



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

**Avaliação comparativa entre holocelulases secretadas por
Clostridium thermocellum isolado B8 e enzimas comerciais:
Sacarificação da polpa escura de Eucalipto**

Pedro Ricardo Vieira Hamann

Brasília- DF, 30 de Junho de 2016

**Avaliação comparativa entre holocelulases secretadas por
Clostridium thermocellum isolado B8 e enzimas comerciais:
Sacarificação da polpa escura de Eucalipto**

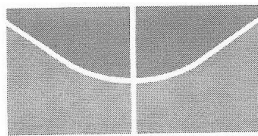
Estudante: Pedro Ricardo Vieira Hamann

Matrícula 10/0038387

Orientadora. Doutora Eliane Ferreira Noronha (Biologia Celular – UnB)

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Brasília – DF, 30 de Junho de 2016



Universidade de Brasília
Faculdade de Tecnologia
Departamento de Engenharia Florestal

Avaliação comparativa entre holocelulases secretadas por
Clostridium thermocellum isolado B8 e enzimas comerciais:
Sacarificação da polpa escura de Eucalipto

Estudante: Pedro Ricardo Vieira Hamann

Matrícula: 10/0038387

Orientador: Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Menção: SS

Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha
Universidade de Brasília – UnB
Departamento de Biologia Celular
Orientadora

Prof. Dr. Joaquim Carlos Gonzalez.
Universidade de Brasília – UnB
Departamento de Engenharia Florestal
Membro da Banca

Prof. Dra. Consuelo Rodrigues de Lima
Universidade de Brasília – UnB
Departamento de Biologia Celular
Membro da Banca

Brasília, 30 de Junho de 2016

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o andamento do trabalho, em especial a equipe de trabalho a qual faço parte no Laboratório de Enzimologia (IB – UnB) sob orientação da Professora Doutora Eliane Ferreira Noronha.

Resumo

A busca por novas fontes sustentáveis de energia faz com que alternativas para os combustíveis fósseis sejam desenvolvidas, uma das mais promissoras é o aproveitamento de materiais renováveis de origem vegetal, lignocelulose, para a produção de biocombustíveis em especial o etanol de segunda geração. Para obter o etanol de segunda geração é necessário desconstruir a parede celular vegetal e liberar os açúcares que nela estão contidos. Um dos microrganismos mais eficientes na degradação de biomassa lignocelulósica é a bactéria aneróbica termofílica *Clostridium thermocellum*, a qual é capaz de construir complexos enzimáticos para hidrolisar polissacarídeos presentes na parede celular vegetal. No presente estudo, o isolado de *Clostridium thermocellum* B8 foi utilizado na produção de holocelulases, sendo capaz de crescer na presença de avicel e secretar pectinases, endoglicanases e xilanases. Comparativamente a enzimas comerciais, as produzidas por *C.thermocellum* tanto na forma de complexos ou presentes no sobrenadante apresentam maior inibição por compostos derivados da lignina, porém uma maior estabilidade em pHs mais básicos. O efeito da temperatura mostrou que tanto a amostra comercial quanto as produzidas por *C.thermocellum* apresentam uma faixa de atividade máxima similar. Quando as amostras enzimáticas foram aplicadas para sacarificação das fibras de Eucalipto foi observada uma maior eficiência na liberação de açúcares redutores quando a amostra composta por complexos enzimáticos produzidos por *C.thermocellum* foi aplicada, indicando um potencial dessa amostra para sacarificação da polpa escura de Eucalipto e futura geração do etanol de segunda geração.

Palavras-chave: *C.thermocellum*, holocelulases, etanol de segunda geração, polpa escura de Eucalipto.

Abstract

The search for new renewable energy sources is pushing the development of new alternative fuels to replace those derived from fossil sources, among the promising alternatives there is the use of renewable resources from plants, lignocellulose, to biofuels production in especial second generation ethanol. To second generation ethanol production plant cell wall deconstruction is required in order to obtain fermentable sugars present on it. One of the most efficient microorganism on plant cell wall deconstruction is *Clostridium thermocellum* an anaerobic thermophilic bacterium, capable of assembling enzymatic complexes aiming plant's polysaccharides degradation. In the present study, *C.thermocellum* B8 was capable of growing in the presence of avicel and secreting pectinases, xylanases and endoglucanases. Comparatively to commercial enzymes, proteins produced by *C.thermocellum* either as enzymatic complexes or supernatant displayed higher inhibition by phenolic compounds, however, an elevated stability was observed in basic pH. Temperature effect on holocellulases showed that either commercial enzymers or those secreted by *C.thermocellum* had similar maximum activity. When enzymatic samples were applied aiming saccharification of Eucalyptus' fibers, highest efficiency of reducing sugar released was observed during saccharification using FRC sample, indicating a potential for this sample to saccharification process of dark Eucalyptus pulp and future production of second generation ethanol.

Key words: *C.thermocellum*, holocellulases, second generation ethanol, dark Eucalyptus pulp.

Sumário

Lista de Abreviações e Termos	8
Lista de Figuras	9
1.INTRODUÇÃO.....	10
2.REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO	13
2.2. ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	15
2.3. COMPOSICAO DA PAREDE CELULAR VEGETAL E SUA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA	18
2.3.1. Celulose e sua degradação biológica	19
2.3.2. Xilana e sua degradação biológica	20
2.3.3. Manana e sua degradação biológica	21
2.3.4. Pectina se sua degradação biológica.....	23
2.3.5. Lignina e sua degradação biológica.....	24
2.4 <i>Clostridium thermocellum</i>	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. OBJETIVOS GERAIS	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5. METODOLOGIA	30
6. Resultados	36
7. Discussão.....	49
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de Abreviações e Termos

Holocelulases: Conjunto de enzimas que degradam a porção de polissacarídeos da parede celular vegetal.

CBP: Bioprocesso consolidado (*Consolidated Bioprocessing*)

SHF: Hidrólise separada de fermentação (*Separated hydrolysis and fermentation*)

M: Molar

μL : Micro litro

μmol : Micro mol

UI: Unidade Internacional

$\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$: Atividade específica

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida

Lista de Figuras

Figura (1): Fator de conversão de glicose para etanol por meio de fermentação alcoólica	14
Figura (2): Estrutura do amido	14
Figura (3): Representação estrutural da parede celular vegetal e suas respectivas camadas	18
Figura (4): Esquema simplificado de degradação das fibras de celulose.....	19
Figura (6): Esquema simplificado da degradação enzimática da manana	22
Figura (7): Esquema geral dos complexos enzimáticos produzidos por <i>C.thermocellum</i>	26
Figura (8): Curva de crescimento de <i>Clostridium thermocellum</i> B8 na presença de avicel 1% (p/v)	36
Figura (9): Produção de holocelulases ao longo do tempo de crescimento de <i>C.thermocellum</i> B8.	36
Figura (10): Microscopia eletrônica de varredura de avicel não degradada e degradada por <i>C.thermocellum</i> B8.....	37
Figura (11): Análises eletroforéticas em SDS-PAGE (10%) de proteínas secretadas por <i>C.thermocellum</i> B8 durante tempo de crescimento).	38
Figura (12): Efeito da temperatura em diferentes atividades enzimáticas.	39
Figura (13): Análises eletroforética em SDS-PAGE (10%) de proteínas presentes na mistura comercial (MC). Gel de atividade (a) xilanolítica e (b) endoglicanase	39
Figura (14): Efeito do pH em diferentes atividades enzimáticas	40
Figura (15): Estabilidade em diferentes pHs	41
Figura (16): Efeito dos compostos fenólicos derivados da lignina para as diferentes amostras (a) FRC (fração rica em celulosomas); (b) sobrenadante; (c) MC (mistura comercial).....	42
Figura (17): Açúcar redutor gerado durante a sacarificação da polpa escura de Eucalipto (triângulo), e celulose (Sigmacell-100)	43
Figura (18): Cinética de liberação de açúcares redutores durante a sacarificação da polpa escura de Eucalipto (triângulo) e celulose (Sigmacell-100) (circulo) pelas diferentes amostras enzimáticas a 50 e 60°C. Barras verticais representam desvio padrão de dois experimentos.....	44
Figura (19): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto controle.	45
Figura (20): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto após 168h de sacarificação pela amostra FRC (Fração rica em celulosomas) a 50°C.	46
Figura (21): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto após 168h de sacarificação pelo sobrenadante de <i>C.thermocellum</i> a 50°C.	47
Figura (22): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto após 168h de sacarificação pela mistura comercial (MC) a 50°C.	48

1.INTRODUÇÃO

As atuais demandas por uma matriz energética com menor impacto ambiental, juntamente com a emissão de gases estufa e o aquecimento global vem fazendo com que a indústria com base em produtos de origem renovável seja cada vez mais desejável (WILLKE; VORLOP, 2004). No cenário mundial, maior parte dos combustíveis utilizados para geração de energia e transporte são de origem petrolífera, além da poluição gerada pela queima de combustíveis oriundos de tal fonte, sua limitação em termos quantitativos a distribuição em apenas alguns países fazem com que diversas nações procurem alternativas a tal produto a fim de obter maior autonomia energética (GNANSOUNOU, 2008).

A queima de combustíveis fósseis é amplamente debatida e questionada, pois é de conhecimento geral que gases do efeito estufa são gerados em sua maior parte pela combustão de produtos de origem do petróleo, tendo a emissão de gases estufa dando um grande salto na época da revolução industrial, período no qual máquinas térmicas começaram a ser amplamente aplicadas (BOSE, 2010).

No cenário global o Brasil tornou-se referência com a produção de etanol proveniente do caldo da cana, sendo essa uma resposta às crises do petróleo que geraram uma desestabilização no mercado de produtos derivados do petróleo, reduzindo assim a dependência brasileira da importação de combustíveis (HIRA; DE OLIVEIRA, 2009). Além do Brasil, países como EUA e China e também parte da Europa apresentam uma produção considerável de etanol proveniente de *commodities* como o milho (MCALOON et al., 2000) sorgo (REDDY; RAMESH; REDDY, 2005) e beterraba (IÇÖZ et al., 2009), entretanto a utilização de produtos que sejam base na alimentação vem recebendo críticas devido a utilização de tais *commodities* para finalidades não alimentícias, podendo assim produtores negociar sua produção com setores que apresentam maior rentabilidade (ZHANG et al., 2010).

Historicamente, a produção brasileira de etanol provindo do caldo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) teve início nos anos 50 com o programa Pro-álcool. Primeiramente o programa não apenas visou a produção em larga escala mas também a criação de pequenas destilarias para produção de combustível a nível local, sendo essa uma ferramenta para desenvolvimento econômico regional (SHIKIDA et al., 2009). A produção de etanol proveniente de outras fontes além da cana de açúcar mostrou-se ineficiente, não apenas por questões técnicas, mas também por motivos de produtividade

visto que a cana de açúcar originária da Índia apresentou rápida adaptabilidade as condições climáticas brasileiras.

Apesar do apelo de ser um combustível dito como “verde”, a indústria do etanol proveniente da cana de açúcar é responsável pela geração de resíduos lignocelulósicos sendo esses parcialmente utilizados para geração de energia térmica na própria cadeia produtiva do etanol, o restante acaba se tornando um poluente ambiental visto que não há um tratamento para tais resíduos (DANTAS; LEGEY; MAZZONE, 2013). Juntamente com indústria do etanol de primeira geração, outros setores da economia também geram uma enorme quantidade de materiais lignocelulósicos que ou não são aproveitados ou apresentam um baixo valor econômico.

Dentre as alternativas propostas para a utilização de materiais lignocelulósicos oriundos da produção agrícola ou industrial temos a aplicação de tais materiais para produção de energia térmica e consecutiva geração de energia elétrica. Essa alternativa é viável para geração de energia elétrica, sendo já aplicada em alguns setores industriais, entretanto essa fonte energética não é compatível com o sistema de combustível utilizado por veículos automotores.

Alternativamente ao processo de combustão de materiais lignocelulósicos existe a opção de aproveitamento de tal biomassa para a produção de etanol, sendo esse conhecido como etanol de segunda geração ou etanol celulósico. Para produção dessa classe de etanol alguns passos adicionais são requeridos, dentre eles: processamento da biomassa, pré-tratamento, hidrólise (química ou enzimática), fermentação e finalmente destilação.

Com a crescente demanda por enzimas que possam degradar os componentes da parede celular vegetal e assim possibilitar a produção do etanol de segunda geração, um grande número de microrganismos está sendo estudado como fontes de tais proteínas. Atualmente o foco na produção de enzimas degradadoras de parede celular vegetal encontra-se voltado para fungos filamentosos, entretanto com a necessidade de enzimas que atuem em condições mais extremas fez com que proteínas sintetizadas por bactérias sejam uma alternativa atrativa (GILBERT; HAZLEWOOD, 1993; ZAMOST; NIELSEN; STARNES, 1991). Dentre as espécies de fungos filamentosos pesquisados para produção de enzimas capazes de desconstruir componentes da parede celular vegetal, temos espécies do gênero *Trichoderma* como modelo, tendo sua habilidade de degradar materiais celulósicos reportada nos anos 50, seu genoma já foi sequenciado, e atualmente é uma importante ferramenta para busca de novas enzimas (MARTINEZ et al., 2008).

Dentre os maiores desafios para a produção do etanol de segunda geração pode-se citar o desenvolvimento de misturas enzimáticas capazes de desconstruir componentes da parede celular vegetal a sua estrutura monomérica, assim como microrganismos capazes de fermentar tanto açúcares de seis quanto os de cinco carbonos, tendo assim um maior aproveitamento dos materiais lignocelulósicos.

O aproveitamento de materiais lignocelulósicos de origem agroindustrial tem como premissa não apenas solucionar uma problemática ambiental, mas também agregar valor as cadeias produtivas, estando essa prática dentro do conceito de biorefinaria. O termo biorefinaria é um conceito análogo a uma refinaria petrolífera, com um único produto é possível extrair diversos outros compostos de interesse econômico, sendo a biomassa um produto que pode ser refinado a diversos produtos: enzimas, biocombustíveis, produtos químicos de valor agregado, biopolímeros entre outros (CHERUBINI, 2010).

Tendo como base o conceito de biorefinaria, é clara a necessidade de uma análise de uma maior diversidade de biomassas disponíveis na produção agroindustrial brasileira para assim uma maior otimização de seus usos e aplicações para uma nova e emergente indústria baseada em produtos naturais e renováveis (termo adaptado do inglês *biobased products*) (CAROLE; PELLEGRINO; PASTER, 2004).

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO

Com a crescente demanda por combustíveis, principalmente após as crises do petróleo, o etanol proveniente de fontes renováveis foi amplamente estudado e aplicado como uma alternativa para a produção de combustível (BAYER; LAMED; HIMMEL, 2007; WYMAN, 2007). A base do etanol de primeira geração consiste na fermentação de açúcares por leveduras e assim obtenção de etanol. Tais açúcares são provenientes de diversas fontes vegetais como o caldo da cana de açúcar, beterraba e fontes ricas em amido.

A produção brasileira do etanol de primeira geração ocorre majoritariamente por meio da fermentação da sacarose (frutose- $\alpha(1,2)\beta$ -glicose) proveniente do caldo de cana de açúcar e consecutiva fermentação por linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. O processo de fermentação do caldo da cana ocorre de forma contínua; além da fácil obtenção de açúcares, a sacarose presente em tal fonte é imediatamente metabolizada pela levedura, sem que tenha a necessidade da realização de processos de hidrólise química.

Para que ocorra a metabolização e assimilação da sacarose e assim utilização dos açúcares monoméricos que compõem a sacarose, D-Frutose e D-Glicose, leveduras são capazes de por meio da ação da enzima invertase (EC 3.2.126) hidrolisar o dissacarídeo e então direcionar tanto D-Frutose quanto D-Glicose para via glicolítica, e assim por meio da fermentação anaeróbica gerar Lactato, acetato e etanol.

A seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para realizar fermentação alcoólica e assim obtenção do etanol ocorre por sua maior tolerância a seus produtos finais da fermentação, rápido metabolismo e sua classificação como microrganismo seguro à saúde humana. Tipicamente a fermentação ocorre por meio de batelada contínua com teor de sacarose próximo de 20% (p/v) com rendimento próximo a 10% (p/v), sendo o rendimento máximo teórico de 51% explicado pelo seguinte balanço estequiométrico presente na figura 1.

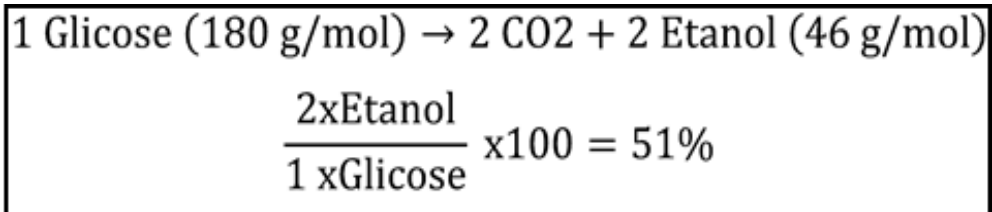
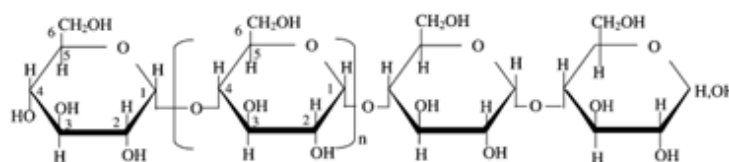
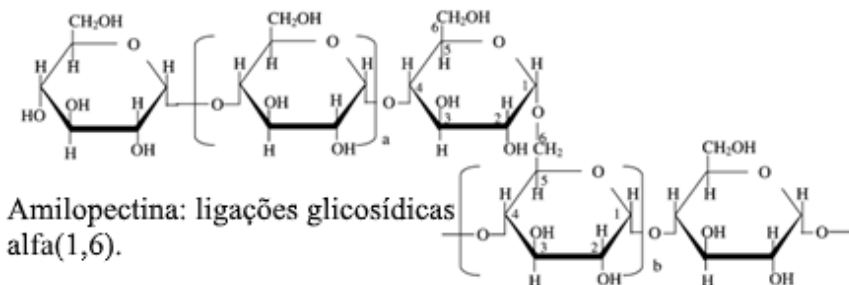


Figura (1): Fator de conversão de glicose para etanol por meio de fermentação alcoólica

Apesar da facilidade na obtenção de açúcares fermentescíveis a partir do caldo da cana de açúcar, existem outras alternativas a seu uso. Atualmente a produção do etanol de primeira geração nos EUA ocorre por meio do hidrólise de materiais ricos em amido, um homopolissacarídeo composto por glicose- $\alpha(1,4)$ -glicose (amilose) e glicose- $\alpha(1,6)$ -glicose (amilopectina), tendo como produto de sua degradação D-glicose. Assim como ocorre na indústria do etanol de primeira geração no Brasil, a produção estadunidense utiliza linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para realizar a fermentação.



Amylose: ligações glicosídicas alfa(1,4).



Amylopectina: ligações glicosídicas alfa(1,6).

Figura (2): Estrutura do amido. Imagem adaptada de (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Contrariamente ao apelo ecológico que a produção de etanol proveniente de fontes renováveis como o milho, batata, e beterraba, adquiriram ao longo dos anos, a utilização de fontes alimentícias para produção de combustíveis vem sendo criticada (ZHANG et al., 2010). Apesar da cana de açúcar não ser base primária alimentar, serve de insumo para indústria, algumas vertentes apontam que a expansão do mercado da cana de açúcar pode incentivar a ampliação da fronteira agrícola para áreas que ainda não foram desmatadas (APPLICATIONS, 2016)

O mercado do etanol de primeira geração, apesar de receber muitas críticas a respeito de sua classificação como combustível verde (GUNKEL et al., 2007;

HALL et al., 2009), desempenha importante papel na indústria brasileira, entretanto, recentes variações no mercado estão fazendo com que o preço do etanol fornecido ao consumidor não ser mais competitivo em relação a combustíveis de origem fóssil.

2.2. ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Almejando obter-se uma maior produtividade de etanol, algumas fontes alternativas começaram a ser desenvolvidas e então aplicadas. Dentre as alternativas propostas a com maior aplicabilidade e apelo ambiental é a do etanol de segunda geração, tendo como princípio a utilização de polissacarídeos presentes em materiais de origem vegetal que apresentem baixo valor comercial ou que são tratados como rejeitos agroindustriais como fonte de açúcares fermentescíveis (BAYER; LAMED; HIMMEL, 2007).

Atualmente, fontes lignocelulósicas provenientes do etanol de primeira geração, resíduos da produção sucroalcooleira, são os mais bem vistos para produção do etanol de segunda geração, tendo como apelo o reaproveitamento de materiais que comumente são descartados no ambiente sem nenhum tipo de aproveitamento econômico. Contudo, para uma eficiente produção do etanol de segunda geração alguns passos são requeridos para que os açúcares fermentescíveis possam ser obtidos, sendo os principais são: processamento da biomassa, pré-tratamento, hidrólise e fermentação.

