



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Enzimologia

Produção, caracterização e purificação de complexos enzimáticos holocelulolíticos produzidos por *Clostridium thermocellum* (Isolado B8) na presença de substratos lignocelulósicos

BRENDA RABELLO DE CAMARGO

2013

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Enzimologia

Produção, caracterização e purificação de complexos enzimáticos
holocelulolíticos produzidos por *Clostridium. thermocellum* (Isolado
B8) na presença de substratos lignocelulósicos

BRENDA RABELLO DE CAMARGO

Orientador: Prof. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
graduação em Biologia Molecular da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília-DF 2013

Dedico aos meus pais que muito batalham na vida e acreditam na sinceridade do meu sonho, e à minha irmã por estar ao meu lado sempre.

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora que vai na frente em todos os caminhos que tenho que seguir.

À Deus pela proteção e fé nas horas difíceis.

À minha família que é o alicerce na minha vida em todas as decisões.

À minha orientadora Dra Eliane Ferreira Noronha por me aceitar como aluna e estar presente em cada passo da pesquisa.

À minha tia Magali, doutora da família por mostrar que é possível.

Às técnicas do laboratório Margarete Lima e Marísia Cortes pela ajuda, café e horas descontraídas.

À Priscila Lima, Jackeline Leite, Karen Osiro e Fracilene Silva que me acolheram no laboratório e foram grandes amigas.

Ao Pedro Hamann, Amanda Barreto, Jéssica Pinheiro pela ajuda nos experimentos e por toda amizade.

Aos companheiros de bancada, comida, e conversa, Paula Jaramilo, Antoniele, Caio Gorgulho, Helder, Gilvan, Bárbara, Aline e Leonora Rios.

Às amigas Juliana Prado, Ângela Batista, Mariana Mota, Uiara Cavalcante, Renata Bomfim e Fabiana Oliveira pela amizade, companheirismo, e alegria.

Às grandes amigas de tantos anos pela amizade, Saiuri Matuoca, Liu Moreira, Heloísa Guelpeli, Mariana Salgado e Camila Thomazi.

Às minhas eternas amigas de Viçosa, Carla Almeida, Daniele Alves, Michelle Neto, e Ana Bicalho, pela torcida mesmo estando distante.

Aos professores Carlos Roberto Félix e Edivaldo Ximenes pelos ensinamentos.

Aos Professores da Biologia Molecular que me deram aulas e compartilharam conhecimento.

À Secretaria do Programa de Pós Graduação da Biologia Molecular por toda a ajuda necessária.

Aos colegas de Mestrado e disciplinas pelo grande aprendizado durante as discussões.

*"Quem cultiva a semente do amor
Segue em frente não se apavora
Se na vida encontrar dissabor
Vai saber esperar sua hora"*

Resumo

A busca por fontes de combustíveis renováveis tem ocupado o centro de discussões em função da necessidade da redução da poluição proveniente da queima de combustíveis fósseis e a uma adequação da matriz energética atual. No Brasil, a proposta é utilizar biomassa vegetal para a produção de bioetanol de segunda geração produzido a partir de resíduos agroindustriais (bagaço e palha de cana de açúcar e piolho de algodão), sendo que uma das etapas limitantes para esse fim é a hidrólise desta biomassa para produção de açúcares fermentáveis. A linhagem de *Clostridium thermocellum* (Isolado B8) isolada de rúmen de caprinos da raça Moxotó foi caracterizada como capaz de hidrolisar as biomassas citadas e de secretar enzimas e complexos enzimáticos (celulossomas) com atividade de carboximetilcelulase (CMCase) e xilanase. Estas atividades foram detectadas nos sobrenadantes das culturas e também nas frações de proteínas celulossomais, eluídas do substrato residual (FES) e recuperadas do sobrenadante por adsorção a celulose cristalina (FEC).. A fração de proteínas celulossomais eluídas dos substratos palha de cana de açúcar, bagaço de cana-de-açúcar e piolho de algodão, denominadas FES, apresentaram valores mais significativos de atividade de CMCase na faixa de pH de 5,0 a 7,0 e de xilanase de 6,0, e valores de temperatura ótima na faixa entre 65°C e 70°C para CMCase e xilanase. A fração de proteínas celulossomais de palha de cana apresentaram uma média de 80% de retenção da sua atividade de xilanase e CMCase quando incubadas a 70°C por 6 horas. As amostras FEC e FES das fontes de carbono utilizadas apresentaram perfis semelhantes de bandas protéicas pela análise de atividade em gel, sendo observadas 6 bandas com atividade de CMCase e 7 bandas com atividade de xilanase. As amostras FES das diferentes fontes de carbono fracionadas em coluna de exclusão molecular apresentaram perfis cromatográficos diferentes com relação ao volume de eluição dos picos protéicos com massa molecular estimada acima de 2 MDa, e em análise por DLS (Espalhamento de luz dinâmica) foi estimado uma proteína com a massa estimada de 6,5MDa para a amostra de bagaço de cana e palha de cana. Duas proteínas presentes na fração de palha de cana foram identificadas por espectrometria de massa: a proteína estrutural (CipA) e a exoglucanase (CelS). Estes resultados indicam o potencial de utilização do isolado B8 como fonte de atividades enzimáticas holocelulolíticas com propriedades cinéticas adequadas para aplicação industrial. O isolado B8 secreta celulossoma quando cultivado em diferentes fontes de carbono e estes apresentam constituições distintas podendo contribuir para o desenvolvimento de processo industrial para hidrólise enzimática destes resíduos .

Abstract

The search for sources of renewable fuels has been at the center of discussions around the need of reducing pollution from the burning of fossil fuels and the adequacy of current energy matrix. In Brazil, the proposal is to use biomass for the production of second generation bioethanol produced from agricultural and industrial waste (sugar cane straw and bagasse, and cotton louse), and one of the limiting steps for this purpose is the hydrolysis of this biomass for production of fermentable sugars. The strain of *Clostridium thermocellum* (Isolated B8) isolated from the rumen of Moxotó goats was characterized as capable of hydrolyzing the biomass cited and secrete enzymes and enzyme complexes (Cellulosomes) with carboxymethylcellulase activity (CMCase) and xylanase. These activities were detected in the culture supernatants and also in cellulosomal protein fractions, eluted from the residual substrate (FES) and recovered from the supernatant by adsorption crystalline cellulose (FEC). The fraction eluted cellulosomal protein substrates of sugar cane straw, sugar cane bagasse and cotton louse, called FES, showed more significant CMCase activity at pH 5.0 to 7.0 and xylanase of 6.0 and optimum temperature values in the range between 65°C and 70°C for CMCase and xylanase. The protein fraction cellulosomal of straw showed a mean 80% retention of its CMCase and xylanase activities when incubated at 70°C for 6 hours. Samples FEC FES from the carbon sources used showed similar profiles of protein bands by activity gel analysis, were observed 6 bands with CMCase activity and 7 bands with xylanase activity. The samples FES of different carbon sources fractionated on a column of molecular exclusion showed different chromatographic profiles with respect to the elution volume of the protein peaks with estimated molecular weight above 2 MDa. Pooled fractions analyzed by DLS (dynamic light scattering) peaks were detected consisting of high molecular weight proteins, with the estimated mass of 6.5 MDa for the sample of bagasse and cane straw. Two proteins present in the fraction of straw were identified by mass spectrometry: the structural protein (CipA) and exoglucanase (CelS). These results indicate the potential use of isolated B8 as a source of xylanases and CMCases activities with kinetic properties suitable for industrial applying. The isolated B8 releases cellulosome when grown on different carbon sources and these have different constitutions and could contribute to the development of industrial processes for Enzymatic hydrolysis of these residues.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1.** Repartição da oferta interna de energia no Brasil em porcentagem ano de 2012 (Balanço energético nacional, EPE, 2012) 16
- Figura 2.** Composição dos resíduos industriais da cana-de-açúcar (da Silva *et al.*, 2010) e piolho de algodão (IF goiano, GO). 18
- Figura 3.** Estrutura cristalina da celulose mostrando os níveis de organização das fibras de celulose Figura modificada de Ramos (Ramos 2003) 19
- Figura 4.** Principais enzimas responsáveis pela degradação do polímero de celulose. Figura modificada de Lynd *et al.* (2002) 21
- Figura 5.** Esquema das principais enzimas atuantes da degradação da hemicelulose (Tuomela, *et al.*, 2000). 22
- Figura 6.** Esquema modificado de (A *et al.*, 2012) São demonstrados os processos SHF (Sacarificação e fermentação separados, SSF (Sacarificação e fermentação simultânea), e CBP (Bioprocesso consolidado)..... 23
- Figura 7.** Figura esquemática do celulosoma de *Clostridium thermocellum* modificada de Bayer (Bayer *et al.*, 2008). Nessa figura está sendo demonstrado em amarelo a proteína estrutural CipA que contém 9 coesinas do tipo I numeradas de 1 a 9. As 9 enzimas indicadas em rosa por sua parte catalítica e em amarelo as regiões dockerinas tipo I. Na proteína estrutural CipA, em azul está demonstrado a dockerina do tipo II que se liga a coesina do tipo II em azul presente na proteína âncora SdbA. A proteína âncora SdbA se liga a célula bacteriana através do domínio SLH. 28
- Figura 8.** Figura esquemática do celulosoma de *Clostridium thermocellum* modificada de Bayer (Bayer *et al.*, 2008). Na figura temos proteína estrutural CipA que pode se ligar nos domínios coesinas do tipo II demonstrados na Orf2p, em que o complexo pode chegar 18 enzimas, ou então se ligar na proteína OlpB que contém 7 coesinas, chegando a conter 63 enzimas..... 28
- Figura 9.** Meio de cultura anaeróbico contendo bagaço de cana como fonte de carbono. 33
- Figura 10.** Esquema do método de preparo das amostras FES e FEC, obtendo assim proteínas que se ligaram ao substrato e aquelas que ficaram no sobrenadante, sendo capturada pela adição de celulose. 35
- Figura 11.** Quantificação de açúcar redutor gerado ao longo do crescimento bacteriano usando unicamente as biomassas como fonte de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x) 43

Figura 12. Quantificação de proteínas em µg/mL do sobrenadante nos diferentes dias de incubação de <i>C.thermocellum</i> nas diferentes fontes de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x).	44
Figura 13. Atividade enzimática de CMCCase ao longo do crescimento bacteriano usando unicamente as biomassas como fonte de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x)	45
Figura 14. Atividade enzimática de xilanase ao longo do crescimento bacteriano usando unicamente as biomassas como fonte de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x)	46
Figura 15 SDS-PAGE 12% das amostras FES e FEC obtidas de 96 horas de crescimento. 1- FES da palha (extrato bruto). 2- FES da palha (concentrado). 3-FEC da palha (extrato bruto). 4-FEC da palha (concentrado). 5- FES do bagaço (extrato bruto). 6- FES do bagaço (concentrado). 7- FEC do bagaço (extrato bruto). 8- FEC do bagaço (concentrado). Foram utilizados 500µL de amostra de cada fração. As setas vermelhas apontam bandas coincidentes para todas as amostras.A seta verde aponta bandas presentes apenas nas amostras 1,3,5 e 6.	48
Figura 16. Zimograma em SDS-PAGE 10%. 1- FES da palha 1(extrato bruto). 2- FES da palha 1 (concentrado). 3-FEC da palha 1(extrato bruto). 4-FEC da palha (concentrado). 5-FES da palha 2(extrato bruto). 6- FES da palha 2 (concentrado). 7-FEC da palha 2(extrato bruto). 8-FEC da palha2 (concentrado). 9- FES do bagaço (extrato bruto). 10- FES do bagaço (concentrado).11- FEC do bagaço (extrato bruto). 12- FEC do bagaço (concentrado). 13-FES do piolho de algodão(extrato bruto). 14- FES do piolho de algodão (concentrado).15- FEC do piolho de algodão (extrato bruto). O primeiro zimograma analisa as atividades de xilanase e o segundo CMCCase. Foram utilizados 500µL de amostra para cada fração.	49
Figura 17. Atividades enzimáticas de CMCCase (■) e xilanase (▲) nos respectivos pHs de 3,0 a 9,0 das amostras concentrada FES de palha de cana (A), bagaço de cana (B), e piolho de algodão (C).	51
Figura 18. Atividades enzimáticas de CMCCase (■) e xilanase (▲)das amostras concentrada FES de palha de cana (A), bagaço de cana (B), e piolho de algodão (C) em diferentes temperaturas.	52
Figura 19. Atividades enzimáticas de CMCCase de Piolho de algodão (•) , Palha de cana (▲), Bagaço de cana (■) das amostras FES concentradas a 70°C. ..	53
Figura 20. Atividades enzimáticas de xilanase de Piolho de algodão (•) , Palha de cana (▲), Bagaço de cana (■) das amostras FES concentradas a 70°C. ..	54
Figura 21. Curva de Michaelis-Menten utilizando substrato xilana oat spelt e amostra FES concentrada de palha de cana.	55
Figura 22. Gráfico de Lineweaver-Burk. Dados gerados a partir do gráfico de Michaelis Menten. $R_2= 0,948$	56
Figura 23. Análise das amostras concentradas de FES(Fração eluída do substrato) e FEC (Fração eluída da celulose) da atividade de CMCCase e	

xilanase. FESP e FECP(Palha de cana), FESB e FECB (Bagaço de cana), FESPi e FECPi (Piolho de algodão).....	60
Figura 24. Cromatograma do mix de marcadores e blue dextran. 1- Blue dextran 2- tiroglobulina 3-gama-globulina 4-ovoalbumina 5-mioglobulina 6- vitamina B12.....	61
Figura 25. Cromatograma demonstrando as atividades de CMCCase e xilanase da amostra de palha de cana de açúcar da FES palha de cana 1 (A), bagaço de cana 1(B) e piolho de cana 1 (C). Foram coletadas 2 mL por fração para palha e bagaço e 4 mL para piolho. Atividades enzimáticas de xilanase (■) e CMCCase (▲), e A280 (---).	62
Figura 26. Figura 9. SDS-Page (12%) das frações eluídas na cromatografia de FES palha de cana 1 (A), bagaço de cana (B) e piolho de algodão (C). Foram utilizados 500µL de amostra para cada fração.	63
Figura 27. Análise pelo teste de Espalhamento dinâmico de luz pelo <i>software</i> Zetasizer do pool da amostra de bagaço de cana de açúcar após a cromatografia	64
Figura 28. Análise pelo teste de Espalhamento dinâmico de luz pelo <i>software</i>	65
Figura 29. SDS-page 10 % das frações unidas do pool de palha de cana (1) e bagaço de cana (2) proveniente da cromatografia de exclusão. Foram utilizadas 10 µg de proteína para preparo do gel. Os números de 1 a 11 indicam os spots cortados do gel para análise.	67

TABELAS

Tabela 1. Atividade específica das enzimas CMCases e xilanases do sobrenadante no período de 2 e 4 dias de cultivo para as amostras de bagaço de cana, palha de cana, piolho de algodão e celulose.....	46
Tabela 2. Comparação das atividades de CMCases e xilanases para proteínas eluídas do substrato residual (FES) de culturas de <i>C. thermocellum</i> contendo palha de cana, bagaço de cana, piolho de algodão e celulose. Unidade enzimática corresponde a µg/min.....	47
Tabela 3. Tabela demonstrando os passos de purificação de obtenção das mostras FES (Fração eluída do substrato) e FEC(Fração eluída da celulose). P- palha de cana, B- bagaço de cana, e Pi- Piolho de algodão. . EB- extrato bruto (antes da concentração) EC-extrato concentrado (depois da concentração). 58	
Tabela 4. Tabela demonstrando os passos de purificação de obtenção das mostras FES (Fração eluída do substrato) e FEC(Fração eluída da celulose). P- palha de cana, B- bagaço de cana, e Pi- Piolho de algodão. EB- extrato bruto (antes da concentração) EC-extrato concentrado (depois da concentração). 59	

Tabela 5. identificação das proteínas a partir do perfil unidimensional das frações eluídas do cromatograma de palha de cana.....	66
Tabela 6. Caracterização das FES (Fração eluída do substrato) para as amostras de bagaço de cana, palha de cana e piolho de algodão.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Bovine Serum albumini albumina sérica bovina
CMC	Carboximetilcelulose
DHB	<i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i> / ácido 2,5-di-hidroxibenzóico
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> / Espalhamento de luz dinâmico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DTT	ditiotreitól
FEC	Proteínas eluídas do substrato
FEC	Proteínas eluídas da celulose
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> / Desorção e ionização e laser assistida por matriz
MS	<i>Mass Spectrometry</i> / Espectrometria de massa
pH	Potencial hidrogênico
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> / Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> / eletroforese em gel de poliacrilamida
TCA	Ácido tricloroacético
TOF	<i>Time of flight</i> / tempo de vôo
UI	Unidade internacional

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Biomassa e bioetanol	16
1.2 Degradação da biomassa lignocelulósica	20
1.3 Processamento da biomassa- Do pré-tratamento à fermentação	22
1.4 Bactérias termófilas e degradação de biomassa lignocelulósica	25
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Condições de cultivo	32
4.1.1 Isolamento e manutenção	32
4.1.2 Produção de atividades enzimáticas.....	32
4.1.3 Fontes de carbono.....	33
4.2 Análise de açúcar redutor e atividade enzimática do sobrenadante	33
4.3 Preparação das amostras para purificação	34
4.4 Determinação das proteínas e atividade enzimática.....	35
4.5 Avaliação do efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	36
4.6 Termoestabilidade	36
4.7 Cinética enzimática- Km e V _{máx}	37
4.8 Purificação do celulosoma e análise.....	37
4.8.2 Análises por eletroforese em gel SDS-PAGE	38
4.8.3 Análise por eletroforese em gel não desnaturante	39
4.8.4 DLS Espalhamento dinâmico de luz	40
4.8.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massa.....	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Avaliação da produção de holocelulases	42
5.1.1 Sobrenadante.....	42
5.2 Análise protéica em SDS-PAGE a 12%.....	47
5.3 Análise em gel de atividade	48
5.4 Caracterização parcial das proteínas eluídas do substrato residual	50
5.6 Cinética enzimática	54
5.7 Purificação de celulosomas	56
5.7.1. Preparo das amostras	56
5.7.2. Fracionamento em coluna de exclusão molecular	60

5.8 Análise protéica em gel não desnaturante	63
5.9 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)	64
5.9.1 Identificação de proteínas por espectrometria de massas	65
6 DISCUSSÃO	68
6.1 Avaliação da utilização da biomassa para crescimento de <i>C.thermocellum</i> isolado B8	68
6.2 Produção de CMCases e xilanase do isolado B8 presentes no sobrenadante	69
6.3 Produção de CMCases e xilanases do isolado B8 nas frações eluídas do substrato (FES) e nas frações eluídas da celulose (FEC).....	70
8 PERSPECTIVAS	81
9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa e bioetanol

A matriz energética no Brasil atualmente é composta por diferentes fontes para obtenção de energia, renováveis e não-renováveis. Segundo os dados do Balanço Energético Nacional do último ano (2012, EPE), 44,1% desta produção é obtida de fontes renováveis e dessa oferta 15,7% provém da utilização de biomassa de cana, enquanto que o petróleo nesse panorama como energia não renovável é a fonte mais utilizada com uma taxa de de 38,6% (Figura 1). No cenário mundial, no entanto, a energia obtida a partir de fontes renováveis corresponde a apenas 13,3 % da produção total. As indústrias são o setor com maior demanda e consumo de energia no Brasil, utilizando 66% da produção total, seguidas pelo setor de transporte e pela utilização para mobilidade da população (Balanço Energético Nacional, 2012, EPE).

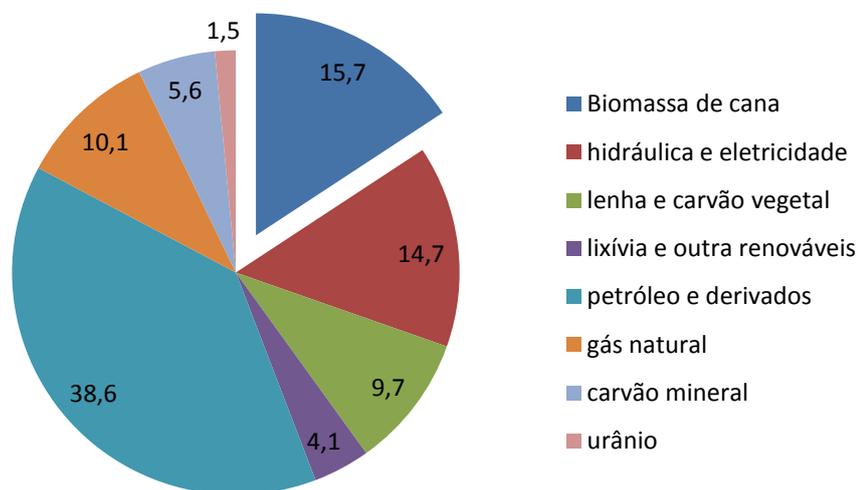


Figura 1. Repartição da oferta interna de energia no Brasil em porcentagem ano de 2012 (Balanço energético nacional, EPE, 2012).

O Brasil é o segundo maior produtor de petróleo da América do Sul, e o décimo terceiro mundial (Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis de 2012). No entanto, a maior parte do petróleo produzida no país não é adequada para utilização como combustível, tornando necessária a sua importação para abastecer o mercado interno. Os países dependentes dos produtores mundiais de petróleo como o Brasil, têm investido na obtenção de combustíveis renováveis para evitarem as flutuações de preços impostos no mercado. A utilização de combustíveis a partir de fontes renováveis também apresentam vantagens em relação aos combustíveis fósseis considerando o impacto ambiental de sua combustão e a sua disponibilidade. As fontes de combustíveis fósseis são limitadas e o seu uso contínuo resultou no aumento da poluição ambiental e em problemas como aquecimento global e mudanças climáticas. (Sarkar *et al.*, 2012).

A biomassa vegetal representa uma importante fonte alternativa para a produção de biocombustíveis como, por exemplo, o bioetanol. Atualmente são utilizadas como matéria-prima o milho nos Estados Unidos e a cana de açúcar no Brasil, para obtenção do etanol de primeira geração. No entanto, o milho e a cana de açúcar têm limitações na sua utilização para este fim, pois também são fonte de alimentos (Dias *et al.*, 2012). Em função disto novas fontes para a produção de bioetanol têm sido propostas, tais como a reutilização de resíduos e rejeitos agroindustriais matérias-primas de baixo custo, renováveis e abundantes. Além disto, a utilização de resíduos não requer aumento de área de cultivo.

