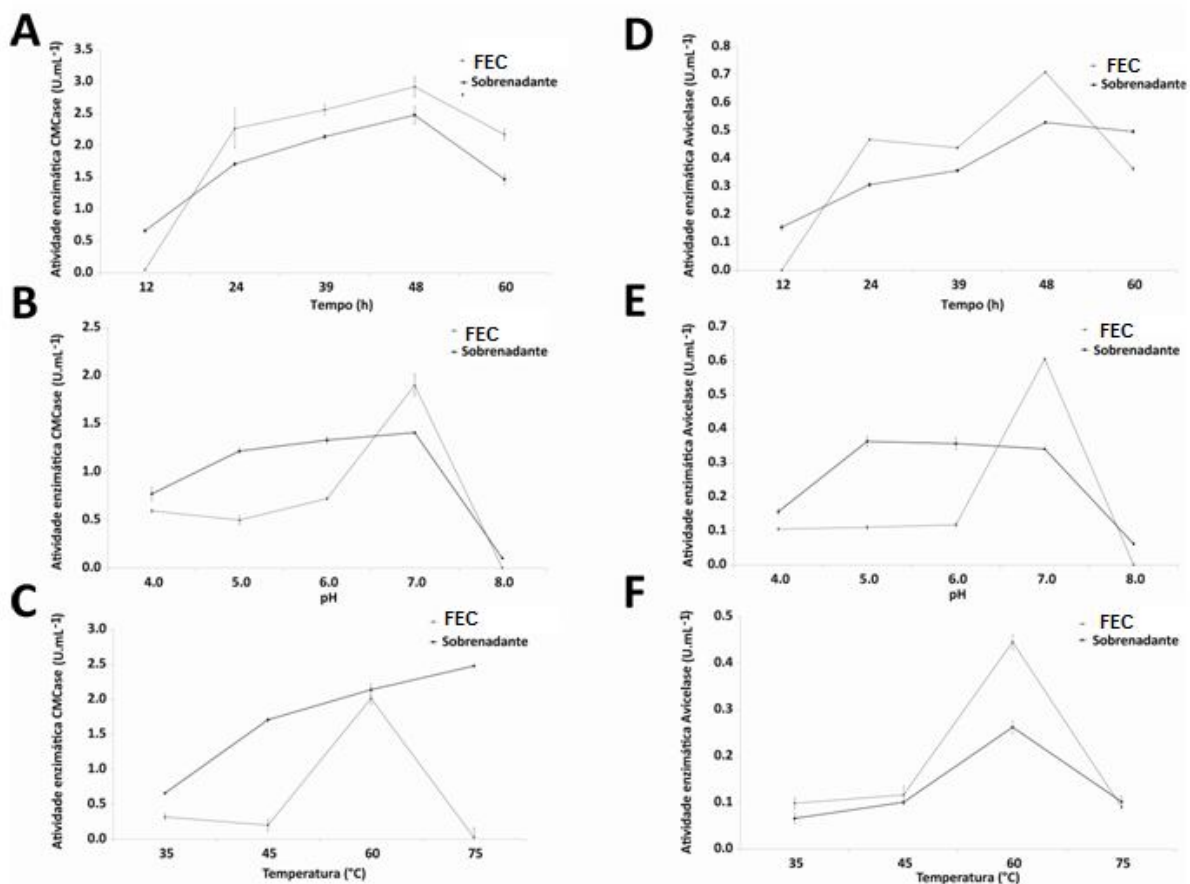


Figura 13. Efeito do tempo, pH e temperatura na produção de CMCCase (A, B e C) e Avicelase (D, E e F) por *C. thermocellum* B8, cultivada em meio líquido contendo 2% de celulose como fonte de carbono sob condições anaeróbicas. (A,D): crescimento em meio pH 7,0 em diferentes tempos: 24, 34, 48 e 72 horas; (B,E) crescimento por 48 horas a 60°C em meio com pH inicial de: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0; (C,F) meio pH 7,0 em diferentes temperaturas: 35, 45, 60 e 75°C por 48 horas. (traço cinza) FEC (fração eluída da celulose residual) e (traço preto) sobrenadante da cultura.

O complexo celulosoma produzido por *C. thermocellum* tem uma alta atividade sobre a celulose cristalina, denominada em alguns trabalhos como

"atividade de celulase verdadeira" por apresentar a capacidade de solubilizar completamente formas de celulose cristalina, tais como algodão e Avicel (Felix and Ljungdahl, 1993; Schwarz *et al.*, 2001; Demain *et al.*, 2005; Molinier *et al.*, 2011).

C. thermocellum B8 apresentou atividade de endoglucanases e exoglucanases na FECe no sobrenadante da cultura (figura 13). O que sugere a sua capacidade em produzir enzimas com afinidade a aderirem à fonte de carbono e formar complexos multienzimáticos (Nataf *et al.*, 2010; Tachaapaikoon *et al.*, 2012; Currie *et al.*, 2013; Kim *et al.* 2013). Isso pode ser confirmado pelas análises de espectrometria de massa realizadas nesse trabalho com FEC onde foi identificada a proteína estrutural CipA do complexo celulosoma, bem como endo e exoglucanases.

5.3 Influência do pH Inicial do Meio de Cultura na Produção de Proteínas de *C. thermocellum* B8

O pH do meio de cultura utilizado para crescimento de *C. thermocellum* B8 afeta não só o crescimento do microorganismo, mas também a sua produção de proteínas totais na FEC e no sobrenadante (tabela 6 e 12 figura BE). Os meios com pH 4, 5, 6 e 7 após o cultivo da bactéria apresentaram pH na faixa entre 5,5 a 5,8. A quantidade de proteínas de FEC obtidas em meio com pH inicial 7,0 (559,69 ug/mL) foi 5 vezes maior que quando cultivado em meio pH 5,0 (114,58 ug/ml). A maior influência do pH na produção de proteínas das duas amostras, FEC e sobrenadante foi observada quando com pH inicial do meio foi ajustado para 8,0.

Tabela 6. Avaliação do efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de proteínas por *C. thermocellum* B8 após 48 horas de cultivo a 60°C tendo como fonte de carbono 2% de celulose cristalina

Fonte de carbono	pH Inicial	H Final	Proteínas* líidas da celulose	Proteínas* do Sobrenadante
Celulose Cristalina	4,0	5,8	173,23 ± 5,67	825,12 ± 5,97
	5,0	5,6	114,58 ± 1,30	1055,20 ± 2,25
	6,0	5,6	204,06 ± 3,44	894.30 ± 8,53
	7,0	5,5	559,69 ± 5,96	828,12 ± 7,25
	8,0	9,2	0	59,70 ± 9,4

*Valores em ug/mL

O rúmen, local onde foi retirado o isolado de estudo, fornece um ambiente favorável ao desenvolvimento contínuo da população microbiana, atuando como câmara de fermentação por apresentar temperatura entre 38 a 42°C; anaerobiose, pH variando entre 5,5 a 7,0 (média de 6,8) (Kozloski, 2002). Essas características condizem com as melhores condições de pH do meio para o cultivo e produção de proteínas por *C. thermocellum* B8 (tabela 6).

5.4 Avaliação da Produção de CMCCase, Avicelase, β -Glicosidade e FPase por *C. thermocellum* B8

Foi registrada atividade de CMCCase, Avicelase, β -Glicosidade e FPase na FEC e no sobrenadante das culturas de *C. thermocellum* B8. Em especial atividade de FPase (complexo endo/exoglucanases) em FEC ($3,956 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,011$) e no sobrenadante da cultura ($3,053 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,212$) (figura 14).

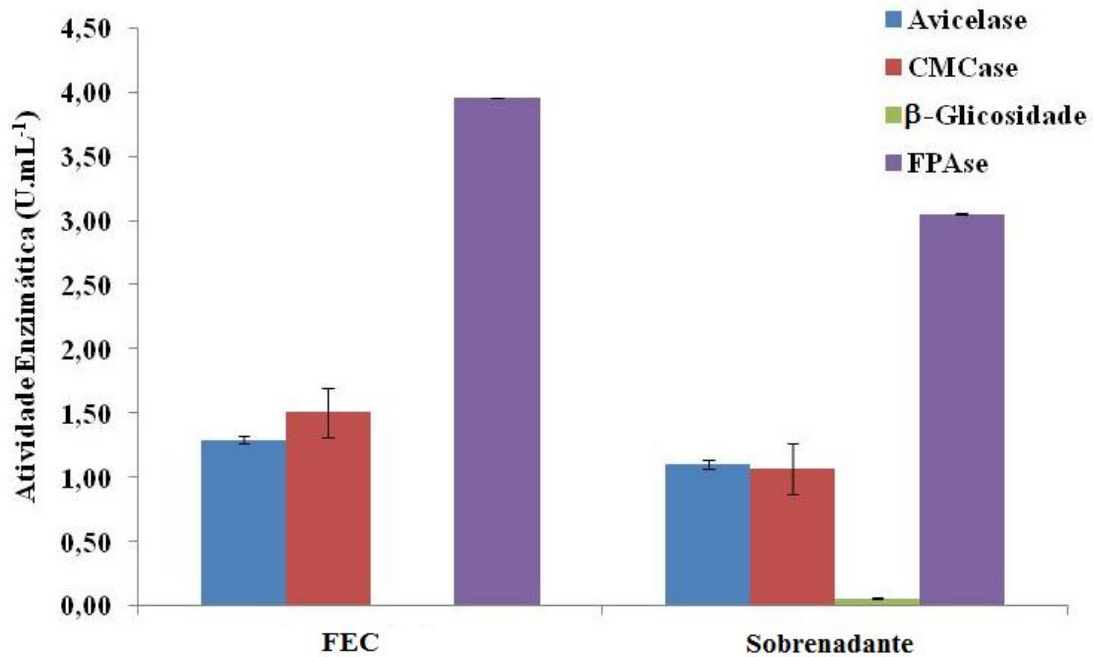


Figura 14. Avaliação da produção de CMCCase, Avicelase, β -Glicosidade e FPase da FEC (fração eluída da celulose residual) e do sobrenadante de *C. thermocellum*B8 cultivado em meio líquido pH 7,0 contendo 2% de celulose cristalina a 60°C por 48 horas sob condições anaeróbicas.

Foram obtidos valores de atividade de Avicelase bem próximos na FEC (1,29 U.mL⁻¹) e no sobrenadante (de 1,10 U.mL⁻¹). Já atividade de β -glicosidade foi registrada apenas na amostra do sobrenadante (0,056 U.mL⁻¹).

Para hidrolisar completamente a celulose, as ações de cooperação de pelo menos três tipos de celulasas, endoglucanase, exoglucanase, e β -glicosidase são necessárias. Endoglucanase quebra aleatoriamente as ligações glicosídicas β nas regiões amorfas da celulose cristalina. As Exoglucanases hidrolisam ainda mais a celulose a partir das extremidades reductoras, libertando, principalmente celobiose, que são finalmente convertidos em glicose por ação das β – glicosidases (Kim *et al.*, 2013). No entanto em *C. thermocellum* a produção desta enzima é baixa, pois pode sofrer inibição de um dos produtos de hidrólise, a celobiose.

5.5 Avaliação da Produção de CMCCase, Avicelase, FPase e Xilanase de *C. thermocellum* B8 Cultivado em Diferentes Substratos Lignocelulósicos

Foram detectadas atividades de CMCCase, Avicelase, FPase e Xilanase nas FEC, FEP e FEPA após o cultivo de *C. thermocellum* B8 (figura 15). No entanto valores mais significativos para atividade enzimática de CMCCase e Xilanase (5,54 U.mL⁻¹ e 3,77 U.mL⁻¹ respectivamente) foram encontrados na FEC.