Para que a biomassa lignocelulósica seja aplicada a indústria do etanol de segunda geração, suas propriedades químicas e físicas devem ser atrativas para tal processo. Em termos gerais espera-se que a biomassa apresente um maior conteúdo sacarídico e baixa presença de compostos de maior recalcitrância como a lignina (GRABBER, 2005). Dentre as propriedades físicas sua facilidade de processamento e de redução do tamanho das partículas são muito importante, visto que o tamanho das partículas utilizadas no processo irá contribuir para a maior acessibilidade as fibras do material lignocelulósico durante o processo industrial. Com base nas características desejáveis, um novo conceito de plantas de interesse econômico foi desenvolvido *dedicated energy crop*, abrangendo cultivares com menor teor de lignina e maior fração de polissacarídeos, tendo em sua composição um maior conteúdo de celulose. Essas culturas também apresentam uma fácil colheita e processamento, dentro as espécies mais exploradas para essa finalidade temos Switchgrass (SCHMER et al., 2008) e Miscanthus (YAN et al., 2012), sendo que atualmente não existe relato do desenvolvimento e pesquisa dessa classe de cultivar no Brasil.

A hidrólise enzimática do material de origem vegetal a hidrólise por meio de enzimas é a mais cotada e aplicada atualmente, tal fato ocorre por sua maior especificidade aos componentes da parede celular vegetal assim como menor geração de compostos poluentes, quando comparada a hidrólise por ácidos (ALCALDE et al., 2006). Além da maior especificidade, menor geração de poluentes, a catálise enzimática ocorre em reações mais brandas, oferecendo menor risco aos trabalhadores envolvidos no processo.

Mesmo com o apelo ambiental que o etanol de segunda geração oferece, alguns processos químicos são requeridos para que a biomassa seja completamente acessível para catálise enzimática. Além do processo de redução das partículas por meios físicos, há a necessidade de facilitar o acesso das enzimas aos componentes estruturais da parede celular vegetal por meio do pré-tratamento. Dentre os processos químicos mais aplicados existem os tratamentos com bases (hidróxidos) (JACKSON, 1977), percolação de amônia (YOON; WU; LEE, 1995), explosão de fibras por amônia (*AFEX*) (TAHERZADEH; KARIMI, 2008), ácidos fracos (SAHA et al., 2005), e peróxidos (*Fenton chemistry*) (CHAMARRO; MARCO; ESPLUGAS, 2001).

Seguindo a linha da hidrólise realizada por agentes biológicos, existem linhas de pesquisas que procuram desenvolver métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica por meio da ação de microrganismos. Fungos filamentosos como *Phanaerochatae cryosporum* já foram testados como possíveis candidatos para degradar a lignina presente em tal material e assim reduzir sua recalcitrância (KELLER; HAMILTON; NGUYEN, 2003), entretanto simultaneamente a degradação da lignina, microrganismo também conseguem consumir uma porção valiosa dos carboidratos presentes na parede celular vegetal. Alternativamente ao uso direto de microrganismos para redução da recalcitrância de materiais de origem vegetal, alguns processos envolvendo a aplicação direta de enzimas já foram abordados, entretanto essa estratégia ainda é pouco reportada na literatura.

Um dos principais problemas na utilização da fração rica em polissacarídeos da parede celular vegetal é sua composição heterogênea, desta forma, para realizar a hidrólise da parede celular vegetal, não apenas uma classe de enzima deve ser aplicada, mas sim um conjunto que possa atuar de forma sinérgica e assim degradar a fração rica em polissacarídeos da parede celular vegetal. O sistema atual de produção do etanol de primeira geração é baseado na fermentação de açúcares com seis carbonos, tendo assim a necessidade de encontrar novos microrganismos que possam fermentar tanto açúcares

de seis carbonos quanto os de cinco presentes na parede celular vegetal. Recentes pesquisas mostram que por meio de técnicas de engenharia genética é possível desenvolver linhagens de *S.cerevisae* capazes de fermentar açúcares de cinco carbonos, porém essas linhagens ainda não foram aplicadas em processos industriais (KÖTTER; CIRIACY, 1993).

Para produção do etanol de segunda geração existem três estratégias que estão sendo estudadas, SSH (Sacarificação Simultânea à Fermentação em tradução livre de *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), SHF (Hidrólise Separada da Fermentação em tradução livre de *Separated Hydrolyses and Fermentation*) e Bioprocesso consolidado (*Consolidated bioprocessing*):

SSF: Consiste em realização da desconstrução do material lignocelulósico a sua unidade monomérica e assim ao mesmo tempo realizar a fermentação alcoólica. A realização dos dois processos ao mesmo tempo reduz a quantidade de etapas para obtenção do etanol, entretanto atualmente não se tem misturas enzimáticas capazes de eficientemente degradar material lignocelulósico na mesma temperatura requerida para de fermentação por leveduras. A utilização de misturas enzimáticas em temperaturas abaixo de seu ponto ótimo faz com que a geração de açúcares fermentescíveis seja abaixo do ideal, fazendo com que a fermentação atinja menor rendimento (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

SHF: Tem como base a hidrólise realizada por uma mistura enzimática seguida por ua fermentação alcoólica. Atualmente este é o modelo mais promissor visto que a separação em duas etapas possibilita que enzimas possam atuar de forma otimizada assim gerando uma maior quantidade de unidades monoméricas e os microrganismos podem realizar o processo fermentativo em sua temperatura ótima (ALFANI et al., 2000; WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003)

Bioprocesso consolidado: Nesse processo um microrganismo é capaz de realizar todas as etapas, secretar enzimas com atividade contra polissacarídeos da parede celular vegetal, metabolizar açúcares redutores e então produzir etanol. Com a tecnologia atual esse processo ainda não é viável, visto que ainda não foi descoberto ou desenvolvido um organismo que seja capaz de realizar todas essas etapas e ter uma produtividade a nível comercial (LYND et al., 2005).

2.3. COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL E SUA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

A parede celular é composta por uma complexa sobreposição de camadas e apresenta uma natureza recalcitrante, sendo formada não apenas por polissacarídeos, mas também por unidades fenólicas unidas por ligações covalentes, formando assim a lignina. Além de tais estruturas, pequena quantidade de outros compostos como, proteínas, também são encontrados; entretanto, a fração composta por polissacarídeos chama maior atenção por sua natureza diversificada, sendo essa formada por vários açúcares monoméricos distintos (HEREDIA; JIMÉNEZ; GUILLÉN, 1995).

Tendo como base a composição diversificada de polissacarídeos que a parede celular vegetal apresenta, para sua completa desconstrução a unidades monoméricas é preciso um grupo diversificado de enzimas.

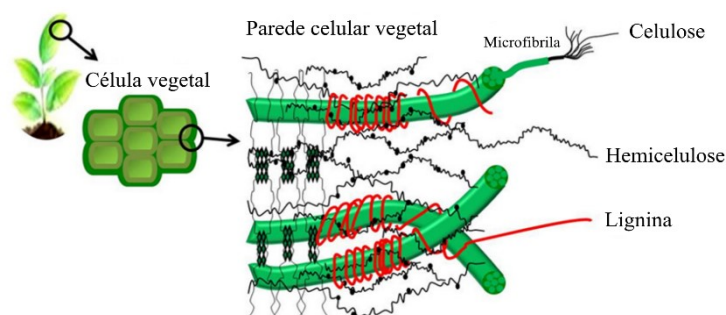


Figura (3): Representação estrutural da parede celular vegetal e suas respectivas camadas. Imagem modificada de (WAEONUKUL, 2013)

Em conjunto com a variedade de açúcares presentes na composição da parede celular vegetal e seu arranjo espacial, a forma com que as fibras de celulose são dispostas fazem com que sua acessibilidade seja difícil. Apesar das fibras de celulose serem lineares, existe uma camada de polissacarídeos diversos que a recobrem formando uma capa protetora, sendo essa comumente chamada de hemicelulose ou poliose (SAHA, 2003). Além de recobrir as fibras de celulose, a hemicelulose também é capaz de covalentemente ligar-se à lignina, sendo essa composição uma barreira para a catálise enzimática dos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal.

2.3.1. Celulose e sua degradação biológica

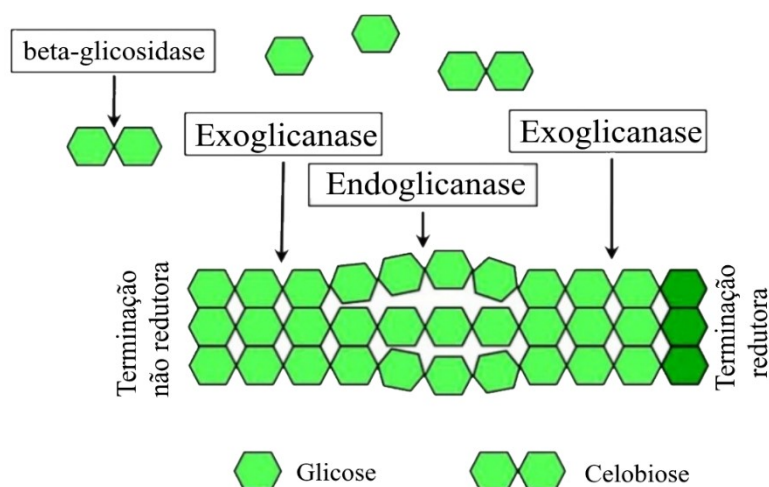


Figura (4): Esquema simplificado de degradação das fibras de celulose. Imagem modificada de (WAEONUKUL, 2013)

Celulose é o biopolímero mais abundante na superfície terrestre e apesar de ser um homopolissacarídeo composto por unidades de D-Glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1,4)$ apresenta uma estrutura tridimensional complexa. Por ser formada por cadeias lineares de subunidades de glicose, as microfibrilas de celulose não apresentam cadeias laterais, entretanto a junção desses filamentos lineares ocorre por meio de interações do tipo ponte de hidrogênio entre as hidroxilas presentes nas unidades de D-Glicose (HEREDIA; JIMÉNEZ; GUILLÉNN, 1995).

A presença de regiões com interações entre hidroxilas faz com que a celulose apresente uma conformação cristalina, sendo de menor acessibilidade a outras moléculas (maior recalcitrância); de forma contrária, regiões em que tais interações são menos presentes apresentam uma conformação amorfa e a acessibilidade às porções internas da celulose é maior, oferecendo assim maior facilidade para a degradação enzimática (LÜ et al., 2012).

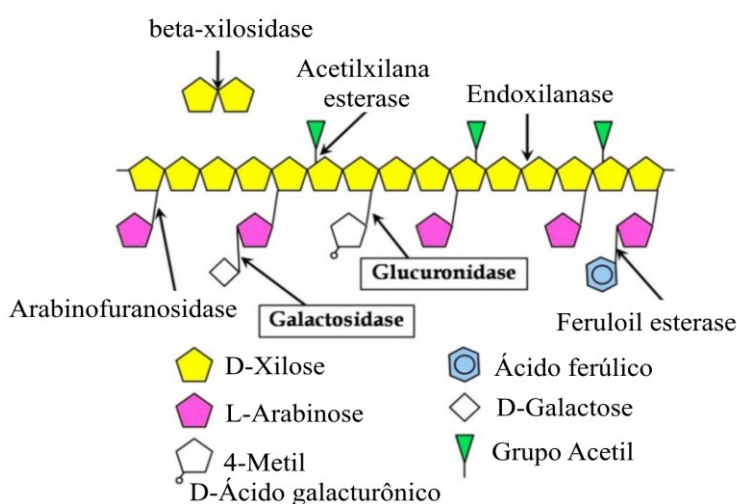
A degradação enzimática da celulose ocorre por meio da ação sinérgica de três grupos de enzimas Endoglicanases (EC: 3.3.1.4), Exoglicanases (EC 3.2.1.91) (também conhecidas como celobiohidrolases), e β -Glicosidases (EC 3.2.1.21). Endoglicanases são responsáveis por de forma aleatória, clivarem regiões internas da celulose que apresentem uma conformação amorfa, sendo assim liberadas pequenas dextrinas. Exoglicanases atuam na parte com conformação cristalina, podendo essas serem classificadas como tipo I e tipo II, atuando respectivamente nas extremidades redutoras e não redutoras. O

principal produto da quebra da região cristalina da celulose pelas Exoglicanases é a celobiose, (D-glicose- β (1,4)-D-glicose), dímero que é então hidrolisado pela ação das β -Glicosidasases, enzima responsável por quebrar pequenas dextrinas, liberando assim D-glicose (BAYER et al., 1998; GILBERT; HAZLEWOOD, 1993).

Em adição ao sistema sinérgico que ocorre na degradação da celulose, atualmente tem-se conhecimento que para que a degradação de tal biopolímero ocorra de forma mais eficiente é necessária a ação de um grupo mais diverso de proteínas que não necessariamente apresentam atividade catalítica. Nesse contexto, fungos filamentosos, como *Trichoderma reesei*, apresentam proteínas que se assemelham às expansinas presentes em plantas, sendo essas conhecidas como *swellings*, e sua função é realizar o relaxamento de fibras de celulose e assim facilitar a acessibilidade de enzimas ao substrato (LIU; MA; ZHANG, 2015).

Apesar do modelo bem consolidado da degradação sinérgica da celulose, recentemente foi descoberto um outro grupo de enzimas a que não utilizam a hidrólise para realizar a degradação da celulose, mas sim a oxidação (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012; LEGGIO; WELNER; DE MARIA, 2012). A descoberta de oxidases que trabalham na degradação da celulose fez com que uma intensa busca por essas enzimas seja realizada, sendo assim um grande avanço para o desenvolvimento de misturas enzimáticas capazes de eficientemente degradar a celulose.

2.3.2. Xilana e sua degradação biológica



Figura(5): Esquema simplificado da degradação da xilana. Imagem modificada de (WAEONUKUL, 2013).

Os polissacarídeos comumente chamado de xilana recebem essa nomenclatura devido ao nome do principal açúcar que está presente em sua constituição, monômeros de D-xilose. Analogamente à celulose, os polímeros de xilana, assim como toda

hemicelulose não apresenta estrutura cristalina, sendo assim formada apenas por uma conformação amorfa, tendo essa não apenas o esqueleto principal e linear, mas também cadeias laterais que contribuem para esse caráter amorfo (BASTAWDE, 1960; EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000).

O esqueleto principal da xilana é composto por unidades repetidas de D-xilose unidas entre si por meio de ligações glicosídicas do tipo $\beta(1,4)$; já suas cadeias laterais, também conhecidas como ramificações são composta por D-ácido galactouronico, D-arabinose e substituições por grupo acetil em monômeros de D-xilose presentes no esqueleto principal.

A degradação da xilana apresenta similaridades com a degradação de celulose, sendo o seu esqueleto principal clivado por β -xilanas (EC 3.2.1.8), enzimas responsáveis por hidrolisar ligações glicosídicas presentes no esqueleto principal de forma aleatória, liberando assim pequenos açúcares redutores. A degradação do esqueleto principal a sua unidade monomérica ocorre por meio da ação da enzima β -xilosidase (EC 3.2.1.17), enzima capaz de hidrolisar ligações glicosídicas presentes nos pequenos açúcares liberados pela ação da β -xilanas (BEG et al., 2001; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

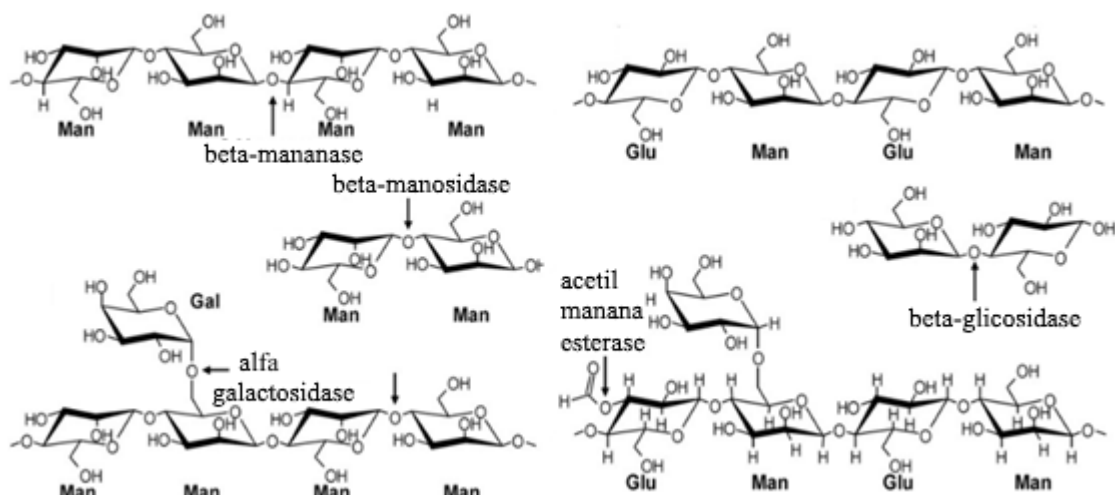
Para que β -xilanas e β -xilosidases tenham pleno acesso a estrutura da xilana as ramificações devem ser removidas de forma que a degradação seja maximizada. A remoção das ramificações ocorre por meio da ação das enzimas: α -glucuronosidases (EC 3.2.1.139), responsáveis pela remoção dos grupos de D-ácido glucorônico; α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), responsável pela remoção da arabinose; acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), responsável pela remoção de grupos acetil presentes no esqueleto principal da xilana.

Apesar da grande diversidade de microrganismo capazes de degradar a hemicelulose composta de xilana de forma eficiente, ainda existe uma procura por bom produtores de xilanas; tal fato ocorre pela versatilidade nas aplicações a qual esse grupo de enzima pode ter: aplicações na indústria alimentar, na formulação de ração animal, no branqueamento de polpa celulósica, e na indústria do etanol de segunda geração (BEG et al., 2001).

2.3.3. Manana e sua degradação biológica

A maior parte dos grupos vegetais apresenta a xilana como componente da hemicelulose, entretanto a manana é o componente principal da hemicelulose de

gimnospermas e polissacarídeo de reserva presente em algumas sementes (MOREIRA; FILHO, 2008). Sua constituição é similar à de xilana, entretanto a unidade monomérica que constitui o esqueleto principal são unidades de D-manose covalentemente unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1,4)$. O caráter amorfo da manana, assim como ocorre na xilana, é devido à presença de cadeias laterais, podendo essas ser constituídas por unidades de D-Galactose- $\alpha(1,6)$ -D-Manose ou substituições contendo grupos acetil nos unidades monoméricas de D-manose presentes no esqueleto principal.



Figura(6): Esquema simplificado da degradação enzimática da manana. Figura modificada de (VAN ZYL et al., 2010)

Além das ramificações presentes na hemicelulose constituída por manana, existe uma outra classificação referente àquelas que contêm monômeros de D-glicose em seu esqueleto principal, sendo essas unidades intercaladas com unidades de D-Glicose e assim classificando esse polímero de manana como glucomana, quando este polímero apresenta resíduos de galactose é classificado como galactoglucomanana (MOREIRA; FILHO, 2008).

Para que ocorra a degradação da manana até sua unidade monomérica de D-manose, um grupo de enzimas é necessário para não apenas degradar a cadeia principal, mas também remover as ramificações e liberar acesso as demais enzimas. β -Mananases (EC 3.2.1.78) são responsáveis por realizar o rompimento de ligações glicosídicas presentes no esqueleto principal da manana entre resíduos de D-manose, β -Manosidases (EC 3.2.1.25), de forma análogas as β -Xilosidases, atuam em resíduos menores de sacarídeos liberando D-manose. Cadeias laterais contendo arabinose são hidrolisadas pela ação da enzima α -Galactosidase (EC 3.2.1.26) e as substituições contendo grupos acetil

são rompidas pela ação das Acetil manana esterase tendo o seu mecanismo similar ao da Acetil xilana esterase.

Complementarmente a ação de enzimas que degradam a manana e suas ramificações, dímeros entre D-glicose e D-manose presentes na glucomanana são hidrolisados por meio da ação de β -Glicosidases, tendo assim essa enzima papel na degradação da celulose e da manana (VAN ZYL et al., 2010). Dentre as aplicações de enzimas degradadoras de manana encontram-se a produção do etanol de segunda geração e o branqueamento de polpa de celulose proveniente de gimnospermas (CHAUHAN et al., 2012).

2.3.4. Pectina se sua degradação biológica

Dentre os compostos que constituem a parede celular vegetal a pectina é o único que situa-se entre as células, biologicamente tendo a função de fornecer mobilidade às células por meio da formação de um material gelatinoso que encontra-se na lamela média nas adjacências de células vegetais (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). A pectina encontra-se em maior quantidade em tecidos frescos como frutas, inflorescências e folhas, e além de fornecer mobilidade às células serve como agente umectante, evitando a perda de líquidos.