No Brasil os resíduos da indústria sucro-alcooleira como palha e bagaço de cana e outros resíduos agrícolas lignocelulósicos como engaço de bananeira e o piolho de algodão têm sido avaliados como fontes para produção de bioetanol, neste caso denominado bioetanol de 2ª geração ou celulósico. Estas biomassas possuem diferenças em sua constituição com teores diferentes de glucanas, xilana, e arabinana que podem influenciar no rendimento final de produção do combustível (Figura 2).

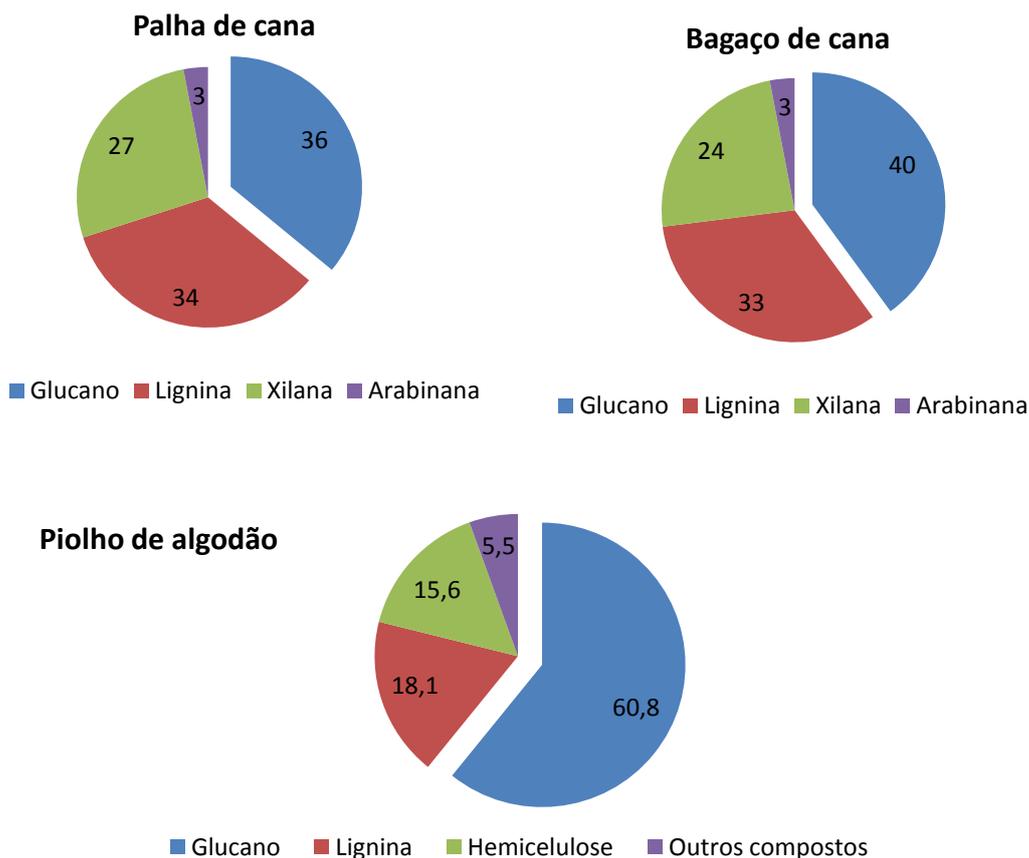


Figura 2. Composição dos resíduos industriais da cana-de-açúcar (da Silva *et al.*, 2010) e piolho de algodão (IF goiano, GO).

Na última safra o Brasil produziu 560,36 milhões de toneladas de cana de açúcar (CONAB, 2012) utilizada tanto para a produção de açúcar como de bioetanol de primeira geração cerca de 23,49 bilhões de litros. O resíduo industrial gerado corresponde a 60% de toda a safra, aproximadamente 336 milhões de toneladas de biomassa lignocelulósica, que pode ser convertida em açúcares para produção de bioetanol de segunda geração.

Outra cultura brasileira de destaque em produção é o algodão, aproximadamente 2 milhões de toneladas na última safra em 2011(CONAB). Após a colheita do miolo do algodão para utilização na indústria têxtil, uma série de resíduos são gerados, entre eles o piolho de algodão. Este resíduo possui aproximadamente 60,8 % de celulose, 15,6% de hemicelulose e 18,1 % de lignina e portanto representa uma fonte potencial de açúcares fermentáveis

para produção de bioetanol (Análise bromatológica realizada pelo professor Carlos Frederico de Souza Castro, IF Goiano).

Estas biomassas contêm basicamente polímeros de celulose e xilana apresentando variações em relação aos seus conteúdos como por exemplo bagaço de cana, que contém 40% de celulose e 24% de xilana (Figura 2). A celulose é um polissacarídeo composto por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1-4 aqui seria interessante descrever esta organização (Figura 3). Associadas à celulose na parede celular vegetal são encontradas as cadeias de hemicelulose, compostas principalmente por xilose, arabinose, manose, galactose e ácido glicurônico. Ainda ligada à hemicelulose de forma covalente tem-se a lignina, que é formada de unidades de fenilpropanóides (Duff and Murray 1996; Lynd 1996).

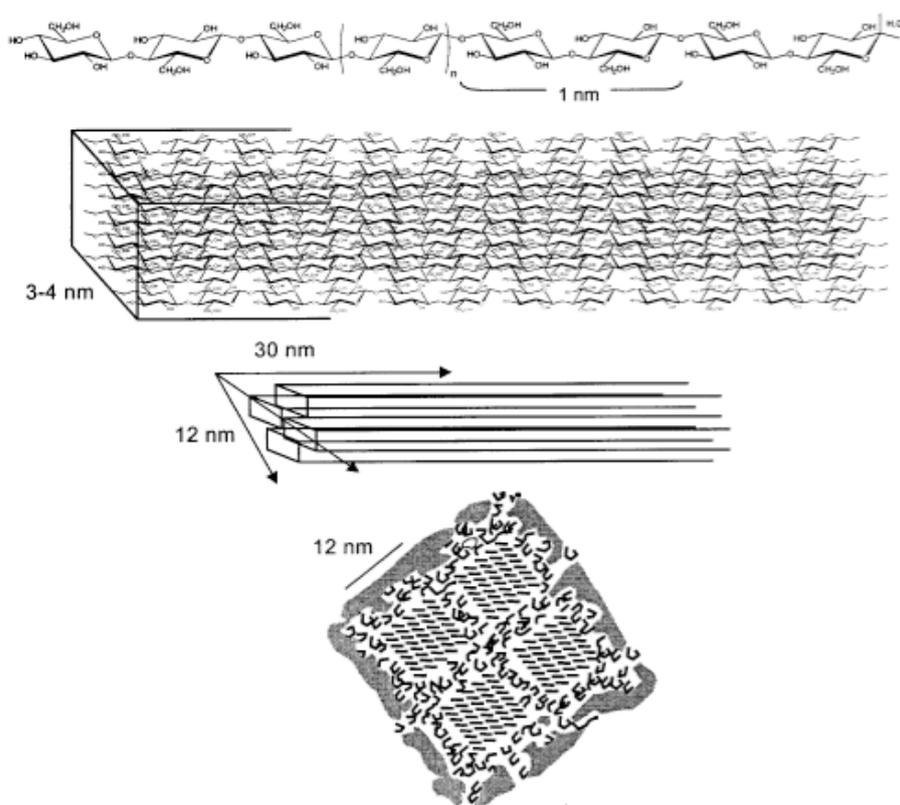


Figura 3. Estrutura cristalina da celulose mostrando os níveis de organização das fibras de celulose Figura modificada de Ramos(Ramos 2003). A figura mostra a cadeia de celulose, e a celobiose no tamanho de 1 nm. Posteriormente tem-se a fibra de celulose de 3 a 4nm, e a estrutura cristalina com a associação das fibras de 12 a 30 nm. A ultima figura do esquema é representada a fibra cristalina de 12 nm associada a hemicelulose e lignina.

Para liberação dos açúcares fermentáveis que originarão o bioetanol, a biomassa deve ser degradada em monossacarídeos, as hexoses ou pentoses. Porém, uma etapa limitante dessa conversão é a complexidade do material lignocelulósico devido a associação da celulose com a hemicelulose e a estrutura cristalina que é formada através de pontes de hidrogênio e ligações intra e entermoleculares, fornecendo assim uma estrutura altamente ordenada e empacotada (Weil *et al.*, 1994). Vários grupos de pesquisa no Brasil e no mundo têm proposto a hidrólise enzimática destas biomassas para a produção do etanol de segunda geração.

O conceito de Biorefinaria é utilizado para unidades industriais que integram processos de produção de etanol, eletricidade e produtos químicos gerados a partir de biomassa. Estudos no Brasil com esse intuito tem sido realizado para as plantações de cana e utilização dos resíduos gerados (Furlan *et al.*, 2012) e encontrados esse conceito em projetos piloto em países da Europa como exemplo a BioGasol que patenteou o processo de pré-tratamento da biomassa, a mistura enzimática utilizada e também os microorganismos utilizados na fermentação dos açúcares.

1.2 Degradação da biomassa lignocelulósica

A hidrólise completa de biomassa lignocelulósica envolve a ação de diferentes tipos de glicosil hidrolases que catalisam a hidrólise de holocelulose, definido pelo conjunto de hemicelulose e celulose, assim como enzimas acessórias que atuam sobre pectina e lignina. As celulasas são enzimas que catalisam a hidrólise de celulose e são classificadas em três tipos principais em função do seu mecanismo de ação: as Endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), que catalisam a hidrólise de ligações β -1,4 internas na cadeia de celulose; as exoglucanases ou celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do polímero de celulose a partir das extremidades redutoras e não-redutoras produzindo celobiose. E ainda as β -glicosidades (E.C. 3.2.1.21) que catalisam a hidrólise de celobiose a glicose (Lynd 1996; Lynd *et al.*, 2002) (figura 4).

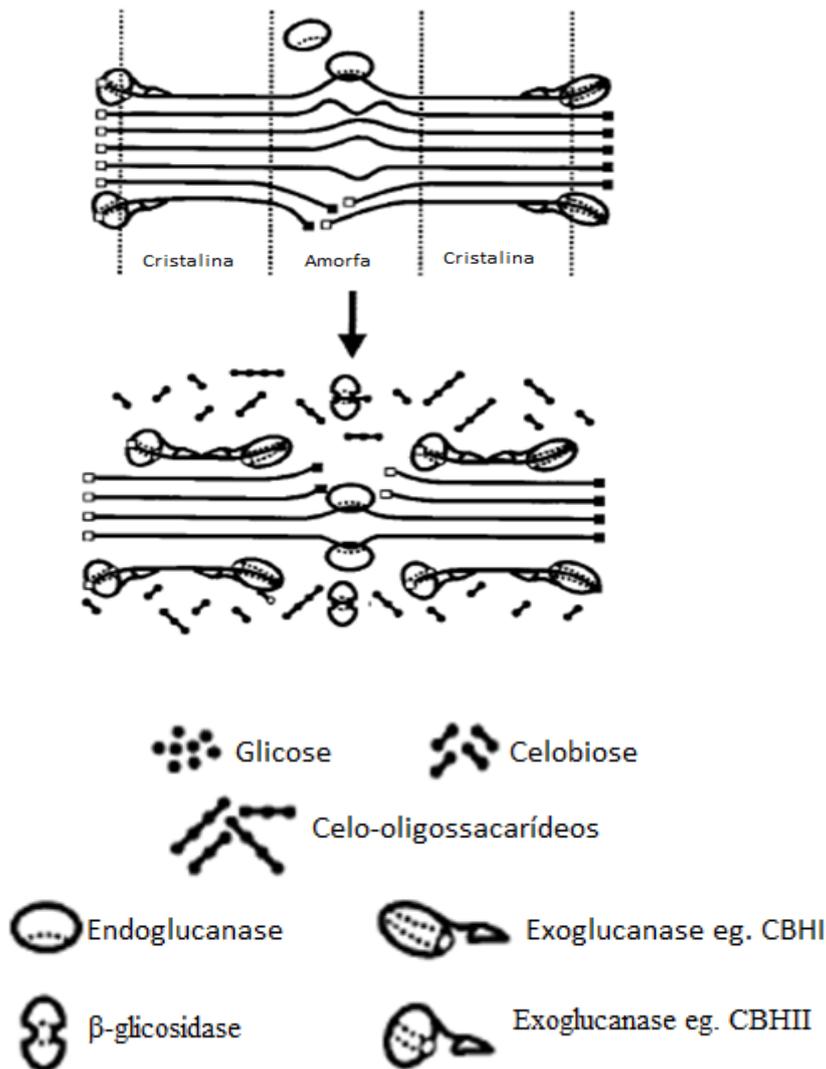


Figura 4. Diagrama esquemático mostrando os mecanismos de ação das celulasas na degradação do polímero de celulose. Figura modificada de Lynd *et al* (2002)

As xilanases catalisam a hidrólise de xilana, o segundo polissacarídeo em maior abundância na Terra, e o principal componente da hemicelulose. As xilanases de maior importância são as endo-1,4- β -D- xilanases (E.C3.2.1.8), que clivam aleatoriamente cadeias de arabinoxilana, e as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) que degradam através de terminais não redutores os xilooligosacarídeos e xilobiose em xilose (Qin *et al.*, 2010) (figura 5). A lignina, por sua vez, é despolimerizada principalmente pela ação de lacases e peroxidases liberando unidades de fenilpropanóides (Tuomela *et al.*, 2000).

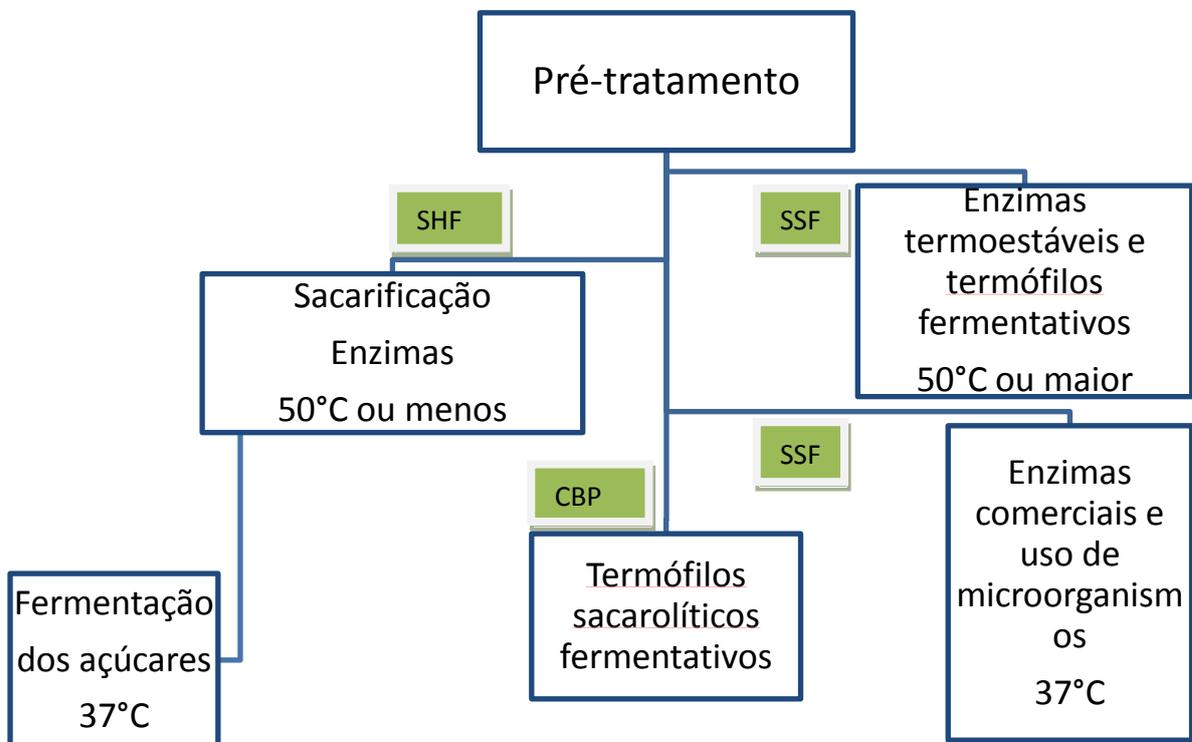


Figura 6. Diagrama esquemático dos processos que podem ser utilizados na cadeia produtiva de bioetanol celulósico. SHF(Sacarificação e fermentação separados, SSF(Sacarificação e fermentação simultânea), e CBP (Bioprocesso consolidado) (A *et al.*, 2012).

Estes processos consistem inicialmente de uma etapa de pré-tratamento utilizada para fragmentar as fibras dos biopolímeros constituintes da parede celular vegetal e para retirada da lignina e hemicelulose, e desta forma facilitar o acesso das enzimas ao substrato durante a sacarificação. Existem diferentes possibilidades de processo de pré-tratamentos, dentre estes se pode citar a utilização de ácidos ou bases diluídos, solventes orgânicos, amônia, ozônio, tratamentos a altas temperaturas e explosão a vapor (Alvira *et al.*, 2010). Essas técnicas podem retirar a lignina, e solubilizar a hemicelulose,

porém podem também gerar subprodutos tóxicos e que inibam a atividade das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise (Limayem and Ricke 2012).

A etapa seguinte ao pré-tratamento é a sacarificação do hidrolisado para produção dos açúcares fermentáveis realizada pelo tratamento com enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. A temperatura utilizada nesta etapa depende das características cinéticas das enzimas aplicadas no tratamento, assim como do tipo de processo escolhido. Durante a sacarificação a temperatura varia em média de 50°, temperatura ótima de enzimas lignocelulolíticas estudadas secretadas por organismos mesófilos. Quando em SSF, essa etapa pode ocorrer tanto a 50° quanto a 37° C, devido a temperatura ótima dos organismos utilizados na fermentação, por exemplo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que deve ser utilizada a 37°C (Olson *et al.*, 2012).

A última etapa na cadeia produtiva do bioetanol celulósico é a fermentação dos açúcares para obtenção do produto final, sendo que a levedura *S. cerevisiae* é a mais utilizada em função de sua tolerância ao produto final e eficiência na conversão dos açúcares em bioetanol.

Estudos como o de (Zuo *et al.*, 2012) publicados em 2012 mostram a degradação de palha de milho através de hidrólise enzimática utilizando enzimas comerciais Celluclast (celulases) e celobiasas Novozyme 188 (Novozymes, Dinamarca) com a liberação de 0,78 e 0,69,g/g de glicose e xilose em relação a biomassa total, com a concomitante fermentação utilizando a levedura *Pichia stipitis* produzindo uma concentração de 0,36g/g de etanol em relação a biomassa o que corresponde a 63,3% do valor máximo teórico.

No bioprocesso consolidado a sacarificação e a fermentação são realizadas em um só reator pela ação de um microorganismo capaz de secretar hidrolases atuantes na parede celular vegetal e fermentar os açúcares liberados. Os microrganismos termófilos são os mais utilizados neste processo, realizado normalmente em temperatura igual ou superior a 50°C (A *et al.*, 2012). Nesse processo são utilizados microrganismos termófilos que atuem sinergicamente, e um complexo de celulases e hemicelulases que degradem a biomassa, juntamente com sua co-fermentação. Esse formato de produção de

etanol pode também ser utilizado sem o pré-tratamento da biomassa, utilizando também o próprio microorganismo pra solubilização da estrutura tridimensional da parede vegetal. Lacases e pectinases atuam nessa etapa. Portanto pode ser utilizado uma associação de microorganismos em um co-cultivo aumentando a poder da hidrólise e da eficiência do processo de fermentação. Estudos relatam a utilização de termófilos sacarolíticos como uso de *Clostridium thermocellum* em junção com linhagens de *Thermoanaerobacter sp.* fermentativa, aumentando a produção de etanol quando em uso apenas com *C.thermocellum* chegando a 0,27g/g de etanol por massa de celulose utilizada no processo (He *et al.*, 2011).

Dessa forma utilizando no CBP bactérias termófilas sacarolíticas fermentativas o processo de produção de bioetanol diminui no custo quando em comparação com o SSF(Olson *et al.*, 2012), considerando que as etapas ocorrem simultaneamente num único bioreator com a utilização do microorganismo sem a necessidade de purificação de enzimas.

Análises da utilização de *Clostridium thermocellum* em Bioprocesso consolidado foram testadas em bioreator de 5L, com a utilização da linhagem JYT01 e subtrato Avicel (celulose microcristalina). A formação de etanol foi de 22,58g/L de meio, totalizando em 0,16g/g de substrato (Xu *et al.*, 2010).

1.4 Bactérias termófilas e degradação de biomassa lignocelulósica

Bactérias termófilas têm sido estudadas visando a sua aplicação na produção de bioetanol celulósico tanto utilizando sua função fermentativa quanto na sacarificação de biomassa vegetal. Estas bactérias são capazes de metabolizar uma variedade de carboidratos como glicose e xilose e os polímeros como xilana e carboximetilcelulose (Chang and Yao 2011).

Para o processo de fermentação, como alternativa por exemplo ao uso de *Saccharomyces cerevisiae* que fermenta apenas glicose, produtos de degradação da celulose, linhagens de bactérias termófilas tem sido estudadas para fermentação de açúcares de produto de degradação da hemicelulose,

como a xilose e a arabinose. Um exemplo são as linhagens de bactérias termófilas de *Thermoanaerobacterium aotearoense* e *thermoanaerobacter mathrani* que fermentam xilose com rendimento de 0,35 e 0,47 g/g de liberação de etanol por grama de açúcar em temperaturas de 45 a 70°C (Cai *et al.*, 2011).