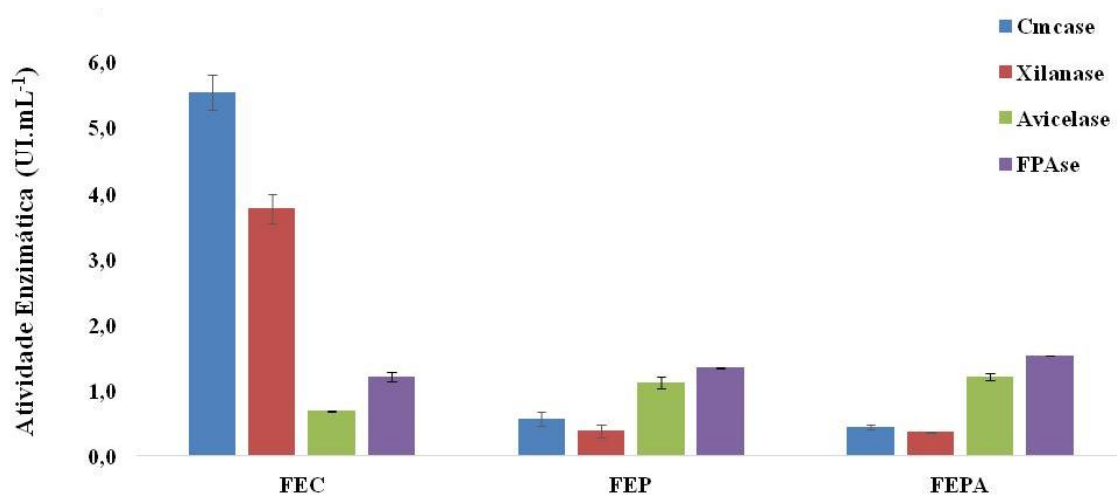


Figura 15. Atividade enzimática (U.mL⁻¹) de CMCCase, Xilanase, Avicelase e FPase de FEC, FEP e FEPA (frações eluídas dos substratos residuais: celulose, piolho de algodão e palha de cana de açúcar respectivamente) obtidas após o cultivo de *C. thermocellum* B8 em meio líquido pH 7,0 por 48 horas a 60°C sob condições anaeróbicas.

Apesar dos valores de atividades enzimáticas encontrados na FEP e na FEPA terem sido menores que na FEC não exclui a possibilidade da utilização do piolho de algodão e da palha de cana na produção de celulasas e hemicelulasas. Isso porque devido a forte interação entre seus componentes, celulose, hemicelulose e lignina, o acesso enzimático torna-se mais difícil quando comparado à celulose comercial utilizada para o cultivo de *C. thermocellum* B8.

Um ponto importante é que os resíduos utilizados neste trabalho como fonte de carbono não passaram por nenhum tratamento químico e as amostras obtidas apresentaram atividade para CMCCase, Avicelase, FPase e Xilanase.

Ainda são poucos os estudos que utilizam resíduos agroindustriais para o cultivo de *C. thermocellum* e os já relatados normalmente utilizam pré-tratamento químico dos resíduos antes da sua adição ao meio de cultivo (Raman *et al.* 2011; Wei *et al.*, 2014).

5.6 Comparação Entre a Produção de CMCCase e Avicelase por *C. thermocellum* B8 e *C. thermocellum* JW20 Cultivados em Celulose e Piolho de Algodão

A amostra correspondente à FEC após o cultivo de *C. thermocellum* B8 apresentou atividade enzimática de CMCCase de 0,977 U.mL⁻¹ (*p = 0,01543) e 1,700 U.mL⁻¹ (*p = 0,0138) de avicelase. Já para o isolado *C. thermocellum* JW20 a atividade de CMCCase na FEC foi de 1,527 U.mL⁻¹ e 2,023 U.mL⁻¹ para Avicelase. Para as amostras protéicas de FEP essa diferença foi ainda maior, pois, para B8 a

atividade de CMCCase foi de $1,182 \text{ U.mL}^{-1}$ (* $p = 0,001211$) e $0,402 \text{ U.mL}^{-1}$ (* $p = 0,008922$) para avicelase. E em JW20 a atividade de CMCCase foi de $0,657 \text{ U.mL}^{-1}$ e para avicelase de $0,065 \text{ U.mL}^{-1}$ (figura 16).

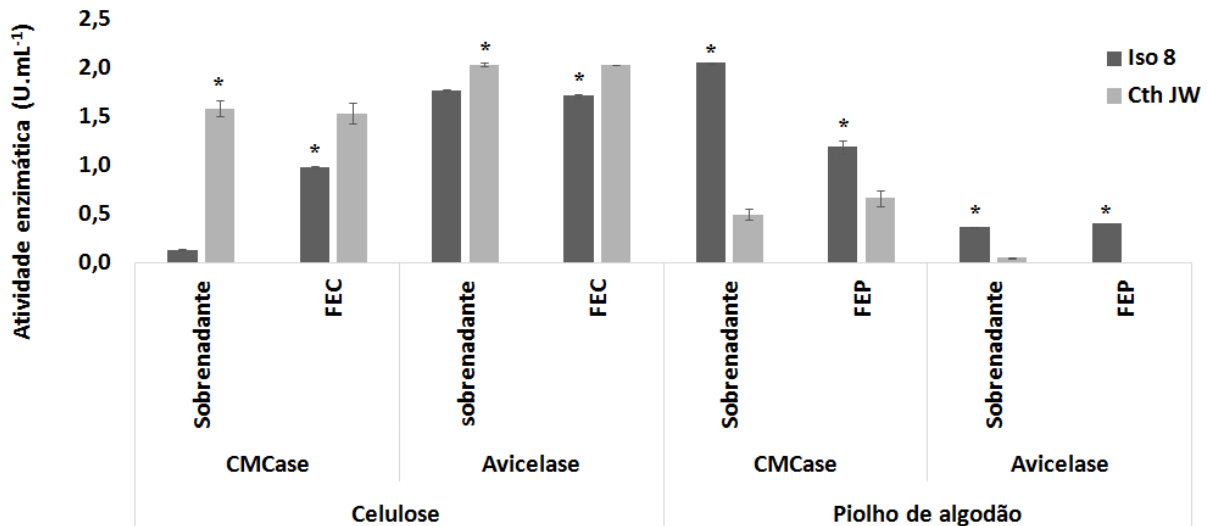


Figura 16. Comparação da produção de CMCCase e Avicelase daFEC (fração eluída da celulose residual) e FEP (fração eluída do piolho de algodão residual) após cultivo de *C. thermocellum* B8 e *C. thermocellum* JW20 em meio líquido contendo 2% de celulose e 2% de piolho de algodão a 60°C, pH 7,0 por 48 horas sob condições anaeróbicas. * $p < 0,05$.

Com base na figura 16 pode-se observar que os isolados apresentaram diferentes perfis enzimáticos de Avicelases e CMCases nos sobrenadantes, na FEC e na FEP dependendo da fonte de carbono utilizada para o cultivo. O isolado B8 apresentou maior atividade celulósica nas frações eluídas dos substratos residuais e no sobrenadante da cultura contendo piolho de algodão ao contrário do isolado CthJW20 que teve um melhor desempenho apenas no sobrenadante contendo celulose.

Estes resultados confirmam que mesmo entre a mesma espécie existem diferenças no crescimento e produção de enzima entre isolados de *C. thermocellum* (Mansfield *at al.*, 1999; Arantes and Saddler, 2010) e que o isolado B8 tanto para celulose quanto em piolho de algodão apresentou um maior desempenho para a produção de celulases. Portanto o isolado brasileiro pode ser um promissor candidato a ser utilizado em processos de hidrólise de biomassas.

5.7 Análise do Secretoma

Os perfis de proteínas secretadas no sobrenadante da cultura de *C. thermocellum* isolado B8 (figura 17) e das proteínas da FEC (figura 18), apresentaram diferenças quanto a quantidade, tamanho e pI dos spots obtidos, principalmente na faixa de pH próximo a 4,0. Spots contendo proteínas com massa molecular superior a 97 KDa e na faixa de pH próximo de 4,0 foram registrados com maior abundância no gel contendo proteínas da FEC. Em ambos os géis, foi observado vários spots com a mesma massa molecular e com diferentes pIs principalmente entre a faixa de 30 a 66 KDa indicando que a maior parte das proteínas secretadas são isoformas proteicas.

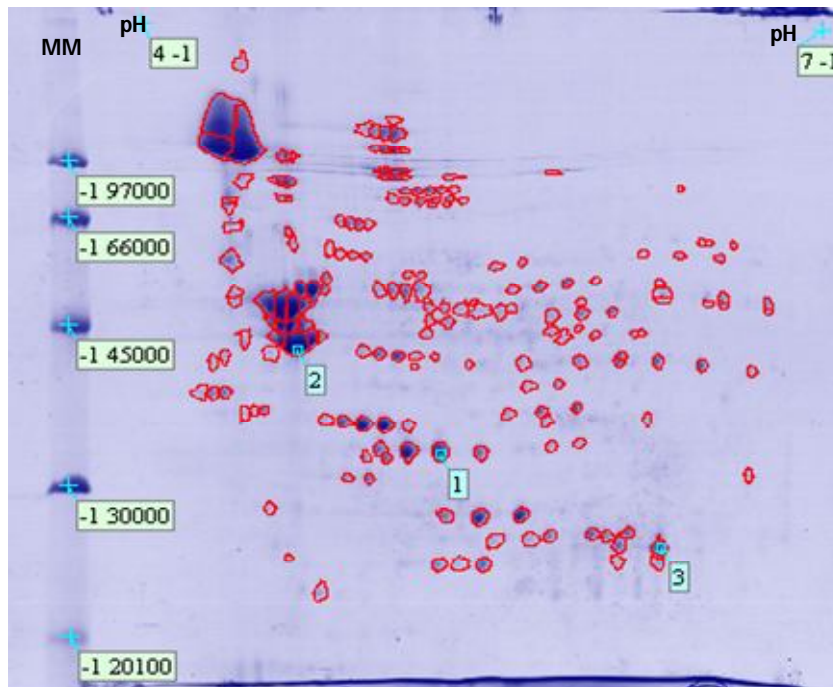


Figura17. Perfil protéico em gel de poliacrilamida bidimensional (2DE) a 10% das proteínas obtidas do sobrenadante da cultura de *C. thermocellum* isolado B8 cultivado em meio líquido contendo 2% de celulose cristalina a 60°C por 48 horas. Foram utilizadas 500 µg de proteínas. MM: marcador molecular; 1, 2 e 3 (em verde) spots de referência "landmark". Variação da faixa de pH 4-7.

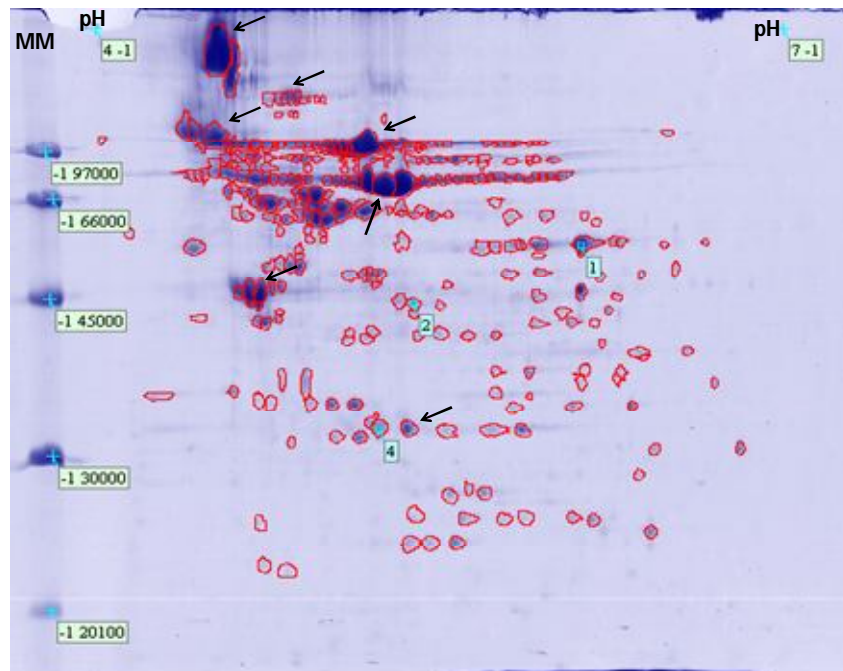


Figura 18. Perfil protéico em gel de poliacrilamida bidimensional (2DE) a 10% das proteínas da FEC (fração eluída da celulose residual) da cultura de *C. thermocellum* isolado B8 cultivado em meio líquido contendo 2% de celulose cristalina a 60°C por 48 horas. Foram utilizadas 500 µg de proteínas. MM: marcador molecular; 1, 2 e 4 (em verde) spots de referência "landmark". Variação da faixa de pH 4-7. Setas pretas: proteínas identificadas.