Estruturalmente a pectina tem seu esqueleto principal formada por unidades repetitivas D-ácido galacturônico unida por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1,4)$, sendo essa classificada como homogalactana e correspondendo à maior fração da pectina. Apesar da simples composição que a pectina homogalactana apresenta, existem algumas regiões na estrutura da pectina nomeadas como Ramnogalactana I e II. A Ramnogalactana I apresenta em sua composição monômero de Ramnose entre as subunidades de Ácido galacturônico e essas covalentemente apresentam ramificações sendo compostas por Galactose, Manose, ou uma combinação entre os dois. Ramnogalactana II apresenta uma estrutura muito mais diversificada que a tipo I, entretanto em sua cadeia principal não está presente os monômeros de Ramnose, sendo o seu esqueleto principal igual ao da homogalactana. As cadeias laterais presentes na Ramnogalactana II são compostas por uma grande diversidade de açúcares, dentre eles, Ramnose, Galactose e Xilose. Juntamente com as ramificações, a homogalactana pode conter substituições em suas unidade monoméricas de D-ácido galacturônico contendo grupos acetil, e metil, analogamente ao que ocorre na hemicelulose composta por xilana e manana (HEREDIA; JIMÉNEZ; GUILLÉN, 1995; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Em função da complexidade que a pectina apresenta, para haver sua completa degradação um grupo de enzimas deve atuar em suas ramificações e substituições para que o esqueleto principal formado pela homogalactana seja assim exposta e degradada. Dentre as enzimas responsáveis por remover substituições na homogalactana existe a Pectina metil esterase (EC 3.1.1.11). A homogalactana sofre degradação por dois tipos de mecanismos de catálise: hidrólise e trans-eliminação. As Poligalacturonases atuam na degradação da homogalactana pelo mecanismo de hidrólise, podendo essas serem classificadas como Endopolygalacturonase (EC 3.2.1.15) atuando de forma aleatória no esqueleto principal, ou as Exopoligalacturonases (EC 3.2.1.67) que realizam a degradação pelas terminações e assim liberando unidade monoméricas de ácido galacturônico. Alternativamente as hidrolases existem as enzimas capazes de degradar a homogalactana utilizando trans-eliminação, sendo essas as Endopoligalacturonases liase (EC 4.2.2.2) Exopoligalacturonases liase (EC 4.2.2.9) (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP et al., 2001).

2.3.5. Lignina e sua degradação biológica

Dentre os componentes presentes na parede celular vegetal, a lignina é o que apresenta maior recalcitrância à degradação biológica por microrganismos. Sua composição é variada e complexa sendo constituída de unidades fenólicas covalentemente unidas formando assim um grande polímero amorfo que é interligado à hemicelulose. Dentre as subunidades fenólicas encontradas na lignina as principais são: ácido p-cumárico, coniferil, e sinapil (GRABBER, 2005).

Em comparação aos demais componentes da parede celular vegetal, a lignina é o que apresenta um menor número de classes de enzimas capazes de realizar sua degradação, sendo essas Polifenoloxidasas, Lacases (EC 1.10.3.2) e Manganês oxidases. Dentre os microrganismos capazes de degradar lignina fungos filamentosos classificados como de “podridão branca” são os mais especializados na secreção de ligninases (ROUCHES et al., 2016), entretanto já existe relato de organismos anaeróbicos capazes de degradar compostos fenólicos como a lignina (ZIMMERMANN, 1990). Assim como os demais grupos de enzimas que degradam a parede celular vegetal Ligninases apresentam muitas aplicações industriais, dentre elas, obtenção de etanol de segunda geração, eliminação de compostos poluentes, e branqueamento de polpa celulósica (VALLS; RONCERO, 2009; VIIKARI L, TENAKANEN M, 2001).

2.4 *Clostridium thermocellum*

Devido à complexidade e recalcitrância que a biomassa lignocelulósica apresenta, microrganismos necessitam secretar um vasto grupo de enzimas para que consigam degradar eficientemente os componentes da parede celular vegetal e assim ter acesso a carboidratos que serão metabolicamente oxidados para obtenção de energia. Tipicamente, fungos filamentosos são a classe de microrganismos mais exploradas para desconstrução de materiais de origem vegetal devido à sua eficiência em secretar holocelulases. Entretanto algumas bactérias conseguem secretar um vasto grupo de enzimas e, assim como fungos filamentosos, realizar a degradação de polissacarídeos presentes em materiais lignocelulósicos.

Dentre os microrganismos mais eficientes na degradação de biomassa lignocelulósica tem se *Clostridium thermocellum*, uma bactéria anaeróbica restrita, termofílica, gram positiva, formadora de esporos (FREIER; MOTHERSHED; WIEGEL, 1988). Naturalmente, *C.thermocellum* é encontrado em ambientes mesófilos como solo, trato digestivo de animais (HAMANN et al., 2015), fezes (VIEIRA et al., 2007) e materiais em decomposição (FREIER; MOTHERSHED; WIEGEL, 1988). O seu papel em tais microbiomas ainda não é completamente entendido, visto que em temperaturas ambiente suas atividades metabólicas ocorrem em níveis basais

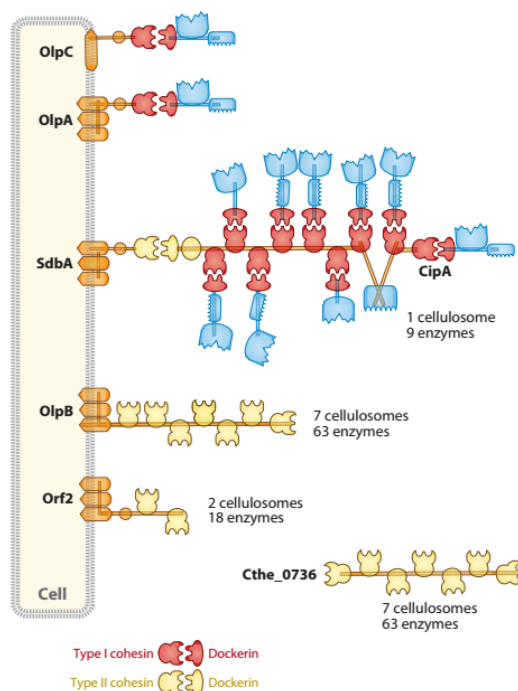
Sua capacidade em degradar materiais celulósicos como avicel (celulose microcristalina) ocorre de forma eficiente, sendo um dos microrganismos com maior taxa de degradação desse tipo de biopolímero. Muito de sua capacidade em desconstruir matéria dessa natureza dá-se por secretar enzimas com ação hidrolítica não apenas com atividade contra a parte amorfa da celulose mas também contra a fração cristalina. Além da atividade contra a fração mais recalcitrante da celulose, *C.thermocellum* tem a capacidade de agrupar um conjunto de enzimas capazes de hidrolisar polissacarídeos da parede celular vegetal em um complexo enzimático chamado de celulosoma.

O celulosoma sintetizado por *C.thermocellum* foi o primeiro complexo enzimático descoberto, sendo esse dotado de uma proteína estrutural *CipA* que reúne nove enzimas; este agrupamento de enzimas ocorre por interações não covalentes entre domínios *dockerin I* presentes nas enzimas e domínios *cohesin I* presentes na proteína estrutural. A *CipA* além de apresentar os domínios de ligação para enzimas, contém um domínio de ligação a carboidrato (*CBM: Carbohydrate binding module*), estrutura dotada de capacidade de aderir complexos enzimáticos ao carboidrato sendo degradado, e um

domínio dockerin II, responsável por aderir o complexo enzimático a proteínas de membrana na célula bacteriana.

As proteínas de ancoragem localizadas na membrana externa da bactéria podem apresentar diferentes conformações; o modelo mais simples contém um domínio *cohesin II*, permitindo o acoplamento de apenas uma proteína estrutural *CipA* sendo eles *OlpA*, *OlpC*, e *SdbA*. Modelos mais complexos de celulosomas podem conter proteínas estruturais com mais de um domínio *cohesin II*; *Orf2* é dotada de dois domínios *cohesin II*, enquanto *OlpB* apresenta sete domínios resultando em complexos com 18 e 63 enzimas, respectivamente (FONTES; GILBERT, 2010).

Além das proteínas encontradas na membrana celular, existe a possibilidade da produção de polixelulosomas em sua forma livre por meio da proteína *Cthe_0736*, uma proteína estrutural que contém apenas sete domínios *cohesin II* e permite a formação de um mega complexo com 63 enzimas sem a necessidade de estar aderido a membrana celular.



Figura(7): Esquema geral dos complexos enzimáticos produzidos por *C.thermocellum*. Figura obtida de (FONTES; GILBERT, 2010)

Dentre as atividades contra parede celular vegetal produzidas por *C.thermocellum* há xilanases, pectinases, endoglicanases, celobiohidrolases, e mananases, sendo parte dessas atividades reunidas na forma de complexos enzimáticos formando assim uma maquinaria desenvolvida para desconstruir materiais lignocelulósicos. Além dos complexos enzimáticos sintetizados por *C.thermocellum*, foram descobertos novos

microrganismos capazes de agrupar enzimas de forma semelhante, entretanto o complexo enzimático produzido por *C.thermocellum* continua sendo o modelo (FELIX; LJUNGDAHL, 1993).

Justamente por sua incrível capacidade de degradar materiais celulósicos, *C.thermocellum* é capaz de metabolizar hexoses e gerar produtos de valor comercial como etanol, acetato, lactato, hidrogênio e malato. Apesar da quantidade produzida ainda não ser viável para aplicações industriais, a facilidade em degradar biomassa e a capacidade em metabolizar o produto de hidrólise em etanol faz com que *C.thermocellum* seja um dos candidatos mais cotados para a realização de bioprocessos consolidados (BAYER; LAMED; HIMMEL, 2007; NG; BEN-BASSAT; ZEIKUS, 1981).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Com a atual demanda por biocombustíveis e por novos processos catalíticos com menor impacto ambiental, existe uma maior procura por desenvolvimento de processos industriais utilizando uma catálise enzimática. Um dos grandes mercados para aplicação de enzimas industriais é a indústria do etanol de segunda geração e tendo em vista esse emergente mercado, este trabalho tem como objetivo geral desenvolver e avaliar diferentes misturas enzimáticas baseadas em enzimas sintetizadas por *Clostridium thermocellum* isolado B8 em comparação com um modelo já estabelecido de enzimas comerciais, assim como verificar a viabilidade de materiais lignocelulósicos de origem florestal para hidrólise enzimática.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Quantificar atividades enzimáticas produzidas por *C.thermocellum* B8 tanto na forma de complexos aderidos a materiais celulósicos quanto secretadas no sobrenadante.
- ❖ Avaliar e comparar parâmetros cinéticos de enzimas sintetizadas e secretadas por *Clostridium thermocellum* B8 e misturas enzimáticas comerciais.
- ❖ Realizar hidrólise da polpa escura de Eucalipto.
- ❖ Analisar por Microscopia Eletrônica de Varredura a degradação da polpa escura de Eucalipto.

4.JUSTIFICATIVA

Dentre os materiais lignocelulósicos produzidos pela agroindústria brasileira, encontram-se aqueles produtos de origem florestal, sendo a exploração dessa classe de biomassa muito importante para o desenvolvimento de uma indústria baseada em produtos renováveis. Atualmente o Brasil conta com florestas comerciais principalmente de Eucalipto e Pinus, e tais culturas representam importante fonte de renda.

Apesar dos múltiplos usos que a biomassa de origem florestal apresenta, atualmente o foco para a produção do etanol de segunda geração encontra-se em gramíneas, em especial resíduos da produção sucroalcooleira, havendo poucos relatos na literatura referentes a demais setores como os rejeitos da produção de algodão (DUARTE et al., 2012) e resíduos da indústria alimentícia (DE SIQUEIRA et al., 2010). Tendo em vista a crescente demanda por materiais para a indústria do etanol de segunda geração existe uma necessidade de avaliar e prospectar novas fontes de carbono para tal finalidade, sendo as fontes renováveis de origem florestal pouco estudadas.

Juntamente com a busca de novas fontes renováveis para aplicação na indústria do etanol de segunda geração, existe a necessidade do desenvolvimento de novas misturas enzimáticas para que a degradação de materiais lignocelulósicos ocorra de forma mais eficiente, possibilitando maior rendimento na produção do etanol de segunda geração.

5. METODOLOGIA

Isolamento de *C.thermocellum* B8

Clostridium thermocellum B8 foi isolado de uma amostra composta proveniente do rúmen de caprino, raça Moxotó, gentilmente cedida pela Dra. Betânia Ferraz Quirino (Embrapa Agroenergia – DF). Amostras líquidas e sólidas provenientes do rúmen de caprino foram então inoculadas em meio anaeróbico líquido contendo 1% (p/v) de celulose microcristalina (softwood, Sigma Aldrich®) e incubados a 60°C por 48h, amostras então foram transferidas para frascos contendo meio de cultura para realização de diluição seriada (1:10 1:100 1:1000). 0,5 mL de cada diluição foi plaqueado em meio sólido contendo carboximetilcelulose e crescidos em anerobiose a 60°C por 48h. Colônias capazes de crescer utilizando CMC como fonte de carbono foram transferidas para meio anaeróbico líquido contendo 1% (p/v) de celulose microcristalina e então identificadas por 16s rDNA e comparação genômica, chegando à espécie *Clostridium thermocellum* (HAMANN et al., 2015).

Crescimento e manutenção do microrganismo

Meio anaeróbico redutor foi preparado em água destilada adicionando extrato de levedura (3 g.L⁻¹), NH₂PO₄ (5 g.L⁻¹), Na₂HPOH (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 (0,5mL), NaOH (0,04 g.L⁻¹), Na₂S.9H₂O (100 µL.L⁻¹), cisteína (0,125 g.L⁻¹), resarzurin 1mL.L⁻¹ (solução estoque 0,01% p/v), ágar 2%(p/v) para meio sólido. A solução foi fervida em frasco do tipo *kitassato* até a eliminação do oxigênio presente no meio, 100 mL do meio anaeróbico foram transferidos para frascos contendo 1g de avicel seguidos de borbulha com nitrogênio gasoso por 5 minutos para preservação da condição anaeróbica. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha, seladas com anel de alumínio e finalmente autoclavados por 20 minutos a 120°C.

Crescimento microbiano em meio líquido foi realizado inoculando 5 mL de uma cultura de *C.thermocellum* previamente crescida por 48h a 60°C, um grupo de 10 frascos preenchidos com meio anaeróbico suplementado com 1 % (p/v) avicel foram inoculados, colocados em estufa a 60°C e então diariamente agitados manualmente. A cada 24h dois frascos foram aleatoriamente removidos, retirado 1 mL de cada cultura e o crescimento estimado por leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

As culturas em meio líquido foram mantidas a 4°C por até duas semanas, o estoque de células foi mantido em glicerol a 50% (p/v) em freezer -80°C e reativado quando necessário.

Preparação das amostras

Amostras provenientes do crescimento de *C.thermocellum* foram preparadas por filtração à vácuo utilizando papel filtro número 5, centrifugadas a 10.000g a 4°C por 10 minutos, as células foram descartadas e 10 mL do sobrenadante foram dialisados contra 5 L de água destilada a 4°C por 12h utilizando membrana com corte de 12 KDa. Esse material foi guardado a 4°C até ser utilizado como fonte de proteínas, essa fração foi denominada sobrenadante. Para realização de caracterização enzimática e ensaios de hidrólise, o material foi concentrado dez vezes utilizando sistema de ultrafiltração em células de 350 mL (Amicon – Millipore, EUA) sob pressão constante de 2,50 kg.cm⁻² utilizando membrana de corte de 10 kDa (Millipore, EUA). Todo o processo foi realizado a 4°C.

O material celulósico residual do crescimento bacteriano (avicel) foi recuperado do papel filtro utilizado para clarificar o sobrenadante, lavado à vácuo com 300 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 para remover proteínas fracamente aderidas ao substrato residual, o material celulósico residual foi então homogeneizado utilizando vortex, em 50 mL de água destilada ultrapura por 2 minutos para remover as proteínas fortemente aderidas ao substrato (celulossomas) e então novamente filtrado. A água residual já clarificada foi centrifugada e dialisada como realizado para o sobrenadante, essa amostra foi denominada **Fração Rica em Celulossomas (FRC)**. Para a caracterização enzimática e ensaios de hidrólise, FRC foi concentrada seguindo os passos descritos para o sobrenadante, porém utilizando membrana de corte de 100 kDa (Millipore, EUA).

A mistura enzimática comercial Viscozyme 1.5L (Novozymes, Dinamarca) foi comercializada pela Siga Aldrich (MO, EUA). 10 mL da amostra foram dialisados contra 5 L de água destilada a 4°C por 12h e então diluída na proporção 10:1000 utilizando água destilada. A mistura final foi denominada **Mistura Comercial (MC)** e armazenada a 4°C até ser utilizada como fonte de enzimas.

Quantificação de proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o reagente Quick Start Bradford Reagent (Biorad), seguindo as orientações do fornecedor. A proteína sérica bovina foi utilizada como padrão, ensaio foram realizados em triplicata técnica.

Determinação de açúcares redutores

Açúcares redutores gerados durante o crescimento de *Clostridium thermocellum* B8 foram estimados por meio do método de MILLER, (1959). 150 µL do sobrenadante

não dialisado foi adicionado de 300 μ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), aquecido a 100°C por 10 minutos e então a reação foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, branco da reação foi feito substituindo o sobrenadante do crescimento pelo meio de cultura sem inóculo. Os ensaios foram realizados em duplicata biológica.

Quantificação de atividades enzimáticas

Atividades enzimáticas de endoglicanase, xilanase, pectinase e mananase foram realizadas incubando 50 μ L da solução contendo enzimas e 100 μ L de substrato 1% (*p/v*) (carboximetilcelulose, xilana de cereais, pectina cítrica e manana), previamente dissolvidos em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0; a reação foi inicialmente incubada por 60 minutos, e a seguir 300 μ L do reagente DNS (MILLER, 1959) foram adicionados e então o sistema de ensaios foi aquecido a 100°C por 10 minutos, os açúcares redutores gerados foram determinados por leitura de espectrofotômetro a 540 nm. Para construção de curvas padrão glicose, xilose, ácido galacturônico e manose foram utilizadas para cálculo das atividades de endoglucanase, xilanase, pectinase e mananase, respectivamente. Uma unidade internacional (UI) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor gerado por minuto, sendo a atividade específica 1 μ mol de açúcar redutor gerado por mg de proteína.

Análise em SDS-PAGE

Sobrenadante, FRC e MC foram preparados para corrida em eletroforese em gel de poliacrilamida por meio de precipitação das proteínas com ácido tricloro acético; 133 μ L de ácido tricloro acético 75% (*p/v*) foram misturados a 1 mL de solução de proteínas e então resfriados por 60 minutos a 4°C, seguido de centrifugação a 10000g a 4°C por 20 minutos. Após precipitação, as amostras passaram por dois passos consecutivos de lavagem com acetona previamente resfriada seguidos de centrifugação a 10000g a 4°C por 20 minutos. Proteínas precipitadas foram ressuspensas em 3 μ L de tampão de amostra, 12 μ L de água destilada ultrapura e então aquecida a 100°C por 10 minutos para corrida em condições desnaturantes.

Géis de poliacrilamida foram preparados com malha de 10%. A corrida foi realizada com amperagem constante de 25 mA por aproximadamente 40 minutos. Após corrida eletroforética, os géis foram removidos, fixados e corados com prata como se segue: Solução fixadora por 60 minutos, etanol 50% (*v/v*) por 60 minutos, tiosulfato de sódio 1 minutos, três vezes com água destilada, nitrato de prata por 15 minutos e então carbonato de sódio até o aparecimento de bandas. A reação foi parada por adição de solução fixadora.

Géis de atividade de xilanase e cmcase foram realizados como gel de poliacrilamida com copolimerização de xilana e carboximetilcelulose na malha, tendo concentração final de 0,1% (p/v). Após corrida em condições desnaturantes o gel foi lavado com Triton 2,5% (p/v) por 60 minutos seguidos de lavagem com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 por 60 minutos, após lavagem, o gel foi incubado a 60°C por 1 hora, resfriado a 4°C e então corado por 15 minutos com Congo Red 0,1% (p/v). Para visualização das bandas o gel foi lavado com NaCl 1M por aproximadamente 30 minutos e então as bandas que apresentaram atividades foram contrastadas com ácido acético 5% (v/v).

Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH nas atividades enzimáticas presentes nas três diferentes misturas (sobrenadante, FRC e MC) foi determinado conduzindo ensaios enzimáticos a 50°C para MC e a 65°C para FRC e sobrenadante, reações foram conduzidas trocando o sistema tamponante para acetato de sódio 100mM pH 3 a 5, fosfato de sódio 100mM pH 6 e Tris-HCl 100mM pH 7 a 9 100 mM, ensaios foram realizados triplicata técnica e atividades normalizadas em termos de atividade relativa. Efeito da temperatura nas diferentes atividades enzimáticas foi realizado conduzindo ensaios enzimáticos em tampão acetato de sódio pH 5,0 50 mM em um intervalo de temperatura de 30 a 80°C. Ensaios foram realizados em triplicata técnica e atividades normalizadas em atividade relativa.