Além disso bactérias termófilas anaeróbicas como por exemplo *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* e *Clostridium thermocellum* (Limayem and Ricke 2012) apresentam crescimento em altas temperaturas, 70°C, fermentam glicose e xilose e produzem enzimas celulolíticas com atividades em temperaturas em torno de 65 a 70°C, e suas enzimas são fracamente inibidas pelo etanol e inibidores liberados durante o processo de pré-tratamento do material lignocelulósico quando comparados com celulasas secretadas por outros microorganismos (Xu *et al.*, 2010). De acordo com estudo de Xu e colaboradores (2010) utilizando 7% e 15% g/L de etanol e incubado celulosoma de *Clostridium thermocellum* por 8 horas, as celulasas retiveram atividade de 64% e 45% respectivamente, enquanto que celulasas de *T. reesei* retiveram 30% e 8% nas mesmas condições. Desta forma sua utilização no bioprocessamento industrial diminui a necessidade de resfriamento nos tanques de pré-tratamento que utilizam altas temperaturas e torna possível a hidrólise e fermentação simultânea (SSF) e o bioprocessamento consolidado (CBP).

A bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* da linhagem ATCC27405 foi primeiramente caracterizada em 1977 por conter atividade celulolítica contra celulose (Ng *et al.*, 1977), e posteriormente foram realizados estudos por Johnson (Johnson *et al.*, 1982) caracterizando atividades enzimáticas de Avicelase e CMCase. Em 1983 e 1985, Lamed, Bayer e colaboradores iniciaram estudos sobre a aderência da bactéria à celulose e a caracterização de suas proteínas secretadas formando um complexo multienzimático denominado posteriormente como celulosoma. A estrutura deste complexo foi melhor esclarecida por Freier (1988) utilizando como modelo *C. thermocellum* linhagem JW20 isolada de algodão possuindo um tamanho de aproximadamente 2 a 6 MDa.

Outras espécies de *Clostridium* mesófilas, como *C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans*, *C. josui* e *C. acetobutylicum* também secretam o celulosoma porém com algumas diferenças na constituição estrutural das escafoldinas, proteína estrutural de formação do complexo (Fontes and Gilbert 2010). Outras bactérias são também produtoras de celulosomas como *R. flavefaciens*, *A. cellulolyticus*, e *B. cellulosolvans*. E ainda bactérias aeróbicas termófilas do gênero *Paenibacillus* são produtoras de complexos enzimáticos semelhantes ao celulosoma, com proteína estrutural de 280 kDa porém de tamanho de 1,450 kDa. O termo celulosoma foi assim criado primeiramente para o complexo enzimático liberado por *C. thermocellum*, e atualmente é usado o mesmo termo para outros complexos com atividade lignocelulolítica de outros microorganismos, que possuem estrutura semelhante: proteína estrutural e subunidades catalíticas unidas por domínios específicos (Karpol *et al.*, 2013).

O celulosoma de *Clostridium thermocellum*, representado na figura 7, é constituído por uma proteína estrutural denominada CipA, a escafoldina, que possui 9 domínios de ligações a subunidades catalíticas. As enzimas constituintes do complexo são na maioria xilanases, endoglucanases, celobiohidrolases e quitinases (Zverlov *et al.*, 2005). A escafoldina é uma proteína com massa molecular estimada de 220 KDa que contém motivos de seqüências de aminoácidos conservados denominados domínios coesina tipo I que se ligam aos domínios do querina tipo I encontrados nas subunidades catalíticas do celulosoma. Além disto, esta proteína estrutural possui um módulo de ligação á celulose denominado CBM. Esse módulo presente na proteína estrutural foi revelado por cristalografia (Tormo *et al.*, 1996) e demonstrado por apresentar uma cadeia lateral de 3 resíduos de aminoácidos aromáticos que pareiam com os resíduos de glicose presentes na cadeia de celulose, além disso aminoácidos polares na superfície da ligação entre o módulo e celulose fazem ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas das unidades de glicose.

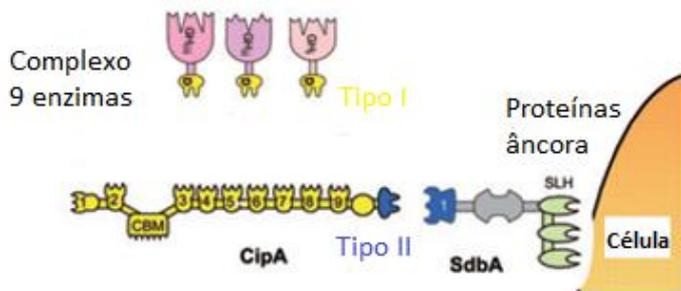


Figura 7. Figura esquemática do celulosoma de *Clostridium thermocellum* modificada de Bayer (Bayer *et al.*, 2008). Nessa figura está sendo demonstrado em amarelo a proteína estrutural CipA que contém 9 coesinas do tipo I numeradas de 1 a 9. As 9 enzimas indicadas em rosa por sua parte catalítica e em amarelo as regiões dockerinas tipo I. Na proteína estrutural CipA, em azul está demonstrado a dockerina do tipo II que se liga a coesina do tipo II em azul presente na proteína âncora SdbA. A proteína âncora SdbA se liga a célula bacteriana através do domínio SLH.

Além da proteína estrutural escafoldina (CipA) é encontrado a proteína estrutural scaffoldina âncora responsável por conectar a scaffoldina contendo as enzimas com a parede celular da bactéria. Nessa proteína existem os domínios coesina tipo II que se ligam a dockerina tipo II, módulo de ligação presente na escafoldina, demonstrado na figura 7. Outras proteínas âncoras estão presentes, como a Orf2p e OlpB demonstradas na figura 8 que podem ligar mais do que uma proteína estrutural CipA. A orf2p pode se ligar a duas CipA, formando um multicomplexo de 18 enzimas, enquanto que a OlpB pode se ligar a sete CipA, formando um complexo de até 63 enzimas.

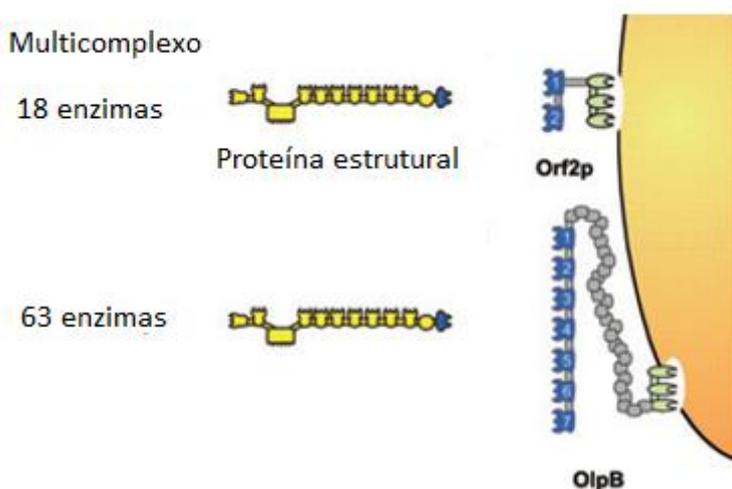


Figura 8. Figura esquemática do celulosoma de *Clostridium thermocellum* modificada de Bayer (Bayer *et al.*, 2008). Na figura temos proteína estrutural CipA que pode se ligar nos

domínios coesinas do tipo II demonstrados na Orf2p, em que o complexo pode chegar 18 enzimas, ou então se ligar na proteína OlpB que contém 7 coesinas, chegando a conter 63 enzimas.

Outras bactérias do gênero *Clostridium* também secretam o celulosoma porém com diferentes estruturas e constituintes diferenciados de proteínas. Um exemplo disso é o *Clostridium Cellulolyticum* que possui uma escafolina particular a CipC e algumas subunidades enzimáticas iguais como a CelF e Cel E em comparação com o *C.thermocellum* (Gal et al., 1997).

Um total de 35 enzimas contendo domínio dockerina, pertencentes do celulosoma, foram identificadas por análise proteômica para *Clostridium thermocellum* quando em crescimento em celobiose e celulose como fonte de carbono mostrando rearranjos diferenciados das subunidades catalíticas para a formação do complexo nos diferentes substratos (Gold and Martin 2007). Quando em crescimento em celulose houve expressão aumentada em relação a celobiose, da proteína âncora OlpB, e exoglucanases CelS, CelK, enquanto houve uma diminuição da expressão de endoglucanases, como Cel A, Cel B, Cel E e Cel C, e hemicelulases como Xyn A, Xyn Z e Xyn C. Esses resultados reafirmam a regulação da expressão diferencial das proteínas do celulosoma através de polissacarídeos externos na meio de cultura.

Bayer e colaboradores também demonstraram esta diferença no perfil das subunidades catalíticas celulosomais de *C.thermocellum* quando a bactéria é crescida em celobiose e avicel (Bayer et al., 1985; Dror et al., 2003) demonstrando também mudanças estruturais na constituição do complexo enzimático formado.

O genoma de espécies de *Clostridium* já foram completamente sequenciados e montados. Os genes codificadores das subunidades catalíticas dos celulosomas estão organizados nestes genomas como grupos gênicos como por exemplo o operon Cel C, primeiro operon de glicosil hidrolase identificado para *C.thermocellum* (Newcomb et al., 2007; Newcomb et al., 2011), caracterizado por conter 6 genes, entre eles *manB* e *celT* expressando proteínas celulosomais. A expressão portanto dessas regiões é finamente regulada, como por exemplo a enzima CelS pertencente ao celulosoma que

possui a expressão regulada por regiões promotoras atuando como fatores sigma sinalizados por polissacarídeos extracelulares (Nataf *et al.*, 2010), modificando assim a montagem do celulosoma de acordo com a fonte de carbono disponível para o crescimento da bactéria.

As proteínas estruturais CipA, OlpB e Orf2 também são encontradas em cluster no genoma, com exceção da *sdbA* (Fujino *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 2013), encontrada em outra região do cromossomo. Assim como descrito para as subunidades catalíticas dos celulosomas, a expressão destas proteínas estruturais também são controlada pela fonte de carbono, como por exemplo celobiose e celulose cristalina que induzem expressões diferenciadas para cada proteína estrutural e também em diferentes estágios de crescimento da bactéria, quando em limitações de fonte de carbono com pequena taxa de crescimento, a transcrição dos genes de CipA, OlpB e Orf2 fica aumentada em relação ao início da fase exponencial (Dror *et al.*, 2003).

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar se o isolado de *C. thermocellum* (Isolado B8) obtido de rúmen de caprino da raça Moxotó é capaz de degradar resíduos agroindustriais de interesse econômico no Brasil, e de secretar enzimas e complexos enzimáticos com atividade holocelulolítica. Além disto, pretende-se purificar os complexos enzimáticos secretados pelo isolado quando cultivado em palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão e identificar as suas proteínas constituintes para avaliar se a fonte de carbono pode influenciar na sua constituição. O mapeamento das proteínas envolvidas na hidrólise de cada um destes resíduos pode contribuir para o desenvolvimento de processo enzimático eficiente de produção de etanol celulósico.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a hidrólise de palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão pelo *C. thermocellum* Isolado B8;
- Avaliar a produção de enzimas holocelulolíticas pelo isolado B8 quando cultivado em meio de cultura contendo resíduos agroindustriais como fonte de carbono;
- Caracterizar as atividades enzimáticas de CMCase e xilanase secretadas pelo isolado B8;
- Purificar os celulosomas secretados de *C. thermocellum* isolado B8;
- Identificar as proteínas constituintes do (s) complexo (s) enzimático (s) por espectrometria de massa;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Condições de cultivo

4.1.1 Isolamento e manutenção

A linhagem de *C.thermocellum* isolado B8 modelo deste trabalho foi isolada de amostras de rúmen de caprinos da raça Moxotó. O isolamento foi realizado a partir da amostra líquida retirada do rúmen e o cultivo foi realizado em meio de cultura redutor anaeróbico, pH ajustado em 7,0, conforme descrito por(Freier *et al.*, 1988) tanto em glicose e em celulose. O meio redutor anaeróbico (1L) foi composto de 1,5g de NH_2PO_4 , 2,5g Na_2HPO_4 , 0,5g NH_4Cl , 0,5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5g de NaHCO_3 , 0,09g de MgCl_2 , 5,00 mL solução mineral, 0,50 mL solução de vitaminas, 200ml NaOH (0,2M), 100 μL $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_{20}$, 3g extrato de levedura, 1% de fonte de carbono Para manutenção da cultura em meio anaeróbico são adicionados agentes redutores como a cisteína e a injeção de nitrogênio gasoso nos frascos do meio de cultura anterior á inoculação. A identificação desta linhagem foi realizada a partir da unidade ribossomal 16 S e foi realizado o seqüenciamento genômico total por pirosequenciamento. O crescimento em meio de 100 mL a 1% de fonte de carbono é deixado por 48 h a 200 rpm a 60°C e depois é armazenado em câmara fria e utilizada como pré-inóculo. O meio após o crescimento é também deixado a -80°C congelado em glicerol 10% como estoque das culturas.

4.1.2 Produção de atividades enzimáticas

O cultivo para produção de enzimas foi realizado em 100 mL de meio de cultura conforme demonstrado na figura 9 suplementado com 1% de celulose, bagaço de cana de açúcar ou palha de cana de açúcar,ou piolho de algodão como fonte de carbono utilizando os meios de celulose como pré-inóculo. Estes foram incubados a 60°C a 200 rpm até 240 horas dependendo do experimento.



Figura 9. Meio de cultura anaeróbico contendo bagaço de cana como fonte de carbono.

4.1.3 Fontes de carbono

As fontes de carbono utilizadas para o crescimento em meio de cultura foram autoclavadas por 1 hora a 120°C e lavadas com água repetidamente para retirar todo o açúcar livre no material. Posteriormente o substrato foi moído e considerado pronto para utilização no meio de crescimento.

4.2 Análise de açúcar redutor e atividade enzimática do sobrenadante

A avaliação do período de produção enzimática de CMCase e xilanase foi estipulado para as fontes de carbono: celulose, palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão. Cada frasco com meio redutor anaeróbico (100mL de meio 1% de biomassa) foi incubado em estufa sob agitação a 200RPM a 60°C sendo removidos frascos nos dias 2, 4, 8, 10, o tempo 0 foi realizado sem a incubação ocorrer.

Após remoção de cada frasco em seu respectivo dia o sobrenadante foi separado das células do meio e do corpo de fundo composto pela biomassa por meio de centrifugação a 11500 RPM por 10 minutos a 4°C sendo vertidos após o processo. Uma alíquota de 5mL foi reservada do sobrenadante e dialisada por 8 horas com trocas de água destilada a cada 2 horas, o processo ocorreu em câmara fria a 4°C sob agitação por meio de barra magnética.

As frações dialisadas foram reservadas para realizar ensaio enzimático de CMCase e xilanase, a fração não dialisada foi usada para quantificar açúcares redutores gerados na degradação da biomassa.

4.3 Preparação das amostras para purificação

As culturas foram incubadas por 96 horas (4 dias) como descrito no item acima e foram filtradas á vácuo em papel whatman nº5, a fonte de carbono residual foi recuperada do papel e lavada com Tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0. A fração celulosomal foi eluída do substrato residual após lavagem com volume de 45 mL por frasco de água Mili-Q e assim denominada fração eluída do substrato (FES). Posteriormente a FES foi concentrada por ultrafiltração em membrana com retenção de 200 kDa (PM 200 Millipore Co., MA, USA). Alternativamente foi realizado outro método para obtenção dos celulosomas conforme procedimento descrito por Morag e colaboradores (1992) mas com modificações. Neste segundo procedimento foi adicionado 1% de celulose fibra longa no sobrenadante das culturas e deixada sob agitação por aproximadamente 12 horas em câmara-fria. A suspensão foi filtrada e a celulose lavada com tampão Tris-HCl e água mili-Q como realizado com a fonte de carbono descrita acima, e denominada fração eluída da celulose (FEC). A FEC foi concentrada por ultrafiltração como anteriormente. Na figura 10 é demonstrado em forma de esquema de maneira sucinta as duas metodologias utilizadas na obtenção das enzimas de interesse.

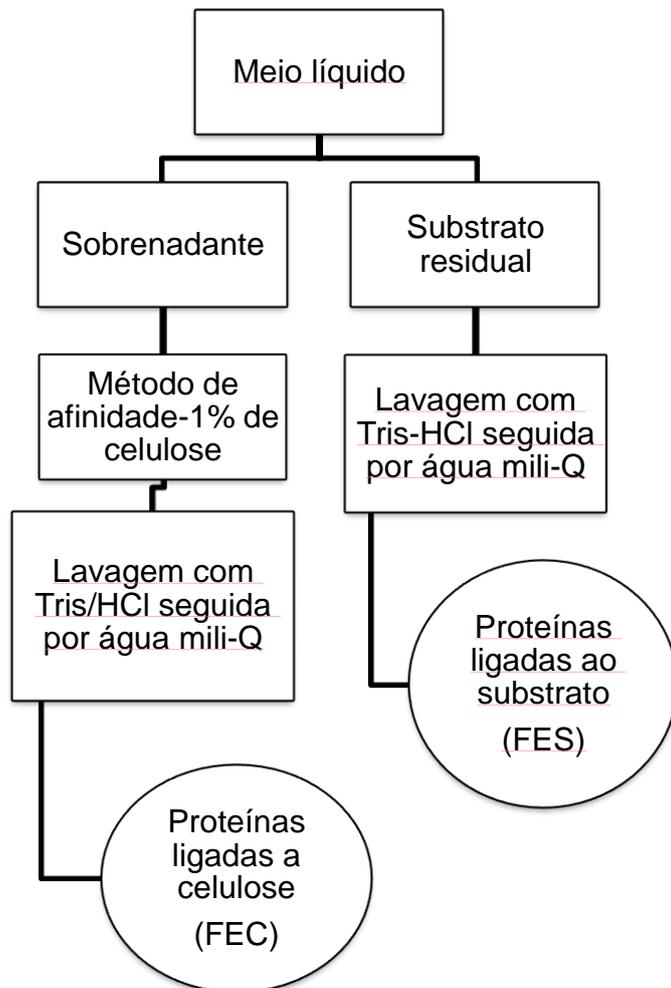


Figura 10. Esquema do método de preparo das amostras FES e FEC, obtendo assim proteínas que se ligaram ao substrato e aquelas que ficaram no sobrenadante, sendo capturada pela adição de celulose.

4.4 Determinação das proteínas e atividade enzimática

Das frações eluídas do crescimento bacteriano, FES e FEC, foi quantificada a proteína total pelo método de Bradford (Bradford 1976), através de Kit (Biorad) utilizando 150µL da amostra e 150µL do reagente conforme orientações do fabricante realizando a leitura a 595 nm, e usando BSA como curva padrão.

Das mesmas frações foram quantificadas as atividade de CMCase e xilanase realizadas pelo método do açúcar redutor (Miller 1959). Os substratos

utilizados foram carboximetilcelulose e xilana oat spelt a 2% em tampão acetato de sódio pH 5,0 e fosfato de sódio pH 6,0 respectivamente. O CMC foi diluído em tampão em aquecimento. A xilana foi preparada da seguinte forma: 1 grama de xilana adicionado por 20 mL de NaOH 1 M em agitação por 30 minutos; adicionou-se 20 mL de HCl 1 M em agitação por 30 minutos, completou para 100 mL com tampão fosfato e ajustado o pH para 6,0; a solução foi centrifugada por 15 minutos a 10000 rpm, e o sobrenadante foi coletado como a solução pronta.

Para o ensaio enzimático foram utilizadas 100µL de amostra e 50µL do substrato incubados a 65°C por 60 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 300µL de DNS (Miller 1959) e os tubos fervidos por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm no equipamento Spectramax plus, 384 (Molecular Devices). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para obter 1 µmol de glicose ou xilose, por minuto de reação.

4.5 Avaliação do efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

As amostras FES foram utilizadas na avaliação do efeito do pH e temperatura na velocidade das reações catalisadas por CMCases e xilanases. Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática foram utilizados os tampões acetato de sódio, fosfato de sódio e Tris-HCL de concentração final de 50mM nos pHs de 3,4,5,6,7,8 e 9. Para avaliar o efeito da temperatura nestas atividades o ensaio enzimático foi realizado nas mesmas condições descritas no item 4.3 alterando apenas a temperatura de incubação. As temperaturas avaliadas foram de 40, 50, 65, 70 e 80°C.

4.6 Termoestabilidade

A estabilidade térmicas das CMCases e xilanases das amostras FES foram avaliadas a 70°C. Uma alíquota destas amostras foram incubada a 70°C

e a cada intervalo de 3 horas foram coletadas uma alíquota e essa utilizada para realização do ensaio enzimático nas condições descritas no item 4.4.

4.7 Cinética enzimática- K_m e $V_{máx}$

O efeito da concentração do substrato na velocidade das reação enzimáticas catalisadas por CMCases e xilanases foi realizado avaliando-se a atividade enzimática em concentrações variáveis de substrato. Os substratos utilizados foram o CMC e xilana oat spelt para a atividade de CMCase e xilanase respectivamente. Os dados foram calculados no programa SigmaPlot 12.3 utilizando as equações de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk.

4.8 Purificação do celulosoma e análise

4.8.1 Cromatografia

A purificação dos celulosomas foi realizada em sistema cromatográfico automatizado "Äkta purifier" (GE, Uppsala, Sweden), utilizando a coluna cromatográfica HiLoad 16/60 Superdex S-200 (GE) equilibrada em tampão TrisHCl 100mM pH 8,0 contendo 150mM NaCl e 2mM de $CaCl_2$. Para a corrida foi utilizado fluxo contínuo de 1 mL/min, pressão de 0,6MPa e frações coletadas de 2 mL. A corrida foi monitorada a 295 nm, e os dados obtidos a partir do programa Unicorn 5.1 (GE, Uppsala, Sweden) acoplado ao sistema Äkta purifier.

Primeiramente foi aplicado na coluna de exclusão molecular o mix de marcadores moleculares (BioRad, CA, USA) na concentração de 1mg/mL e o Blue dextran (2,0 MDa) na mesma concentração nos mesmos padrões de corrida para a fração eluída do substrato. O mix de marcadores possuía as proteínas: Tiroglobulina 670 KDa, Gama globulina 158 kDa, Ovoalbumina 44 kDa, Mioglobulina 17 kDa e Vitamina B12 1,35 kDa.