A média dos coeficientes de correlação da amostra do sobrenadante foi de 0,98 e da FEC foi de 0,97. Dos 333 spots identificados na análise de imagem, 55 spots foram registrados em ambas às condições, 112 são exclusivos para perfil do sobrenadante e 172 exclusivos ao perfil da FEC (Figura 19).

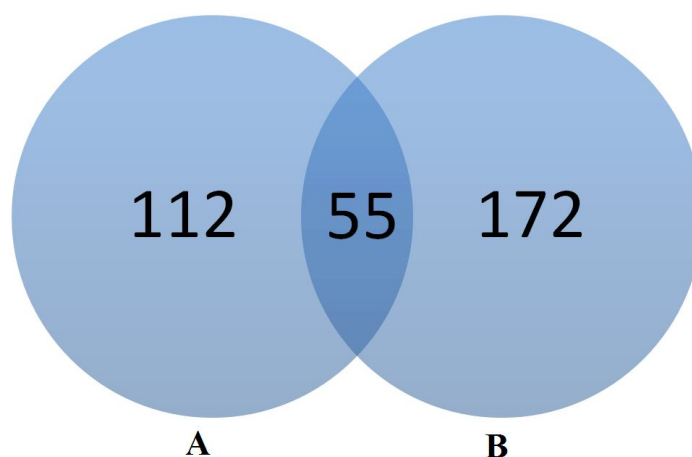


Figura 19. Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas na análise de imagem dos géis (Programa Image Master Platinum). No sobrenadante (A) foram identificadas 167 proteínas e na fração eluída da celulose (B) foram identificadas 227 proteínas.

Do total de spots registrados da FEC, sete foram identificados por espectrometria de massa, sendo que destes, seis correspondem a proteínas do complexo celulosomal produzido por *C. thermocellum* e um correspondente a proteína flagelina que está relacionada à motilidade e a estrutura do flagelo da bactéria (tabela 7).

Tabela 7. Proteínas identificadas porMALD/TOFTOF obtidas da FEC (fração eluída da celulose residual) após o cultivo de *C. thermocellum* isolado B8 em meio contendo celulose a 2% (m/v) como fonte de carbono

ID Spot	Proteína	Mr	pI	Nº acesso NCBI	Z (score) MASCOT	Organismo	Cobertura Sequência
1	Região da coesina da escafoldina	143.856	4,5	gi/316939673	168	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 1313	25%
2	Glicosil hidrolase GH9	101.185	5,11	gi/125972933	299	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	38%
4	Proteína domínio Ig	113101	4,51	gi/281418712	224	<i>Clostridium thermocellum</i> JW20	34%
6	Proteína flagelina	29549	5,23	gi/125974721	112	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	40%
9	Proteína domínio Ig	113145	4,51	gi/256004907	119	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	14%
11	Proteína domínio Ig	113101	4,51	gi/281418712	117	<i>Clostridium thermocellum</i> JW20	26%
13	Xiloglucanase	81178	4,92	gi/109157373	182	<i>Clostridium thermocellum</i>	20%

As amostras obtidas da FEP e da FEPA apresentaram certas características como pigmentação marrom, alta viscosidade e partículas insolúveis que dificultaram a obtenção dos géis bidimensionais. Várias tentativas foram realizadas no sentido de melhorar a qualidade das amostras, tais como: aumento no tempo de diálise, método de filtração, método de precipitação e concentração. No entanto, não obtivemos sucesso, pois a qualidade dos géis continuaram ruins. Diante destas dificuldades, optamos por mudar a metodologia na tentativa de obter melhores resultados com as amostras FEC, FEP e FEPA.

A partir dos peptídeos obtidos utilizando a técnica de nanoUPLC-MSE foram identificadas 80 proteínas das amostras obtidas dos substratos residuais após o cultivo de *C. thermocellum* B8, sendo que destas 32 da FEC, 25 da FEP e 23 da FEPA (tabelas 8, 9 e 10 em anexo).

Na amostra da FEC foram identificadas proteínas chaves do complexo celossoma de *C. thermocellum*, como: a proteína de ancoragem CipA, proteína domínio Ig, glicosil hidrolase da família 9 (GH9): endo- β -1,4-glucanase (Cell), glicosil hidrolase da família 8 (GH8): endo- β -1,4-glucanase (CelA), uma glicosil hidrolase da família 48 (GH48): β -1,4 glucanase (CelY) e glicosil transferase da família 36: manose GDP (tabela 11).

Tabela 11. Proteínas do complexo celossoma da FEC (fração eluída da celulose residual) identificadas por nanoUPLC-MSE obtidas após o *C. thermocellum* isolado B8 em meio contendo celulose a 2% (m/v) como fonte de carbono

Uniprot code	Description	Protein (MW)	Score (AVG)	Peptides (AVG)	Fmol Covarian	Ngram (AVG)	Repeate Rate	% of TSP
C7HDZ8	Glycoside hydrolase family 48: β -1,4-glucanase (CelY)	83702,57	4127,18	21,5	2,84	57,33	2	30,66
D1NLS2	Glycoside hydrolase family 9 - endo- β -1,4-glucanase I (Cell)	101339,39	3850,12	30	2,38	24,06	2	12,87
C7HDM	Glycoside hydrolase family 9 - endo- β -1,4-glucanase I (Cell)	80224,77	158,12	8	1,71	4,15	2	2,22
D1NLS3	Glycoside hydrolase family 9 - endo- β -1,4-glucanase I (Cell)	137914,91	277,86	20	1,28	2,63	2	1,41
C7H GK	Glycoside hydrolase family 8 - endo- β -1,4-glucanase A (CelA)	51657,52	80,77	5,5	1,26	0,94	2	0,50
C7HJX6	Cellulosome anchoring protein cohesin region (Fragment)	19238,62	437,45	2	1,54	0,67	2	0,36
E6UU82	Cellulosome anchoring protein cohesin subunit	143945,17	1544,70	17,5	2,19	22,19	2	11,87
H8EDW	Ig domain protein	113214,20	472,10	21	1,87	8,42	2	4,51
O86999	hypothetical protein	113387,37	472,26	19,5	1,83	7,61	2	4,07

% TSP - porcentagem de cada proteína na mistura total solúvel, em relação à carga total de proteína (em nanogramas) sobre a coluna.

Na amostra da fração eluída de piolho de algodão foram identificadas menos proteínas envolvidas com a formação do complexo celossoma do que em celulose. Apenas quatro das 25 proteínas identificadas estão relacionadas ao complexo celossoma: duas proteínas Ig, uma glicosiltransferase da família 36 e uma região do domínio coesina da proteína estrutural CipA (tabela 12).

Tabela 12. Proteínas do complexo celossoma da FEP (fração eluída do piolho de algodão residual) identificadas por nanoUPLC-MSE após o *C. thermocellum* isolado B8 em meio contendo piolho de algodão a 2% (m/v) como fonte de carbono

Uniprot code	Description	Protein (MW)	Score (AVG)	Peptides (AVG)	Fmol Covarian	Ngram (AVG)	Repeate Rate	% of TSP
D1NP50	Ig domain protein	113170,14	656,67	26	1,41	11,70	2	14,58
H8EDW	Ig domain protein	113214,20	644,52	25,5	1,41	11,61	2	14,47
D1NNW	Type 3a cellulose-binding domain protein	112443,80	85,25	9,5	0,03	5,11	2	6,36
C7HJX6	Cellulosome anchoring protein cohesin region (Fragment)	19238,62	298,45	3,5	0,07	0,31	2	0,38

% TSP - porcentagem de cada proteína na mistura total solúvel, em relação à carga total de proteína (em nanogramas) sobre a coluna.

Quanto às proteínas identificadas na FEPA, seis proteínas estão relacionadas ao complexo celossoma: uma proteína Ig, uma escafoldina CipA, uma GH48, uma proteína doquerina e dois fragmentos das proteínas CipA e GH48 (tabela 13).

Tabela 13. Proteínas do complexo celossoma da FEPA (fração eluída da palha de cana residual) identificadas por nanoUPLC-MSE após o *C. thermocellum* isolado B8 em meio contendo palha de cana de açúcar a 2% (m/v) como fonte de carbono

Uniprot code	Description	Protein (MW)	Score (AVG)	Peptid (AVG)	Fmol Covariance	Ngram (AVG)	Repeate Rate	% of TSP
H8EDW1	Ig domain protein	113214,20	396,55	20,7	0,2	13,63	3	25,01
E6UU82	Cellulosome anchoring protein cohesin region	143945,17	667,80	14,3	0,1	12,18	3	22,36
C7HDZ8	Glycosyl hydrolase family 48 - β -1,4-glucanase (CelS)	83702,57	470,25	10,7	0,9	4,36	3	8,01
C7ED31	Glycosyl hydrolase family 48 - β -1,4-glucanase (CelS)	43068,50	452,99	6,7	1,7	1,02	3	1,87
C7HJX6	Cellulosome anchoring protein cohesin region (Fragment)	19238,62	112,06	2,3	0,1	0,25	3	0,45
D1NNW4	Type 3a cellulose-binding domain protein	112443,80	39,67	6,5	0,1	1,91	2	3,50

% TSP - porcentagem de cada proteína na mistura total solúvel, em relação à carga total de proteína (em nanogramas) sobre a coluna.

A estrutura principal do celossoma é a proteína scafoldina CipA, proteína capaz de solubilizar a celulose cristalina, em conjunto com a celulase celossomal CelS (glicosil hidrolase da família 48). A CipA é formada por um conjunto de elementos repetidos conhecidos como coesinas tipo I que se ligam a domínios doquerinas tipo I encontrados em celulases celossomais. Apresentam ainda módulos adicionais doquerina tipo II e módulo de ligação a carboidrato (CBM). Neste trabalho foi identificada nas três condições (FEC, FEP e FEPA) a proteína escafoldina CipA de 143,94 KDa (tabelas 11, 12 e 13).

Para Zverlov *et al.* (2014) CipA é essencial para a rápida solubilização de celulose cristalina, entretanto Olson *et al.* (2013) demonstraram que estipes de *C. thermocellum* com deleção do gene para CipA também foram capazes de solubilizar celulose cristalina. Os autores explicam que neste caso os componentes do sistema de celulases não celossomais (Cell e CelY) que solubilizam sinergicamente a celulose cristalina pode estar compensando a perda de CipA já que cada celulase tem seu próprio CBM e não haveria então a necessidade de CipA para mediar a ligação com o substrato celulósico. Outra hipótese levantada é que componentes do celossoma podem estar diretamente ligados a superfície celular através de OlpA (proteína âncora) já que as estirpes com deleção de CipA apresentaram níveis de 40% a mais de OlpA.

As celulases que hidrolisam as cadeias do polímero de celulose podem ser encontradas de duas formas: “livres” (não celossomais) secretadas com CBM para

guia-las até o substrato ou ligadas /organizadas no complexo celulosomal por meio de um módulo doquerina presente em cada celulase que se liga a outro módulo coesina da proteína estrutural CipA. Normalmente os microorganismos produtores de celulases apresentam um dos dois tipos de celulases. Dados da literatura demonstraram que *C. thermocellum* apresentam os dois tipos de celulases. Em maior abundância estão as celulases celulosomais glicosil GH48 CelS e GH9 CelR com o módulo doquerina e as celulases não celulosomais GH48 CelY e GH9 Cell com o módulo CBM (Vazana *et al.*, 2010).

As GH48 e GH9 identificadas neste trabalho correspondem a GH48 CelY e GH9 Cell ou sejam celulases não celulosomais, porém com módulos CBM com atuação análoga as GH celulosomais com a chamada “atividade celulosítica verdadeira”, ou seja, solubilização de forma sinérgica da celulose cristalina (Raman *et al.*, 2009).