Efeito do pH na estabilidade das enzimas

A avaliação da estabilidade enzimática em relação ao pH foi determinado utilizando o sistema tamponante aplicado para caracterização do efeito do pH nas atividades enzimáticas em uma concentração final de 20 mM. Amostras contendo 0,10 UI.mL de atividade enzimática (endoglicanase, xilanase e pectinase) foram incubadas em banho quente a 60°C para FRC e sobrenadante, e a 45°C para MC por 24h e então a atividade residual foi quantificada a 60°C com substratos preparados em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. O grupo controle foi realizado determinando a atividade enzimática antes do tempo de incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e os valores normalizados em atividade relativa ao controle.

Hidrólise enzimática de materiais celulósicos

Os ensaios de hidrólise de materiais celulósicos foram conduzidos em estufa de incubação a 50 e 60°C com rotação contínua de 120 revoluções por minuto. Misturas enzimáticas FRC, sobrenadante e MC foram filtradas em membrana de 0,22 µm, e tetraciclina e azida sódica (NaN₃) foram adicionadas em uma concentração final de 4

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,02% (*p/v*) respectivamente. A carga enzimática foi normalizada em 4 UI de endoglicanase por grama de substrato, o sistema tamponante fosfato de sódio pH 6 foi aplicado em concentração final 100 mM. Como material celulósico foi utilizada a celulose amorfa (Sigmacell 100 – Sigma Aldrich, EUA) e a polpa escura de *Eucalyptus* sp. tratada pelo processo *kraft*, cozida e lavada. Este material foi cedido ao laboratório de Enzimologia (Biologia Celular – Universidade de Brasília) pelo laboratório de Química, Celulose e Energia (ESALQ) e foi manufaturado pela empresa CONPACEL(São Paulo) como previamente publicado (DE SOUZA MOREIRA et al., 2015; MOREIRA, 2013). O meio de reação foi composto por 100 mg (2,5% *p/v*) de material celulósico (celulose ou polpa escura de eucalipto) em 4 mL de solução enzimática. Os ensaios foram realizados em duplicata e o açúcar redutor gerado durante a hidrólise foi quantificado como descrito anteriormente. Grupos controle foram incubados sem a presença de enzima, tendo seu volume ajustado com água destilada ultra pura. A absorbância de açúcares redutores, aplicando a metodologia de (MILLER, 1959), no tempo zero de hidrólise para cada condição testada também foi utilizada como controle. O volume removido de cada frasco com meio de reação não ultrapassou 10% do volume inicial.

Efeito de compostos fenólicos derivados da lignina

A avaliação do efeito de compostos fenólicos derivados da lignina foi realizada utilizando os compostos ácido *p*-cumárico e ácido caféico. Soluções das amostras sobrenadante, FRC e MC contendo $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína foram incubadas em banho térmico a 25°C por 24 horas na presença dos compostos fenólicos previamente diluídos em etanol absoluto (ácido *p*-cumárico e caféico), sendo a concentração final de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A detecção das atividades enzimáticas foi realizada como já descrito, e o ensaio controle foi feito com encubação da solução de proteínas apenas com etanol absoluto, e então as atividades foram normatizadas em relação ao controle

Microscopia eletrônica de varredura

Para visualização das amostras por meio de microscopia eletrônica de varredura, o material residual após 168h de sacarificação a 50°C foi filtrado a vácuo em papel filtro, e então seco por 72h a 60°C em estufa; o mesmo tratamento foi realizado para o substrato residual (avicel) após 48h do crescimento de *C.themrocellum* B8. O grupo controle foi realizado encubando a polpa escura de Eucalipto nas condições do ensaio de hidrólise, porém sem a presença de enzimas e então seco em estufa, para avicel o grupo controle foi feito com meio de cultura contendo avicel incubado por 48h a 60°C porém sem a inóculo

de bactéria. A metalização, e visualização das amostras foi realizada no laboratório de Microscopia (IB-UnB), seguindo os passos descritos em (BLUME, 2011).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot (V12.5), sendo calculado ANOVA seguida de teste de Tukey com nível significância $p < 0,05$

6. Resultados

Após a inoculação em meio anaeróbico, *C.thermocellum* B8 foi capaz de realizar crescimento a 60°C na presença de avicel 1% (p/v), apresentando crescimento máximo em 48h de cultivo e decaimento a partir de 72h. A taxa de açúcar redutor máximo foi observado durante 72 e 96h e apresentando decaimento após 96h, tempo no qual a bactéria obteve maior decaimento no crescimento (DO 600 nm) (figura 8). A degradação das fibras de avicel durante o crescimento de *C.thermocellum* B8 foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura, sendo observado desfragmentação das fibras após 48h de crescimento bacteriano (figura 10).

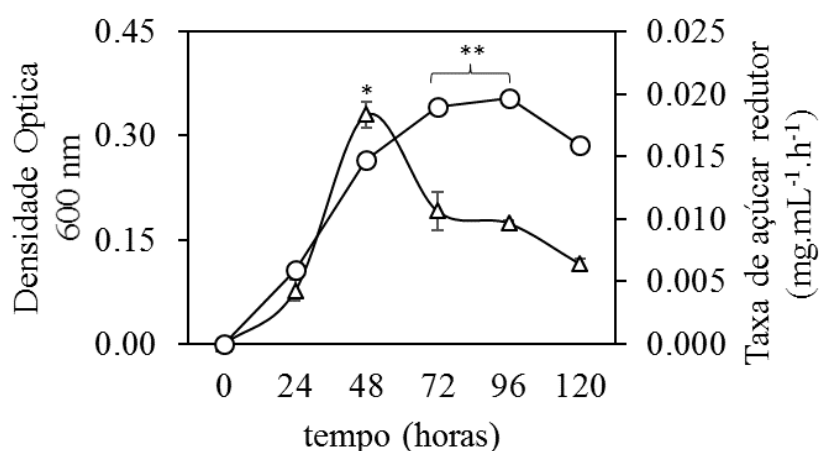


Figura (8): Curva de crescimento de *Clostridium thermocellum* B8 na presença de avicel 1% (p/v) (triângulo) e taxa de açúcar redutor gerado durante crescimento (círculo). Barras verticais representam desvio padrão de uma duplicata biológica. * p<0,05; **p>0,05

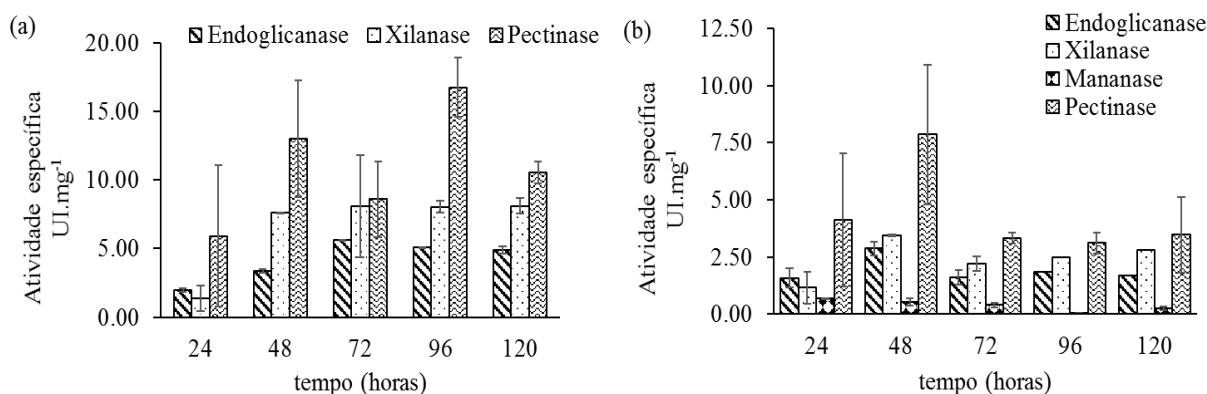


Figura (9): Produção de holocelulases ao longo do tempo de crescimento de *C.thermocellum* B8. (a) Fração rica em celulosomas (FRC). (b) sobrenadante. Barras verticais representam o desvio padrão de uma duplicata biológica.

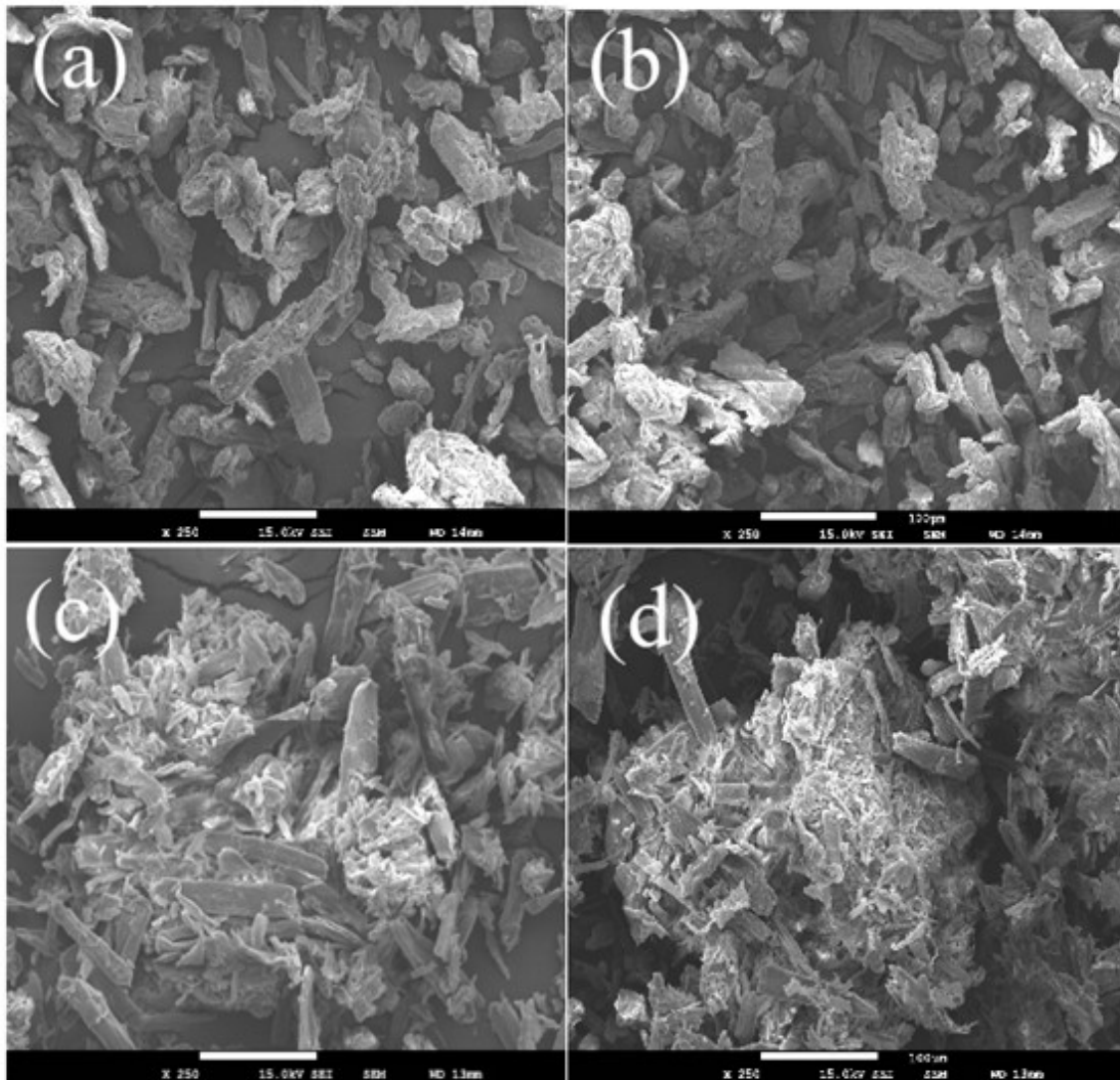


Figura (10): Microscopia eletrônica de varredura de (a,b) avicel não degradada e (c,d) avicel degradada por *C.thermocellum* B8 após 48 horas de crescimento a 60°C.

Acompanhando a curva de crescimento, a bactéria foi capaz de sintetizar e secretar uma gama de enzimas capazes de degradar componentes da parede celular vegetal, dentre elas foram detectadas, pectinases, endoglucanases, xilanases e mananases (figura 9).

Além de uma maior atividade específica observada para a amostra FRC, foi notada uma diferente proporção entre atividades xilanolíticas e endoglicanases, sendo que no segundo dia de cultivo a atividade xilanolítica foi duas vezes maior que a de endoglicanase. A atividade manonolítica foi observada apenas para a amostra proveniente do sobrenadante, sendo essa detectada em maior quantidade nos primeiros três dias de cultivo.

A análise em SDS-PAGE (10%) mostrou uma predominância de proteínas acima de 50 kDa para a amostra FRC, enquanto o perfil eletroforético da amostra sobrenadante

apresentou uma maior diversidade de bandas sendo aquelas na região de 116 kDa e 45 kDa mais intensas (figura 11).

Os geis de atividade para as atividades xilanolíticas mostraram para as amostras de *C.thermocellum* predominância de bandas acima de 45 kDa podendo ser contadas nove isoformas presentes para a amostra FRC e seis para o sobrenadante, a mistura comercial apresentou duas bandas com maior intensidade, sendo todas as isoformas observadas abaixo de 50 kDa. Para o gel de atividade de celulase (endoglicanase) as amostras produzidas por *C.thermocellum* B8 majoritariamente apresentaram bandas acima de 66 kDa, para a amostra comercial foram observadas bandas mais intensas na linha dos marcadores de 35 e 25 kDa (figura 12).

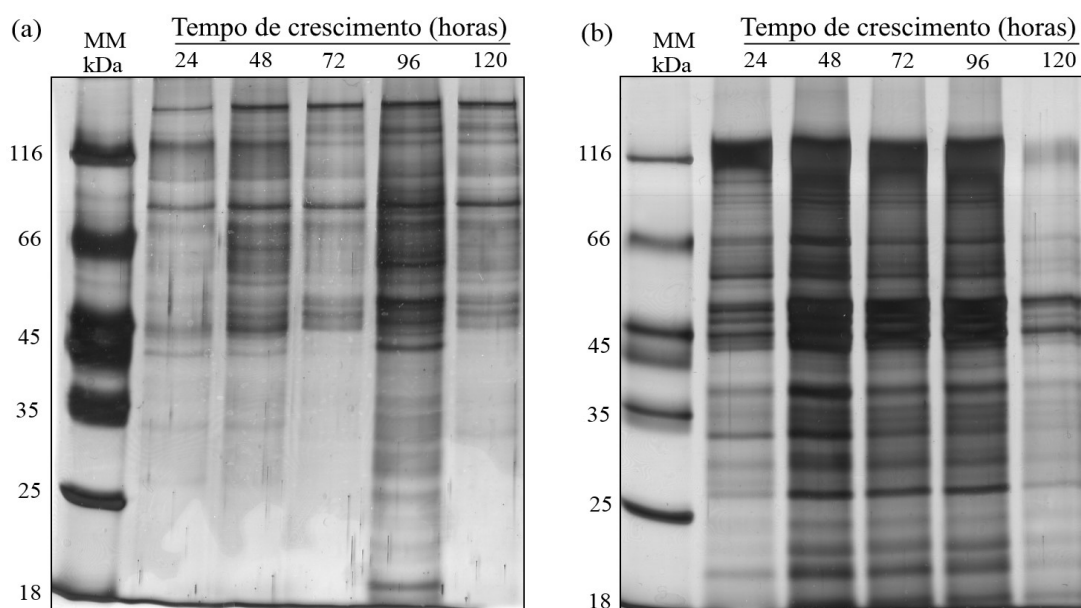


Figura (11): Análises eletroforéticas em SDS-PAGE (10%) de proteínas secretadas por *C.thermocellum* B8 durante tempo de crescimento (a) FRC (b) sobrenadante. MM (marcador molecular): beta-galactosidase (116 kDa), serum bovino (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), beta-lactoglobulin (18 kDa).

Em relação ao efeito da temperatura nas atividades de pectinase, endoglucanase e xilanase, observa-se que enzimas produzidas por *C.thermocellum* apresentam uma temperatura de atuação entre 50 e 70°C. Endoglicanases tiveram sua atividade máxima em 60°C, enquanto xilanases apresentaram atividade máxima em 70°C. Dentre o grupo de enzimas produzidas por *C.thermocellum*, as pectinases foram as que tiveram a temperatura ótima mais baixa, sendo essa de 50°C (figura 12). Para a mistura comercial (MC) a temperatura em que foi obtida a máxima atividade foi 50°C para pectinases e 60°C para endoglicanases e xilanases.

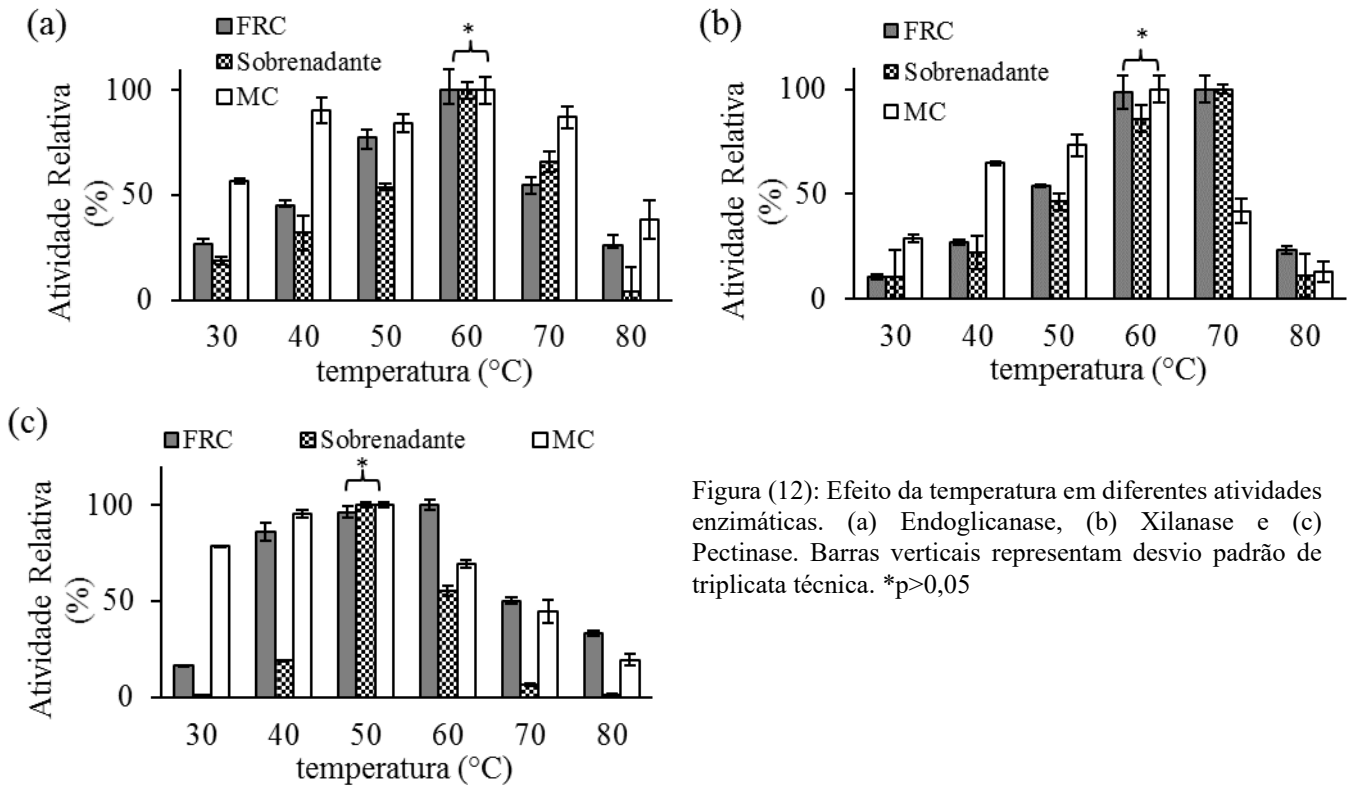


Figura (12): Efeito da temperatura em diferentes atividades enzimáticas. (a) Endoglicanase, (b) Xilanase e (c) Pectinase. Barras verticais representam desvio padrão de triplicata técnica. * $p > 0,05$

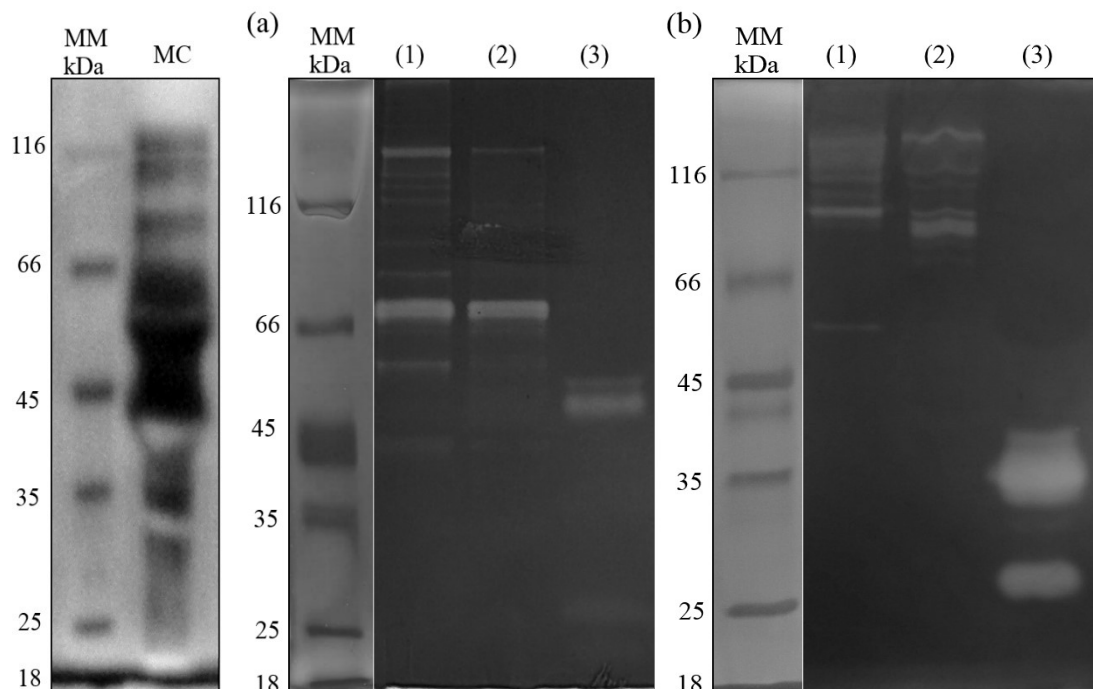


Figura (13): Análises eletroforética em SDS-PAGE (10%) de proteínas presentes na mistura comercial (MC). Gel de atividade (a) xilanolitica e (b) endoglicanase em SDS-PAGE (10%) para (1) FRC, (2) sobrenadante, (3) MC. MM (marcador de massa molecular): beta-galactosidase (116 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), beta-lactoglobulin (18 kDa).