Para purificação dos celulosomas foram aplicados 5mL das amostras FES de palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão, totalizando em 280 µg, e 180 µg respectivamente. Foi utilizado fluxo e pressão como citado anteriormente. As frações cromatográficas foram utilizadas para quantificação das atividades de CMCase e xilanase e essas frações que apresentaram ambas atividades provenientes da corrida foram unidas e utilizadas para as análises posteriores.

4.8.2 Análises por eletroforese em gel SDS-PAGE

As amostras FES e FEC de palha de cana, bagaço de cana, e piolho de algodão antes e depois da concentração por ultrafiltração foram analisadas por SDS-PAGE, assim como as frações cromatográficas reunidas das amostras FES.

As amostras em questão foram precipitadas com TCA 75% (Damerval *et al.*, 1986) e fervidas por 5 minutos e ressuspensas em tampão de amostra Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 contendo glicerol 10%, SDS 10%, 2β-mercaptoetanol e azul de bromofenol 0,05%. As amostras ressuspensas foram aplicadas em um gel desnaturante 12% (Laemmli 1970). Foram utilizados 500 µL de amostra para os géis realizados das amostras FES e FEC presentes no trabalho.

Para as análises de atividade em gel foram utilizados 500 µL das amostras FES e FEC precipitadas com TCA 75% como anteriormente e aplicadas em um gel de 10% (Laemmli, 1970) contendo 0.1 % (p/v) xilana oat spelt ou CMC polimerizado juntamente com a matriz do gel. A corrida eletroforética foi realizada a 25 mA e posteriormente submetido a tratamento para renaturação das proteínas conforme descrito por (Bischoff *et al.*, 1998). O gel foi lavado 2 vezes por 20 minutos em tampão Tris HCl 100mM pH8,0 contendo 2,5% (v/v) de Triton x-100 e 2 vezes com tampão Tris HCl 100mM pelo mesmo tempo, e deixado overnight em câmara fria. Para detecção da atividade estes géis foram incubados por 1 hora a 65° em tampão acetato de sódio pH 5,0 e tampão fosfato de sódio pH 6,0, para determinação da atividade de CMCase e xilanase, respectivamente. Em seguida para visualização das bandas com atividade enzimática os géis foram corados com “congo red” a 0,1% (p/v) por 1

hora e lavados sucessivamente com NaCl 1M. Para aumento do contraste foi acrescentado ácido acético 0,5 % .

4.8.3 Análise por eletroforese em gel não desnaturante

Após a purificação do celulosoma por Cromatografia em coluna, foi realizada duas análises por eletroforese em gel sob condições não-desnaturantes com o intuito da visualização do complexo enzimático.

Foi realizada uma eletroforese em condições não desnaturantes conforme o protocolo descrito por Laemmli et al (1970). O gel de estoque foi feito na concentração de 3% de acrilamida e o gel de corrida na concentração de 5% e 7%. Uma quantidade das amostras (10 μ L) foi aplicada em 10 μ L de tampão de amostra contendo glicerol, tampão Tris 1M pH 6,8 e Azul de bromofenol, sendo 20 μ L aplicados no gel. O tampão de corrida empregado foi: Tris 250 mM e Glicina 1,9 M pH 8,3, diluído 1:10 (1 de tampão de corrida diluído em 10 volumes de água). A corrida foi realizada sob corrente elétrica em 25 mA , e o gel corado com prata.

O segundo método utilizado foi em condições não desnaturantes conforme o protocolo descrito por Schagger & Von Jagow (Schagger and von Jagow 1991). O gel de estoque foi feito na concentração de 3% de acrilamida, e o gel de corrida em um gradiente de poliacrilamida de 5% a 11%. Uma quantidade das amostras (10 μ L) foi aplicada em 10 μ L de Comassie Blue G 5%, diluído em ácido aminocapróico 750 mM, Bis-Tris 50 mM e EDTA 0,05mM, sendo o total de 20 μ L aplicados no gel. Os tampões de corrida foram: Tricina 0,5M e Bis-Tris 0,15M pH 7,0 (tampão de cátodo 1), Tricina 0,5M, Bis-Tris0,15M com Comassie Blue 0,02% pH 7,0 (tampão de cátodo 2), diluídos 1:10 (1de tampão em 10 de água) e Bis-Tris (0,5M) pH 7,0 diluído 1:10 (tampão para o ânodo). Após aplicação da amostra no gel, a corrente elétrica foi fixada em 100mA durante a corrida.

4.8.4 DLS Espalhamento dinâmico de luz

O grau de pureza das frações cromatográficas foram avaliadas por espalhamento dinâmico de luz utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern, London, UK). As medidas foram realizadas a 28°C com tempo de aquisição de 5 segundos e 15 aquisições por medida. Foram utilizadas as amostras dos pools da cromatografia, em tampão Tris/HCl pH 8,0. O cálculo da massa molecular é feito com base no raio hidrodinâmico da proteína e leva em consideração proteínas perfeitamente globulares (Wilson 2003).

4.8.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

As frações cromatográficas contendo atividades de CMCase e xilanase foram analisadas em gel SDS-PAGE e as bandas protéicas resultantes foram recortadas do géis e preparadas para identificação por espectrometria de massas. As bandas protéicas recortadas numeradas de 1 a 11 foram maceradas em tubos plásticos cônicos estéreis submetidas a três lavagens sucessivas com bicarbonato de amônio 25 mM contendo 50% (V/V) de acetonitrila sob agitação por 20 minutos, lavagem com acetonitrila a 100% (V/V) e secagem à vácuo em “speed vaccum” (Speed Vac, Germany)). Após a secagem as amostras foram alquiladas pela incubação por 1 hora a 56°C com DTT 10mM e iodoacetamida 55mM por 45 minutos minutos a temperatura ambiente. O DTT e a iodoacetamida são retiradas e a solução de bicarbonato de amônio 25 mM foi adicionada nos spots para lavagem e em seguida adicionado a mesma solução de bicarbonato com 50% de acetonitrila. A solução foi retirada, os spots secados em speed vaccum e em seguida foi realizada a digestão por 16 h à 37 °C utilizando solução de tripsina na concentração final de 10ng/µl ressuspendida em bicarbonato de amônio 25 mM. Após o tempo de incubação foi retirada a solução dos tubos e colocado em tubos novos. Posteriormente foi adicionado acetonitrila 100% com 5% de TFA nos pedaços de géis e agitados em vórtex por 10 minutos. A solução foi novamente retirada e repassada pros tubos novos de anteriormente. Os tubos novos contendo a solução foi secado em Speed vaccum e ressuspendidos em 20 µl de água

miliQ. Em um tubo novo foi pipetado 9 μ l de matriz (50% de acetonitrila/0,3% TFA) e 3 μ l da amostra. Foi aplicado dessa amostra 0,7 μ l na placa e utilizada para análise. A análise foi realizada em MALDI-TOF e obtidas as seqüências por MS/MS através da interpretação manual dos espectros.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da produção de holocelulases

5.1.1 Sobrenadante

A linhagem B8 de *Clostridium thermocellum* apresentou liberação de açúcar redutor (figura 11) em meio de cultura contendo bagaço de cana, palha de cana e celulose como fonte de carbono mostrando a capacidade de degradar estes substratos, no entanto essa degradação foi diferente entre as fontes de carbono. Através da quantificação de açúcar redutor realizada foi notado que a fonte de carbono que apresentou a maior taxa de hidrólise ocorreu com a cultura contendo celulose liberando 1,61 mg/mL de açúcar redutor no oitavo dia de crescimento, seguido por uma queda na liberação de açúcar para 1,063 mg/mL em 10 dias de crescimento. Em seguida, a cultura de crescimento contendo palha de cana de açúcar teve a sua maior liberação de açúcar também no intervalo de 8 dias (0,45mg/mL), portanto com ligeiro aumento em relação ao tempo de 9 dias (0,38mg/mL). Por último, o bagaço de cana e o piolho de algodão induziram a menor liberação de açúcar em comparação com as outras duas fontes, a sua maior liberação de açúcar no meio foi de aproximadamente 0,14mg/mL ocorrida no intervalo de tempo de 4 dias e se estabilizando com o mesmo valor até 10 dias.

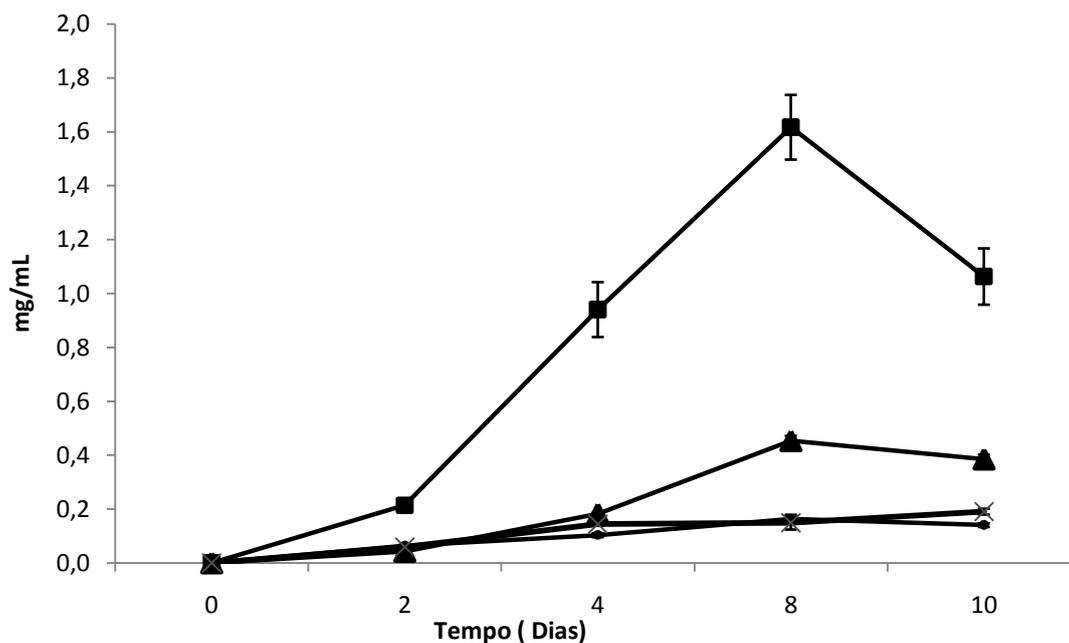


Figura 11. Quantificação de açúcar redutor gerado nos diferentes tempos de incubação usando unicamente as biomassas como fonte de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x)

A quantificação das proteínas (figura 12) foi realizada em todos os crescimentos assim como a análise de açúcar redutor. O meio contendo celulose obteve a maior quantidade de proteínas em 2 dias, enquanto que para outras fontes, palha, bagaço e piolho foi em 4 dias. Os dados de atividade específica também foram avaliados.

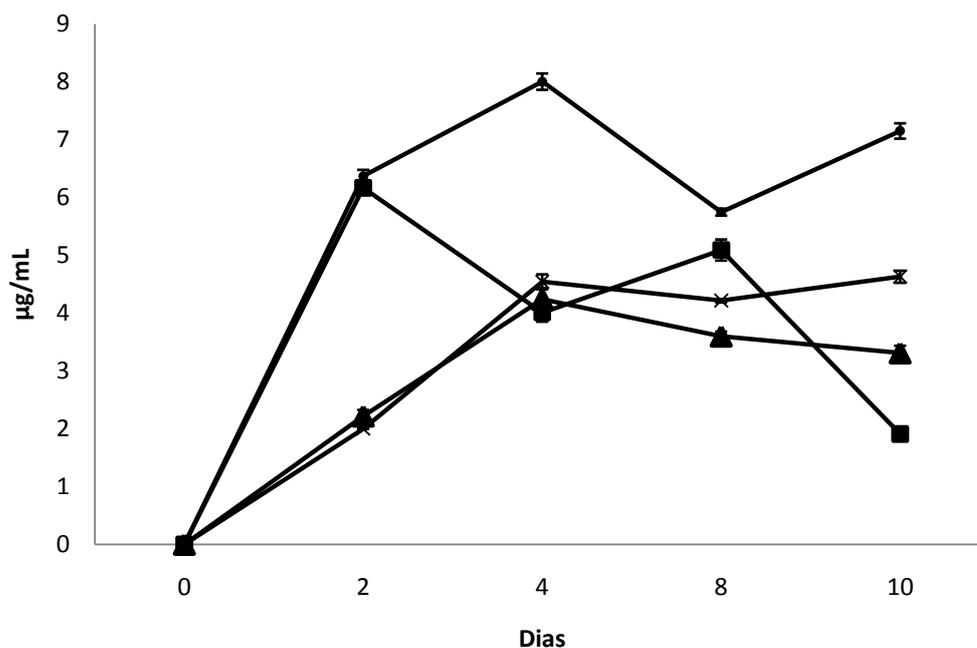


Figura 12. Quantificação de proteínas em $\mu\text{g/mL}$ do sobrenadante nos diferentes dias de incubação de *C.thermocellum* nas diferentes fontes de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x).

Foi realizada também através de análise de atividade enzimática de CMCase e xilanasas do sobrenadante com o intuito de verificar quantidade de dias ideal para produção enzimática da bactéria *C.thermocellum*. Inicialmente para a atividade de CMCase (figura 13) o meio de crescimento contendo celulose obteve a maior atividade enzimática, sendo liberada no tempo de 2 dias (0,055 UI/mL), acompanhada pelo crescimento sob palha de cana com atividade enzimática de 0,053 UI/mL no tempo de 4 dias. Paralelamente no tempo de 4 dias também foi o intervalo de dias de maior atividade de CMCase para os meios de crescimento contendo como fonte de carbono: piolho de algodão e bagaço de cana (0,017 UI/mL e 0,007U/mL).

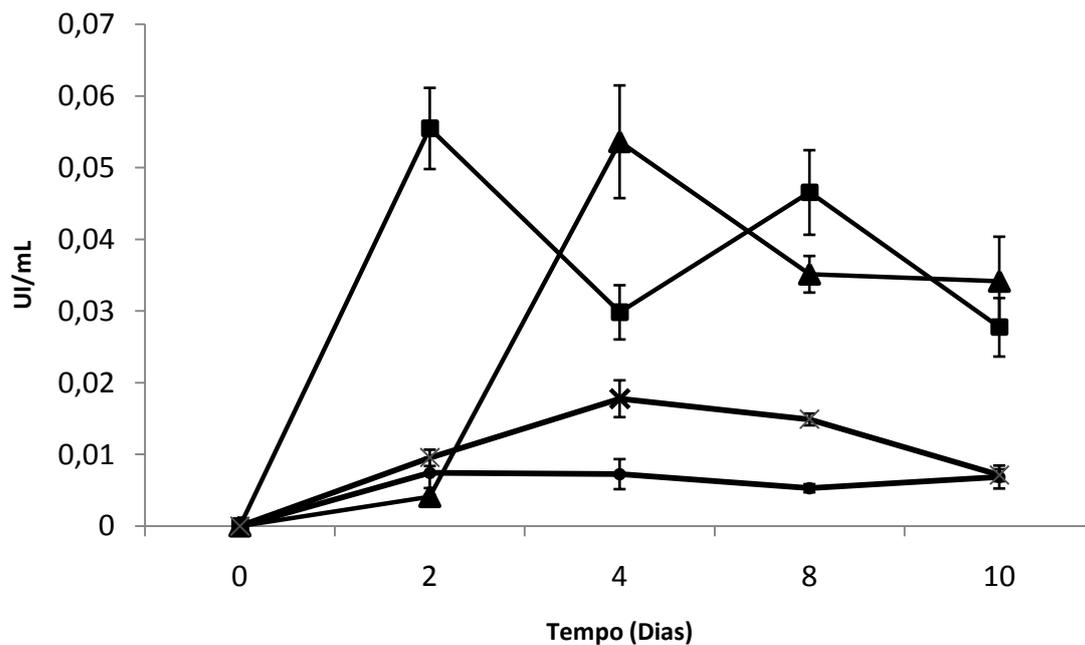


Figura 13. Atividade enzimática de CMCase ao longo do crescimento bacteriano usando unicamente as biomassas como fonte de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x)

Para a atividade de xilanase (figura 14) o meio de crescimento contendo celulose obteve a segunda maior atividade enzimática, sendo liberada no tempo de dias (0,076 UI/mL), enquanto isso o crescimento sob palha de cana obteve a maior atividade entre as fontes de carbono, uma atividade enzimática de 0,139 UI/mL no tempo de 4 dias. Paralelamente no tempo de 4 dias também foi o intervalo de dias de maior atividade de CMCase, com baixos valores, para os meios de crescimento contendo como fonte de carbono: piolho de algodão (0,009 UI/mL) e para o meio de bagaço de cana não foi encontrado atividade de xilanase.

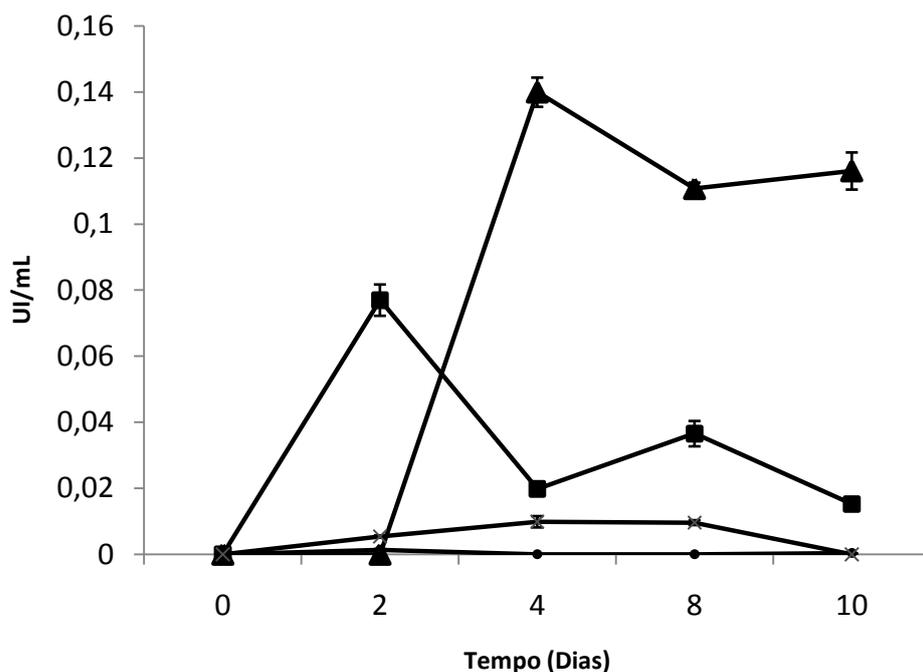


Figura 14. Atividade enzimática de xilanase ao longo do crescimento bacteriano usando unicamente as biomassas como fonte de carbono. Celulose (■), bagaço de cana (•), palha de cana (▲), e piolho de algodão(x)

A análise da quantificação de proteínas foi realizada para todos os dias de análise da atividade enzimática. Na tabela 1 são mostrados, os valores e atividades específicas, μmol de açúcar liberado/ minuto/mg de proteína. Na tabela são analisadas as atividades para os dias 2 e 4 que temos os maiores valores de atividade nas amostras. As maiores atividades específicas foi encontrada para xilanase e CMCase no 4º dia na amostra de palha de cana, e atividade de CMCase no 2º dia.

Tabela 1. Atividade específica das enzimas CMCases e xilanases do sobrenadante no período de 2 e 4 dias de cultivo para as amostras de bagaço de cana, palha de cana, piolho de algodão e celulose.

Dias	UI/mg	Celulose	Bagaço de cana	Palha de cana	Piolho de algodão
2	CMCase	8,996376	1,168402	1,849156	4,776329
	Xilanase	12,48459	0,216757	0	0
4	CMCase	7,440671	0,908894	12,64505	3,916731
	Xilanase	4,945223	0	32,99747	2,180405

Posteriormente à realização da análise das atividades enzimáticas nos diferentes tempos de incubação, o intervalo de tempo de cultura fixado para 4 dias de crescimento, a atividade holocelulítica foi inicialmente avaliada para as amostras das frações eluídas obtidas do substrato como descrito para a obtenção de celulosomas, e posteriormente utilizando mais uma estratégia para preparo da amostra enzimática para avaliação de sua atividade, a eluição de proteínas da celulose adicionada ao sobrenadante, sendo chamada de FEC descrito na metodologia seção 4.3. Esta segunda estratégia foi utilizada como uma alternativa para recuperação de celulosomas dos sobrenadantes das culturas para as etapas de purificação, resultados apresentados no item purificação de celulosomas

As atividades de CMCase (tabela 2) foram maiores para as culturas de crescimento contendo palha de cana de açúcar, seguido por piolho de algodão e bagaço de cana com valores em U/mL de 113,68, 11,16 e 5,58 respectivamente. Para as atividades de xilanase os maiores valores foram obtidos para os meios contendo palha de cana de açúcar, piolho de algodão e bagaço de cana, com valores de U/mL de 8,4, 7,8 e 2,25 respectivamente.

Tabela 2. Comparação das atividades de CMCases e xilanases para proteínas eluídas do substrato residual (FES) de culturas de *C. thermocellum* contendo palha de cana, bagaço de cana, piolho de algodão e celulose. Unidade enzimática corresponde a $\mu\text{g}/\text{min}$

U/mL	Palha de cana	Bagaço de cana	Piolho de algodão
CMCase	13,68	5,58	11,16
Xilanase	8,4	2,25	7,8

5.2 Análise protéica em SDS-PAGE a 12%

As amostras de bagaço de cana e palha de cana apresentaram perfis protéicos representados na figura 15 semelhantes de proteínas tanto para as amostras sem concentrar e concentradas com membrana de 200 KDa e também para as amostras FES e FEC, demonstradas pelas setas vermelhas

na figura. Pode ser visualizado em gel que a concentração maior de proteínas se encontra acima de 45 KDa e podemos notar proteínas de alta massa, acima de 116 KDa. São verificadas proteínas de mesma massa molecular nas oito condições como por exemplo a de 45 KDa e outras que estão presentes nas amostras concentradas de FES e FEC de palha, mas não na FES de bagaço de cana, exemplificada pela seta verde na figura 13.