GH9 faz parte de uma grande família de glicosil hidrolases que inclui principalmente endoglucanases, duas endo/exoglucanases e duas exoglucanases altamente homólogas CelK e CbhA. Representantes desta família caracterizam-se por apresentarem diferenças nos arranjos do módulo catalítico de suas estruturas. Com base nessas diferenças podem ser divididas em quatro grupos. O grupo A representa principalmente enzimas de plantas, com apenas um módulo catalítico, sendo que em *C. cellulolyticum* é identificado uma Cel9M que contém um módulo catalítico e um módulo doquerina em sua extremidade C-terminal; o grupo B inclui GH9 em que em sua extremidade C-terminal possui um CBM da família 3A; o grupo C inclui enzimas GH9 com um módulo do tipo Ig ligado a sua extremidade N-terminal e o grupo D possui enzimas GH9 com módulo do tipo Ig seguido de CBM4 na porção N-terminal (Bayer *et al.*, 2000).

A inativação dos módulos de Ig em GH9 Cel9A, CelK ou CbhA resulta na inativação completa do módulo catalítico de GH9. Nas identificações realizadas no presente trabalho foram encontradas três GH9 com massas de 101 KDa, 80 KDa e 137 KDa, além de uma proteína com domínio Ig com massa de 113,21 KDa. Na FEPA também foram identificadas GH9 e GH48 além de uma proteína com domínio Ig. Em piolho de algodão apesar de não ter sido identificadas proteínas GH9 e GH48, foram identificadas duas proteínas com domínio Ig com massas bem próximas, provavelmente isoformas (113,17 e 113,21 KDa).

Quando *C. thermocellum* é cultivado em celobiose, hemicelulases são os

componentes celulosossomais mais abundantes (XynA, Xync, XynZ e XghA) ao lado de endoglucanases CelA, GH5 e endoglucanases CelB, CelE, e CelG. Já cultivado em celulose como única fonte de carbono, as GH9 é grupo mais abundante, juntamente com a proteína de âncora da superfície da célula OlpB e as exoglucanases CelS e CelK (Gold e Martin, 2007). Quanto cultivado em celulose, o isolado B8 apresentou um perfil de expressão de proteínas próximo ao descrito, pois foram registradas proteínas CH9, OlpA, além de GH48 e GH8.

A produção destas proteínas, a sua organização para a montagem do celulosossoma bem como a expressão dos genes que as codificam pode ser positivamente ou negativamente regulada por diferentes fatores tais como a taxa de crescimento celular, a quantidade de H₂, o tipo e a disponibilidade de substrato (Rydzak *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012).

Para a amostra obtida da FEP não foram identificadas proteínas da família de glicosil hidrolases como em celulose. Apenas proteínas com domínio Ig e um fragmento de uma coesina da proteína CipA de 19,23 KDa. Algumas hipóteses podem ser levantadas pela ausência de endo- β -glucanase e exo- β -glucanases na amostra utilizada para as identificações:

- a) provavelmente pela libertação destas proteínas no sobrenadante da cultura *C. thermocellum* B8 uma vez que não se sabe ainda como é a formação do celulosossoma e a interação destas proteínas ao piolho de algodão. Ou ainda, o processo de obtenção destas proteínas envolve algumas lavagens com tampão acetado de sódio antes da eluição, as proteínas podem ter se soltado e ficado no sobrenadante;
- b) como utilizamos apenas as frações eluídas dos resíduos dos substratos, estas proteínas podem não terem sido coletadas, podendo ter ficado ligadas a célula por exemplo. Sabe-se que em celulose durante o crescimento de *C. thermocellum* seu celulosossoma está ligado à célula na fase inicial, na fase exponencial é liberado e em sua fase final estacionária encontra-se ligado à celulose. O estágio da extração destas proteínas pode influenciar na quantidade obtida (Akinosho *et al.*, 2014);
- c) Outra possibilidade é que como vimos nos dados de RT-qPCR em piolho de algodão foi registrada alta taxa de expressão de genes envolvidos na CCR, o que pode ter inibido a síntese destas proteínas (Zhang and Lynd, 2005).

A maioria das proteínas identificadas em FEC, FEP e FEPA foram proteínas do metabolismo celular (figura 20) como fosfoenolpiruvato carboxilase (GTP), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, frutose-1,6-bifosfato, enrolase, piruvato ferredoxina, álcool desidrogenase (tabelas 8, 9 e 10 em anexo).

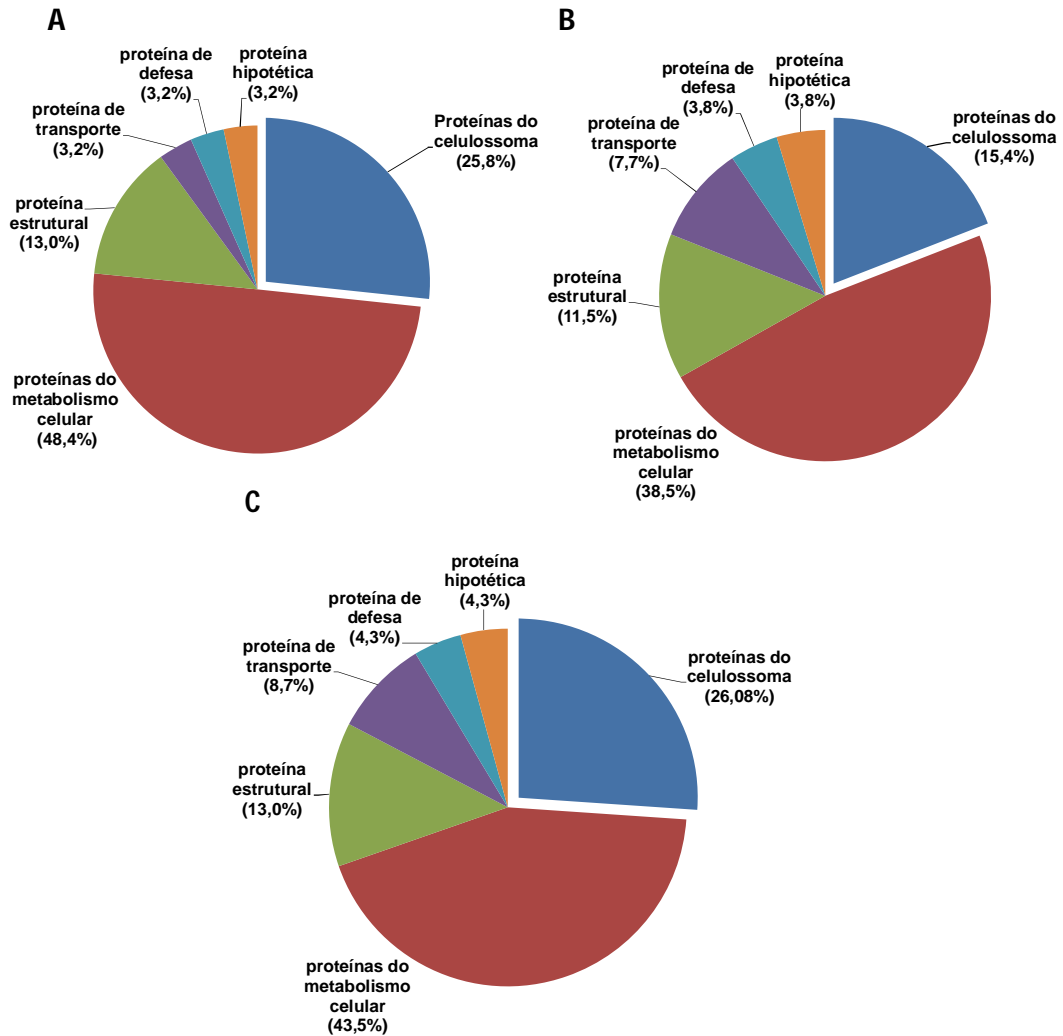


Figura 20. Função das proteínas identificadas dos secretomas de *C. thermocellum* B8 com 48h de crescimento a 60°C: A) FEC (fração eluída da celulose residual); B) FEP (fração eluída do piolho de algodão residual); C) FEPA (fração eluída da palha de cana de açúcar).

A produção das principais proteínas metabólicas é dependente da fase de crescimento de *C. thermocellum* e que aproximadamente um quarto das proteínas metabólicas apresentam mudanças moderadas entre a transição da fase exponencial para a fase estacionária. Proteínas celulosomais apresentam muito mais variabilidade na expressão de seus genes, principalmente em resposta a alterações na disponibilidade de fonte de carbono do que as proteínas do

metabolismo celular (Rydzak *et al.*, 2012).

Nas FEP e FEPA foi identificada uma proteína envolvida no transporte de açúcar (ABC) com massa de 34,18 KDa. O transporte de açúcar em microrganismos é geralmente mediado por um sistema de fosfoenolpiruvato dependente de fosfotransferase. Em *C. acetobutylicum*, o transporte de glicose e lactose é mediado por o sistema fosfotransferase, enquanto que em *Streptomyces reticuli*, outra bactéria gram-positiva do solo o transporte de celobiose e celotriose é mediada por transportadores ABC (Nataf *et al.*, 2009).

Strobel *et al.* (1995) sugeriram que em *C. thermocellum*, celodextrinas entram nas células através de um sistema de transporte ATP dependente, ou seja, os transportadores ABC. Este sistema apresenta vários componentes entre eles domínios que atravessam a membrana (LME) que constituem o canal através da membrana e domínios de ligação de nucleotídeos (NBDs) no interior do citoplasma da célula onde a hidrólise de ATP e a utilização da energia liberada para a proteína gera sua mudança conformacional e impulsiona o transporte. Em bactérias Gram-negativas ligação da proteína ao soluto ocorre no periplasma, já em bactérias Gram-positivas é presa a superfície da célula através de um resíduos de Cys ligado covalentemente na porção N-terminal ligado a membrana lipídica.

Apesar dos transportadores ABC exibirem especificidade de substrato na ausência de proteínas de ligação, a presença delas diminui a distancia ao substrato e, portanto eleva a afinidade do sistema. A identificação e caracterização dos sistemas de transporte de açúcar em *C. thermocellum* são de grande interesse, uma vez que pode permitir a melhoria de utilização da celulose e de outros substratos e gerar novas ferramentas para a introdução de capacidade de utilização de açúcares e produtos finais fermentativos como o etanol.

Entender como *C. thermocellum* modifica seu metabolismo em resposta à disponibilidade de um substrato insolúvel pode oferecer um maior entendimento de quais proteínas específicas são necessárias para a hidrólise dos resíduos agroindustriais e como acontece o transporte de açúcares liberados dentro da célula.

5.8RT-qPCR

A técnica da RT-qPCR foi utilizada para avaliar a expressão de genes envolvidos na formação do celulosoma, fermentação de glicose e repressão catabólica. Foi observada uma diferença no padrão de expressão dos genes *ce/S*,

manA, *celob*, *sdbA*, *cbp*, *ldh*, *hydA*, *crpZ*, *crp*, *hprK*, *hprY* e *hprX* quando *C. thermocellum* B8 foi cultivada em celulose, piolho de algodão e palha de cana de açúcar como fonte de carbono. Além disso, este também é alterado em função do tempo de cultivo (figuras 21 e 22).