O efeito do pH para as atividades xilanolíticas foi similar para as amostras produzidas por *C.thermocellum* B8 tanto para a amostra FRC quanto para o sobrenadante, tendo valores máximos entre pH 5 e 6, valores também observado para as atividades de endoglicanase produzidas pelo isolado B8. Quando analisadas as atividades pectinolíticas produzidas pelo isolado B8 é notado uma predominância de atividades máximas em pHs 8 e 9, já para o sobrenadante observa-se uma faixa mais ampla. Para a amostra comercial maiores atividades de pectinase, xilanase e endoglicanase foram observadas em uma faixa mais ácida, estando essas nos pHs 3 e 4 (figura 14).

Quando avaliado o efeito da estabilidade em diferentes pHs nas atividades holocelulolíticas, é notado uma maior manutenção das atividades das proteínas secretadas por *C.thermocellum* B8 em uma faixa mais básica. A atividade xilanolítica presente no sobrenadante foi capaz de manter toda sua atividade em pH 9, já as atividades pectinolíticas foram estáveis em um maior intervalo de pH, tendo sua maior estabilidade em na faixa neutra de pH. Ainda a respeito das enzimas produzidas por *C.thermocellum* B8, não foram observadas perdas na atividade de endoglicanase em pH 8 e 9. Para a amostra comercial foi observada uma maior estabilidade em pH ácido para xilanases e pectinases, já endoglicanases apresentaram maior estabilidade em uma faixa de pH entre

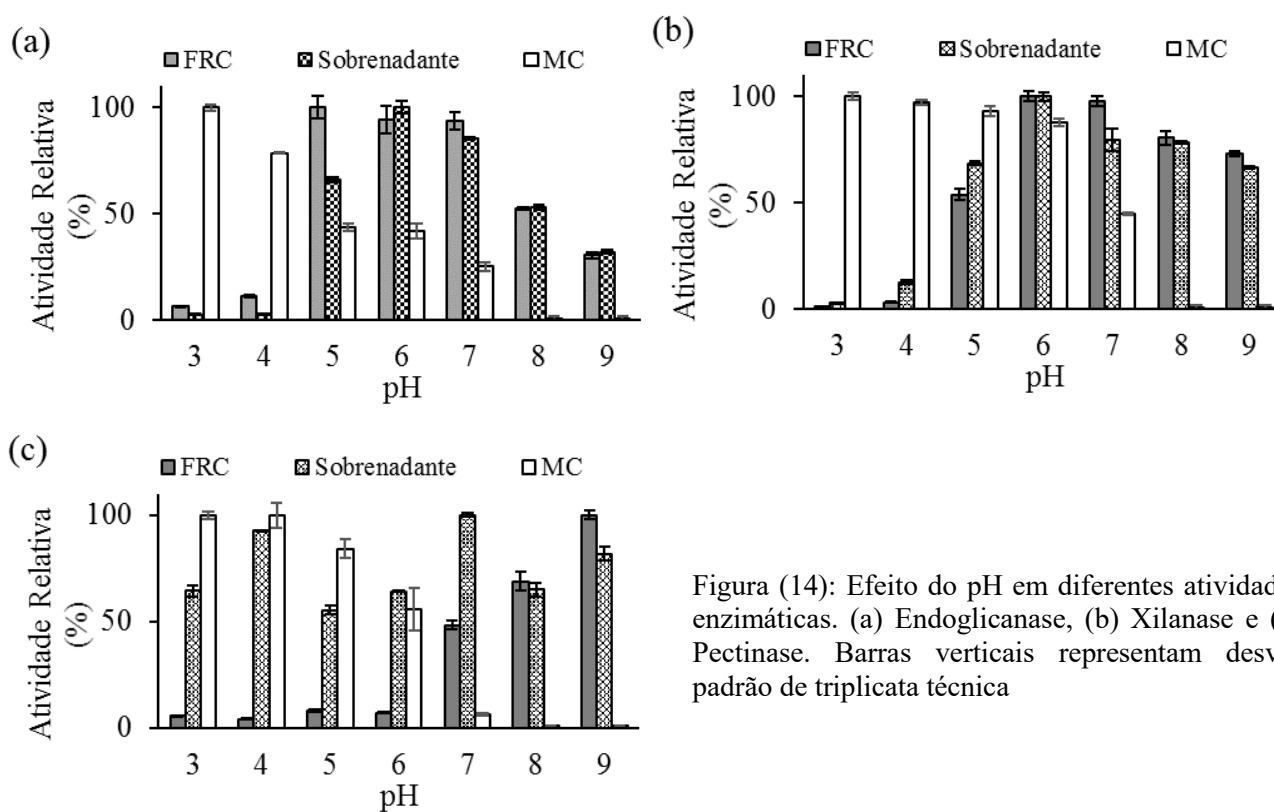
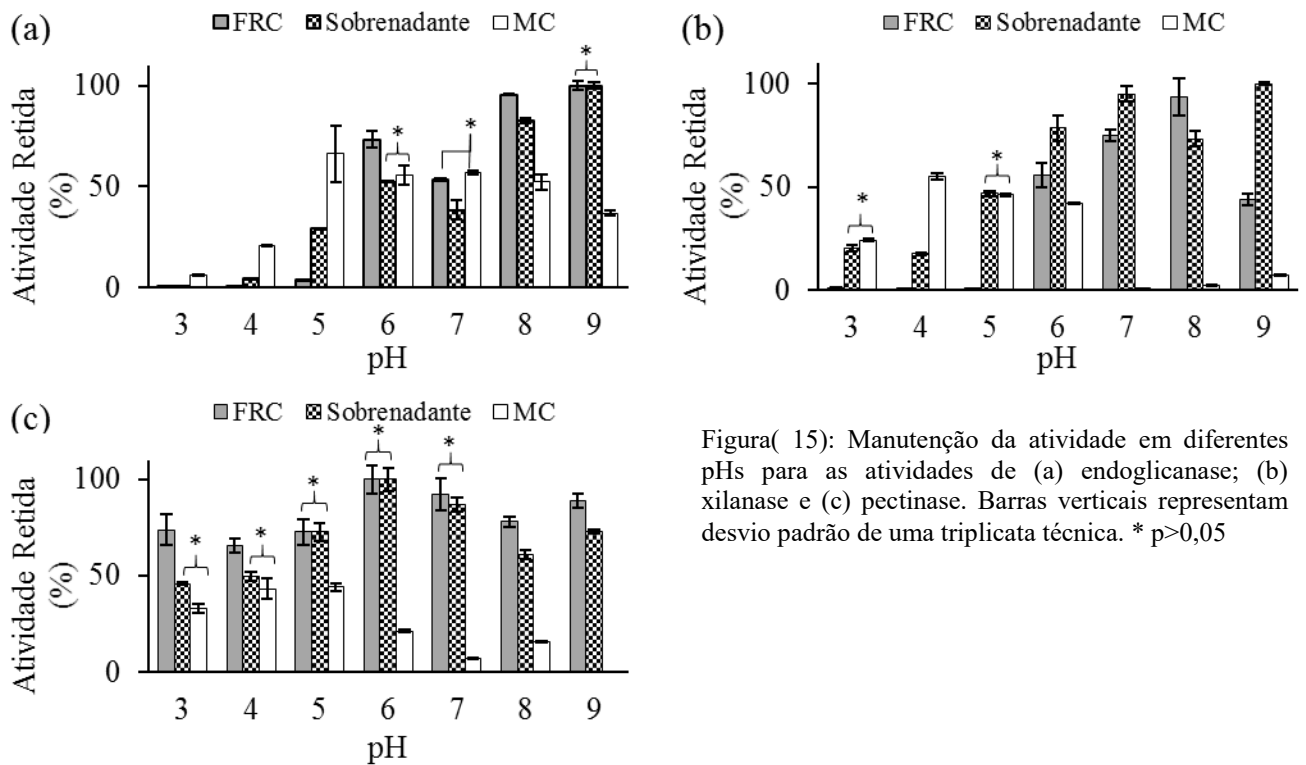


Figura (14): Efeito do pH em diferentes atividades enzimáticas. (a) Endoglicanase, (b) Xilanase e (c) Pectinase. Barras verticais representam desvio padrão de triplicata técnica

5 e 9.

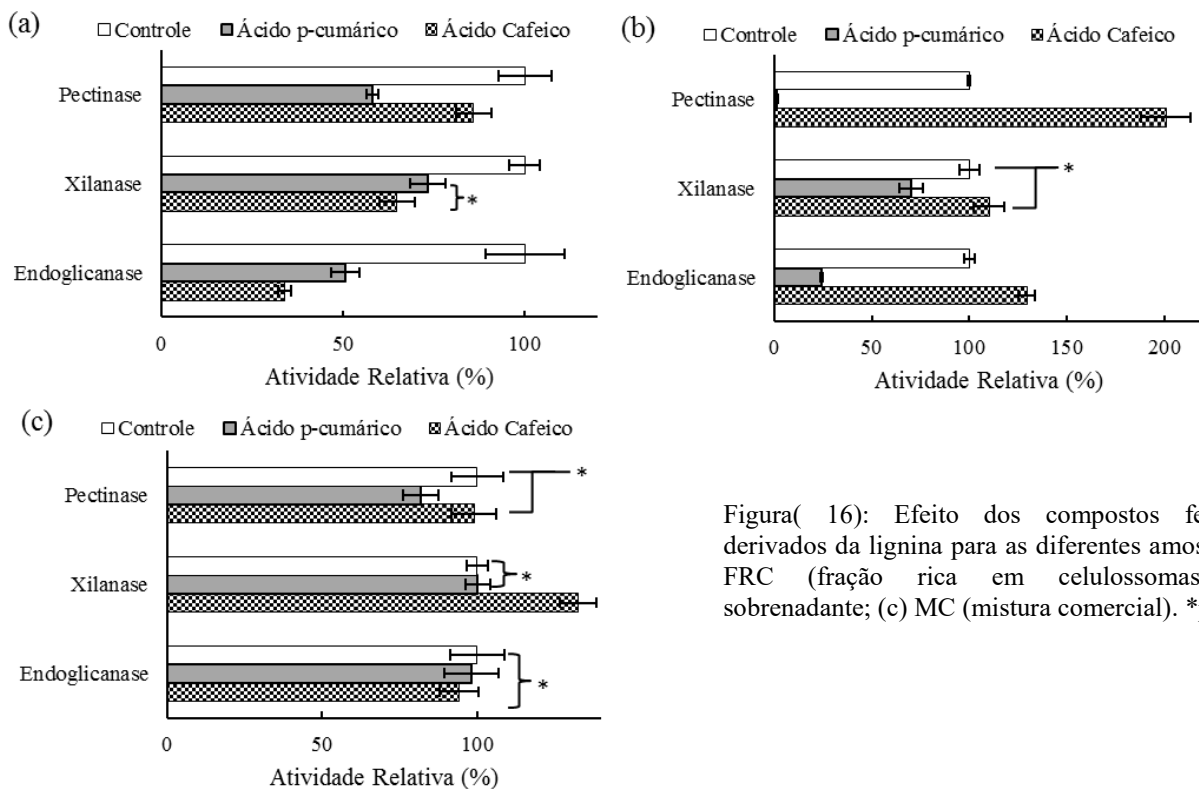


Figura(15): Manutenção da atividade em diferentes pHs para as atividades de (a) endoglucanase; (b) xilanase e (c) pectinase. Barras verticais representam desvio padrão de uma triplicata técnica. * $p > 0,05$

A análise do efeito de compostos derivados da lignina na atividade de holocelulases mostrou que amostras produzidas por *C.thermocellum* B8 apresentam maior inibição por compostos fenólicos em comparação com as amostras comerciais que não apresentaram inibição. A atividade pectinolítica presente no sobrenadante e na amostra comercial é aumentada na presença de ácido caféico, tendo a atividade duplicado para o sobrenadante de *C.thermocellum* B8 (figura 16).

O ensaio de sacarificação da polpa escura de Eucalipto (figura 17) mostrou maior liberação de açúcar redutor ($3,38 \text{ g.L}^{-1}$) quando a amostra FRC foi utilizada como fonte de enzimas a 50°C . Quando o mesmo processo foi realizado a 60°C houve expressiva redução da liberação de açúcar redutor ($1,89 \text{ g.L}^{-1}$). A hidrólise da celulose amorfa (Sigmacell 100) mostrou maior liberação de açúcar redutor quando o processo foi realizado utilizando o sobrenadante de *C.thermocellum* B8 ($1,67 \text{ g.L}^{-1}$). Quando a amostra comercial foi utilizada como fonte de enzimas para sacarificação dos materiais celulósicos, foi observada uma maior facilidade em degradar a celulose pura (Sigmacell-100), sendo observado maior valor quando o processo foi realizado a 50°C ($0,61 \text{ g.L}^{-1}$).

Em termos de cinética de produção de açúcar redutor durante a sacarificação da polpa escura de Eucalipto e celulose amorfa (figura 18), foi notado uma maior taxa durante as primeiras 72 horas. Para os processos realizados a 50°C e utilizando o sobrenadante de *C.thermocellum* B8 observou-se uma maior diferença entre a velocidade



Figura(16): Efeito dos compostos fenólicos derivados da lignina para as diferentes amostras (a) FRC (fração rica em celulosomas); (b) sobrenadante; (c) MC (mistura comercial). * $p > 0,05$

em que o açúcar redutor foi liberado a 60°C. Para a amostra comercial essa diferença foi menos perceptiva entre as temperaturas em que a sacarificação foi realizada.

A análise da degradação das fibras de Eucalipto que compõe a polpa escura foi feita por meio de microscopia eletrônica de varredura, sendo mostrada uma degradação que em maior nível ocorreu na extremidade das fibras. As fibras de Eucalipto proveniente da sacarificação utilizando FRC e o sobrenadante de *C.thermocellum* B8 mostraram uma degradação mais perceptível em relação ao material residual obtido após degradação pela mistura comercial (figura 19,20,21,22).

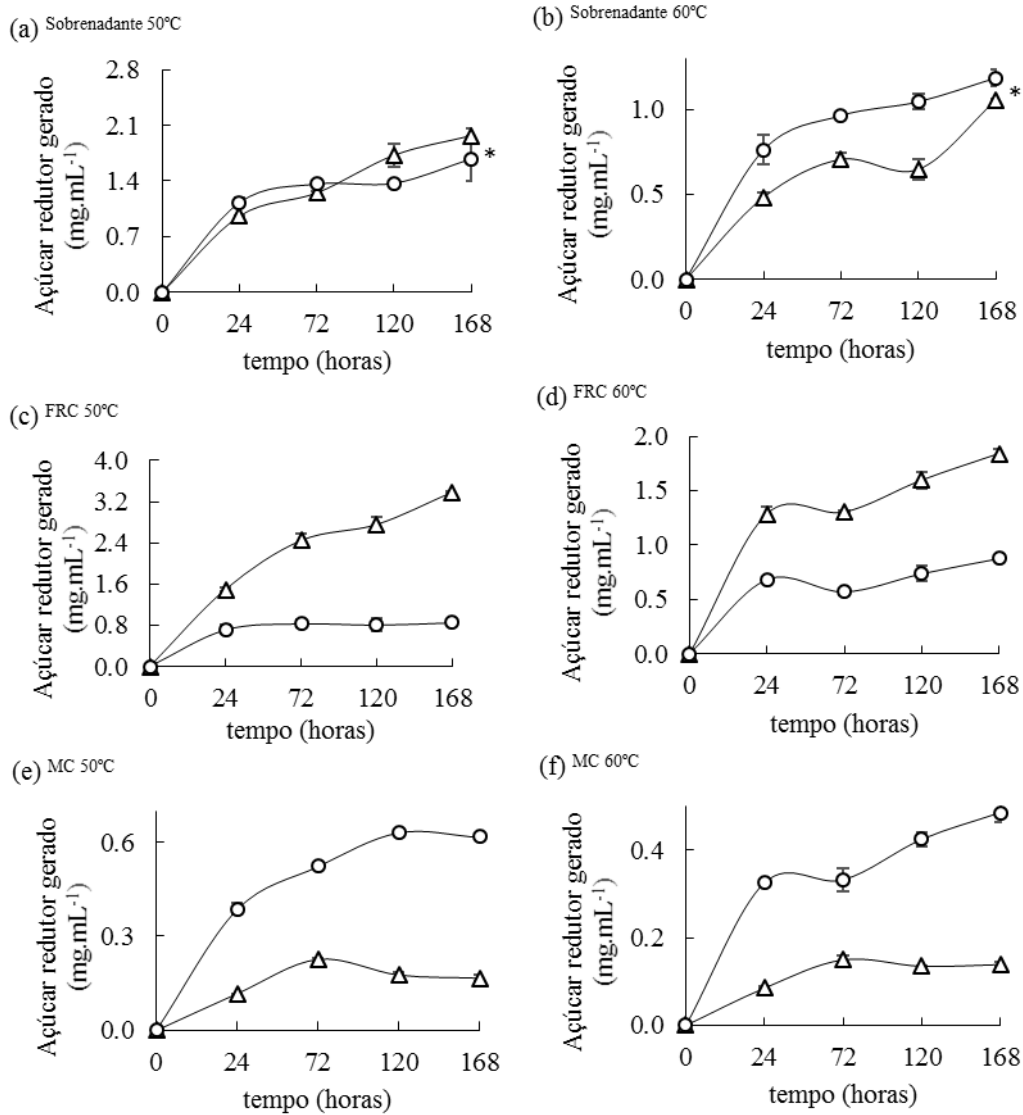
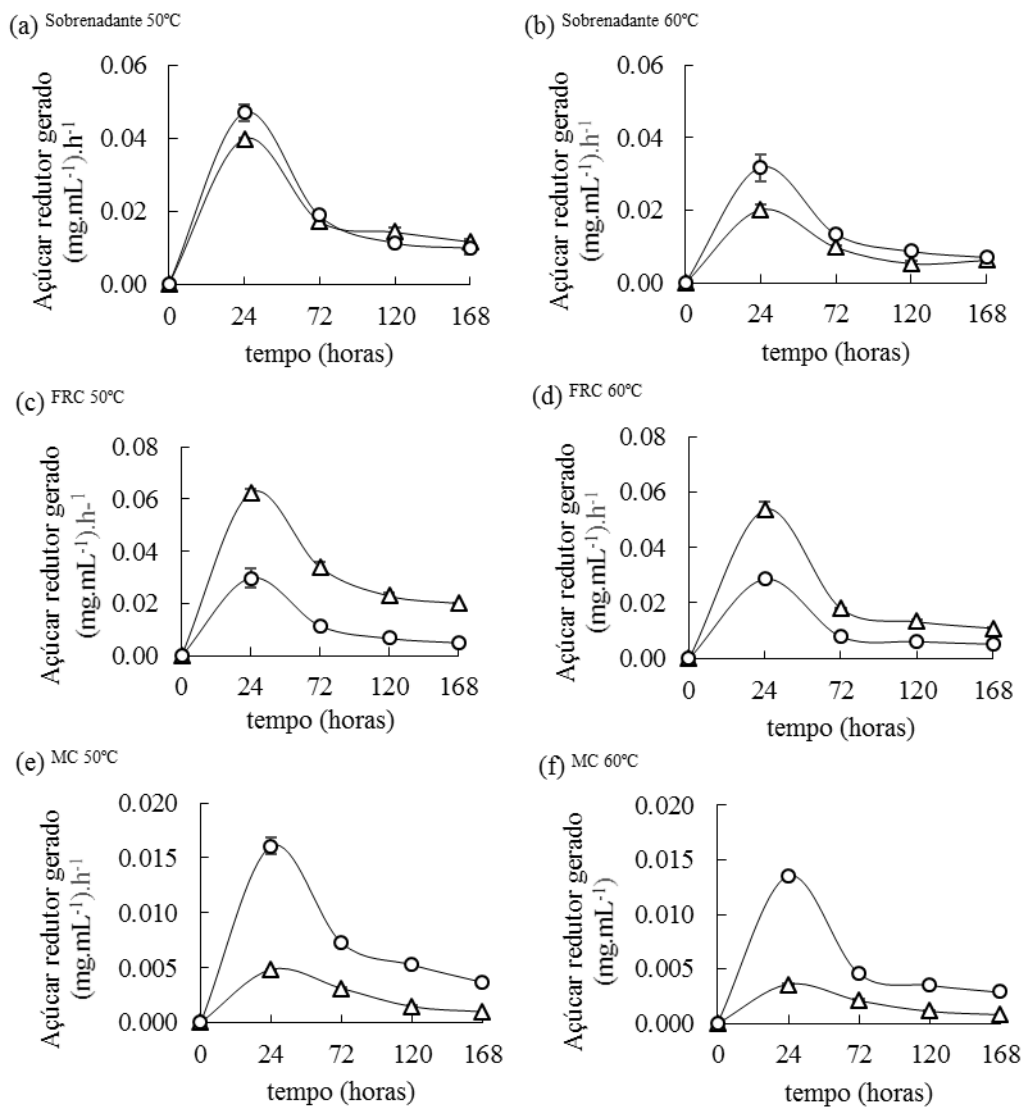


Figura (17): Açúcar redutor gerado durante a sacarificação da polpa escura de Eucalipto (triângulo), e celulose (Sigmacell-100) (circulo) pelas diferentes amostras enzimáticas a 50 e 60°C. Barras verticais representam desvio padrão de dois experimentos. * $p < 0,05$



Figura(18): Cinética de liberação de açúcares redutores durante a sacarificação da polpa escura de Eucalipto (triângulo) e celulose (Sigmacell-100) (circulo) pelas diferentes amostras enzimáticas a 50 e 60°C. Barras verticais representam desvio padrão de dois experimentos.