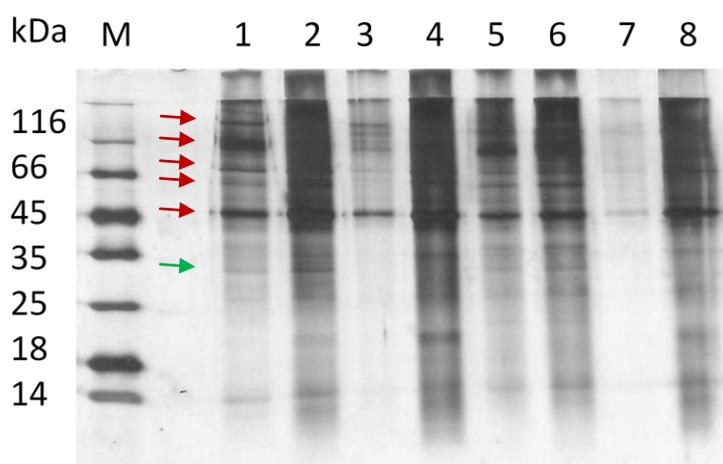


Figura 15 SDS-PAGE 12% das amostras FES e FEC obtidas de 96 horas de crescimento. 1- FES da palha (extrato bruto). 2- FES da palha (concentrado). 3-FEC da palha (extrato bruto). 4-FEC da palha (concentrado). 5- FES do bagaço (extrato bruto). 6- FES do bagaço (concentrado). 7- FEC do bagaço (extrato bruto). 8- FEC do bagaço (concentrado). Foram utilizados 500 μ L de amostra de cada fração. As setas vermelhas apontam bandas coincidentes para todas as amostras.A seta verde aponta bandas presentes apenas nas amostras 1,3,5 e 6.

5.3 Análise em gel de atividade

A análise da atividade de CMCase e xilanase em gel de poliacrilamida representado na figura 14 foi realizado para as amostras de FES e FEC de palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão sendo observadas bandas protéicas correspondentes a estas atividades. Foram encontradas 6 proteínas com atividade de xilanase nas amostras protéicas eluídas da palha de cana, amostras de 1 a 8, contendo 2 repetições biológicas de cada amostra, sendo estas coincidentes entre as amostras concentradas e não concentradas

contendo um maior número de subunidades protéicas de massa molecular acima de 45kDa até acima de 116 kDa. Para a amostra eluída da cultura contendo bagaço de cana como fonte de carbono, amostras de 9 a 12 foram encontradas 6 bandas protéicas com massa molecular correspondentes às observadas para a preparação de palha de cana. Para as amostras de piolho de algodão, de 13 a 15, foram encontradas bandas coincidentes com as mesmas massas estimadas em relação a palha de cana e bagaço de cana.

Para o gel de atividade de CMCase são encontradas 7 proteínas que são coincidentes para todas as amostras compreendendo um maior número de subunidades protéicas acima de 45 KDa e nas amostras de 7 a 15 são encontradas mais 2 enzimas com menos de 45 kDa. Uma proteína de aproximadamente 45 KDa possui atividade sob CMC, podendo ser a mesma que possui atividade sob xilana apresentando uma possível promiscuidade sobre ambos substratos.

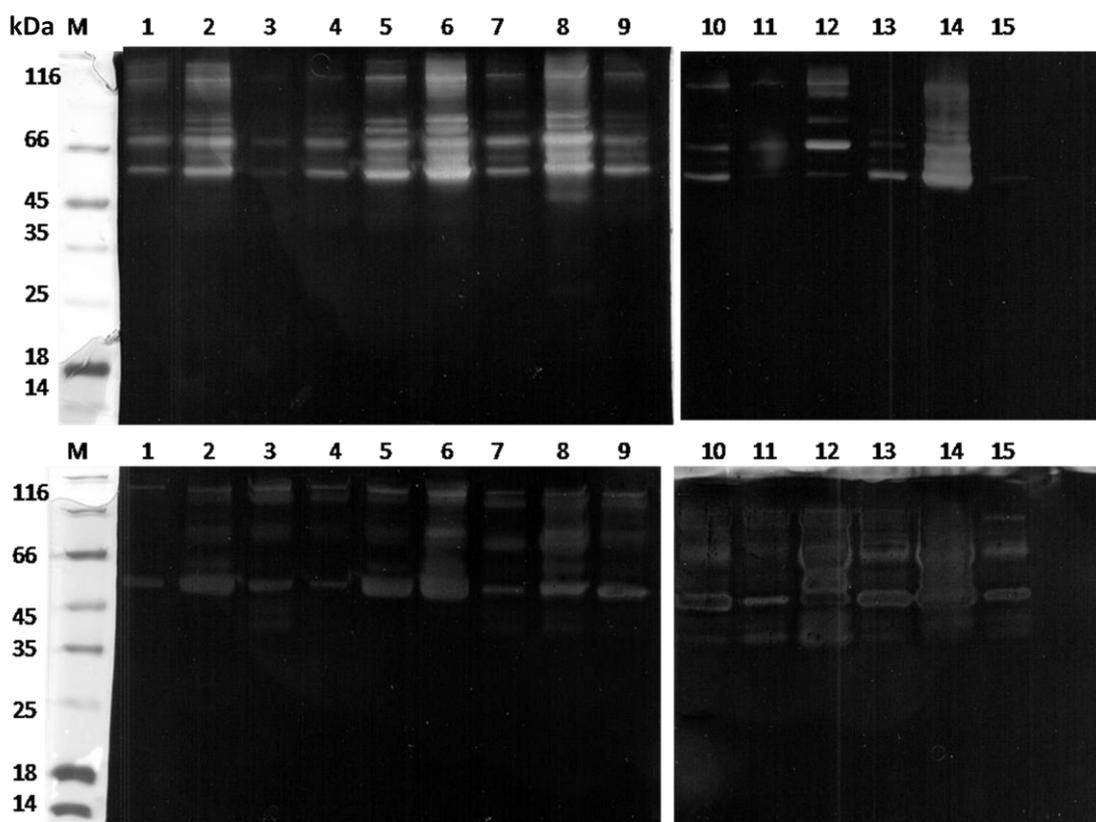


Figura 16. Zimograma em SDS-PAGE 10%. 1- FES da palha 1(extrato bruto). 2- FES da palha 1 (concentrado). 3-FEC da palha 1(extrato bruto). 4-FEC da palha (concentrado). 5-FES da

palha 2(extrato bruto). 6- FES da palha 2 (concentrado). 7-FEC da palha 2(extrato bruto). 8- FEC da palha2 (concentrado). 9- FES do bagaço (extrato bruto). 10- FES do bagaço (concentrado).11- FEC do bagaço (extrato bruto). 12- FEC do bagaço (concentrado). 13-FES do piolho de algodão(extrato bruto). 14- FES do piolho de algodão (concentrado).15- FEC do piolho de algodão (extrato bruto). O primeiro zimograma analisa as atividades de xilanase e o segundo CMCase. Foram utilizados 500 μ L de amostra para cada fração.

5.4 Caracterização parcial das proteínas eluídas do substrato residual

As atividades de CMCase obtidas para proteínas eluídas de palha de cana , bagaço de cana e piolho de algodão para a fração eluída do substrato concentrada (FES) possui valores diferenciados para o pH ótimo relatado na figura 17. Analisando o FES de palha de cana a atividade de CMCase possui maior valor na faixa de pH de 5,0 a 7,0, com valores muito próximos nessa faixa, para os outros substratos é demonstrado uma curva típica com maiores valores de atividade de 6,0 e 5,0 respectivamente, tanto para bagaço e para piolho.

O efeito do pH na atividade de xilanase foi avaliada e as amostra de palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão obtiverem maior valor para o pH de 6,0, porém estendendo valores próximos em pH 7,0 para bagaço de cana, e pH de 7,0 a 9,0 para piolho de algodão.

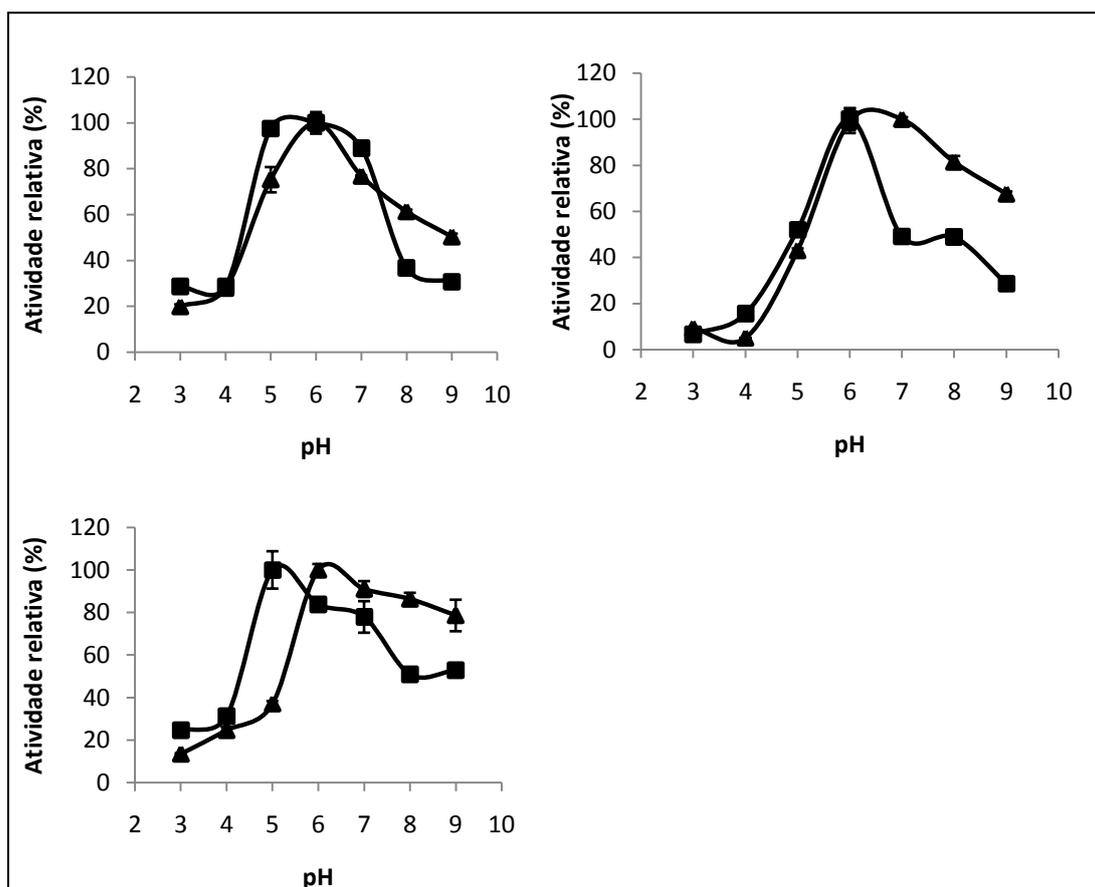


Figura 17. Atividades enzimáticas de CMCCase (■) e xilanase (▲) nos respectivos pHs de 3,0 a 9,0 das amostras concentrada FES de palha de cana (A), bagaço de cana (B), e piolho de algodão (C).

Estas mesmas amostras também foram utilizadas para avaliar o efeito da temperatura nas atividades de CMCCase e xilanase revelado na figura 18. Em relação á atividade de CMCCase foi obtida a temperatura ótima de atividade de 70°C para a amostra de palha de cana e piolho de algodão, portanto como pode ser percebido no gráfico, quando a 65°C a atividade enzimática possui o valor ligeiramente menor, caracterizando uma faixa de temperatura ótima de 65 a 70°C, sendo observada uma queda a 80°C na atividade. Para a amostra de bagaço de cana, a atividade ótima é de 65°C, possuindo um pico definido, com queda visível para 60 e 70°C na atividade enzimática.

Para a atividade enzimática de xilanase em relação a temperatura observamos comportamento semelhante a atividade enzimática de CMCCase.

Analisando a amostra de palha de cana, a temperatura ótima é de 70°C, porém a 65°C o valor de atividade é apenas ligeiramente menor, o que caracteriza também uma faixa de atividade de 65 a 70°C. Para a atividade enzimática no substrato de piolho de algodão, a temperatura ótima é de 70°C, apresentando para as temperaturas de 60 e 65°C valores bem similares, o que poderia caracterizar uma faixa de temperatura ótima de 60 a 70°C. Para o substrato de bagaço de cana, novamente como demonstrado para a atividade de CMCase, a atividade ótima é de 65°C, com queda acentuada para 60 e 70°C.

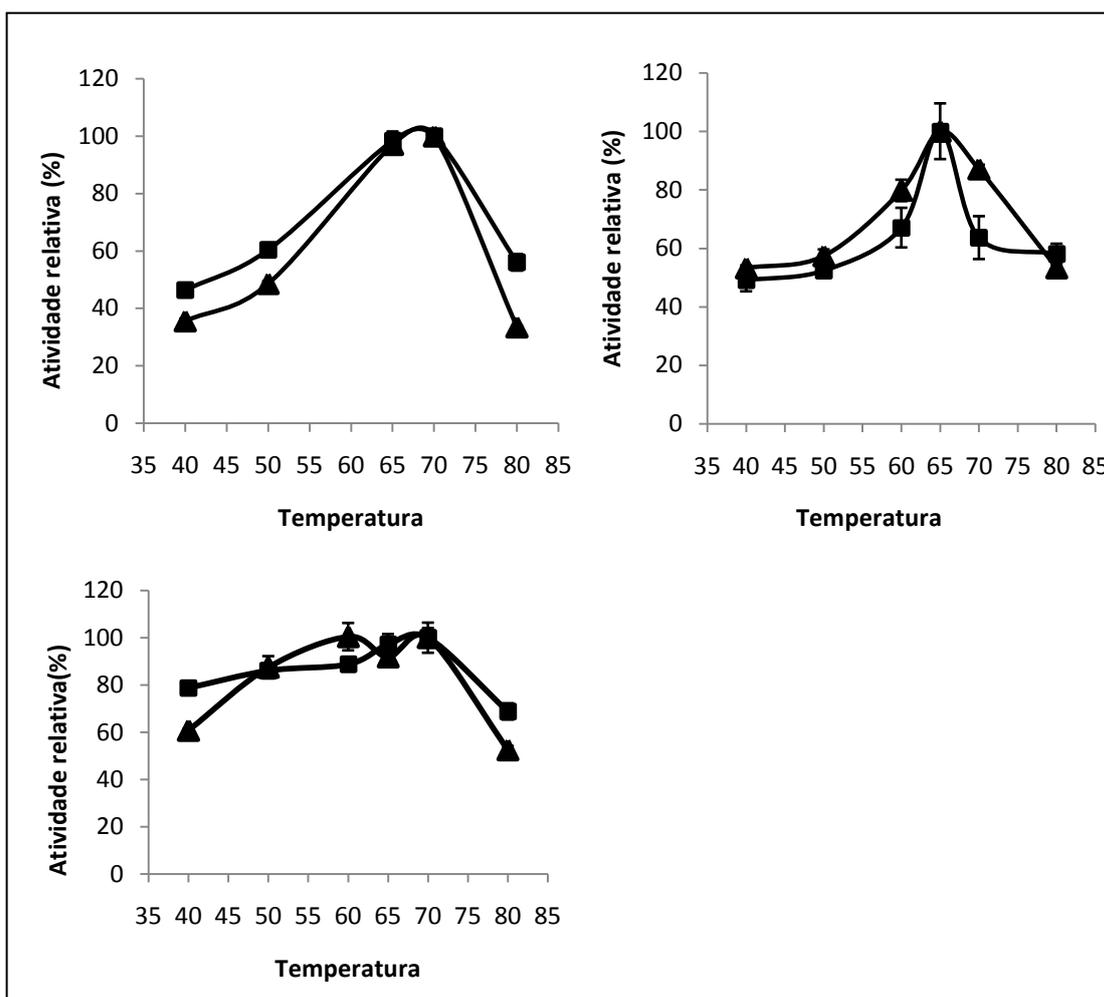


Figura 18. Atividades enzimáticas de CMCase (■) e xilanase (▲) das amostras concentrada FES de palha de cana (A), bagaço de cana (B), e piolho de algodão (C) em diferentes temperaturas.

5.5 Termoestabilidade

A termoestabilidade das enzimas CMCase e xilanase das FES de bagaço de cana, palha de cana e piolho de algodão foi realizada com incubação a 70°C durante 6 horas. Analisando o gráfico de CMCase (figura 19), é observado que após 6 horas a amostra de palha de cana retém 78% de sua atividade, seguida pelas amostras de piolho de algodão e bagaço de cana com 35 e 13 % da sua atividade relativa. Além disso no gráfico é notado que para a amostra de bagaço de cana, após 3 horas, sua atividade relativa já possui uma queda de 78 % da sua atividade inicial, ficando apenas com 22% da sua atividade.

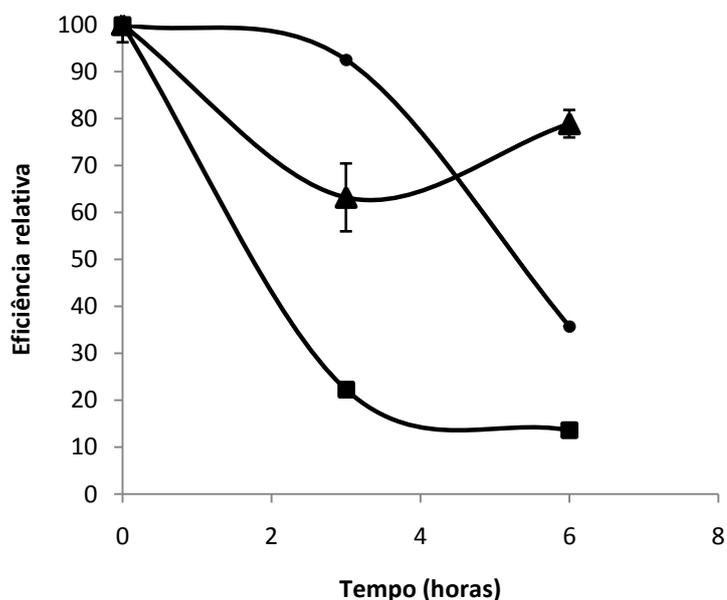


Figura 19. Atividades enzimáticas de CMCase de Piolho de algodão (•) , Palha de cana (▲), Bagaço de cana (■) das amostras FES concentradas a 70°C.

Analisando o gráfico de CMCase (figura 18), é observado que após 6 horas a amostra de palha de cana retém 75% de sua atividade, seguido novamente pelas amostras de piolho de algodão e bagaço de cana com 48% e 9 % da sua atividade relativa. E assim como demonstrado anteriormente , o comportamento da amostra de bagaço de cana é o

mesmo, após 3 horas, sua atividade relativa já possui uma queda de 79 % da sua atividade inicial, ficando apenas com 21% da sua atividade.

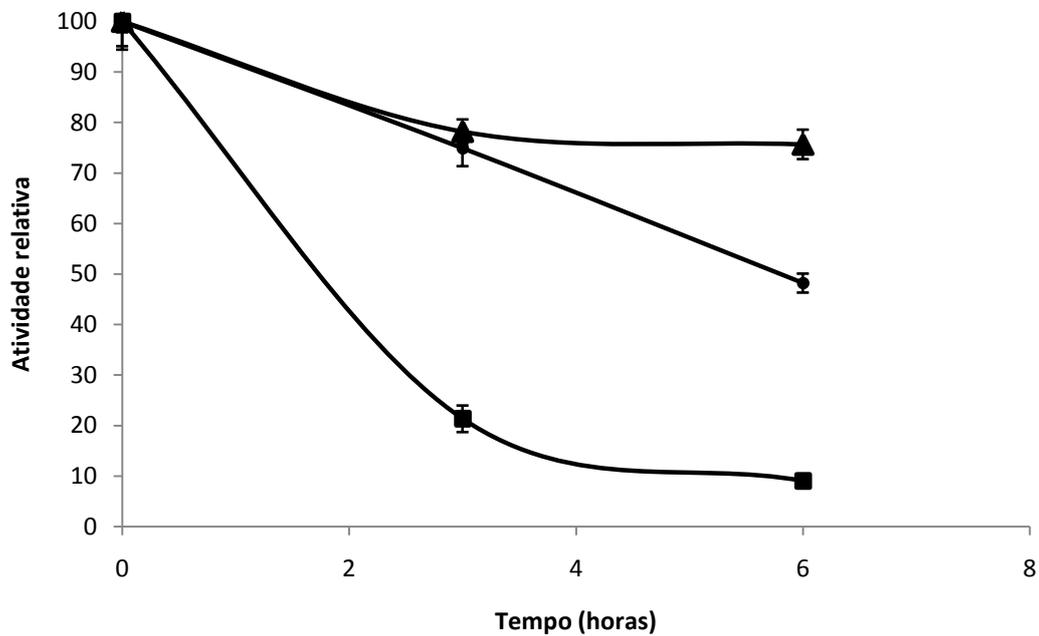


Figura 20. Atividades enzimáticas de xilanase de Piolho de algodão (•) , Palha de cana (▲), Bagaço de cana (■) das amostras FES concentradas a 70°C.

5.6 Cinética enzimática

As amostras FES de palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão foram testadas perante a condições crescentes de substrato; CMC, e xilana oat spelt para cálculo de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. O K_{mapp} e $V_{m\acute{a}xapp}$ foram calculados para a atividade de xilanase, na amostra de palha de cana, obtendo os valores de K_m de 46,5 $\mu\text{mol/mL}$, e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,006683 $\mu\text{mol/min}$.