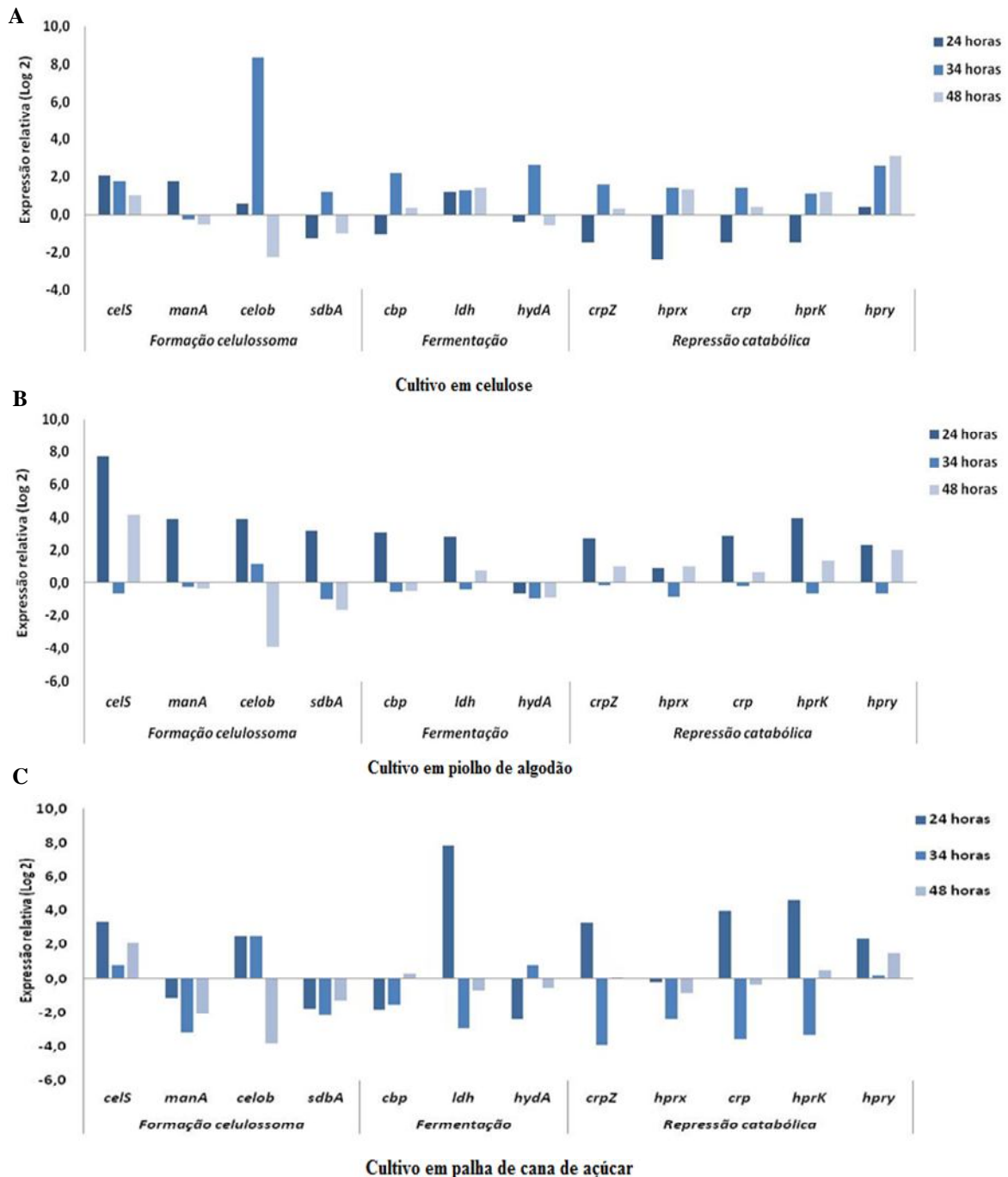


Figura 21. Cinética da expressão gênica de *C. thermocellum* isolado B8 cultivado em meio líquido por 12, 34 e 48 horas a 60°C sob agitação constante tendo como substrato 2% de celulose cristalina (A), piolho de algodão (B) e palha de cana de açúcar (C). Os dados do cultivo em glicose foram utilizados como padrão. Genes avaliados: *celS* (exoglucanase), *manA* (mananase), *celob* (celobiohidrolase), *sdbA* (proteína com domínio doquerina), *cbp* (celobiose fosforilase), *ldh* (lactato desidrogenase), *hydA* (hidrogenase), *crpZ* e *crp* (proteína ligada ao (cAMP)) *hprK*, *hprY* e *hprX* (serina quinases). O gene *recA* foi utilizada como normalizador.

Os genes *celS*, *celob* e *sdbA* que codificam proteínas celulosossomais tiveram expressão diferenciada em celulose entre os tempos de cultivo (24, 34 e 48h). *celS* foi mais expresso em 24 horas, *celob* e *cdbA* apresentaram maior taxa de expressão em 34 horas, com exceção de *ldh*, *cbp* e *hydA* que apresentaram perfil de expressão semelhante.

Em piolho algodão os genes *manA*, *celob* e *sdbA* em 48 horas tiveram valores de expressão mais baixos quando comparados com os obtidos no tempo de 24 horas. *cbp*, *ldh* e *hydA* também apresentaram perfis de expressão semelhantes, já os genes *crpZ*, *hprx*, *crp*, *hprK* e *hprY* em 24 horas já apresentaram valores mais altos quando comparados com o cultivo em celulose.

Ao comparar a expressão relativa de mais alguns genes como o de *cipA*, *olpA*, *adhY* e *ack* entre as culturas *C. thermocellum* B8 em celulose, piolho de algodão e palha de cana de açúcar, apenas no tempo de 24 horas foi possível observar melhor a influência da fonte de carbono sobre a expressão dos genes utilizados neste estudo (figura 22).

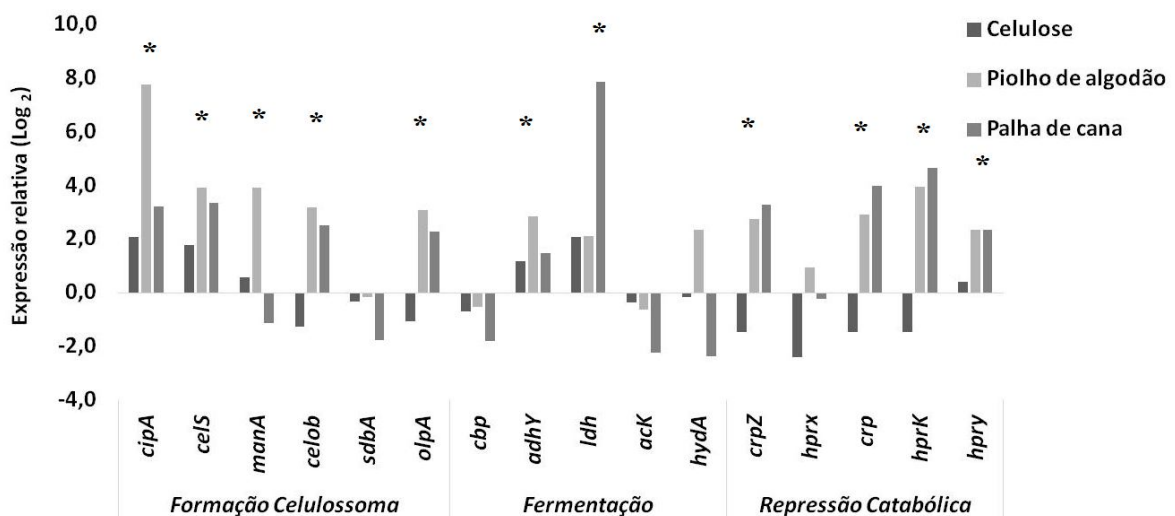


Figura 22. Comparação da expressão relativa de genes envolvidos na formação do complexo celulosoma, fermentação de carboidratos e repressão catabólica por *C. thermocellum* isolado B8 após crescimento em meio líquido pH 7,0 contendo 2% de celulose cristalina, piolho de algodão e palha de cana de açúcar por 24 horas a 60°C. Os dados do cultivo em glicose foram utilizados como padrão. Genes avaliados: *cipA* (escafoldina), *celS* (exoglucanase), *manA* (mananase), *celob* (celobiohidrolase), *sdbA* (proteína com domínio doquerina), *olpA* (proteína âncora), *cbp* (celbiose fosforilase), *adhY* (álcool hidrogenase), *ldh* (lactato desidrogenase), *hydA* (hidrogenase), *crpZ* e *crp* (proteína ligada ao (cAMP)) *hprK*, *hprY* e *hprX* (serina quinases). O gene *recA* foi utilizada como normalizador. * $p < 0,05$.

Os transcritos que codificam CipA, proteína crítica para a montagem da estrutura do celulosoma, em piolho de algodão e palha de cana assim como os genes *celS*, *celob* e *olpA* apresentaram níveis de expressão mais altos quando comparado com celulose.

O papel de CipA em *C. thermocellum* ainda é pouco compreendido, no entanto trabalhos como o de Zverlov *et al.* (2013) relatam que a capacidade do microorganismo em aderir a celulose cristalina e de hidrolisá-la de forma mais eficientemente está ligada a CipA. Em mutantes de *C. thermocellum* onde foi deletado o gene para *cipA* houve uma redução de 15 vezes da atividade específica da hidrólise de celulose.

OlpA é uma proteína que liga os componentes celulosomais a superfície da célula. Os níveis de expressão de *olpA* parece estar intimamente ligado aos de *cipA* uma vez que a diminuição de um altera também os níveis do outro (Olson *et al.*, 2013). Apesar de *manA* não estar entre os principais componentes presentes em biomassas, são encontradas significativamente em gimnospermas e angiospermas (Mizutani *et al.*, 2012). Já *celS* é sensível ao tipo de substrato, em células cultivadas em grama e madeira de algodão, por exemplo, é altamente expressa. Já em celobiose pode ser 4,5 vezes menor.

Em uma comparação transcricional de *C. thermocellum* cultivado em celobiose e álamo amarelo pré-tratado, utilizando a técnica RNA-seq, os genes celulosomais *cipA*, *olpB*, *olf2P*, *sdbA*, *celS* tiveram maior abundância transcricional em álamo amarelo. Esse resultado reforça a ideia de que o complexo celulosoma é essencial para a eficiente degradação da biomassa (Wei *et al.* 2014). No presente trabalho a expressão diferencial destes também foi observada quando cultivado *C. thermocellum* B8 em celulose e piolho de algodão.

A partir na análise proteômica das proteínas produzidas por *C. thermocellum* cultivado em celulose e celobiose, Gold e Martin (2007) encontraram uma maior produção de *OlpB*, *CelS* e *CelK* em celulose e uma menor produção de *CelU*, *CelB*, *CelE* e *CelC* e *XynA*, *XynZ* e *XynC* em celobiose. Estes resultados confirmam a regulação diferencial da produção das proteínas por fontes de carbono e indica a possibilidade da montagem do celulosoma ser direcionada pelo tipo de fonte de carbono em que a bactéria for cultivada (Gold e Martin, 2007).

Com exceção de *adhY* e *ldH* que apresentaram maior expressão em piolho de algodão e em palha de cana, respectivamente, o perfil de expressão dos outros

genes envolvidos no processo fermentativo *cbp*, *ack*, *hydA* foi semelhante entre as fontes de carbono (figura 21).

A taxa de expressão dos genes envolvidos na repressão catabólica de carboidratos (CCR): *crpZ*, *crp*, *hprK*, *hprY* e *hprX* foi diferente entre as fontes de carbono. Em especial em piolho de algodão e palha de cana os níveis de expressão foram maiores que em celulose.

Com exceção de *adhY* o perfil de expressão dos genes envolvidos no processo fermentativo *cbp*, *ack*, *ldh* e *hydA* foi semelhante entre as fontes de carbono. Ainda são pouco compreendidos os fatores que regulam a expressão desses genes, mas já se sabe que a taxa de crescimento e o fator de diluição do substrato podem interferir na expressão desses genes (Stevenson and Weimer, 2005).

A expressão de *cbp* é registrada em células em crescimento em celulose. Já *adhY* parece ter expressão diferencial quanto ao tipo de substrato e a taxa de crescimento. Exemplo disso, é que quanto maior o crescimento de *C. thermocellum* em celobiose menor a sua expressão (Stevenson e Weimer, 2005). Apesar de não termos avaliado a taxa de crescimento entre as fontes, *C. thermocellum* B8 apresentou taxa de expressão 2 vezes maior de *adhY* em piolho de algodão em relação a celulose. Esse resultado pode ser um estímulo a novos estudos já que este gene confere a uma álcool desidrogenase que participa do processo de produção de etanol.

A taxa de expressão dos genes avaliados envolvidos na repressão catabólica de carboidratos (CCR): *crpZ*, *crp*, *hprK*, *hprY* e *hprX* foi diferente entre as fontes de carbono. Em especial em piolho de algodão os níveis de expressão foram maiores que nos outros substratos (figura 22).

A regulação da síntese de celulases do complexo celulosomal de *C. thermocellum* e de outras bactérias termofílicas celulolíticas é determinante para o processo de hidrólise e de crescimento. E o processo de montagem desse complexo é dependente do CCR (Zhang and Lynd, 2005). CCR acontece por inibição dos transportadores ou enzimas alostéricas citoplasmáticas que impede a absorção ou síntese de indutores ou por interação com regulares de transcrição.