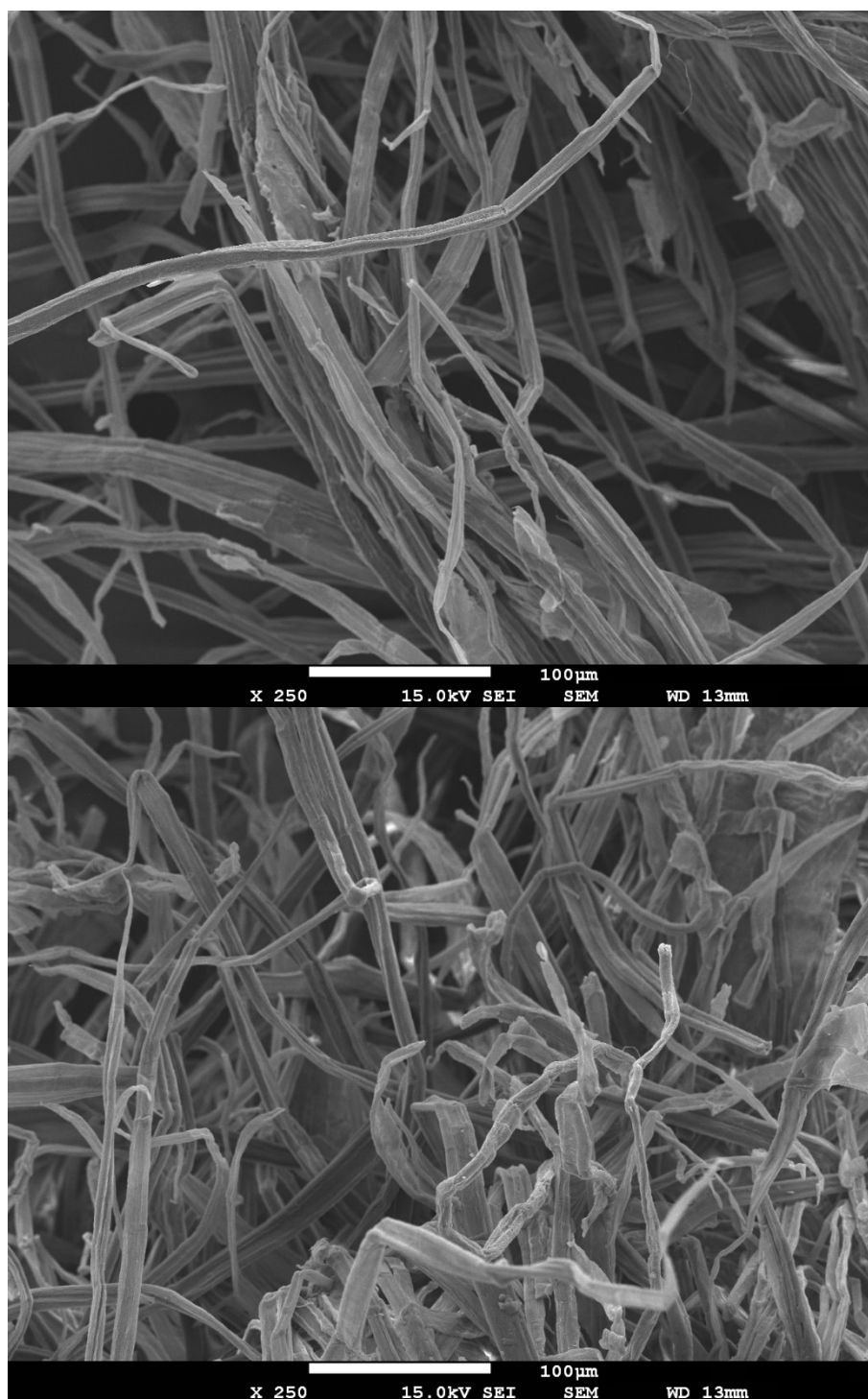


Figura (19): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto controle (sem degradação enzimática).

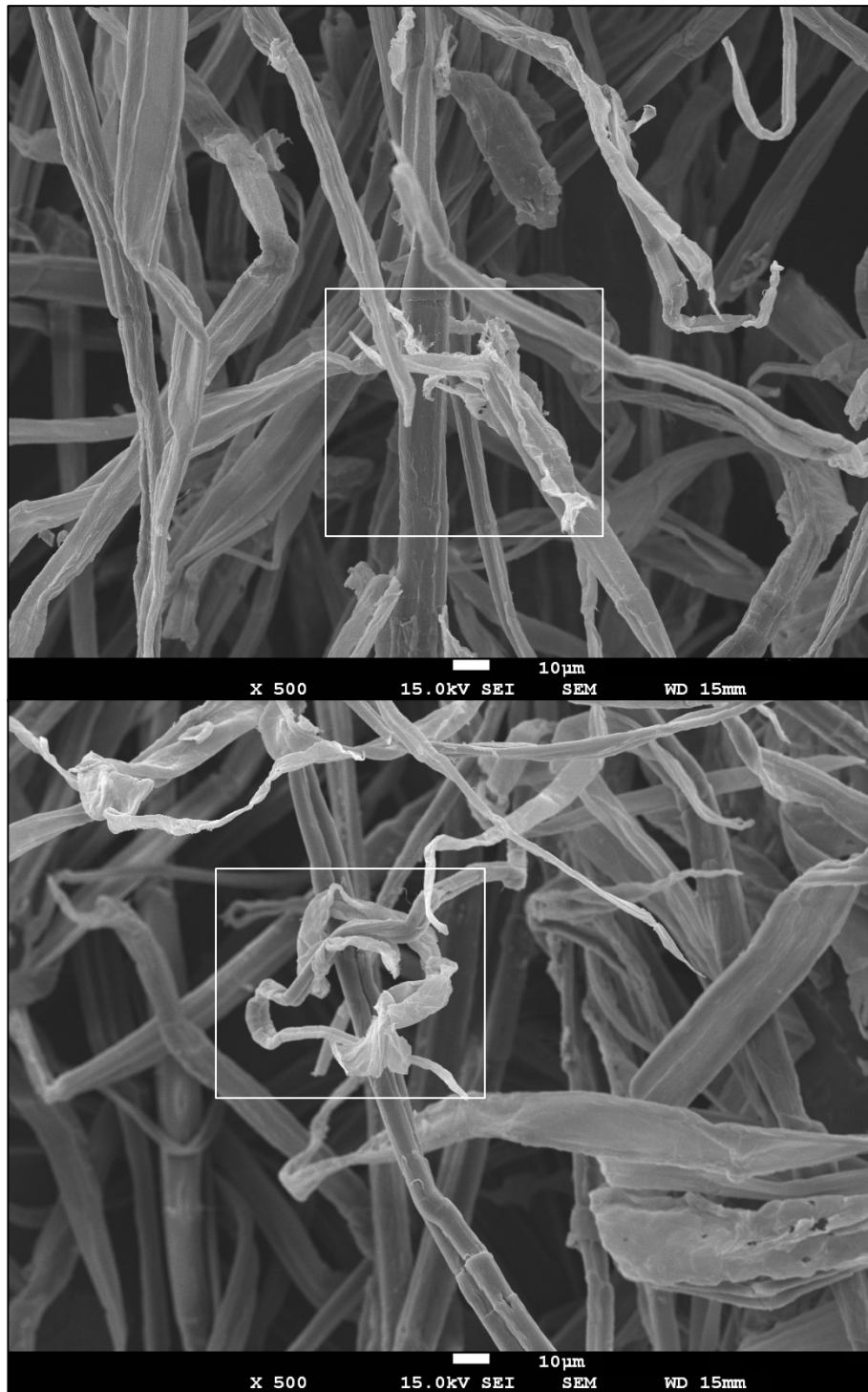


Figura (20): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto após 168h de sacarificação pela amostra FRC (Fração rica em celulosomas) a 50°C. Área delimitada por quadrado branco representa maior degradação.

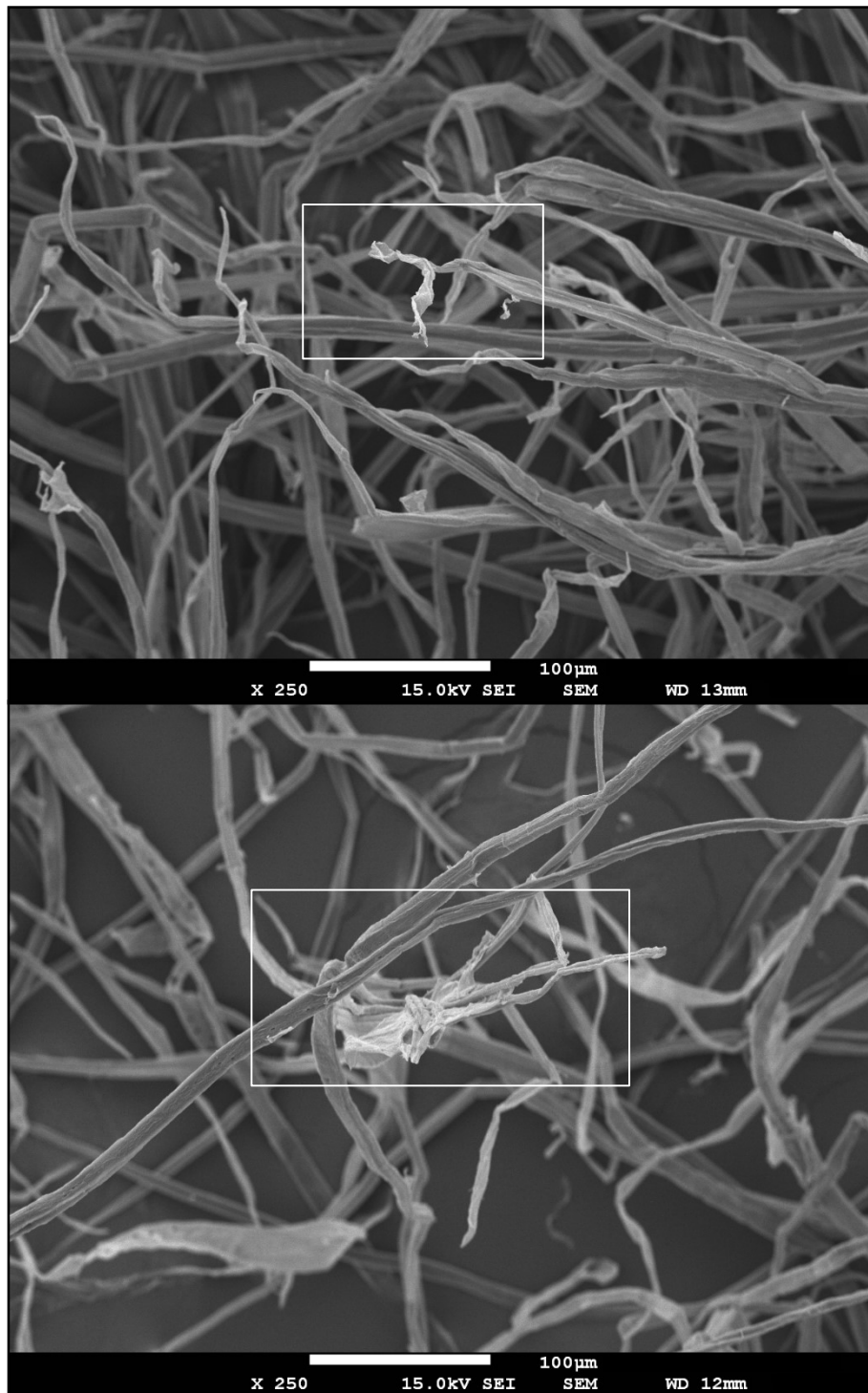
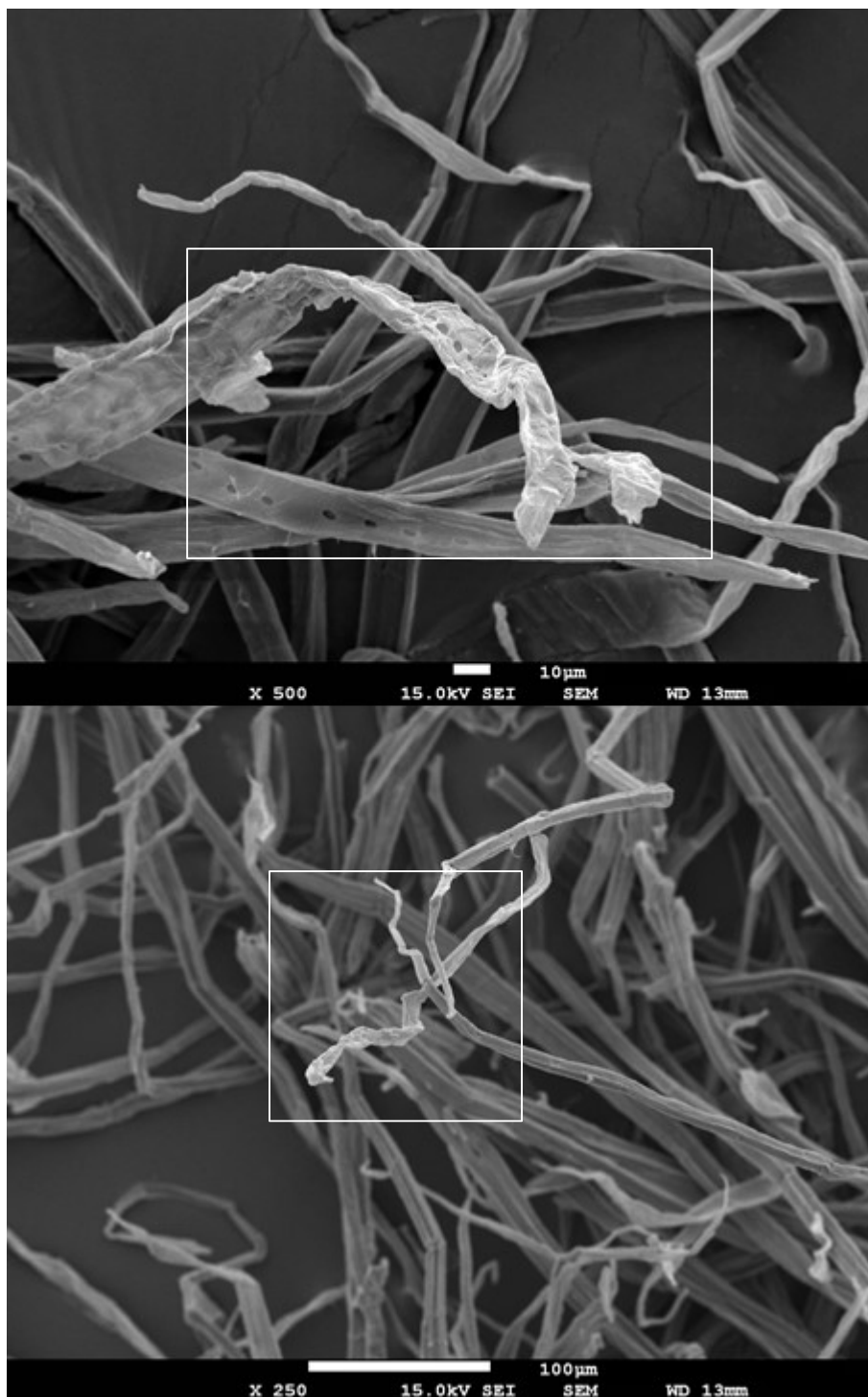


Figura (21): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto após 168h de sacarificação pelo sobrenadante de *C.thermocellum* a 50°C. Área delimitada por quadrado branco representa maior degradação.



Figura(22): Microscopia eletrônica de varredura da polpa escura de Eucalipto após 168h de sacarificação pela mistura comercial (MC) a 50°C. Área delimitada por quadrado branco representa maior degradação.

7. Discussão

No presente estudo, *C.thermocellum* B8 foi capaz de degradar e crescer na presença de avicel como única fonte de carbono, apresentando maior taxa de crescimento após 48 h (DO 600 nm) de cultivo (Figura 8). Este resultado é esperado visto que diferentes isolados de *C.thermocellum* foram mostrados como capazes de degradar materiais celulósicos como avicel e celulose assim como maior taxa de crescimento após 48 h (BLUME et al., 2013).

Apesar da leitura da turbidez do meio de cultura (DO 600 nm) ser um bom indicador de crescimento bacteriano, quando microrganismos com capacidade de degradar substratos insolúveis como fibras celulósicas tem seu crescimento aferido pela turbidez muito do valor obtido pode ser oriundo de partículas insolúveis derivadas da degradação das fibras da celulose. Alternativamente à estimativa da taxa de crescimento de *C.thermocellum* por meio da leitura da turbidez do meio, a taxa de açúcar redutor gerado durante a degradação do material celulósico também pode ser utilizada com um indicador de crescimento, tendo esse atingido seu ápice entre 72 e 96 h. Outras alternativas já foram propostas para melhorar a estimativa do crescimento de *C.thermocellum* quando cultivado em materiais insolúveis como a celulose. Recentemente TANG et al.(2015) demonstraram que tanto a leitura DO 450 nm responsável pela detecção da YAS (*Yellow affinity substrate*) (LJUNGDAHL et al., 1983), proteína secretada por *C.thermocellum* durante crescimento em fontes celulósicas e a DO 600 nm apresentam forte correlação com o número de transcritos da proteína estrutural do celulosoma *cipA*. No referido estudo, *C.thermocellum* ATCC 27405 mostrou maior taxa de crescimento entre 48 e 96 h tendo seu máximo em 96 h (DO 450 nm) quando crescida na presença de celulose.

A capacidade de diferentes isolados de *C.thermocellum* em degradar materiais celulósicos e liberar açúcares redutores em seu meio de crescimento é uma característica interessante do ponto de vista do desenvolvimento de processos de cocultivo, no qual a degradação e fermentação de materiais lignocelulósicos é realizada simultaneamente por mais de um organismo. O cocultivo de diferentes espécies de bactérias anaeróbicas juntamente com *C.thermocellum* já foi amplamente demonstrado na literatura com diversas finalidades como produção de etanol, butanol, hidrogênio (NG; BENBASSAT; ZEIKUS, 1981; Y et al., 2010). O isolado de *C.thermocellum*, B8, foi obtido de uma amostra complexa com presença de diferentes organismos anaeróbicos e termófilos. A facilidade com que essa bactéria degrada polissacarídeos e libera açúcares redutores faz

com que seu papel seja chave para o fornecimento de fontes de carbono facilmente assimiláveis para os demais componentes da microbiota.