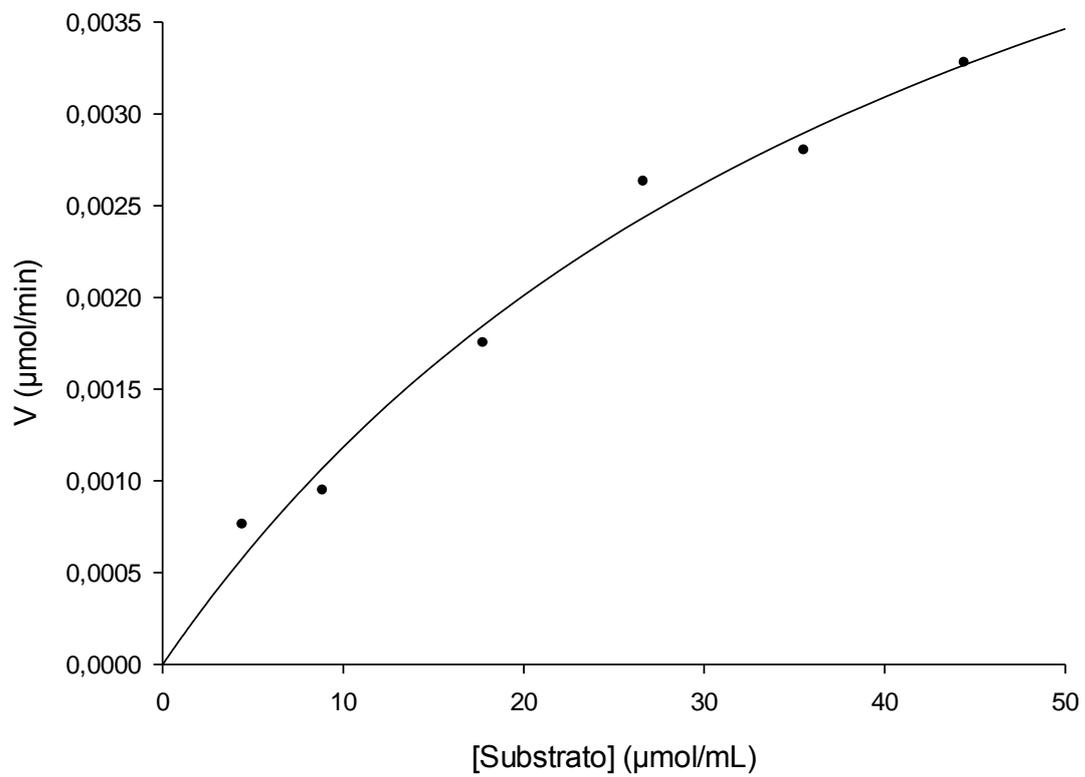


Figura 21. Curva de Michaelis-Menten utilizando substrato xilana oat spelt e amostra FES concentrada de palha de cana.

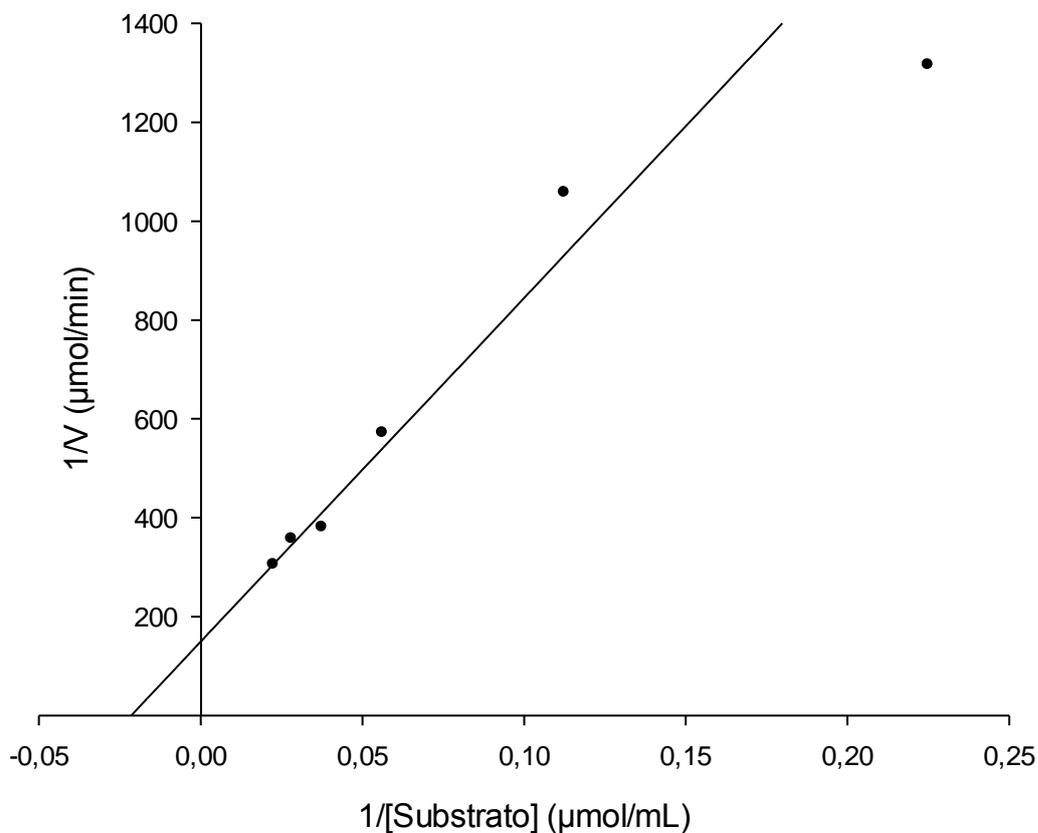


Figura 22. Gráfico de Lineweaver-Burk. Dados gerados a partir do gráfico de Michaelis Menten. $R_2 = 0,948$

Para as outras amostras não foi possível obter os valores de K_m e V_{max} .

5.7 Purificação de celulosomas

5.7.1. Preparo das amostras

Foram utilizadas duas estratégias para preparações de amostras protéicas contendo os celulosomas, eluição das proteínas ligadas ao substrato resultando na FES e a fração eluída da celulose FEC caracterizada pela

recuperação do celulosoma no sobrenadante utilizando para isso a afinidade do complexo pela celulose. As amostras de FES e FEC para os substratos de palha de cana, bagaço e piolho de algodão foram concentradas e o rendimento da recuperação das atividades enzimáticas foram avaliados a cada etapa de sua preparação.

Primeiramente ao analisar as amostras FES e FEC antes e depois de concentrar, é notada que a quantidade de proteínas totais diminui quando a amostra foi concentrada para todos os casos, assim como a atividade total tanto de CMCase demonstrado na tabela 3, tanto para a atividade de xilanase, tabela 4.

A atividade específica, relação entre a atividade total e a quantidade de proteínas, aumentou consideravelmente para as amostras FES de palha concentradas em relação a FES de palha não concentrada nas atividades de CMCase e xilanase.

Tabela 3. Tabela demonstrando os passos de purificação de obtenção das mostras FES (Fração eluída do substrato) e FEC(Fração eluída da celulose). P- palha de cana, B- bagaço de cana, e Pi- Piolho de algodão. . EB- extrato bruto (antes da concentração) EC-extrato concentrado (depois da concentração).

Amostra	Etapas	Proteínas mg/mL	Proteína total (mg)	CMCase (UI/mL)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI/mL)	Purificação (UI/mg)	Rendimento (%)
FESP	EB	0,019	6,048	0,030	9,427	1,55	1	100
	EC	0,010	0,231	0,076	1,764	7,62	4,91	18,68
FECP	EB	0,009	2,997	0,023	7,250	2,42	1	100
	EC	0,044	0,624	0,052	0,741	1,19	0,49	10,20
FESB	EB	0,028	8,870	0,018	5,720	0,64	1	100
	EC	0,036	1,110	0,031	0,096	0,86	1,34	1,67
FECB	EB	0,005	2,121	0,013	5,695	2,69	1	100
	EC	0,022	0,802	0,055	1,942 *	2,42	0,90	34,1
FESPi	EB	0,016	7,227	0,0174	7,591	1,05	1	100
	EC	0,108	4,456	0,062	2,566	0,57	0,54	33,80
FECPi	EB	0,002	1,213	0,011	5,146	4,24	-	-
	EC	0,030	1,356	-	-	-	-	-

Tabela 4. Tabela demonstrando os passos de purificação de obtenção das mostras FES (Fração eluída do substrato) e FEC(Fração eluída da celulose). P- palha de cana, B- bagaço de cana, e Pi- Piolho de algodão. EB- extrato bruto (antes da concentração) EC-extrato concentrado (depois da concentração).

Amostra	Etapas	Proteína mg/mL	Proteína total (mg)	Xilanase (UI/mL)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Purificação	Rendimento (%)
FESP	EB	0.019	6.048	0.023	7.396	1.22	1	100
	EC	0.010	0.231	0.056	1.292	5.58	4.57	17,47
FECP	EB	0,009	2.997	0,011	3.661	1,22	1	100
	EC	0,044	0.624	0,041	0.579	0,92	0.75	15,81
FESB	EB	0,028	8,870	0,012	3,890	0,02	1	100
	EC	0,036	1,110	0,015	0,460*	0,05	2,4	10,52
FECB	EB	0,005	2.121	0,005	2.503	1,18	1	100
	EC	0,022	0.802	0,012	0.453*	0,56	0.47	18,12
FESPi	EB	0,016	7,227	0,018	7,906	1,08	1	100
	EC	0,108	4,456	0,052	2,169	0,48	0,44	27,43
FECPi	EB	0,002	1,213	0,011	5,264	4.40	1	100
	EC	0,030	1,356	0,001	0,073	0,054	0,01	1,38

Na figura 23 é representado os valores de atividade total para todas as FES e FEC concentradas para melhor visualização dos dados evidenciando que as amostras de piolho FES obtiveram maior recuperação de atividade de CMCase e xilanase no volume total, seguindo pela fração eluída FES de palha de cana. Quando realizado o método de lavagem da celulose, FEC, a amostra de bagaço apresentou as maiores atividades.

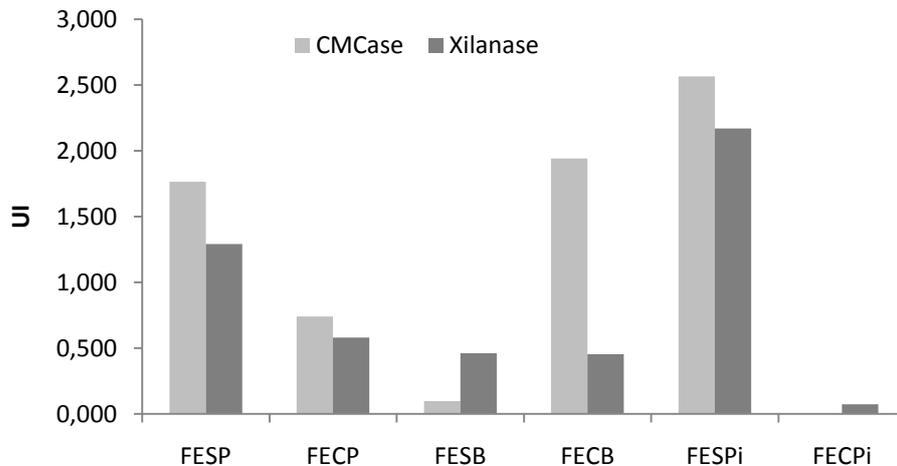


Figura 23. Análise das amostras concentradas de FES (Fração eluída do substrato) e FEC (Fração eluída da celulose) da atividade de CMCase e xilanase. FESP e FECP (Palha de cana), FESB e FECB (Bagaço de cana), FESPi e FECPi (Piolho de algodão).

5.7.2. Fracionamento em coluna de exclusão molecular

Após fracionamento em coluna de exclusão molecular (Superdex S-200) a amostra de proteínas eluídas de palha de cana (figura 25-A) apresentou dois picos de proteína denominados picos I e II. O pico I foi eluído no volume de eluição de 46 mL anterior às frações de eluição do marcador de massa molecular Blue-Dextran (2MDa) eluídas no volume de 53 mL como demonstrado na figura 24, enquanto o pico II foi eluída aproximadamente no volume de 100 mL, correspondente à eluição do marcador mioglobulina (17kDa). As atividades de xilanase e CMCase foram co-eluídas nas mesmas frações coincidentes com o pico I, apresentando maior atividade para CMCase, enquanto que no II pico encontramos atividade de xilanase maior, enquanto que a atividade de CMCase já se encontra em queda.

Para a amostra de proteínas eluídas de bagaço de cana o perfil cromatográfico (Figura 25-B) também apresentou dois picos de proteína denominados picos I e II eluídos nas mesmas posição que para o cromatograma da amostra de palha de cana. O pico I foi eluído no volume de eluição de 46 mL anterior às frações de eluição do marcador de massa molecular Blue-Dextran (2MDa) eluídas no volume de 53 mL como demonstrado na figura 14, enquanto o pico II foi eluída aproximadamente no

volume de 100 mL, correspondente á eluição do marcador mioglobulina (17kDa). As atividades de xilanase e CMCCase foram co-eluídas nas mesmas frações coincidentes com o pico I, apresentando atividades equivalentes de CMCCase e xilanase, observando um pico mais definido em relação ao cromatograma A, enquanto que no II pico encontramos atividades tanto de CMCCase quanto de xilanase, irrelevantes.

O perfil cromatográfico (Figura 25-C) para a amostra de proteínas eluídas de piolho de de algodão também apresentou dois picos de proteína denominados picos I e II eluídos nas mesmas posição que para o cromatograma da amostra de palha de cana. O pico I foi eluído no volume de eluição de 46 mL anterior às frações de eluição do marcador de massa molecular Blue-Dextran (2MDa) eluídas no volume de 53 mL como demonstrado na figura 14, enquanto o pico II foi eluído aproximadamente no volume de 96 mL, e se prolongou por um volume maior em comparação com as amostras de bagaço e palha de cana. Porém As atividades de xilanase e CMCCase foram co-eluídas nas mesmas frações com um deslocamento a direita em relação ao pico I, extendendo suas atividades de CMCCase e xilanase até o pico II.

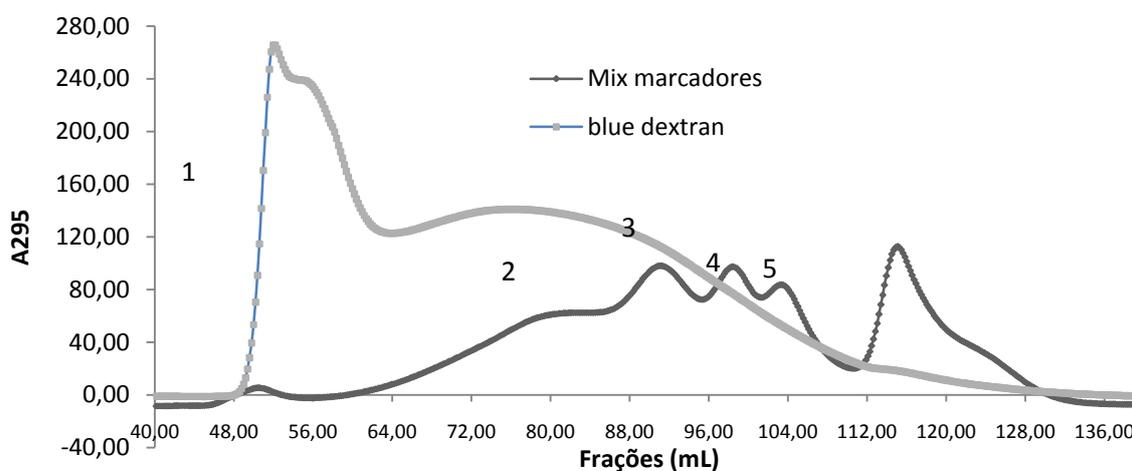


Figura 24. Cromatograma do mix de marcadores e blue dextran. 1- Blue dextran 2- tiroglobulina 3-gama-globulina 4-ovoalbumina 5-mioglobulina 6-vitamina B12

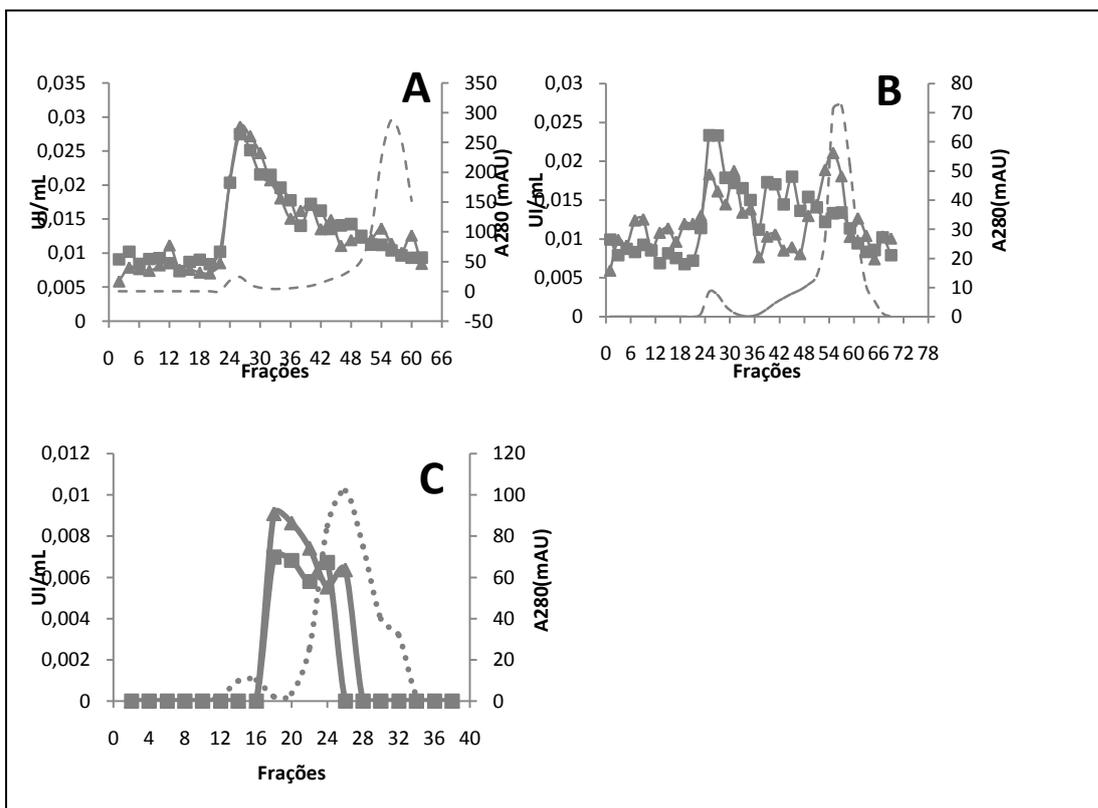


Figura 25. Cromatograma demonstrando as atividades de CMCase e xilanase da amostra de palha de cana de açúcar da FES palha de cana 1 (A), bagaço de cana 1(B) e piolho de cana 1 (C). Foram coletadas 2 mL por fração para palha e bagaço e 4 mL para piolho. Atividades enzimáticas de xilanase (■) e CMCase (▲), e A280 (---).

Na figura 26 são demonstrados os perfis de SDS-Page a 12% das frações que possuem atividade dos cromatogramas de bagaço de cana, palha de cana e piolho de algodão.

Os perfis A, B e C se assemelham quando visualizada as primeiras frações e podemos notar a presença de três proteínas presentes em ambos. São essas as proteínas demonstradas por setas sendo uma de massa molecular acima de 116 KDa, e as outras duas na faixa de 66 e 45 KDa respectivamente. Após a visualização do perfil foram reunidas as frações de 23 a 27 das amostras de bagaço de cana e palha de cana para as análises posteriores.

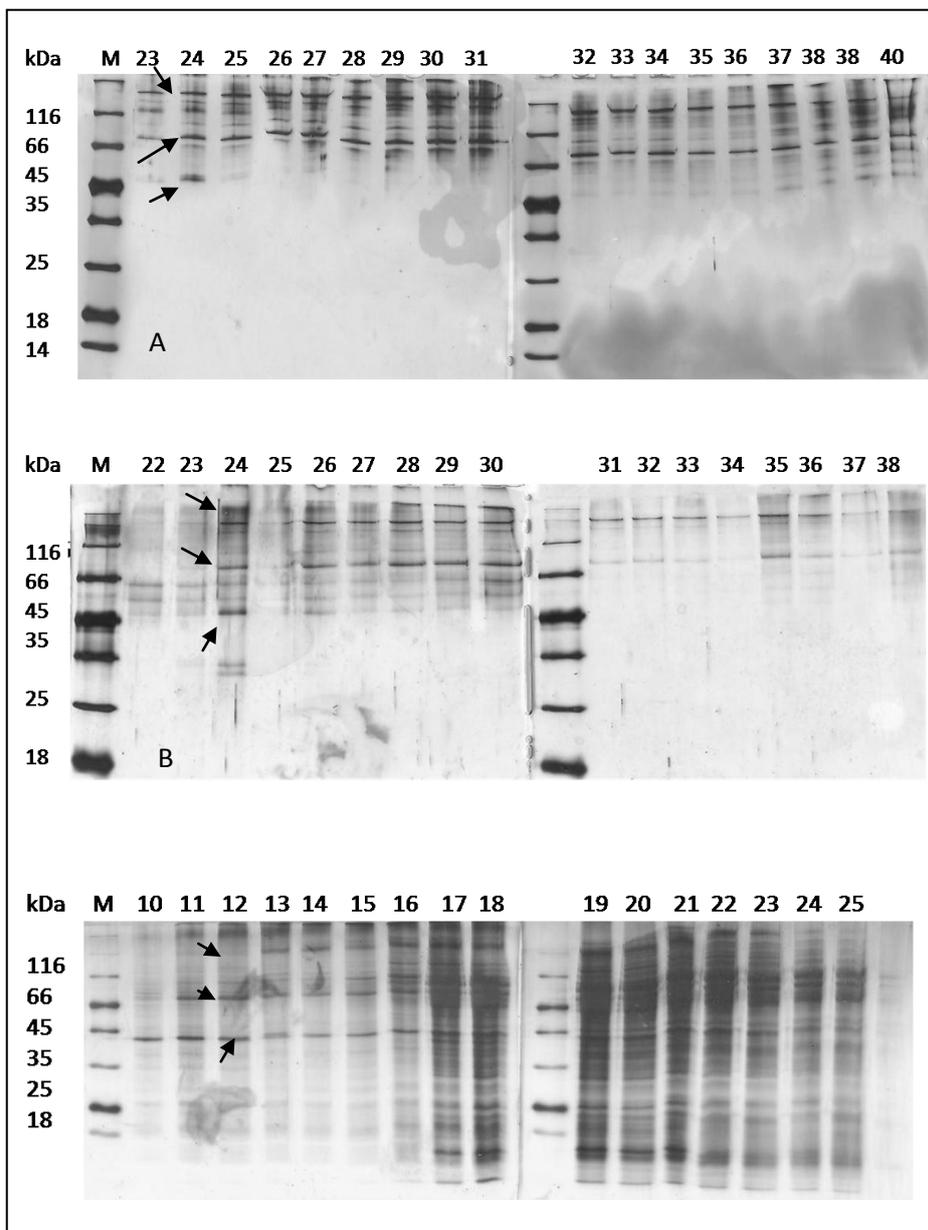


Figura 26. Figura 9. SDS-Page (12%) das frações eluídas na cromatografia de FES palha de cana 1 (A), bagaço de cana (B) e piolho de algodão (C). Foram utilizados 500 μ L de amostra para cada fração.