Os genes *crp* ou *crpZ* e *hprK*, *hprY* e *hprX* codificam proteínas ligadas a AMPc e serina quinase ambas proteínas com o papel de reguladores transcricionais. O fato de ocorrer ou não a fosforilação destas proteínas é decisivo para tradução do gene

alvo da via glicolítica. Em bactérias gram-positivas quando o resíduo de serina (Se) de Hpr é fosforilado por Hprk, este se a liga-se a um fator transcricional (CcpA) e impede a transcrição do gene alvo (Stulke *et al.*, 1998; Warner e Lolkema, 2003).

O registro de altas taxas de expressão dos genes referentes a estas proteínas em piolho de algodão e palha de cana pode sugerir que nestas condições esteja acontecendo CCR. Isso pode explicar os valores de atividades enzimáticas mais baixas na FEP e FEPA do que na FEC (figuras 8 e 9) mesmo apresentando altas taxas de expressão de genes que conferem celulases celulosomais (figuras 21 e 22).

CONCLUSÃO

- *C. thermocellum* B8 isolado da parte líquida do rúmen de cabra foi capaz de hidrolisar celulose cristalina, piolho de algodão e palha de cana quando cultivado em meio pH 7,0, a 60°C durante 48 horas contendo 2% das fontes de carbono;
- Em comparação com *C. thermocellum* JW20, *C. thermocellum* B8 apresentou maiores taxas de atividades enzimáticas de CMCase e Avicelase na FEC e FEP;
- A análise de RT-qPCR mostrou que, quando cultivado em piolho de algodão e palha de cana *C. thermocellum* B8 apresenta maiores taxas de expressão de genes que codificam proteínas celulosômicas e genes que codificam proteínas envolvidas da CCR em relação à celulose cristalina;
- A expressão diferencial de *adhY* em piolho de algodão e *ldHem* palha de cana faz destas fontes de carbono candidatas para experimentos futuros envolvendo a regulação da expressão de genes de *C. thermocellum* envolvidos na via glicolítica;
- A espectrometria por meio de nanoUPLC-MSE foi capaz de identificar 80 proteínas, sendo que destas 32 em celulose, 25 piolho de algodão e 23 em palha de cana. Estavam presentes proteínas envolvidas com a formação do celulosoma, proteínas do metabolismo celular, proteínas estruturais, de transporte de solvente e íons e de defesa;
- Os resultados apresentados podem ajudar a conceber estratégias para a otimização do cultivo de *C. thermocellum* B8 em piolho algodão e palha de cana já que demonstrou ter capacidade de produzir proteínas com capacidade de hidrolisar essas fontes de carbono.

PERSPECTIVA

- Aprimorar a forma de obtenção das proteínas eluídas dos substratos residuais a fim de obter o maior número possível de proteínas envolvidas com a formação do complexo celulosomal;
- Identificar as proteínas diferencialmente produzidas nas diferentes fontes de carbono a fim de selecionar proteínas chaves envolvidas no processo de reconhecimento e hidrólise dos substratos;
- Investigar quais genes, em especial os que codificam glicosil hidrolases são expressos de forma diferenciada quando o *C. thermocellum* isolado B8 cresce em diferentes biomassas;
- Utilizar os resultados gerados para planejamento de experimentos que envolvam a sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, V. S. **Avaliação do gerenciamento de resíduos sólidos na agroindústria do algodão branco**: o caso de uma indústria têxtil de Cajazeiras. Dissertação de Mestrado (Sistemas Agroindustriais), Paraíba: Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

AKINOSHO, H.; YEE, K.; CLOSE, D.; RAGAUSKAS, A. The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. **Frontiers Chemistry**, V.2, p. 66, 2014.

ANDRADE, T. E.; CARVALHO, G. R. S.; SOUZA, F. L. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista**, V. 11, n. 2, p. 127-136, dezembro 2009.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Bioetanol de cana de açúcar**: Energia para o Desenvolvimento Sustentável. 1a. ed. Rio de Janeiro: 2008.

BAYER, E.A.; KENIG, R.; LAMED, R. Adherence of *Clostridium thermocellum* to Cellulose. **Journal of Bacteriology**, 156 (2), p. 818-827, 1983.

BAYER, E.A.; SETTER, E.; LAMED, R. Organization and Distribution of the Cellulosome in *Clostridium thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, 163(2), p. 552-559, 1985.

BAYER, E.A.; LAMED, R.; WHITE, B.A. FLINT, H.J. From Cellulosomes to Cellulosomics. **Chemical Record**, 8(6), p. 364-377, 2008.

BLUME, R. L.; NORONHA, F. E.; LEITE, J.; QUEIROZ., L. M. R.; RICART, O. A. C.; SOUZA, V. M.; FELIX, R. C. Cellulose and Sugarcane Bagasse. **Bioenergy. Res.** 6, p. 763–775.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72 (1-2), p. 248-254, 1976.

CAI, Y.; LAI, C.; LI, S.; LIANG, Z.; ZHU, M.; LIANG, S. WANG, J. Disruption of Lactate Dehydrogenase through Homologous Recombination to Improve Bioethanol Production in *Thermoanaerobacterium Aotearoense*. **Enzyme and Microbial Technology**, 48(2), p. 155-161, 2011.

CARVALHO, L. A.; DIAS, V. M. F.; PRATES, M. A. J.; NAGY, T.; GILBERT, J. H.; DAVIES, J. G. Cellulosome assembly revealed by the crystal structure of the cohesin–dockerin complex. **PNAS**, v. 100, n. 24, 2003.

CHANG, J. J.; HO, F. J.; HO, C. Y.; WU, Y. C.; HOU, Y. H.; HUANG, C. C.; SHIN, M. C.; LI, W. H. Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, 6, p. 19, 2013.

CHRISTOPHERSON, M.; DAWSON, A. J.; STEVENSON, M. D.; CUNNINGHAM, C. A.; BRAMHACHARYA, S.; WEIMER, J. P.; KENDZIORSKI, C.; SUEN, G. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. **BMC Genomics**, 15, p.1066, 2014.

CHENG, Y. F.; MAO, S. Y.; LIU, J. X.; ZHU, W. Y. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. **Letters in Applied Microbiology**, 48(5),p. 585-592, 2009.

CORE, R.; TEAM. R. **A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2013.

CURRIE, H. D.; HERRING, D. C.; GUSS, M. A.; OLSON, G. D.; HOGSETT, A. D.; LYND, R. L. Functional heterologous expression of an engineered full length CipA from *Clostridium thermocellum* in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. **Biotechnology for Biofuels**, 6:32, 2013.

CUNHA, S. I. **Caracterização e análise funcional da comunidade bacteriana ruminal de caprinos da caatinga brasileira utilizando DNA metagenômico**. Dissertação de Mestrado (Ciências Genômicas e Biotecnologia). DF: Universidade Católica de Brasília, 2010.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical Improvements in Two-Dimensional Electrophoresis Increase the Level of Genetic Variation Detected in Wheat-Seedling Proteins. **Electrophoresis**,7(1): 52-54, 1986.

DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M; WU, JH. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiol Mol Biol Rev**, 69, (1), p. 124-154, 2005.

DEMAIN, L. A. Biosolutions to the energy problem. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 319-332, 2009.

DEMIBRAS, M. F.; BALAT, M.; BALAT, H. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 1746-1760, 2009.

DESVAX, M. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 741-764, 2005.

DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M.P.; JESUS, C.D.F.; ROSSELL, C.E.V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Integrated Versus Stand-Alone Second Generation Ethanol Production from Sugarcane Bagasse and Trash. **Bioresource Technology**, 103(1), p. 152-161, 2012.

DUARTE, G. C. **Holocelulases produzidas *Aspergillus oryzae***: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular; Universidade de Brasília. Brasília- DF, 2013.

DUMITRACHE, A.; WOLFAARDT, G.; ALLEN, G.; LISS, N. A.; LYND, R.L. Form and Function of *Clostridium thermocellum* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology** p. 231–239, 2013.

DROR, T.W.; MORAG, E.; ROLIDER, A.; BAYER, E.A.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. Regulation of the Cellulosomal Cels (Cel48a) Gene of *Clostridium Thermocellum* Is Growth Rate Dependent. **Journal of Bacteriology**, 185(10): 3042-3048, 2003.

ESAKA, K.; ABURAYA, S.; MORISAKA, H.; KURODA, K.; UEDA, M. Exoproteome analysis of *Clostridium cellulovorans* in natural soft-biomass degradation. **AMB Express**, v. 5, p. 22, 2015.

FELIX, C. R.; LJUNGDAHL, L. G. The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. **Annu Rev Microbiol**, v. 47, p. 791-819, 1993.

FREIER, D.; MOTHERSHED, C. P.; WIEGEL, J. Characterization of *Clostridium-thermocellum* Jw20. **Applied and Environmental Microbiology**, 54(1), p. 204-211, 1988.

FERRER, M; BELOQUI, A.; GOLYSHINA, O. V.; , PLOU, F. J.; NEEF, A.; CHERNIKOVA, T. N.; FERNANDES-ARROJO, L.; GHAZI, I.; BALLESTEROS, A.; ELBOROUGH, K.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P. N. Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. **Journal of Biotechnology**, 2(2), p. 207-13, 2007.

FEINBERG, L.; FODEN, J.; BARRETT, T.; DAVENPORT, K. W.; BRUCE, D.; DETTER, C. *et al.* Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum* DSM1313. **Journal Bacteriology**, 193, p. 2906–2907, doi:10.1128/JB.00322-11, 2011.

FONTES, C. M. G. A.; GILBERT, H. J. Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. **Annual Review of Biochemistry**, 79, (1), p. 655-681, 2010.

FLINT, H.J.; BAYER, E.A.; RINCON, M.T.; LAMED, R.; WHITE, B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, 6(2), p. 121-31, 2008.

FUKUSHIMA, S. R., HATFIELD, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 505 511, 2003.

GEROMANOS, S. J., VISSERS, J. P. C., SILVA, J. C., DORSCHER, C. A.; LI, G.-Z., GORENSTEIN, M.V.; BATEMAN, R. H; LANGRIDGE, J. I. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **Proteomics**, 9, p. 1683–1695, 2009.

GILES, K.; WILDGOOSE, J. L.; LANGRIDGE, D. J.; CAMPUZANO, I. A method for direct measurement of ion mobilities using a travelling wave ion guide. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 298, p.10-16, 2010.

GOLD, N.D.; MARTIN, V. J. Global View of the *Clostridium Thermocellum* Cellulosome Revealed by Quantitative Proteomic Analysis. **Journal of Bacteriology**, 189(19), p. 6787-6795, 2007.

GONG, X.; GRUNINGER, J. R.; QI, M.; PATERNON, L.; FORSTER, J. R.; TEATHER, M. R.; MCALLISTER, A. T. Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene. **BMC Research Notes**, 5, p. 566.

HATTOTI, K.; MATSUI, H. Diversity of fumarate reducing bacteria in the bovine rumen revealed by culture dependent and independent approaches. **Anaerobe**, 14(2), p. 87-93, 2008.

HEMME, C. L.; MOUTTAKI, H.; Lee, Y. J.; Zhang, G.; Goodwin, L.; Lucas, S.; *et al.* Sequencing of multiple clostridial genomes related to biomass conversion and biofuel production. **Journal Bacteriology**, 192, p. 6494–6496, 2010.

HOLTZ, M.; SILVEIRA, M. L. L.; WKISBEC, E. Caracterização e Utilização de algodão da indústria Têxtil para a produção de Corpos Frutíferos *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. In: VI Congresso Brasileiro do Algodão, **Anais...** 2007.

HOOK, S. E.; NORTHWOOD, K. S.; WRIGTH, A. D.; MCBRIDE, B.W. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. **Applied Environ Microbiology**, 75(2), p. 374-380, 2009.

IRWIN, D.; LEATHERS, T.; GREENE, R.; WILSON, D. Corn fiber hydrolysis by *Thermobifida fusca* extracellular enzymes. **Applied Environ. Microbiology**, 61, p. 352–358, 2003.

ISLAM, R.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D. Influence of initial cellulose concentration on the carbon flow distribution during batch fermentation by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. **Applied Microbiology Biotechnology**, 82 (1), p. 141-8, 2008.