A versatilidade de *C.thermocellum* em crescer em diferentes materiais lignocelulósicos complexos como bagaço de cana de açúcar, resíduos da colheita do algodão (HAMANN et al., 2015), resíduos da cultura da bananeira (VIEIRA et al., 2007) e materiais oriundos de gramíneas como *switchgrass* (WILSON et al., 2013) fazem com que essa espécie seja não apenas uma ferramenta para o desenvolvimento de processos bioconsolidados mas também para a gestão de resíduos e materiais lignocelulósicos (BAYER; LAMED; HIMMEL, 2007). Anteriormente nosso grupo de pesquisa mostrou que a degradação de fibras de resíduos de algodão ocorre de uma forma similar a degradação de fibras de celulose microcristalina (HAMANN et al., 2015)(BLUME, 2011). O padrão de degradação das partículas de avicel durante o crescimento de *C.thermocellum* B8 mostrou-se diferente do modelo anteriormente descrito para outras fontes de carbono. No presente estudo as partículas de avicel foram parcialmente desfragmentadas (figura 10) enquanto que para outras fontes de carbono as fibras foram excisadas. Mudanças no perfil de degradação além de serem relacionadas com a natureza do material, tendo em consideração que avicel é a fração com maior cristalinidade da celulose, podem estar relacionadas com o perfil diferenciado de enzimas secretadas pela bactéria.

Ainda em respeito à competência em degradar de forma diferenciada materiais celulósicos de composição variada, a habilidade de *C.thermocellum* em aderir-se a biomassa por meio do complexo enzimático ligado a membrana celular e os domínios de ligação a carboidratos presentes no mesmo fazem com que a distância entre as células bacterianas e o material celulósico seja reduzida, permitindo a secreção de cobre amino oxidases e consecutiva geração de hidróxidos nas imediações do material lignocelulósico. A produção de hidróxido próximo às fibras de celulose foi reportada como um mecanismo de despolimerização das regiões com maior cristalinidade nas fibras de celulose (SCIENCES; POLYTECHNIC; ST, 1989). A presença de grupos reativos faz com que as pontes de hidrogênio presentes na fração mais cristalina sejam desestruturadas e então ocorre uma redução da cristalinidade e recalcitrância, seguida de uma maior acessibilidade das enzimas. Esse mecanismo foi extensamente estudado em fungos de “podridão marrom” (ENOKI; TANAKA; FUSE, 1989), porém para *C.thermocellum* existem poucos relatos da funcionalidade de tais enzimas como agentes auxiliares na degradação da celulose. Estudos do proteoma de diferentes isolados de *C.thermocellum*

quando degradando materiais como celulose e demais materiais lignocelulósicos mostram a presença de cobre amino oxidases juntamente com as glicosil hidrolases (GOLD; MARTIN, 2007), reforçando a importância dessa classe de enzima.

A capacidade de *C.thermocellum* em degradar materiais celulósicos de elevada recalcitrância ocorre por meio da secreção de diversos grupos de enzimas hábeis em degradar fibras de celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos presentes em estruturas vegetais. Além da secreção de tais enzimas, *C.thermocellum* tem a capacidade de reunir subunidades enzimáticas em complexos enzimáticos, conferindo assim efeito sinérgico na degradação da parede celular vegetal. O isolado B8 produziu diversas classes de enzimas (pectinases, endoglicanases, xilanases e mananases) quando cultivado na presença de avicel (homopolissacarídeo), a co-produção de enzimas não relacionadas a degradação de celulose indicam que a regulação da expressão de tais genes ocorre por meio de mecanismos similares ou que se inter-relacionam. A possibilidade de tradução de várias enzimas encodadas em um único mRNA (policistrônico) não é esperado ser um fator de grande relevância para a co-produção de um grupo de enzimas não relacionados a degradação da celulose visto que já foi descrito que genes de *C.thermocellum* codantes para holocelulases são majoritariamente transcritos em mRNAs monocistrônicos (GUGLIELMI; BÉGUIN, 1998).

Dentre os mecanismos moleculares descritos para o controle da expressão de genes relacionados à produção de holocelulases por *C.thermocellum* encontram-se aqueles sob controle de um único promotor. Newcomb et al (2011) descreveram a existência de um cluster gênico contendo *celC* (endoglicanase), *licA* (liquenase), *manB* (β -mananase) e *celT* (endoglicanase) em que os genes *celC* e *licA* são transcritos em um único mRNA e sua regulação ocorre por meio da presença de laminaribiose. O operon descrito por Newcomb (2011) foi um dos poucos operons descritos para *C.thermocellum*, entretanto o mesmo não é capaz de explicar o variado perfil de produção de enzimas demonstrado nesse trabalho.

Complementar ao operon *celC*, existem outros mecanismos moleculares que explicam parte do controle da expressão de genes por *C.thermocellum* durante a degradação de materiais celulósicos, NATAF et al., (2010) mostraram que diferentes interruptores celulares localizados no espaço extracitoplasmático são regulados pela presença de sacarídeos advindos da degradação de materiais celulósicos, liberando fatores σ e assim iniciando a transcrição de genes. Os interruptores que regulam os fatores σ são específicos para diferentes componentes da parede celular vegetal, sendo essa

especificidade obtida por meio de regiões com domínio de ligação a diferentes carboidratos, KAHREL-RAIFER et al. (2010) mostraram a existência de três diferentes domínios de ligação a carboidratos presentes em tais interruptores biológicos, sendo esses agrupados nas classes CBM3 (afinidade a materiais celulósicos), CBM42 (afinidade a arabinosilana) e PA14 (afinidade a componentes da pectina).

Em complemento aos interruptores localizados no espaço extracitoplasmático, existem regiões no genoma de *C.thermocellum* as quais apresentam sequências que indicam as possíveis regiões alvo para os fatores σ , essas predições realizadas por MUÑOZ-GUTIÉRREZ et al., (2016) demonstram que um único fator σ capacidade de iniciar a transcrição de genes de uma gama de enzimas não apenas relacionadas à degradação de celulose, mas também componentes da hemicelulose e pectina. Esse modelo de controle gênico é capaz de explicar a co-síntese de xilanases, endoglicanases, pectinases e mananases reportado no presente trabalho, entretanto o controle de quais enzimas farão parte do complexo ou quais estarão em sua forma livre (sobrenadante) ainda não foi elucidado.

Contrariamente ao que se tem reportado na literatura, a atividade mananólítica no presente trabalho foi apenas encontrada na fração sobrenadante, outros estudos mostram que isolados de *C.thermocellum* apresentam mananases em seu complexo enzimático, VIEIRA et al., (2007) purificou um celulosoma sintetizado por *C.thermocellum* ISOII que majoritariamente era formado por xilanases, entretanto apresentava considerável atividade mananólítica. GOLD & MARTIN, (2007) mostraram a presença da enzima *manA* (β mananase) como componente do complexo enzimático sintetizado pelo isolado ATCC 27450 quando cultivado na presença de avicel. A não detecção de atividade mananólítica na fração correspondente aos celulosomas (FRC) pode ocorrer pela menor presença de tais enzimas a um nível que sua detecção seja comprometida, ou por diferenças na produção e montagem dos complexos enzimáticos.

A produção de endoglicanases e xilanases tanto na forma de complexos aderidos ao material celulósico ou no sobrenadante foi reportada para diversos outros isolados quando cultivados em materiais das mais diversas origens como resíduos da cultura da cana-de-açúcar (BLUME et al., 2013), celulose e celobiose (WISE; AVIV, 1990), entretanto as atividades pectinolíticas foram por poucas vezes analisadas. O isolado B8 foi capaz de secretar enzimas com atividade pectinolítica tanto na fração rica em celulosomas quanto no sobrenadante, a presença de atividade pectinolítica na fração obtida do substrato residual (FRC) vai contra o que foi reportado por BLUME et al.,

(2013) e VIEIRA et al., (2007) em que a fração contendo celulosomas não apresentou atividade pectinolítica, entretanto o estudo do proteoma de *C.thermocellum* ATCC 27405 quando cultivado na presença de avicel mostra uma Endopoligalacturonosidase (64,50 kDa) como componente do complexo enzimático. RAMAN et al (2009) também mostraram para o celulosoma do isolado ATCC27405 a presença de uma poligalacturanosidase pertencente à família 11 (PL11) quando a bactéria foi cultivada na presença de misturas contendo celulose/pectina/xilana, e Switchgrass (*Panicum virgatum*) quimicamente tratada.

O perfil de proteínas (figura 11) obtido das amostras FRC e sobrenadante apresentam grande variação, a diferença entre as amostras é esperada uma vez que a fração rica em celulosomas trata-se de uma amostra com maior grau de pureza em que apenas as proteínas que de alguma forma tiveram capacidade de aderir à celulose estão presentes. A análise em SDS-PAGE (10%) para a amostra obtida do substrato residual (FRC) apresenta similaridade com o padrão de bandas proteicas mostradas por (RAMAN et al., 2009) em que a fração correspondente ao celulosoma do isolado 27450 quando crescido em variadas fontes de carbono apenas apresentou bandas dentro do intervalo de 250 a 50 kDa. Apesar do perfil em SDS-PAGE (10%) ser similar para as frações celulosomais obtidas nesse estudo e o que se tem reportado na literatura, é importante ressaltar a limitação da técnica na precisa identificação de similaridades entre os perfis proteicos, uma vez que a técnica apresenta resolução apenas pela massa das proteínas, sendo necessária a aplicação de técnicas mais avançadas com resolução do gel em uma segunda dimensão. Comparativamente ao perfil de proteínas advindas da amostra FRC, o sobrenadante apresentou proteínas com um padrão mais diversificado, resultado similar ao que foi previamente mostrado por nosso grupo de pesquisa quando cultivando o isolado B8 na presença de resíduos agroindustriais (HAMANN et al., 2015).

A análise da mistura comercial (MC) em SDS-PAGE (10%) mostrou poucas bandas em relação ao sobrenadante de *C.thermocellum* B8, e com maior concentração de proteínas entre 66 e 45 kDa (seguindo linha dos marcadores). O secretoma de alguns fungos filamentosos como *Emmericella nidulans* (SILVA et al., 2015) apresentam predominância de bandas proteicas nesse intervalo de massa, entretanto já é reportado na literatura a presença de proteínas envolvidas na degradação da parede celular vegetal com uma menor massa, como a xilanase de 21,50 kDa secretada por *Aspergillus oryzae* (DUARTE et al., 2012).

A atividade enzimática observada nos géis (figura 13) mostra uma multiplicidade de isoformas para xilanases e endoglicanases presentes na amostra sobrenadante e FRC. Para o gel de atividade xilanolítica foram observadas enzimas com massa entre 45 e acima de 116 kDa nas amostras FRC e sobrenadante, enquanto para a mistura comercial entre 25 e 45 kDa. Apesar das massas das isoformas de xilanases observadas nas amostras de *C.thermocellum* B8 estarem contidas em um mesmo intervalo é possível observar nove isoformas na amostra FRC enquanto o sobrenadante apresenta seis bandas mais aparentes, esse resultado está de acordo com a literatura em que xilanases compõe uma porção significativa das enzimas aderidas ao celulosoma (GOLD; MARTIN, 2007; VIEIRA et al., 2007). A banda com maior intensidade com massa aproximada de 66 kDa (linha do marcador) está de acordo com o estudo do proteoma celulosomal de *C.thermocellum* ATCC27405 (GOLD; MARTIN, 2007), quando a bactéria foi cultivada na presença de avicel a xilanase *XynC* (69,50 kDa) foi a mais abundante entre as hemicelulases. Ainda a respeito do gel de atividade xilanolítica, foi observado um menor número de bandas na amostra comercial, entretanto as mesmas apresentaram menor massa. Atualmente tem-se um interesse em xilanases de menor tamanho devido a sua capacidade de entrar em tecidos vegetais e realizar a despolimerização da hemicelulose em regiões menos acessíveis, essa característica as tornam atrativas para aplicações no branqueamento da polpa de celulose (DUARTE et al., 2012).

Similarmente ao que foi observado para o gel de atividade xilanolítica, os de endoglicanase mostraram uma diversidade de isoformas tanto para a amostra FRC quanto para a sobrenadante. A elevada quantidade de bandas com atividade contra celulose é uma característica típica de *C.thermocellum*, sendo muito do seu poder de degradação advindo da capacidade de secretar sinergicamente não apenas endoglucanases mas também exoglicanases. O padrão de massa observado para as celulases de *Clostridium thermocellum* B8 ocorre majoritariamente em um intervalo entre 66 e acima de 116 kDa, indicando enzimas com maior massa quando comparado com o gel de atividade xilanolítica. Dentre as proteínas com atividade celulolítica acima de 100 kDa existem a *CbhA* (137 kDa, exoglicanase) e *CelJ* (178 kDa, endoglicanase) (GOLD; MARTIN, 2007; RAMAN et al., 2009). A massa das celulases observadas para as misturas comerciais estão de acordo com as enzimas produzidas por fungos filamentosos em que usualmente se encontram abaixo de 50 kDa (GOYAL; GHOSH; EVELEIGH, 1991).

Dentre as principais características descritas para as enzimas de *C.thermocellum* a capacidade de atuar em elevadas temperaturas é uma das mais notáveis, no presente

estudo endoglicanases e xilanases tanto na forma de complexos enzimáticos (FRC) ou presentes no sobrenadante apresentaram maior atividade entre 50 e 70°C, resultado que vai de acordo com os relatos acerca da atividade celulolítica e hemicelulolítica de diferentes isolados (VIEIRA et al., 2007; WISE; AVIV, 1990). De forma geral, a atividade celulolítica esteve mais presente na faixa de 50 e 60°C enquanto atividades xilanolíticas entre 60 e 70°C, esses resultados também estão de acordo com as diferentes enzimas purificadas de *C.thermocellum* como a endoglicanase purificada de um complexo enzimático descrita por MORI, (1992) que obteve atividade máxima a 60°C, já para a proteína recombinante *celS* (exoglicanase) descrita por KRUUS et al., (1995) uma maior atividade foi observada a 70°C.

Apesar da produção comercial de celulasas ser obtida por meio do cultivo de fungos filamentosos mesofílicos como *Trichoderma reesei* e espécies de *Aspergillus*, a mistura comercial analisada mostrou uma atividade máxima para endoglicanases e xilanases similar aos de *C.thermocellum*. Algumas enzimas purificadas de *T.reesei* apresentaram temperatura máxima próxima às reportadas no presente trabalho para as misturas comerciais, CHEN; HAYN; ESTERBAUER (1992) mostraram que duas β -glicosidases de *T.reesei* apresentam temperatura máxima de atividade a 60°C, já MILANEZI, (2010) reportou xilanases produzidas por *Aspergillus niger* com máxima atividade entre 50 e 60°C.

O perfil do efeito da temperatura para pectinases obtidas das amostras produzida por *C.thermocellum* indicam uma atividade máxima a 50°C, resultado contrastante com o efeito da temperatura nas atividades de endoglicanase e xilanase. O efeito da temperatura nas atividades pectinolíticas produzidas pelo isolado B8 apresenta similaridades com pectinases recombinantes de *C.thermocellum* descritas por CHAKRABORTY et al., (2015) em que duas isoformas tiveram atividade máxima a 50°C, todavia no mesmo estudo é reportada uma terceira pectinase com atividade máxima a 60°C, indicando variabilidade entre as atividades pectinolíticas secretadas por *C.thermocellum*. A influência da temperatura na atividade pectinolítica observada para a mistura comercial apresenta perfil similar as de *C.thermocellum*, de fato, enzimas pectinolíticas usualmente são encontradas com atuação nessa faixa de temperatura (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

O efeito do pH nas diferentes atividades secretadas por *C.thermocellum* B8 assim como o efeito da temperatura tiveram um perfil similar entre as amostras FRC e o sobrenadante, resultado que foi previamente mostrado para xilanases produzidas pelo

isolado YS (WISE; AVIV, 1990), entretanto o efeito do pH nas atividades pectinolíticas foi diferente quando comparando as frações ricas em celulosomas e sobrenadante, FRC apresentou atividade majoritariamente em uma faixa mais básica de pH entre 8 e 9, já o sobrenadante uma ampla faixa de atuação com seu máximo em pH 7. Esse resultado pode ser explicado pelas características diferenciadas que cada pectinase de *C.thermocellum* apresenta, como mostrado por CHAKRABORTY et al., (2015), podendo essas estarem em diferentes concentrações nas amostras FRC e sobrenadante. O pH em que as atividades xilanolíticas e endoglicanases da mistura comercial apresentaram seu máximo foi oposto do observado para as amostras de *C.thermocellum* B8, sendo esse em uma faixa mais ácida, pH 3 e 4. A baixa atividade das enzimas secretadas por *C.thermocellum* em pH ácido estão de acordo com a literatura referente a outras bactérias provenientes do rumem, as quais são incapazes de degradar materiais lignocelulósicos em tal condição (RUSSELL; WILSON, 1996).

Apesar do perfil do efeito do pH ser similar entre as amostras produzidas por *C.thermocellum* B8, atualmente pouca atenção é dada a capacidade de apresentar atividade xilanolítica mesmo em pHs mais básicos como 8 e 9, essa característica juntamente com a elevada temperatura de atuação fazem com que essas enzimas sejam promissoras para aplicação na indústria do branqueamento da polpa de papel.

A estabilidade em diferentes pHs para xilanases e celulases produzidas por *C.thermocellum* ainda não foi explorada para estudos de degradação de componentes da parede celular vegetal, entretanto no presente estudo é observado que em pHs básicos as enzimas tanto na amostra FRC quanto no sobrenadante são mais resistentes, perdendo pouco de sua atividade após 24h a 60°C. Essa informação é relevante para o desenvolvimento de processos de hidrólise da biomassa lignocelulósica, uma vez que usualmente o mesmo é realizada em pH 5,0, pH no qual ocorre consideráveis perdas nas atividades das enzimas secretadas pelo isolado B8, indicando a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias quando aplicando proteínas secretadas por *C.thermocellum*. Apesar da acentuada perda de atividade em pHs ácidos, as atividades pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas foram mais estáveis que a mistura comercial em pHs 8 e 9. A excepcional termoestabilidade das enzimas produzidas por *C.thermocellum* foi reportada por nosso grupo para o isolado B8 (HAMANN et al., 2015), sendo essas mais estáveis a 50°C, havendo poucas perdas após mais de 10 dias.

A inativação/ativação de holocelulases por compostos fenólicos é um tópico que vem recebendo muita atenção, atualmente muito está sendo reportado na literatura da

atuação de tais componentes da lignina como inibidores e desativadores de celulases e xilanases principalmente aquelas oriundas de fungos filamentosos. No presente trabalho o efeito dos derivados de lignina ácido p-cumárico e ácido cafeico nas atividades holocelulolíticas foi avaliado, porém, inusitadamente foi notado uma grande ativação de pectinases na presença de ácido cafeico para a sobrenadante de *C.thermocellum* (figura 16), sendo esse o primeiro relato da influência de derivados da lignina em pectinases.

De forma geral, as enzimas comerciais sofreram menor inibição por compostos fenólicos derivados da lignina quando comparada com as amostras de *C.thermocellum*, resultado similar aos reportados por SILVA et al., (2015) em que é demonstrado uma xilanase secretadas por *Emericella nidulans* com elevada tolerância a compostos fenólicos derivados da lignina. Quando comparando as amostras produzidas por *C.thermocellum* é observado uma menor inibição por ácido p-cumárico nas enzimas presentes na amostras FRC em relação ao sobrenadante, o efeito sinérgico concedido pela junção de enzimas em um único complexo enzimático contribui para redução da inibição.

Além da inibição por compostos derivados da lignina, existe um crescente interesse na procura de microrganismos e enzimas que possam eficientemente degradar materiais lignocelulósicos sem o pré-tratamento químico (YANG et al., 2009). A sacarificação das fibras de Eucalipto oriundas do processo *Kraft* mostrou uma maior facilidade da amostra FRC em degradar um material que não foi deslignificado, sendo essa característica importante para ao desenvolvimento de misturar enzimáticas mais eficientes para sacarificação de materiais de maior recalcitrância e assim redução dos custos de produção do etanol de segunda geração. A maior facilidade com que a amostra FRC tem na hidrólise das fibras de Eucalipto ocorre não apenas pelo efeito sinérgico concedido pelo agrupamento de enzimas em complexos enzimáticos, mas também ao seu potencial xilanolítico, sendo que na polpa escura de Eucalipto a hemicelulose também está presente.

Quando comparando a eficiência na hidrólise das fibras amorfas da celulose (Sigmacell -100) a amostra oriunda do sobrenadante apresenta maior geração de açúcar redutor, esse resultado pode ser explicado pela capacidade do isolado B8 em secretar enzimas com atividade de β -glicosidase (HAMANN et al., 2015), atividade que não está presente na amostra FRC. A maior eficiência da amostra proveniente do sobrenadante em hidrolisar as fibras de celulose não foi correspondida na hidrólise da polpa escura de Eucalipto, sendo essa uma direta consequência de seu menor potencial xilanolítico em relação a amostra FRC assim como maior inibição por compostos derivados da lignina.