5.8 Análise protéica em gel não desnaturante

A análise através de gel não desnaturante, tanto usando a técnica de Laemmli (1970) quanto a técnica de Schägger & Von Jagow (1991) não obteve resultado esperado. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do complexo

enzimático possuir uma massa estimada de 2 a 6,5 MDa, sendo muito grande para entrar na malha de poliacrilamida.

5.9 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

Analisando os dados do programa Zetasizer, obtemos a descrição de resultados em picos de proteínas, com o tamanho estimado dessas proteínas em nm, a massa estimada em kDa e as porcentagens de intensidade de luz desviada pela proteína, e sua massa relativa a amostra.

O pool coletado da cromatografia de bagaço de cana e palha de cana (frações reunidas de 23 a 27) em tampão Tris-HCl pH8,0 foi analisada na temperatura de 28°C e foi verificado para a amostra de bagaço de cana (Figura 27) 3 picos, contendo um pico (Pico 1) monodisperso com polidispersidade baixa (16,8%), e quantidade de massa de 10,3 % correspondente da massa total presente na amostra. O pico monodisperso representa proteínas com a mesma estrutura e massa. A massa molecular estimada para a proteína foi de $6,50 \pm 4,08$ MDa conforme analisado no gráfico exibido pelo programa Zetasizer. O segundo pico representado pela maior porcentagem da massa total da amostra mostra massa estimada de $565,00 \pm 225,00$ MDa, representando um agregado de proteínas,

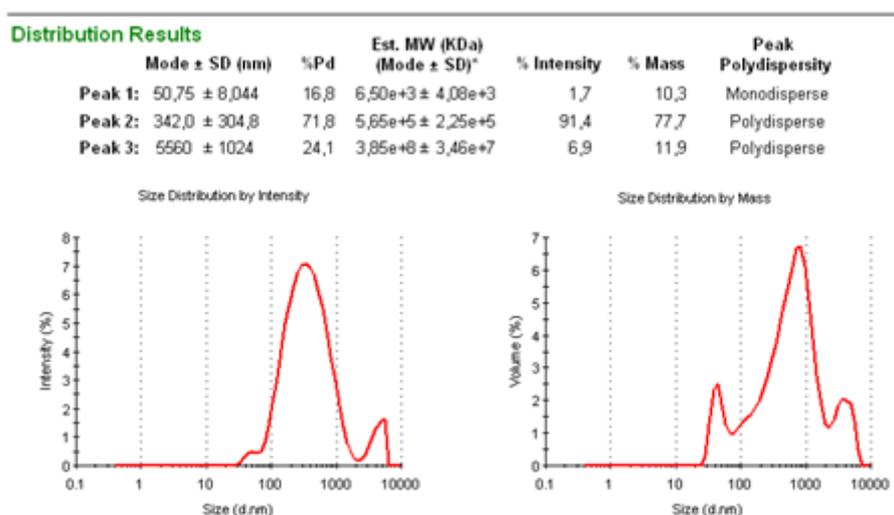


Figura 27. Análise pelo teste de Espalhamento dinâmico de luz pelo *software* Zetasizer do pool da amostra de bagaço de cana de açúcar após a cromatografia

O pool coletado da cromatografia de palha de cana em tampão Tris-HCl pH8,0 foi analisada na temperatura de 28°C e foi verificado nas figura 27 , 3 picos. Na figura 28 a amostra apresentou um pico (Pico 1) com massa de 38% e polidispersidade baixa de 16%. O pico 1 monodisperso indica a presença de apenas 1 tipo de população, tendo a massa molecular estimada foi de $6,50 \pm 2,66$ MDa conforme analisado no gráfico exibido pelo progama Zetasizer. O segundo pico com a porcentagem de massa de 59,6% possui tamanho estimado de $202 \pm 36,7$ MDa, demonstrando a presença de um agregado protéico.

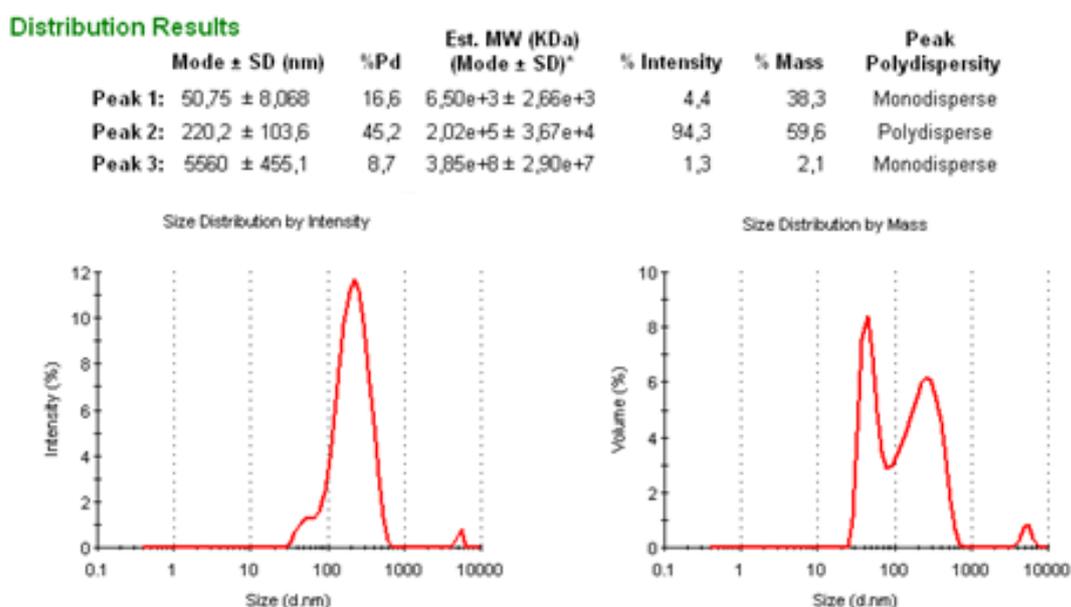


Figura 28. Análise pelo teste de Espalhamento dinâmico de luz pelo *software* Zetasizer do pool da amostra de palha de cana de açúcar após a cromatografia.

5.9.1 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

As frações contendo atividade de xilanase e CMCase e com massa molecular acima de 45 kDa foram reunidas e analisadas em gel SDS-PAGE (figura 29). As bandas foram recortadas e tripsinizadas para identificação por espectrometria de massas. Das amostras tripsinizadas analisadas duas foram identificadas utilizando a técnica de PMF (Peptide Mass Fingerprint) (Tabela 5)

.A proteína 1 foi identificada como a proteína estrutural celulosomal contendo o domínio coesina tipo I descrito para a proteína estrutural CipA, e a proteína 4 identificada como sendo a exogucanase Cel S,

Tabela 5. identificação das proteínas a partir do perfil unidimensional das frações eluídas do cromatograma de palha de cana.

Proteínas Identificadas	Nº de acesso ^a	Organismo	Sequência dos peptídeos identificados ^b	e-value	MM e pI teóricos ^c
cellulosome anchoring protein cohesin region	ZP_14254176.1	<i>Clostridium thermocellum</i>	SFDTAVYPDKR	1.3	76,338 e 4,76
	ZP_14254176.1	<i>Clostridium thermocellum</i>	FVEVGGFANNDLVEQR	2.0 E-07	76,338 e 4,76
glycoside hydrolase family 48	ZP_05429046.1	<i>Clostridium thermocellum</i>	ATFINTFQR	0.88	85,588 e 5,33
	ZP_05429046.2	<i>Clostridium thermocellum</i>	GEAPVLNYHR	0.1	85,588 e 5,33
	ZP_05429046.3	<i>Clostridium thermocellum</i>	LYGDVNDDGKVNSTDAVALKR	8.0 E-12	85,588 e 5,33
	ZP_05429046.4	<i>Clostridium thermocellum</i>	VTSYGTDLGVAGSLANALATYAAATER	2.0 E-16	85,588 e 5,33

a Número de acesso do GenBank (NCBI)

b Sequencia peptídica obtida através da interpretação manual do espectro de MS/MS

c Massa molecular em kDa.2

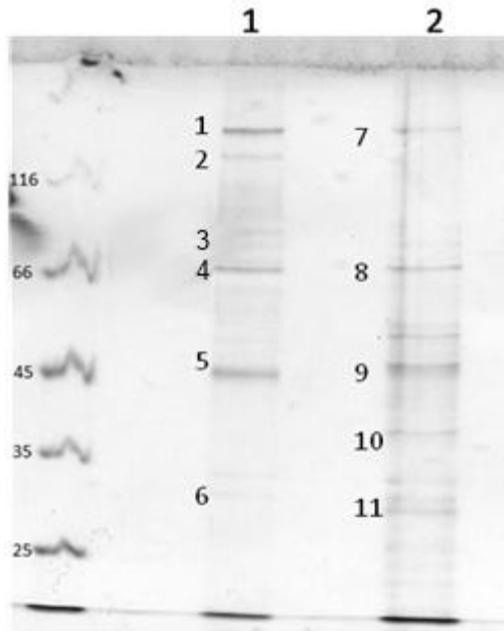


Figura 29. SDS-page 10 % das frações unidas do pool de palha de cana (1) e bagaço de cana (2) proveniente da cromatografia de exclusão. Foram utilizadas 10 μ g de proteína para preparo do gel. Os números de 1 a 11 indicam os spots cortados do gel para análise.

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação da utilização da biomassa para crescimento de *C.thermocellum* isolado B8

Os resíduos agroindustriais palha de cana de açúcar, bagaço de cana de açúcar e piolho de algodão são fontes de carbono mais complexas que a celulose obtida comercialmente, apresentando em sua composição além da celulose, polímeros de xilana e lignina. Destes resíduos a palha e o bagaço de cana de açúcar apresentam alto teor de lignina, 36 e 40 % respectivamente seguido de teores de glucanos (34% e 33%) e de xilana (27% e 24%) (da Silva *et al.*, 2010). O processo industrial de produção de bioetanol a partir deste tipo de biomassa requer seu pré-tratamento para solubilização da lignina de forma a favorecer o acesso das enzimas hidrolíticas ao substrato e conseqüentemente a sacarificação dos polímeros de celulose e hemicelulose. O isolado B8 foi capaz de hidrolisar os substratos lignocelulósicos “in natura” (figura 10) indicando o seu potencial de utilização na sacarificação destas biomassas para produção de bioetanol celulósico. A maior taxa de degradação da celulose comercial (figura 10) pode assim estar relacionada à sua constituição, pois ao contrário das biomassas complexas esta não é constituída por lignina ou hemicelulose. Portanto, apesar das culturas partirem de um mesmo pré-inóculo e da mesma quantidade de células na cultura inicial a taxa de crescimento foi diferente entre as biomassas, que isto de certa forma está relacionada com a capacidade de hidrolisar os substratos (resultado não mostrado), sendo avaliado apenas quantidade de proteínas produzidas nos respectivos dias, sendo considerada uma quantificação indireta do crescimento bacteriano.

No entanto, para avaliação e comparação da taxa de hidrólise destas biomassas em relação à celulose são necessários mais experimentos padronizando o número de células bacterianas iniciais utilizadas no processo de sacarificação, assim como aprimorar a estratégia de análise de produtos de hidrólise, como pela utilização de técnica de HPLC para análise de açúcares liberados e produtos de fermentação como etanol, acetato e lactato. Neste

trabalho foi realizada uma avaliação preliminar desta hidrólise pela dosagem de açúcar redutor total.

6.2 Produção de CMCase e xilanase do isolado B8 presentes no sobrenadante

Linhagens já identificadas de *C. thermocellum* tais como: YM4, YS, JW20, ATCC27405, F7, S14 isoladas de diferentes fontes (águas termais, algodão, solo, estrume e feno) já foram descritas como produtoras de CMCase e xilanas, no entanto nestes trabalhos foram utilizados os substratos comerciais celulose cristalina, celobiose, glicose, xilana e frutose (Bayer *et al.*, 1985; Freier *et al.*, 1988; Mori 1992; Gold and Martin 2007; Tachaapaikoon *et al.*, 2012), não sendo relatado ainda o uso de biomassas complexas na produção dessas enzimas para *Clostridium thermocellum*.

A diferença na cinética de produção das CMCase e xilanas entre os substratos celulose comercial e biomassas (Figura 13 e 14), assim como os valores de atividade específica (Tabela 1), podem estar relacionados também com a estrutura dos substratos. A natureza recalcitrante dos resíduos agroindustriais dificulta a sua hidrólise e a disponibilidade de fontes de carbono assimiláveis pela bactéria retardando o seu crescimento, assim como a secreção de CMCase e xilanas e estes foram compensados após 4 dias de cultivo. Atividades específicas altas de xilanase e CMCase foram encontradas para palha de cana, sendo mais acentuada para a atividade de xilanase, sugerindo uma relação com a presença de polímeros de xilana na palha de cana, não encontrada na celulose comercial.

Dessa forma, a produção de CMCase e xilanas pelo isolado B8 quando cultivado na presença dos resíduos agroindustriais nos sugere a reutilização desses resíduos lignocelulósicos produzidos como rejeito agroindustrial na geração de produtos industriais como a produção de enzimas para uso biotecnológico. Assim, podemos utilizar esse resultado como uma utilização na agregação de valor econômico a esses subprodutos, assim como

minimizando problemas ambientais causados pelo seu acúmulo no ambiente. Resíduos agroindustriais demonstrados nesse trabalho e outros como casca de soja, palha de arroz, engaço de bananeira dentre outros, tem sido utilizados como fontes de carbono e energia para desenvolvimento de meios de cultura e cultivo de microrganismos produtores de enzimas e outras biomoléculas de interesse biotecnológico. Dados na literatura comprovam o grande potencial de utilização biotecnológica de resíduos agroindustriais como palha de cana e bagaço de cana, na produção de enzimas, xilitol e etanol (Chandel *et al.*, 2012).

6.3 Produção de CMCases e xilanases do isolado B8 nas frações eluídas do substrato (FES) e nas frações eluídas da celulose (FEC)

A proteína estrutural CipA constituinte do celulosoma secretado por *C. thermocellum* possui o módulo de ligação à celulose, CBM, caracterizado por um domínio contendo aminoácidos aromáticos e polares responsável pela ligação da proteína estrutural com os resíduos de glicose presentes na celulose através de ligações de hidrogênio, e contendo importante função descrita na facilitação da degradação da biomassa (Bayer *et al.*, 1998). No entanto, o papel deste domínio na interação destas proteínas com substratos lignocelulósicos mais complexos como o bagaço de cana, palha de cana e piolho de algodão ainda não foram demonstrados em estudos anteriores.

A diferença nos valores das atividades de CMCases e xilanases recuperadas nas amostras FES (fração de proteína ligantes ao substrato-fração celulosomal) (Tabela 2), pode estar relacionada à intensidade da interação entre o domínio CBM presente nas proteínas desta amostra e os substratos complexos. Celulosomas foram recuperados pela lavagem do substrato (Bayer *et al.*, 1983) quando *C.thermocellum* utiliza como fonte de carbono celulose no seu crescimento, sugerindo a presença desse complexo enzimático aderido às biomassas utilizadas nesse trabalho, a palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão. A atividade de CMCase recuperada foi portanto superior à de xilanase, ao contrário do observado para as linhagens ATCC27405, JW20, S14 crescidas em celulose e celobiose como fonte de

carbono (Tachaapaikoon *et al.*, 2012). Considerando que estes substratos contém na sua estrutura além da celulose uma grande porcentagem de lignina e xilana, existe a possibilidade que a interação substrato-proteína ligante seja menos intensa e por isto foi utilizado também o método de afinidade por celulose (Morag *et al.*, 1996), obtendo-se as amostras FEC. Essa abordagem têm sido utilizada por muitos grupos com o intuito de purificação de celulosomas recuperando atividades de CMCases e xilanase nas frações eluídas (Tachaapaikoon *et al.*, 2012).

A eluição direta das proteínas ligantes ao substrato residual (FES) para as fontes de carbono de palha de cana e piolho de algodão foi o procedimento mais adequado para a obtenção das proteínas que contém o domínio de ligação à celulose (CBM) e denominadas frações celulosomais. Demonstrando assim que maior parte das proteínas que apresentam domínio de ligação á celulose estavam ligadas ao substrato (tabela 3 e 4). Porém na análise da amostra de bagaço de cana, a fração FEC obteve maior atividade de CMCCase e xilanase, sugerindo uma diferença estrutural na biomassa que dificultou a ligações das proteínas com CBM se aderirem à biomassa. Além disso para as outras biomassas, palha de cana e piolho de algodão foram também encontradas atividades de CMCCase e xilanase na fração FEC, demonstrando a presença de proteínas contendo CBM presente livre do substrato.

Atividades específicas de CMCCase (12,64 UI/mg) e xilanase (32,99 UI/mg) nas frações eluídas do substrato para a amostra de palha de cana obtiveram valores superiores de dados relatados na literatura alcançando 12 vezes e 30 vezes maior que as mesmas atividades encontradas para linhagens de *C.thermocellum* ATCC27405, JW20, e S14 crescidas em celulose (Tachaapaikoon *et al.*, 2012).

Apesar das diferenças nos valores de atividade e proteína recuperadas nas amostras FES e FEC das fontes de carbono utilizadas, os perfis de proteínas presentes nestas foram semelhantes (Figura 15). Perfis semelhantes a estes também já foram observados nas análises de celulosomas produzidos por *C.thermocellum* quando cultivado em celulose e celobiose com uma

prevalência de proteínas com massa molecular acima de 45 kDa e pela presença de 10 a 14 bandas protéicas (Bayer *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1990). Esse resultado sugere que estas amostras podem conter o celulosoma. A presença de proteínas com massa molecular abaixo do valor esperado para proteínas celulosomais pode representar proteínas que se ligaram de forma inespecífica ao celulosoma ou ao substrato durante o preparo da amostra, ou ainda proteínas que contém domínio CBM mas não fazem parte do complexo enzimático (Bayer *et al.*, 1998).

Dados na literatura demonstram a caracterização de 5 xilanases pertencentes ao celulosoma de *C.thermocellum* como Xyn A, Xyn C, Xyn U, Xyn Z e Xyn Y, e CMCases como Cel A, Cel B, Cel D, Cel E, Cel F, Cel G, Cel H, Cel N, Cel Q, Cel R, Cel S (Zverlov *et al.*, 2005). As massa moleculares das xilanases variam de 70 kDa (Xyn C) a 120 kDa (Xyn Y), enquanto que as endoglucanases variam de 53kDa (Cel A) a 178 kDa (Cel J).

Pela análise das atividades de xilanases e CMCases em gel (Figura 16) pode-se observar que 6 bandas apresentam atividades de xilanase e 7 bandas apresentam atividade de CMCCase. Esta diferença proposta em zimograma para diferentes fontes de carbono não foi proposta anteriormente para celulosomas de *C.thermocellum*. Em contrapartida Morag e colaboradores (1990) realizaram zimograma do celulosoma purificado de *C.thermocellum* crescido em celulose, encontrando 9 bandas com atividade de xilanases e 7 bandas com atividade de CMCCase, dentre elas bandas que apresentaram ambas atividades e atividade exclusiva. O perfil de atividade enzimática em gel para as amostras FES (Figura 16) também foram semelhantes a perfis obtidos para análise de celulosomas de *C.thermocellum* reforçando a hipótese que estas amostras contém este complexo enzimático Morag (1990), e Zverlov (Zverlov *et al.*, 2005). Os perfis sugerem diferenças em algumas bandas protéicas, indicando uma possível diferença na constituição do celulosomas. Dados da literatura indicaram diferenças na estrutura desse complexo quando a fonte de carbono é modificada (Bayer *et al.*, 1985; Dror *et al.*, 2003; Nataf *et al.*, 2010).

6.3 Caracterização das atividades de CMCase e xilanase das frações eluídas do substrato (FES)

Uma das etapas críticas no processo industrial de produção de etanol é o pré-tratamento, que pode ser realizado utilizando-se diferentes métodos, em diferentes pHs, sendo este seguido pela sacarificação da biomassa utilizando-se enzimas ou catalisadores químicos. No caso da utilização de hidrólise enzimática após o pré-tratamento é necessário o ajuste do pH para a faixa de atuação do catalisador biológico. Desta forma, quando as enzimas apresentam atividade em um faixa mais extensa de pH, demonstrada na figura 17, faixa de pH de 5,0 a 7,0 para a atividade de CMCase da amostra de palha de cana indica uma característica positiva para sua utilização no processo de produção de etanol e ainda xilanases de bagaço e piolho que em pH 9,0 retém aproximadamente 80% da atividade.

Os dados de avaliação do efeito do pH na velocidade da reação catalisada pelas CMCases das amostras FES eluídas dos resíduos agroindustriais (Figura 17) indicam que estas são constituídas por conjuntos de CMCases distintas. Estes dados estão de acordo com os descrito acima dos dados do zimograma (Figura 16) que mostra um conteúdo de subunidades catalíticas diferenciadas para as diferentes fontes de carbono.

As CMCases e xilanases das amostras FES de palha de cana, piolho de algodão e bagaço de cana de açúcar foram caracterizadas (Tabela 5), dados apresentaram valores ótimos de atividade nas temperaturas de 65 a 70°C (figura 18), estando de acordo com o descrito para a atividade de Avicelase e CMCases de *C. thermocellum* por Kobayashi (1990) e Johnson (Johnson *et al.*, 1982). Na amostra de piolho de algodão, quando a 40°C e 80°C a atividade de CMCase retém 80% e 70% respectivamente, o que novamente é de grande interesse biotecnológico pela faixa extensa de atividade da enzima.

Tabela 6. Caracterização das FES (Fração eluída do substrato) para as amostras de bagaço de cana, palha de cana e piolho de algodão.