JOHNSON, E. A.; SAKAJOH, M.; HALLIWELL, G.; MADIA, A.; DEMAIN, A. L. Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from *Clostridium-Thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 43(5), p. 1125-1132, 1982.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, Universidade de São Paulo – USP, 2010.

KONISH, F.; SOARES, M. P.; Galvão, A. R.; Silva, S. M.; Rocha, M. A. Uma década de tecnologia biocombustível: análise do segmento automobilístico e sua correlação com o setor sucroalcooleiro. **Energia na agricultura**, ISSN, p. 1808-8759, 2014.

KRISTENSEN, J. B; BORJESSON, J.; BRUUN, M. H.; TJERNELD, F.; JORGWENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 888-895, 2007.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, V. O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

LI, G.-Z.; VISSERS, J. P. C.; SILVA, J. C.; GOLICK, D.; GORENSTEIN, M.V.; GEROMANOS, S. J. Database searching and accounting of multiplexed precursor

and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**,v. 9, p. 1696-1719, 2009.

LIMAYEM, A., RICKE, S. C. Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**,v.38(4), p. 449-467, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**,v. 25(4), p. 402-408, 2001.

LYND, L. R. Overview and Evaluation of Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. **Annual Review of Energy and the Environment**,v. 21, p. 403-465, 1996.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**,v. 66(3), p. 506-577, 2002.

LOT, C. A. **Patentes e Etanol Lignocelulósicos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Escola de Economia Fundação Getúlio Vargas - FGV – EESP, São Paulo, 2013.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, vol 6, p 21, 1976.

MERINO, S.; TOMÁS, M. J. *Review Gram-Negative Flagella Glycosylation*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 2840-2857, 2014.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 324-329, 2001.

MILANEZ, Y. A.; NYKO, D.; GARCIA, F. L. J.; REIS, S. F. S. L. B. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **Biocombustíveis BNDS Setorial**, v. 35, p. 277-302, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**,v. 31 (3), p. 426-428, 1959.

MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, B. D.; MORRISON, M. Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. **J. Dairy Sci**, 84, p. 1294-1309, 2001.

NAKATANI, Y.; YAMADA, R.; OGINO, C.; KONDO, A. Synergetic effect of yeast cell-surface expression of cellulase and expansin-like protein on direct ethanol production from cellulose. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 66, 2013.

NATAF, Y.; BAHARI, L.; KAHAL-RAIFER, H.; BOROVOK, I.; LAMED, R.; BAYER, E.A.; SONENSHEIN, A. L.; SHONAM, Y. *Clostridium thermocellum* Cellulosomal Genes Are Regulated by Extracytoplasmic Polysaccharides Via Alternative Sigma Factors. Proceedings of the **National Academy of Sciences** of the United States of America, 107(43), p. 18646-18651, 2010.

NG, T.K.; WEIMER, T.K.; ZEIKUS, J.G. Cellulolytic and Physiological Properties of *Clostridium Thermocellum*. **Arch Microbiol**, 114(1), p. 1-7, 1977.

NORDON, E. R.; CRAIG, J. S. Molecular engineering of the cellulosome complex for affinity and bioenergy application. **Biotechnology Letters**, 31, p. 465-476, 2009.

OGEDA, T.L.; Petri, D.F.S. Revisão: Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLSON, D.G.; Giannone, R.J.; Hettich, R.L.; Lynd, L.R. Role of the Cipa Scaffoldin Protein in Cellulose Solubilization, as Determined by Targeted Gene Deletion and Complementation in *Clostridium Thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, v. 195(4), p. 733-739, 2013.

PACHECO, F. T. **Produção de etanol: primeira ou segunda geração?** Circular Técnica 04 Embrapa Agroenergia. Parque Estação Biológica - Brasília, DF, 2011.

PANG, H.; ZHANG, P.; DUAN, C.-J.; MO, X.-C.; TANG, J.-L.; FENG, A.-X. Identification of Cellulase Genes from the Metagenomes of Compost Soils and Functional Characterization of One Novel Endoglucanase. **Current Microbiology**, 58, p. 404-408, 2009.

PARK, Y. E.; NARUSE, K.; KATO, T. One-pot bioethanol production from cellulose by co-culture of *Acremonium cellulolyticus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, 5, p. 64, 2012.

PEREIRA *et al.* **Biotechnology for Biofuels**, 8, p. 44, 2015.

QUEDES, F. F. Inovação na produção de etanol de segunda geração pela sacarificação de resíduos de algodão provenientes da indústria têxtil.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, Centro de Ciências Exatas e Naturais, 2012.

RAMAN, B.; MCKEOWN, C. K.; RODRIGUEZ, M.; BROWN, S. D.; MIELENZ, J. R. Transcriptomic analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC27405 cellulose fermentation. **BMC Microbiology**,11, p. 134, 2011.

RAMAN, B.; PAN, C.; HURST, G. B.; RODRIGUEZ, M.; MCKEOWN, C. K.; LANKFORD, P. K.; SAMATOVA, N. F.; MIELENZ, J. R. Impact of Pretreated Switchgrass and Biomass Carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 Cellulosome Composition: A Quantitative Proteomic Analysis. **Plos One**, 4 (4), e5271, 2009.

RIEDERER, A.; TAKASUKA, T. E.; MAKINO, S. I.; STEVENSON, D. M.; BUKHMAN, Y. V.; ELSEN, N. L. *et al.* Global gene expression patterns in *Clostridium thermocellum* as determined by microarray analysis of chemostat cultures on cellulose or cellobiose. **Appl. Environ. Microbiology**,77, p. 1243-1253. doi:10.1128/AEM. 02008-10, 2011.

RYDZAK, T.; MCQUEEN, D. P.; KROKHIN, V. O.; SPICE, J.; EZZATI, P.; DWIVEDI, C. D.; SHAMSHURIN, D.; LEVIN, B. D.; WILKINS, A. J.; SPARLING, R. Proteomic analysis of *Clostridium thermocellum* core metabolism: relative protein expression profiles and growth phase-dependent changes in protein expression. **BMC Microbiology**, p. 12-214, 2012.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T.; Leitão, R.C. In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA - Foz do Iguaçu, PR. Volume I – **Palestras**, 2011.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 816-822, 2005.

SIQUEIRA, F.G. **Resíduos Agroindustriais com potencial para a Produção de Holocelulases de origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular; Universidade de Brasília. Brasília- DF, 2010.

SILVA, V. F. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.13, n. 20, p. 01-134, 2012.

SING, K. M.; PANDYA, P. R.; TRIPATHI, A. K.; PATEL, R.; PARNEKAR, G. S. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. **Meta Gene**, 2014.

SCHWARZ, H. W. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, p. 634-649, 2001.

SOUZA, P. A.; GRANDIS, A.; LEITE, C.C.D.; BUCKERIDGE, S. M. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. **Bioenergy Research**, DOI 10.1007/s12155-013-9366-8, 2013.

STEVENSON, M. D.; Weimer, J. P. Expression of 17 Genes in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during Fermentation of Cellulose or Cellobiose in Continuous Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4672-4678, 2005.

STROBEL, J. H.; CALDWELL, C. F.; DAWSON, A. K. Carbohydrate Transport by the Anaerobic Thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4012-4015, 1995.

STULKE, J.; ARNAUD, M.; RAPOPORT, G.; MARTIN-VERSTRAETE, I. PRD – a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. **Molecular Microbiology**, 28(5), 865–874, 1998.

SUNDSET, M. A.; EDWARDS, J. E.; CHENG, Y. F.; SENOSIAIN, R. S.; FRAILE, M. N.; NORTHWOOD, K.S.; PRAESTENG, K. E.; GLAD, T.; MATHIESEN, S. D.; Wright, A. D. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. **Microbiology Ecology**, 57(2), p. 335-480, 2009.

TACHAAPAIKOON, C.; KOSUGI, A.; PASON, P.; WAEONUKUL, R.; RATANAKHANOKHAI, K.; KYU, K.L.; ARAI, T.; MURATA, Y.; MORI, Y. Isolation and Characterization of a New Cellulosome-Producing *Clostridium thermocellum* Strain. **Biodegradation**, 23(1), p. 57-68, 2012.

WANG, L.; HATEM, A.; CATALYUREK, V. U.; MORRISON, M.; YU, Z. Metagenomic Insights into the Carbohydrate-Active Enzymes Carried by the Microorganisms Adhering to Solid Digesta in the Rumen of Cows. **Plos One**, 8(11), 78507.

WARNER, B. J.; LOLKEMA, S. J. CcpA-Dependent Carbon Catabolite Repression in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology**, p. 475–490, 2003.

WEI, H.; FU, Y.; MAGNUSSON, L.; BAKER, O. J.; MANESS, P.-C.; XU, Q.; YANG, S.; BOWERSON, A.; BOGORAD, I.; WANG, W.; TUCKERS, P. M.; HUMMEL, E. M.; DING, S.-Y. **Comparison of transcriptional profiles of *Clostridium thermocellum* grown on cellobiose and pretreated yellow poplar using RNA-Seq**, 2014.

WILSON, M. C.; JR, R. M.; JOHNSON, M. C.; MARTIN, L. S.; CHU, M. T.; WOLFINGER, D. R.; HAUSER, J. L.; LAND, L. M.; KLINGEMAN, M. D.; SYED, H. M.; RAGAUSKAS, J. A.; TIMOTHY, J.; TSCHAPLINSKI, J. T.; MIELENZ, R. J.; BROWN, D. S. Global transcriptome analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated Populus and switchgrass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 179, 2013.

WHITFORD, M. F.; FORSTER, R. J.; BEARD, C. E.; GONG, J.; TEATHER, R. M. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. **Anaerobe**, v.4, n.3, Jun, p.153-63, 1998.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, 25, p. 153-157, 2007.

YANG, S.; Giannone, J. R.; Dice, L.; Yang, K. Z.; Engle, L. N.; Tschaplinski, J. T.; Hettich, L. R.; Brown, D. S. *Clostridium thermocellum* ATCC27405 transcriptomic, metabolomic and proteomic profiles after ethanol stress. **BMC Genomics**, 13, p. 336, 2012.

YEE, L. K.; JR, R. M.; THOMPSON, A. O.; FU, C.; WANG, Z.-Y.; DAVISON, H. B.; R MIELENZ, R. J. Consolidated bioprocessing of transgenic switchgrass by an engineered and evolved *Clostridium thermocellum* strain. **Biotechnology for Biofuels**, 7, p. 75, 2014.

VAZANA, Y.; BARAK, Y.; UNGER, T.; PELEG, Y.; SHAMSHOUM, M.; BEN-YEHEZKEL, T.; MAZOR, Y. A synthetic biology approach for evaluating the functional contribution of designer cellulosome components to deconstruction of cellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, 6, p. 182, 2013.

ZHANG, P. H.-Y.; LYND, R. L. Regulation of Cellulase Synthesis in Batch and Continuous Cultures of *Clostridium thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, p. 99-106, 2005.

ZVERLOV, V. V.; KLUPP, M.; KRAUSS, J.; SCHWARZ, H. W. Mutations in the Scaffoldin Gene, *cipA*, of *Clostridium thermocellum* with Impaired Cellulosome Formation and Cellulose Hydrolysis: Insertions of a New Transposable Element, IS1447, and Implications for Cellulase Synergism on Crystalline Cellulose. **Journal of Bacteriology**, p. 4321–4327, 2008.

ZVERLOV, V. V.; KELLERMANN, J.; SCHWARZ, W. H. Functional Subgenomics of *Clostridium Thermocellum* Cellulosomal Genes: Identification of the Major Catalytic Components in the Extracellular Complex and Detection of Three New Enzymes. **Proteomics**,5(14), p. 3646-3653, 2005.