O aumento do açúcar redutor gerado quando a sacarificação foi realizada a 50°C ocorre pelo incremento na termoestabilidade das amostras, esse efeito já foi mostrado para uma *celC* de *C.thermocellum* quando aplicada na hidrólise de materiais lignocelulósicos (HAQ et al., 2015), a aplicação de enzimas em uma temperatura abaixo do seu ponto de máximo é uma estratégia de fácil aplicação e de elevado retorno na eficiência da sacarificação de materiais celulósicos.

Contrariamente aos diferentes níveis de açúcar redutor gerado durante a sacarificação tanto da celulose amorfa quanto das fibras de Eucalipto, a cinética de produção de açúcares redutores (figura 18) apresenta perfil similar para todas as condições estudadas, esse resultado ocorre pela rápida associação que enzimas holocelulolíticas realizam no substrato por meio de seus domínios de ligação a carboidratos e pela inibição dessas enzimas por seus produtos de hidrólise (QING; YANG; WYMAN, 2010), fator que as impede de mesmo havendo termoestabilidade de obter maiores incrementos na taxa de açúcar redutor gerado.

Além do perfil similar na cinética de produção de açúcares redutores, as análises em microscopia eletrônica de varredura das fibras de Eucalipto utilizadas como substrato para a sacarificação mostram similaridades na degradação, apresentando afinamento das extremidades das fibras e pouca degradação nas regiões internas (figuras 19,20,21,22). Esse padrão de degradação ocorre pela maior recalcitrância do material lignocelulósico que não foi deslignificado e nem passou por qualquer processo pós-indústria para redução do tamanho das partículas. Juntamente com a maior acessibilidade em que as extremidades das fibras podem apresentar a hidrólise enzimática, IMAI et al., (1998) mostram que extremidades de fibras celulósicas sofrem ataque por celobiohidrolases que apresentam processividade, mostrando um padrão de degradação similar ao observado no presente estudo.

Conclusões

- ❖ No presente estudo, *C.thermocellum* B8 foi capaz de crescer na presença de avicel e secretar diferentes atividades enzimáticas como endoglicanases, xilanases e pectinases.
- ❖ Comparativamente, as proteínas secretadas por *C.thermocellum* e a mistura comercial apresentaram um perfil similar no efeito da temperatura para atividades holocelulolíticas, entretanto, um perfil completamente diferente foi observado para o efeito do pH.
- ❖ Amostra comercial apresentou menor estabilidade das atividades em diferentes pHs, enquanto amostras produzidas por *C.thermocellum* apresentaram excepcional estabilidade em pHs básicos.
- ❖ Comparativamente a amostra comercial, as amostras produzidas por *C.thermocellum* B8 foram mais inibidas por compostos fenólicos, com exceção da atividade pectinolítica presente no sobrenadante que foi ativada na presença de ácido cafeico.
- ❖ Experimentos de sacarificação mostram que a amostra FRC tem maior potencial para degradar fibras de Eucalipto.
- ❖ Fibras de Eucalipto apresentam maior acessibilidade na terminação, indicando a necessidade da redução do tamanho das partículas para possibilitar maior acessibilidades das enzimas ao substrato.
- ❖ A polpa escura, mesmo não passando por um tratamento de branqueamento mostrou maior susceptibilidade à hidrólise enzimática pela amostra FRC, indicando um potencial para a indústria do etanol de segunda geração.
- ❖ Xilanases produzidas por *C.thermocellum* B8 apresentaram características atrativas para aplicação no processo industrial de branqueamento da polpa de celulose.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALDE, M. et al. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281–287, 2006.
- ALFANI, F. et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 184–192, 2000.
- APPLICATIONS, E. Expansion of Sugarcane Ethanol Production in Brazil : Environmental and Social Challenges Authors (s): Luiz A . Martinelli and Solange Filoso Published by : Wiley Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/40062197> Accessed : 24-03-2016 05 : 01 UTC Your u. v. 18, n. 4, p. 885–898, 2016.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 353–368, 1960.
- BAYER, E. A. et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 5, p. 548–557, 1998.
- BAYER, E. A.; LAMED, R.; HIMMEL, M. E. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 237–245, 2007.
- BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 2001.
- BLUME, L. R. **Avaliação e caracterização da atividade holocelulolítica de isolados de Clostridium thermocellum**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2011.
- BLUME, L. R. et al. Characterization of Clostridium thermocellum Isolates Grown on Cellulose and Sugarcane Bagasse. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 763–775, 2013.
- BOSE, B. Global Warming: Energy, Environmental Pollution, and the Impact of Power Electronics. **IEEE Industrial Electronics Magazine**, v. 4, n. 1, p. 6–17, 2010.
- 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**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- CAROLE, T.; PELLEGRINO, J.; PASTER, M. Opportunities in the Industrial Biobased Products Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, n. 3, p. 871–885, 2004.
- CHAKRABORTY, S. et al. Role of pectinolytic enzymes identified in Clostridium thermocellum cellulosome. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2015.
- CHAMARRO, E.; MARCO, A.; ESPLUGAS, S. Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. **Water Research**, v. 35, n. 4, p. 1047–1051, 2001.
- CHAUHAN, P. S. et al. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1817–1830, 2012.
- CHEN, H.; HAYN, M.; ESTERBAUER, H. Purification and characterization of two extracellular beta-glucosidases from Trichoderma reesei. **Biochimica et biophysica**

acta, v. 1121, p. 54–60, 1992.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

DE SIQUEIRA, F. G. et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20–26, 2010.

DE SOUZA MOREIRA, L. R. et al. Xylan-degrading enzymes from *Aspergillus terreus*: Physicochemical features and functional studies on hydrolysis of cellulose pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, n. June, p. 700–708, 2015.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose Degradation By Oxidative Enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–8, 2012.

DUARTE, G. et al. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 754–772, 2012.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; FUSE, G. Relationship between degradation of wood and production of H₂O₂-producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. **Wood Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 1989.

FELIX, C. R.; LJUNGDAHL, L. G. The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. **Annual review of microbiology**, v. 47, p. 791–819, 1993.

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

FREIER, D.; MOTHERSHED, C. P.; WIEGEL, J. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 1, p. 204–211, 1988.

GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P. Bacterial cellulases and xylanases. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 2, p. 187–194, 1993.

GNANSOUNOU, E. Assessing the energy vulnerability: Case of industrialised countries. **Energy Policy**, v. 36, n. 10, p. 3734–3744, 2008.

GOLD, N. D.; MARTIN, V. J. J. Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 19, p. 6787–6795, 2007.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 37–50, 1991.

GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 820–831, 2005.

- GUGLIELMI, G.; BÉGUIN, P. Cellulase and hemicellulase genes of *Clostridium thermocellum* from five independent collections contain few overlaps and are widely scattered across the chromosome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161, n. 1, p. 209–215, 1998.
- GUNKEL, G. et al. Sugar cane industry as a source of water pollution - Case study on the situation in Ipojuca river, Pernambuco, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 180, n. 1-4, p. 261–269, 2007.
- HALL, J. et al. Brazilian biofuels and social exclusion: established and concentrated ethanol versus emerging and dispersed biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, n. SUPPL. 1, 2009.
- HAMANN, P. R. V. et al. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 97–105, 2015.
- HAQ, I. UL et al. CenC, a multidomain thermostable GH9 processive endoglucanase from *Clostridium thermocellum*: cloning, characterization and saccharification studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1699–1710, 2015.
- HEREDIA, A.; JIMÉNEZ, A.; GUILLÉNN, R. Composition of plant cell walls. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 200, n. 1, p. 24–31, 1995.
- HIRA, A.; DE OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, n. 6, p. 2450–2456, 2009.
- IÇÖZ, E. et al. Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 1, p. 1–7, 2009.
- IMAI, T. et al. Unidirectional processive action of cellobiohydrolase Cel7A on Valonia cellulose microcrystals. **FEBS Letters**, v. 432, n. 3, p. 113–116, 1998.
- JACKSON, M. G. Review article: The alkali treatment of straws. **Animal Feed Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 105–130, 1977.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.
- KAHEL-RAIFER, H. et al. The unique set of putative membrane-associated anti-?? factors in *Clostridium thermocellum* suggests a novel extracellular carbohydrate-sensing mechanism involved in gene regulation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 308, n. 1, p. 84–93, 2010.
- KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215–227, 2001.
- KELLER, F. A; HAMILTON, J. E.; NGUYEN, Q. A. Microbial pretreatment of biomass: potential for reducing severity of thermochemical biomass pretreatment. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 105 -108, n. 1, p. 27–41, 2003.
- KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 776–783, 1993.
- KRUUS, K. et al. Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, a major cellulosome component. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 6, p. 1641–

1644, 1995.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

LEGGIO, L. LO; WELNER, D.; DE MARIA, L. a Structural Overview of Gh61 Proteins – Fungal Cellulose Degrading Polysaccharide Monooxygenases. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–8, 2012.

LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnology Letters**, n. March 2016, 2015.

LJUNGDAHL, L. G. et al. A yellow affinity substance involved in the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum*. **Current Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 195–199, 1983.

LÜ, Y. et al. The effect of temperature on the structure and function of a cellulose-degrading microbial community. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 2, p. 219–233, 2012.

LYND, L. R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577–583, 2005.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–560, 2008.

MCALOON, A. et al. Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic. **Agriculture**, n. October, p. 44, 2000.

MILANEZI, N. V. G. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENDO-1,4- β -XILANASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* COM CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE INDUSTRIAL. p. 82, 2010.

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

MOREIRA, L. R. D. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus* : Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos.** [s.l: s.n.].

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165–178, 2008.

MORI, Y. Purification and characterization of an endoglucanase from the cellulosome (multicomponent cellulase complex) of *Clostridium thermocellum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, n. June, p. 1199–1203, 1992.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ, I. et al. Decoding biomass-sensing regulons of *clostridium thermocellum* alternative sigma-I factors in a heterologous *bacillus subtilis* host system. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.

NATAF, Y. et al. *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes are regulated by extracytoplasmic polysaccharides via alternative sigma factors. v. 107, n. 43, 2010.

- NG, T. K.; BENBASSAT, A.; ZEIKUS, J. G. Ethanol-Production by Thermophilic Bacteria - Fermentation of Cellulosic Substrates by Cocultures of Clostridium-Thermocellum and Clostridium-Thermohydrosulfuricum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1337–1343, 1981.
- NG, T. K.; BEN-BASSAT, A.; ZEIKUS, J. G. Ethanol production by thermophilic bacteria: Fermentation of cellulosic substrates by cocultures of Clostridium thermocellum and Clostridium thermohydrosulfuricum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1337–1343, 1981.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 7, 2008.
- QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9624–9630, 2010.
- RAMAN, B. et al. Impact of Pretreated Switchgrass and Biomass Carbohydrates on Clostridium thermocellum ATCC 27405 Cellulosome Composition: A Quantitative Proteomic Analysis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.
- REDDY, B. V. S.; RAMESH, S.; REDDY, P. S. Sweet Sorghum – A potential alternate raw material for Bio-ethanol and bio- energy. **SAT eJournal**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2005.
- ROUCHES, E. et al. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. in press, p. 179–198, 2016.
- RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of dairy science**, v. 79, n. 8, p. 1503–9, 1996.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.
- SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 816–822, 2005.
- SCHMER, M. R. et al. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 464–469, 2008.
- SCIENCES, B.; POLYTECHNIC, T.; ST, W. The Role of Hydrogen Peroxide in the Degradation of Crystalline Cellulose by Basidiomycete Fungi. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 1989, p. 2799–2806, 1989.
- SHIKIDA, P. F. A. et al. Agroindústria canavieira e crescimento econômico local. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 47, n. 3, p. 569–600, 2009.
- SILVA, C. DE O. G. et al. GH11 xylanase from Emericella nidulans with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 13, p. 1–8, 2015.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review.** [s.l: s.n.]. v. 9
- TANG, H.; OU, J. F.; ZHU, M. J. Development of a quantitative real-time PCR assay for direct detection of growth of cellulose-degrading bacterium Clostridium

- thermocellum in lignocellulosic degradation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1333–1344, 2015.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.
- VALLS, C.; RONCERO, M. B. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 2032–2039, 2009.
- VAN ZYL, W. H. et al. Fungal α -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1203–1213, 2010.
- VIEIRA, W. B. et al. Production and Characterization of an Enzyme Complex From a New Strain of Clostridium Thermocellum With Emphasis on Its Xylanase Activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 237–242, 2007.
- VIKARI L, TENAKANEN M, S. A. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. **Biotechnology | Volume 10**, n. March, p. 523–46, 2001.
- WAEONUKUL, R. Paenibacillus curdlanolyticus strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**, p. 369–394, 2013.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006.
- WILLKE, T.; VORLOP, K. D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 131–142, 2004.
- WILSON, C. M. et al. Global transcriptome analysis of Clostridium thermocellum ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated Populus and switchgrass. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 179, 2013.
- WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1109–1117, 2003.
- WISE, S.; AVIV, T. Relationship of Cellulosomal and Noncellulosomal Xylanases of Clostridium thermocellum to Cellulose-Degrading Enzymes. v. 172, n. 10, p. 6098–6105, 1990.
- WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153–157, 2007.
- Y, H. K. R. et al. Coculture fermentation of banana agro-waste to ethanol by cellulolytic thermophilic Clostridium thermocellum CT2. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 13, p. 1926–1934, 2010.
- YAN, J. et al. Variability and adaptability of Miscanthus species evaluated for energy crop domestication. **GCB Bioenergy**, v. 4, n. 1, p. 49–60, 2012.
- YANG, S. J. et al. Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment, by the thermophilic anaerobe “Anaerocellum thermophilum” DSM 6725. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4762–4769, 2009.

YOON, H. H.; WU, Z. W.; LEE, Y. Y. Ammonia-recycled percolation process for pretreatment of biomass feedstock. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51-52, n. 1, p. 5–19, 1995.

ZAMOST, B. L.; NIELSEN, H. K.; STARNES, R. L. Thermostable enzymes for industrial applications. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 71–81, 1991.

ZHANG, Z. et al. Food versus fuel: What do prices tell us? **Energy Policy**, v. 38, n. 1, p. 445–451, 2010.

ZIMMERMANN, W. Degradation of lignin by bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2-3, p. 119–130, 1990.

Anexos

1-Artigo “Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes”. Publicado como primeiro autor na Revista *International Biodeterioration and Biodegradation*. 20 de Agosto de 2015.

2-Artigo “Characterization of *Clostridium thermocellum* growth on different carbon sources and analysis of fermentative and cellulosomal gene expression patterns”. Artigo como colaborador aceito com modificações na revista *Journal of industrial biotechnology and microbiology*. Junho 2016.

3- Artigo “A complete proteomic description of cellulosomes produced by *Clostridium thermocellum* isolated from goat rumen and their characterization aiming lignocellulosic biomasses degradation” Artigo com colaborador sob revisão na revista *Enzyme and microbial technology*. Junho 2016.



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes



Pedro Ricardo V. Hamann^a, Dayane L. Serpa^a, Amanda Souza Barreto da Cunha^a,
Brenda R. de Camargo^a, Karen Ofuji Osiro^a, Marcelo Valle de Sousa^b, Carlos R. Felix^a,
Robert N.G. Miller^c, Eliane F. Noronha^{a,*}

^a Laboratory of Enzymology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^b Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^c Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2015

Received in revised form

19 August 2015

Accepted 20 August 2015

Available online 7 September 2015

Keywords:

Clostridium thermocellum

Holocellulases

Agro-industrial wastes

Biofuel

ABSTRACT

Plant cell wall represents an important source of fermentable sugars for second generation bioethanol production. However, cellulosic biomass hydrolysis still is a bottleneck to bioethanol production in an efficient and low cost process. Thermophilic bacteria have been studied as a source of cellulolytic enzymes for cellulosic biomass deconstruction, as their enzymes present unique features compatible with current industrial process conditions. The present study was carried out to evaluate the use of different agro-industrial wastes as suitable carbon sources for growth and enzyme secretion by a strain of *Clostridium thermocellum* isolated from goat rumen. *C. thermocellum* B8 was able to grow on/degrade microcrystalline cellulose, Sugar cane bagasse/Straw and Cotton waste, and produced different sets of cellulases and hemicellulases in their presence. The enzymatic mixtures produced by *C. thermocellum* (B8) showed activities over a broad range of temperatures (50–70 °C). Highest values were obtained between 60 and 70 °C, at a pH range from 5 to 7, decreasing at alkaline pH values. In addition, enzymes displayed thermostability, with CMCase and xylanase activities maintaining maximum values over 12 days at 50 °C.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The possibility of exhaustion of fossil fuels sources, together with associated environmental pollution is driving world energy policies towards the development of alternative energy sources (Goldemberg, 2008). In this context, there is a global interest in the development of industrial processes to produce biofuels from vegetal biomasses such as natural oils, starch, sucrose and lignocelluloses. The use of lignocellulosic biomass as a fuel source has emerged from a neglected potential energy source to a promising alternative for bioethanol production (second generation). Several tons of this type of biomass, which includes sugar cane straw/bagasse, cotton waste, corn stover and rice straw, are produced daily and accumulated as waste by different agricultural activities.

However, in order to develop an industrial process based on lignocellulosic biomass with a competitive price in the fuel market, bottlenecks need to be overcome.

Raw lignocellulosic materials are composed of cellulose, hemicellulose, pectin and lignin (45–60%, 20–40%, 5–10% and 10–40%, respectively), which are mainly found in plants as cell wall components (Hadar et al., 1993; Howard et al., 2004; Kumar et al., 2008). Their complex organization has resulted in a remarkable resistance against mechanical forces and recalcitrance to enzymatic hydrolysis. As such, the complete deconstruction of the plant cell wall requires a set of glycosyl hydrolases (cellulases, xylanases, pectinases) and lignin modifying enzymes, together with accessory proteins such as disbranching enzymes and swollenin. This resistant nature of raw lignocellulosic materials hampers its complete hydrolysis and has a direct negative impact on yield and production costs of second generation bioethanol.

Historically, bacteria haven't been explored as a source of lignocellulolytic enzymes, although more recently some genera

* Corresponding author. Enzymology Laboratory, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brazil.

E-mail address: enoronha@unb.br (E.F. Noronha).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.013>

0964-8305/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology
Characterization of Clostridium thermocellum growth on different carbon sources and analysis of fermentative and cellulosomal gene expression patterns
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JIMB-D-16-00187R1	
Full Title:	Characterization of Clostridium thermocellum growth on different carbon sources and analysis of fermentative and cellulosomal gene expression patterns	
Article Type:	Original Paper	
Section/Category:	Biocatalysis	
Corresponding Author:	Eliane Noronha, PhD University of Brasilia BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of Brasilia	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Vanessa Oliveira Leitão, Master	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Vanessa Oliveira Leitão, Master	
	Eliane Noronha, PhD	
	Brenda Rabello de Camargo, Master	
	Pedro Ricardo Vieira Hamann	
	Andrei Stecca Steindorff, PhD	
	Betania Ferraz Quirino, PhD	
	Marcelo Valle de Sousa, PhD	
	Cirano José Ulhoa, PhD	
	Carlos Roberto Felix, PhD	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Universidade de Brasília	Dr. Eliane Noronha
	CNPq	Dr. Eliane Noronha
	CAPES	Dr. Eliane Noronha
	FAPDF	Dr. Eliane Noronha
	Embrapa	Dr Betania Ferraz Quirino
	FINEP	Dr. Eliane Noronha
Abstract:	<p>The plant cell wall is a source of fermentable sugars in second generation bioethanol production. However, cellulosic biomass hydrolysis remains an obstacle to bioethanol production in an efficient and low-cost process. Clostridium thermocellum has been studied as a model organism able to produce enzymatic blends that efficiently degrade lignocellulosic biomass, and also as a fermentative microorganism in a consolidated process for the conversion of lignocellulose to bioethanol. In this study, a C. thermocellum strain (designated B8) isolated from goat rumen was characterized for its ability to grow on sugarcane straw and cotton waste, and to produce cellulosomes. We also evaluated C. thermocellum gene expression control in the presence of complex lignocellulosic biomasses. This isolate is capable of growing in the presence of</p>	

Cover Letter

A complete proteomic description of cellulosomes produced by *Clostridium thermocellum* isolated from goat rumen and their characterization aiming lignocellulosic biomasses degradation

Karen O. Osiro^a; Rachel Satomi^a; Brenda R. de Camargo^a; Pedro Ricardo V. Hamann^a; Jéssica Pinheiro Silva^a; Marcelo Valle de Sousa^b; Betania F. Quirino^c; Elaine N. Aquino^a; Carlos R. Felix^a; André Melro Murad^d and Eliane F. Noronha^{a*}.

^aLaboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

^bLaboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^cEmbrapa-Agroenergy, Parque Estação Biológica, s/n, Brasília, Brazil

^dEmbrapa Genetic Resources and Biotechnology, Laboratory of Synthetic Biology,

*Corresponding author:

PhD. Eliane Ferreira Noronha

Enzymology Laboratory, University of Brasilia (UnB), 70910-900, Brazil

e-mail: enoronha@unb.br. Tel: +55 61 31072952