ANEXOS

Tabela 8. Identificação das proteínas obtidas da FEC (fração eluída da celulose residual) após o cultivo de *C. thermocellum* B8

Uniprot code	Description	Protein (MW)	Score (AVG)	Peptides (AVG)	Fmol Covariância	Ngram (AVG)	Repeate Rate	% of TSP
P00489	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE_ MUSCLE FORM EC*	97671,64	1643,73	27	2,40	24,42	2	
C7HDZ8	Glycoside hydrolase family 48: β -1,4-glucanase (CeLY)	83702,57	4127,18	21,5	2,84	57,33	2	30,66
D1NLS2	Glycoside hydrolase family 9: endo- β -1,4-glucanase I (Cell)	101339,39	3850,12	30	2,38	24,06	2	12,87
E6UU82	Cellulosome anchoring protein cohesin subunit	143945,17	1544,70	17,5	2,19	22,19	2	11,87
D1NLD9	Glycosyltransferase family 36: GDP- mannose	93507,18	174,51	11	2,09	11,57	2	6,19
H8EC95	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase type I	36367,42	3407,59	13	2,50	11,52	2	6,16
H8EDW1	Ig domain protein	113214,20	472,10	21	1,87	8,42	2	4,51
O86999	hypothetical protein	113387,37	472,26	19,5	1,83	7,61	2	4,07
H8EI70	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	68140,76	491,33	22	2,03	7,34	2	3,93
C7HDM7	Glycoside hydrolase family 9: endo- β -1,4-glucanase I (Cell)	80224,77	158,12	8	1,71	4,15	2	2,22
H8ECA0	Enolase	47159,67	416,04	7	1,84	3,30	2	1,76
H8EEF1	Iron-containing alcohol dehydrogenase	96523,27	119,73	11	1,49	3,00	2	1,60
H8EC97	Triosephosphate isomerase	27362,25	1120,33	7,5	1,98	2,64	2	1,41
D1NLS3	Glycoside hydrolase family 9: endo- β -1,4-glucanase I (Cell)	137914,91	277,86	20	1,28	2,63	2	1,41
H8EC96	Phosphoglycerate kinase	42876,57	392,78	10	1,76	2,47	2	1,32
H8EH05	Extracellular solute-binding protein family 1	50085,69	178,19	8,5	1,68	2,38	2	1,27
H8ECN7	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II	33917,79	302,71	5,5	1,79	2,11	2	1,13
D1NPL2	Cysteine synthase	33398,28	1117,94	10	1,72	1,75	2	0,94
H8ECN6	Phosphofructokinase	46023,32	243,05	8,5	1,52	1,52	2	0,82
H8ECT1	Peroxioredoxin	20918,57	2076,98	7,5	1,85	1,49	2	0,80

Uniprot code	Description	Protein (MW)	Score (AVG)	Peptides (AVG)	Fmol Covariance	Ngram (AVG)	Repeat Rate	% of TSP
H8ED52	Pyruvate phosphate dikinase	99363,67	75,47	6	1,17	1,47	2	0,78
H8EGU6	Iron-containing alcohol dehydrogenase	42472,46	290,05	8	1,50	1,33	2	0,71
C7HGK4	Glycoside hydrolase family 8: endo- β -1,4-glucanase (CelA)	51657,52	80,77	5,5	1,26	0,94	2	0,50
H8EI53	10 kDa chaperonin	10155,82	4272,94	4	1,94	0,88	2	0,47
D1NNZ6	Pyruvate ferredoxin flavodoxin oxidoreductase delta subunit	11774,34	269,92	2	1,87	0,87	2	0,46
H8EED4	Glucose-6-phosphate isomerase	50401,43	113,51	8	1,18	0,77	2	0,41
H8EEQ2	50S ribosomal protein L7L12	13295,45	2545,68	3,5	1,73	0,72	2	0,38
C7HJX6	Cellulosome anchoring protein cohesin region (Fragment)	19238,62	437,45	2	1,54	0,67	2	0,36
H8EGB1	Ketol-acid reductoisomerase	36393,66	134,67	5,5	1,24	0,63	2	0,34
H8EAA6	Pyruvate ketoisovalerate oxidoreductase gamma subunit	21260,55	122,86	1,5	1,43	0,57	2	0,31
H8EGI8	Histone family protein DNA-binding protein	9728,33	673,48	4,5	1,57	0,36	2	0,19
H8EE76	50S ribosomal protein L27	10038,71	104,06	1	1,42	0,26	2	0,14

The ScoreAVG is the average PLGS score for each hit. ProductsAVG is the average fragment ion products for a protein hit. PeptideAVG is the average of the peptide hits per identified protein. FmolCovariance is the covariance at the femtomole detection level for each protein in the replicate analyses. NgramAVG is the average (in nanograms) of each protein load on the column. The repetition rate is the repeatability of each protein in the replicates. % of TSP is the percentage of each protein in the total soluble mixture relative to the total protein load (in nanograms) on the column. * Protein used as the internal standard.

Tabela 9. Identificação das proteínas obtidas da FEP (fração eluída do piolho de algodão residual) após o cultivo de *C. thermocellum* B8

Uniprot code	Description	Protein MW	Score AVG	Peptides AVG	Fmol Covariance	Ngram AVG	Repeate Rate	% of TSP
P00489	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE_ MUSCLE FORM EC*	97671,64	1655,21	32	0,00	24,42	2	
H8EH05	Extracellular solute-binding protein family 1	50085,69	1080,11	15	0,07	12,28	2	15,30
D1NP50	Ig domain protein	113170,14	656,67	26	1,41	11,70	2	14,58
H8EDW1	Ig domain protein	113214,20	644,52	25,5	1,41	11,61	2	14,47
H8EC95	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase type I	36367,42	2320,96	11,5	0,06	10,58	2	13,18
D1NLD9	Glycosyltransferase family 36 : GDP- mannose	93507,18	108,49	12	0,01	6,23	2	7,76
D1NNW4	Type 3a cellulose-binding domain protein	112443,80	85,25	9,5	0,03	5,11	2	6,36
H8ECA0	Enolase	47159,67	374,90	11	0,10	3,77	2	4,70
H8ECT1	Peroxiredoxin	20918,57	2483,25	10	0,08	2,45	2	3,05
H8EI70	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	68140,76	78,81	10	0,05	2,36	2	2,94
H8EGU7	Sugar ABC transporter (Sugar-binding protein)	34182,35	340,55	5,5	0,05	2,13	2	2,65
H8ECN7	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II	33917,79	229,60	6	0,07	1,95	2	2,43
H8ECN6	Phosphofructokinase	46023,32	328,35	10,5	0,05	1,78	2	2,21
D1NPL2	Cysteine synthase	33398,28	832,51	9	0,02	1,43	2	1,79
H8EI53	10 kDa chaperonin	10155,82	3318,50	3,5	0,04	1,21	2	1,50
H8EC96	Phosphoglycerate kinase	42876,57	159,48	8,5	0,03	0,96	2	1,19
H8EAA6	Pyruvateketoisovalerate oxidoreductase gamma subunit	21260,55	514,73	4	0,04	0,91	2	1,14
D1NNZ6	Pyruvate ferredoxinferredoxin oxidoreductase delta subunit	11774,34	399,03	1,5	0,01	0,72	2	0,90
H8EGU6	Iron-containing alcohol dehydrogenase	42472,46	80,99	8	0,24	0,69	2	0,86
D1NIC8	Putative uncharacterized protein	14884,06	267,57	2	0,10	0,52	2	0,65

Uniprot code	Description	Protein MW	Score AVG	Peptides AVG	Fmol Covariance	Ngram AVG	Repeate Rate	% of TSP
H8EEQ2	50S ribosomal protein L7L12	13295,45	392,21	3	0,04	0,35	2	0,44
H8EAA3	Thiamine pyrophosphate TPP-binding domain-containing protein	34991,36	80,71	5	0,07	0,33	2	0,42
H8EHD2	Ribosome-recycling factor	20944,28	126,47	2,5	0,22	0,33	2	0,41
H8EGI8	Histone family protein DNA-binding protein	9728,33	528,69	4	0,08	0,33	2	0,41
C7HJX6	Cellulosome anchoring protein cohesin region (Fragment)	19238,62	298,45	3,5	0,07	0,31	2	0,38
H8EHR7	Small acid-soluble spore protein alphabeta type	7662,61	173,30	1	0,10	0,20	2	0,25
H8EHK7	Cysteine synthase	33350,23	599,89	7,5	1,41	0,03	2	0,04

The ScoreAVG is the average PLGS score for each hit. ProductsAVG is the average fragment ion products for a protein hit. PeptideAVG is the average of the peptide hits per identified protein. FmolCovariance is the covariance at the femtomole detection level for each protein in the replicate analyses. NgramAVG is the average (in nanograms) of each protein load on the column. The repetition rate is the repeatability of each protein in the replicates. % of TSP is the percentage of each protein in the total soluble mixture relative to the total protein load (in nanograms) on the column. * Protein used as the internal standard.

Tabela10. Identificação das proteínas obtidas da FEPA (fração eluída da palhada de cana-de-açúcar residual) após o cultivo de *C. thermocellum* B8

Uniprot code	Description	Protein MW	Score AVG	Peptides AVG	Fmol Covariance	Ngram AVG	Repeat Rate	% of TSP
P00489	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE_ MUSCLE FORM EC*	97671,64	1950,657	29,0	0,0	24,42	3	
H8EDW1	Ig domain protein	113214,2	396,5477	20,7	0,2	13,63	3	25,01
E6UU82	Cellulosome anchoring protein cohesin region	143945,2	667,7969	14,3	0,1	12,18	3	22,36
H8EC95	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase type I	36367,42	1584,699	8,0	0,2	5,35	3	9,83
C7HDZ8	Glycoside hydrolase family 48	83702,57	470,2453	10,7	0,9	4,36	3	8,01
D1NLD9	Glycosyltransferase 36	93507,18	41,91127	4,7	0,2	2,43	3	4,47
H8EI70	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	68140,76	87,4204	7,3	0,3	2,23	3	4,09
H8EH05	Extracellular solute-binding protein family 1	50085,69	222,8151	8,7	0,5	2,15	3	3,94
D1NNW4	Type 3a cellulose-binding domain protein	112443,8	39,66805	6,5	0,1	1,91	2	3,50
H8ECN7	Fructose-1 6-bisphosphate aldolase class II	33917,79	127,1929	4,5	0,1	1,36	2	2,50
H8EC97	Triosephosphate isomerase	27362,25	316,9793	4,0	0,6	1,28	3	2,35
H8ECA0	Enolase	47159,67	118,4957	6,5	0,1	1,21	2	2,23
C7ED31	Glycosyl hydrolase family 48 protein CelS (Fragment)	43068,5	452,9875	6,7	1,7	1,02	3	1,87
H8ECN6	Phosphofructokinase	46023,32	110,5377	6,0	0,1	0,90	3	1,66
H8EGU6	Iron-containing alcohol dehydrogenase	42472,46	84,1978	5,5	0,2	0,78	2	1,43
H8EC96	Phosphoglycerate kinase	42876,57	70,22967	5,0	0,2	0,66	3	1,21
H8EGU7	Sugar ABC transporter (Sugar-binding protein)	34182,35	111,0937	3,0	0,1	0,61	2	1,12
H8EI53	10 kDa chaperonin	10155,82	1457,85	4,3	0,1	0,58	3	1,06
D1NIY6	Phosphate acetyltransferase	35535,02	67,29785	4,0	0,1	0,50	2	0,91
H8ECT1	Peroxiredoxin	20918,57	112,1181	3,0	0,2	0,38	3	0,70
D1NIC8	Putative uncharacterized protein	14884,06	129,4501	1,7	0,2	0,36	3	0,67

Uniprot code	Description	Protein MW	Score AVG	Peptides AVG	Fmol Covariance	Ngram AVG	Repeat Rate	% of TSP
C7HJX6	Cellulosome anchoring protein cohesin region (Fragment)	19238,62	112,0565	2,3	0,1	0,25	3	0,45
H8EEQ2	50S ribosomal protein	13295,45	215,0472	2,0	0,0	0,17	2	0,31
H8EGI8	Histone family protein DNA-binding protein	9728,331	177,3943	3,5	0,0	0,17	2	0,31

The ScoreAVG is the average PLGS score for each hit. ProductsAVG is the average fragment ion products for a protein hit. PeptideAVG is the average of the peptide hits per identified protein. FmolCovariance is the covariance at the femtomole detection level for each protein in the replicate analyses. NgramAVG is the average (in nanograms) of each protein load on the column. The repetition rate is the repeatability of each protein in the replicates. % of TSP is the percentage of each protein in the total soluble mixture relative to the total protein load (in nanograms) on the column.

* Protein used as the internal standar