Caracterização enzimática da FES nos diferentes meios suplementados		
Temperatura ótima	CMCase	Xilanase
Bagaço de cana	65°C	65°C
Palha de cana	65-70°C	65-70°C
Piolho de algodão	60-70°C	60-70°C
pH ótimo	CMCase	Xilanase
Bagaço de cana	6,0	6,0
Palha de cana	6,0	5,0-7,0
Piolho de algodão	5,0	6,0
Atividade relativa após 6 horas de incubação a 70°C (%)	CMCase	Xilanase
Bagaço de cana	13,62	9,03
Palha de cana	78,89	75,67
Piolho de algodão	35,74	48,21

O processo de hidrólise na sacarificação da biomassa na produção de etanol é realizado em temperaturas de acordo com a temperatura adequada para atuação das enzimas utilizadas. O processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, etapa anterior à sacarificação no processo industrial de produção de etanol celulósico normalmente é realizada em altas temperaturas, sendo necessário o seu posterior resfriamento. A utilização de misturas enzimáticas com atividade em temperaturas mais elevadas e termoestáveis diminui o custo para o resfriamento das caldeiras, podendo contribuir desta forma para aprimoramento da cadeia produtiva do etanol. Como exemplo pode-se citar o pré-tratamento realizado com amônia realizado em temperaturas de 70 a 90°C (Wyman *et al.*, 2005).

A termoestabilidade é um fator importante levado em consideração para a hidrólise enzimática durante o processo de sacarificação na produção de etanol, característica desejável no processo de produção de bioetanol. Celulases termoestáveis expressas por *E.coli* e utilizadas em bioprocessos retém 80% de sua atividade após 30-60 minutos, como por exemplo enzimas expressas de endoglucanase de *Thermobifida halatolerans* e endoglucanase de *C.thermocellum* (Zhang *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011). As CMCases e xilanases da amostra FES de palha de cana de açúcar (Figura 19 e 20)

mantiveram aproximadamente 80% de sua atividade após 6 horas de pré-incubação a 70°C, superior ao tempo de 3 horas obtido para as CMCases e xilanases de FES de bagaço de cana e piolho de algodão, demonstrando ser constituída por um pool de enzimas mais termoestáveis.

As amostras de FES de palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão apresentaram propriedades cinéticas adequadas à utilização no processo industrial de produção de bioetanol e com potencial de aplicação no desenvolvimento de misturas enzimáticas para sacarificação destas biomassas. A identificação da proteínas e experimentos de sacarificação utilizando estas amostras, pode contribuir para verificar a hidrólise destas biomassas depende de um grupo específico de enzimas e desta forma ter uma mistura contendo todas as enzimas necessárias para sacarificar qualquer uma destas biomassas. Os resultados demonstrados para amostras eluídas do substrato podem sugerir assim que não seja necessário a purificação do celulosoma para uso biotecnológico.

Foi realizado também ensaios enzimáticos (figura 21 e 22) com o intuito de definir os valores de $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$ para as amostras de FES concentradas. O valor encontrado para uma xilanase presente na amostra preparada de palha cana, foi de 46,5 $\mu\text{mol/mL}$ para K_m e V_{max} de 0,0066 μmolmin . De acordo com estudos com Xyn C purificada de *C.thermocellum* (Hayashi et al., 1997), o valor de K_m encontrado e o de V_{max} são de 3,9mg/mL e 611 $\mu\text{mol/min/mg}$. Demonstrando que no presente estudo os dados são bem diferentes, mostrando um alto K_m , que a grosso modo condiz uma baixa afinidade pelo substrato e a velocidade baixa de conversão em produto. Porém devemos salientar que a amostra contém vários tipos de xilanases como verificados no zimograma (figura 14), sendo difícil definir os parâmetros cinéticos, como ocorrido para as outras amostras que não possível definir.

6.4 Fracionamento das amostras FES em coluna de exclusão molecular e sua análise

As amostras FES após fracionamento em coluna de exclusão molecular apresentaram picos protéicos com massa molecular estimada na faixa superior a 2 MDa, além disto para estes picos foram detectadas ambas as atividades de CMCase e xilanase (Figura 25). A eluição de piolho de algodão é diferenciada das outras biomassas o que sugere um tamanho diferenciado do celulosoma presente. Tamanhos diferentes do celulosoma de *Clostridium* já foram descritos, como os de: 2,1 MDa da linhagem YS crescida em celulose e 6,5 MDa de ATCC 274089 proveniente do crescimento em avicel (Lamed *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 2008). A diferença na massa dos celulosomas pode ocorrer devido a uma diferença na sua constituição ou até mesmo pela dissociação das proteínas celulosomais da proteína estrutural. Desta forma, é comum se obter uma mistura de celulosomas com diferentes graus de organização dependendo de quantas subunidades dissociaram do complexo.

Os perfis de proteínas das frações celulosomais (Figura 26) fracionadas para as amostras FES de palha e bagaço de cana são semelhantes sendo observadas bandas protéicas com massa molecular variando de 45 KDa a 116 KDa e acima desta. Estes resultados estão de acordo com o descrito em trabalhos anteriores que analisaram a constituição de celulosomas purificados de *C.thermocellum* (Bayer *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1990; Mori 1992). O perfil pode ser melhor visualizado na figura 29 para a fração de palha e bagaço de cana sugerindo a diferença de constituição por diferentes subunidades catalíticas, ou mesmo por diferença em uma maior ou menor quantidade de bandas. Dessa forma, cada tipo de biomassa induz a formação de um tipo de complexo e o que sugere a utilização de complexos de composições diferentes para a hidrólise de diferentes biomassas.

A produção de celulosomas de *C. thermocellum* isolado B8 utilizando as fontes de carbono bagaço de cana, piolho de cana e palha de cana foi descrita pela primeira vez neste trabalho. Celulosomas produzidos por espécies de *Clostridium* foram relatados durante crescimento em avicel e celulose (Honnami *et al.*, 1986) apresentando em sua purificação 2 picos

contendo massa molecular estimada de 100 MDa e 4,5 MDa demonstrando tanto a presença de celulosoma quanto encontrados também na forma de policelulosomas com o tamanho de 100 MDa. A presença de policelulosomas é verificada também no trabalho de Yutaka Mori (Mori 1992) em crescimento em avicel.

Trabalhos anteriores como os de Mori (1982) e Lamed (1983), caracterizaram o tamanho dos celulosomas purificados através da eluição na cromatografia líquida. A utilização de géis não desnaturantes não foram bem sucedidas devido ao fato do complexo ser muito grande, aproximadamente 2 MDa a 6.5 MDa, não conseguindo entrar na malha de poliacrilamida, mesmo sendo utilizadas concentrações baixas na polimerização. Estudos demonstrando a realização do Blue Native Page com a resolução de complexos de 600 kDa (Swamy *et al.*, 2006).

A análise por DLS dos celulosomas fracionados por exclusão molecular (Figuras 27 e 28) confirmou que os picos protéicos são constituídos por um composto protéico de alta massa molecular correspondente à dos celulosomas já descritos. No entanto estas amostras contêm também uma outra população de proteínas com massa acima da estimada para os celulosomas, que pode corresponder a policelulosomas e agregados dos complexos protéicos.

Duas proteínas da fração celulosomal de palha de cana foram identificadas utilizando espectrometria de massa. A banda protéica número 1, relacionada na figura 29, com massa molecular estimada acima de 116 kDa foi identificada como a proteína estrutural de *C.thermocellum* que é responsável através dos domínios coesina do tipo I pela ligação às regiões dockerina tipo I presentes nas proteínas constituintes do celulosoma. A banda protéica número 4 (Figura 29) foi identificada como a exoglucanase Cel S, componente catalítico mais abundante do celulosoma (Guimaraes *et al.*, 2002). A identificação destas proteínas confirmam que a amostra FES de palha de cana de açúcar contém o celulosoma e que este foi purificado pelo uso da cromatografia de exclusão molecular.

Dessa forma, com a purificação do celulosoma e a finalização da identificação das proteínas constituintes dos celulosomas será possível determinar a constituição adequada para hidrolisar cada uma das biomassas que possuem estruturas de diferentes teores de celulose, hemicelulose e lignina, contribuindo assim para o desenvolvimento de misturas enzimáticas eficientes na sacarificação das biomassas produtos de rejeito agroindustrial. Além disso a caracterização parcial preliminar das enzimas presentes nas frações eluídas do substrato possuiu características cinéticas que podem ser melhor avaliadas em respeito a tolerância do isolado B8 aos subprodutos do processo de produção de etanol para seu uso na hidrólise da biomassa e também em uso de Bioprocesso consolidado.

7 CONCLUSÃO

- O isolado B8 de *Clostridium thermocellum* isolado de rúmen de caprinos da raça Moxotó utilizam celulose, bagaço de cana, palha de cana e piolho de cana como fonte de carbono para seu crescimento, demonstrado nos gráficos de liberação de açúcar, nos diferentes tempos de incubação da bactéria.
- O isolado B8 de *C.thermocellum* secreta atividades de CMCase e xilanase encontradas em sobrenadante e ligados ao substrato, determinado por atividade enzimática e análise em atividade por eletroferese em gel, sendo encontradas 6 CMCases e 7 xilanases.
- Os dois métodos utilizados na purificação de celulosoma; a lavagem da biomassa e o método de afinidade modificado, obtiveram em suas frações atividades de CMCase e xilanase identificados por ensaio enzimático, obtendo altas atividades específicas em relação com dados da literatura.
- A caracterização de temperatura e pH das atividades de CMCase e xilanase possuíram resultados diferentes, caracterizando um pool diferenciado de enzimas nas frações eluídas do substrato.
- Os perfis cromatográficos foram diferentes para as fontes de carbono utilizada nos crescimento, palha de cana, bagaço de cana e piolho de algodão, podendo demonstrar diferentes proteínas presentes nas frações eluídas dos diferentes substratos.
- Foram identificadas a proteína estrutural CipA e uma exoglucanase Cel S ambas pertencentes ao celulosoma de *C.thermocellum* demonstrando a obtenção do complexo nas frações eluídas do substrato e no pico cromatográfico reunido na cromatografia de palha de cana.

- O tamanho estimado do complexo enzimático através da técnica DLS (Espalhamento de luz dinâmica) foi de 6,5MDa para as amostra de bagaço de cana palha de cana.

8 PERSPECTIVAS

- Dar continuidade ao processo de purificação de celulosomas e identificação de um maior número de subunidades protéicas.
- Identificar detalhadamente quais são as proteínas expressas diferencialmente nas diferentes fontes de carbono.
- Aprimorar o uso da técnica de DLS para estimar a massa molecular do complexo enzimático produzido para cada fonte de carbono.
- Utilizar os resultados gerados para planejamento de experimento na sacarificação das biomassas utilizando as amostras de FES e os celulosomas purificados, e a associação dos diferentes celulosomas.
- Através da identificação das enzimas constituintes do celulosoma no processo da sacarificação, utilizar esse conhecimento para apontar as enzimas-chave na degradação, e assim desenvolver misturas eficientes na degradação de rejeitos agroindustriais.

9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- A, B.;N, B.;S, K.;KM, B.RK, S. (2012).- Improved Lignocellulose Conversion to Biofuels with Thermophilic Bacteria And thermoestable enzymes. *Bioresource Technology* 8(12): 01654-01659.
- Agência Nacional do Petróleo, G.N.e.B. (2012). Anuário Estatístico Brasileiro Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis, Centro de Documentação e informação da ANP.
- Alvira, P.;Tomas-Pejo, E.;Ballesteros, M.Negro, M.J. (2010).Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review. *Bioresource Technology* 101(13): 4851-4861.
- Bayer, E.A.;Kenig, R.Lamed, R. (1983).Adherence of Clostridium Thermocellum to Cellulose. *Journal of Bacteriology* 156(2): 818-827.
- Bayer, E.A.;Lamed, R.;White, B.A.Flint, H.J. (2008).From Cellulosomes to Cellulosomics. *Chemical Record* 8(6): 364-377.
- Bayer, E.A.;Setter, E.Lamed, R. (1985).Organization and Distribution of the Cellulosome in Clostridium-Thermocellum. *Journal of Bacteriology* 163(2): 552-559.
- Bayer, E.A.;Shimon, L.J.W.;Shoham, Y.Lamed, R. (1998).Cellulosomes - Structure and Ultrastructure. *Journal of Structural Biology* 124(2-3): 221-234.
- Bischoff, K.M.;Shi, L.Kennelly, P.J. (1998).The Detection of Enzyme Activity Following Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 260(1): 1-17.
- Bradford, M.M. (1976).A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cai, Y.;Lai, C.;Li, S.;Liang, Z.;Zhu, M.;Liang, S.Wang, J. (2011).Disruption of Lactate Dehydrogenase through Homologous Recombination to Improve Bioethanol Production in Thermoanaerobacterium Aotearoense. *Enzyme and Microbial Technology* 48(2): 155-161.
- Chandel, A.K.;da Silva, S.S.;Carvalho, W.Singh, O.V. (2012).Sugarcane Bagasse and Leaves: Foreseeable Biomass of Biofuel and Bio-Products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 87(1): 11-20.
- Chang, T.Yao, S. (2011).Thermophilic, Lignocellulolytic Bacteria for Ethanol Production: Current State and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92(1): 13-27.
- da Silva, A.S.A.;Inoue, H.;Endo, T.;Yano, S.Bon, E.P.S. (2010).Milling Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Straw for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation. *Bioresource Technology* 101(19): 7402-7409.
- Damerval, C.;De Vienne, D.;Zivy, M.Thiellement, H. (1986).Technical Improvements in Two-Dimensional Electrophoresis Increase the Level of Genetic Variation Detected in Wheat-Seedling Proteins. *Electrophoresis* 7(1): 52-54.

- Dias, M.O.S.;Junqueira, T.L.;Cavalett, O.;Cunha, M.P.;Jesus, C.D.F.;Rossell, C.E.V.;Maciel Filho, R.Bonomi, A. (2012).Integrated Versus Stand-Alone Second Generation Ethanol Production from Sugarcane Bagasse and Trash. *Bioresource Technology* 103(1): 152-161.
- Dror, T.W.;Morag, E.;Rolider, A.;Bayer, E.A.;Lamed, R.Shoham, Y. (2003).Regulation of the Cellulosomal Cels (Cel48a) Gene of Clostridium Thermocellum Is Growth Rate Dependent. *Journal of Bacteriology* 185(10): 3042-3048.
- Dror, T.W.;Rolider, A.;Bayer, E.A.;Lamed, R.Shoham, Y. (2003).Regulation of Expression of Scaffoldin-Related Genes in Clostridium Thermocellum. *Journal of Bacteriology* 185(17): 5109-5116.
- Duff, S.J.B.Murray, W.D. (1996).Bioconversion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: A Review. *Bioresource Technology* 55(1): 1-33.
- Fontes, C.M.Gilbert, H.J. (2010).Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annu Rev Biochem* 79: 655-681.
- Freier, D.;Mothershed, C.P.Wiegel, J. (1988).Characterization of Clostridium-Thermocellum Jw20. *Applied and Environmental Microbiology* 54(1): 204-211.
- Fujino, T.;Beguín, P.Aubert, J.P. (1993).Organization of a Clostridium-Thermocellum Gene-Cluster Encoding the Cellulosomal Scaffolding Protein Cipa and a Protein Possibly Involved in Attachment of the Cellulosome to the Cell-Surface. *Journal of Bacteriology* 175(7): 1891-1899.
- Furlan, F.F.;Costa, C.B.B.;Fonseca, G.d.C.;Soares, R.d.P.;Secchi, A.R.;Cruz, A.J.G.d.Giordano, R.d.C. (2012).Assessing the Production of First and Second Generation Bioethanol from Sugarcane through the Integration of Global Optimization and Process Detailed Modeling. *Computers & Chemical Engineering* 43(0): 1-9.
- Gal, L.;Pages, S.;Gaudin, C.;Belaich, A.;Reverbel-Leroy, C.;Tardif, C.Belaich, J.P. (1997).Characterization of the Cellulolytic Complex (Cellulosome) Produced by Clostridium Cellulolyticum. *Appl Environ Microbiol* 63(3): 903-909.
- Gold, N.D.Martin, V.J.J. (2007).Global View of the Clostridium Thermocellum Cellulosome Revealed by Quantitative Proteomic Analysis. *Journal of Bacteriology* 189(19): 6787-6795.
- Guimaraes, B.G.;Souchon, H.;Lytle, B.L.;David Wu, J.H.Alzari, P.M. (2002).The Crystal Structure and Catalytic Mechanism of Cellobiohydrolase Cels, the Major Enzymatic Component of the Clostridium Thermocellum Cellulosome. *J Mol Biol* 320(3): 587-596.
- Hayashi, H.;Takagi, K.I.;Fukumura, M.;Kimura, T.;Karita, S.;Sakka, K.Ohmiya, K. (1997).Sequence of Xync and Properties of Xync, a Major Component of the Clostridium Thermocellum Cellulosome. *Journal of Bacteriology* 179(13): 4246-4253.
- He, Q.;Hemme, C.L.;Jiang, H.;He, Z.Zhou, J. (2011).Mechanisms of Enhanced Cellulosic Bioethanol Fermentation by Co-Cultivation of Clostridium and Thermoanaerobacter Spp. *Bioresour Technol* 102(20): 9586-9592.
- Honnami, K.;Coughlan, M.P.;Honnami, H.Ljungdahl, L.G. (1986).Separation and Characterization of the Complexes Constituting the Cellulolytic Enzyme-System of Clostridium-Thermocellum. *Archives of Microbiology* 145(1): 13-19.

Johnson, E.A.;Sakajoh, M.;Halliwell, G.;Madia, A.Demain, A.L. (1982).Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from Clostridium-Thermocellum. *Applied and Environmental Microbiology* 43(5): 1125-1132.

Karpol, A.;Jobby, M.K.;Slutzki, M.;Noach, I.;Chitayat, S.;Smith, S.P.Bayer, E.A. (2013).Structural and Functional Characterization of a Novel Type-iii Dockerin from Ruminococcus Flavefaciens. *FEBS Letters* 587(1): 30-36.

Kobayashi, T.;Romaniec, M.P.M.;Fauth, U.Demain, A.L. (1990).Subcellulosome Preparation with High Cellulase Activity from Clostridium-Thermocellum. *Applied and Environmental Microbiology* 56(10): 3040-3046.

Laemmli, U.K. (1970).Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Lamed, R.;Setter, E.Bayer, E.A. (1983).Characterization of a Cellulose-Binding, Cellulase-Containing Complex in Clostridium Thermocellum. *Journal of Bacteriology* 156(2): 828-836.

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

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

Lynd, L.R.;Weimer, P.J.;van Zyl, W.H.Pretorius, I.S. (2002).Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3): 506-577.

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

Mori, Y. (1992).Comparison of the Cellulolytic Systems of Clostridium-Thermocellum Ym4 and Jw20. *Biotechnology Letters* 14(2): 131-136.

Nataf, Y.;Bahari, L.;Kahel-Raifer, H.;Borovok, I.;Lamed, R.;Bayer, E.A.;Sonenshein, A.L.Shoham, Y. (2010).Clostridium Thermocellum Cellulosomal Genes Are Regulated by Extracytoplasmic Polysaccharides Via Alternative Sigma Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(43): 18646-18651.

Newcomb, M.;Chen, C.-Y.Wu, J.H.D. (2007).Induction of the Celc Operon of Clostridium Thermocellum by Laminaribiose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(10): 3747-3752.

Newcomb, M.;Millen, J.;Chen, C.-Y.Wu, J.H.D. (2011).Co-Transcription of the Celc Gene Cluster in Clostridium Thermocellum. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(2): 625-634.

Ng, T.K.;Weimer, T.K.Zeikus, J.G. (1977).Cellulolytic and Physiological Properties of Clostridium Thermocellum. *Arch Microbiol* 114(1): 1-7.

- Olson, D.G.;Giannone, R.J.;Hettich, R.L.Lynd, L.R. (2013).Role of the Cipa Scaffoldin Protein in Cellulose Solubilization, as Determined by Targeted Gene Deletion and Complementation in *Clostridium Thermocellum*. *Journal of Bacteriology* 195(4): 733-739.
- Olson, D.G.;McBride, J.E.;Joe Shaw, A.Lynd, L.R. (2012).Recent Progress in Consolidated Bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology* 23(3): 396-405.
- Qin, Y.;He, H.;Li, N.;Ling, M.Liang, Z. (2010).Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase-Producing *Fusarium Chlamydosporum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(11): 1991-1997.
- Ramos, L.P. (2003). The Chemistry Involved in the Steam Treatment of Lignocellulosic Materials. *Quimica Nova*. **26**: 863-871.
- Sarkar, N.;Ghosh, S.K.;Bannerjee, S.Aikat, K. (2012).Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An Overview. *Renewable Energy* 37(1): 19-27.
- Schagger, H.von Jagow, G. (1991).Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Analytical Biochemistry* 199(2): 223-231.
- Swamy, M.;Siegers, G.M.;Minguet, S.;Wollscheid, B.Schamel, W.W.A. (2006).Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Bn-Page) for the Identification and Analysis of Multiprotein Complexes. *Sci. STKE* 2006(345): pl4-.
- Tachaapaikoon, C.;Kosugi, A.;Pason, P.;Waeonukul, R.;Ratanakhanokchai, K.;Kyu, K.L.;Arai, T.;Murata, Y.Mori, Y. (2012).Isolation and Characterization of a New Cellulosome-Producing *Clostridium Thermocellum* Strain. *Biodegradation* 23(1): 57-68.
- Tormo, J.;Lamed, R.;Chirino, A.J.;Morag, E.;Bayer, E.A.;Shoham, Y.Steitz, T.A. (1996).Crystal Structure of a Bacterial Family-II Cellulose-Binding Domain: A General Mechanism for Attachment to Cellulose. *Embo Journal* 15(21): 5739-5751.
- Tuomela, M.;Vikman, M.;Hatakka, A.Itävaara, M. (2000).Biodegradation of Lignin in a Compost Environment: A Review. *Bioresource Technology* 72(2): 169-183.
- Weil, J.;Westgate, P.;Kohlmann, K.Ladisich, M.R. (1994).Cellulose Pretreatments of Lignocellulosic Substrates. *Enzyme and Microbial Technology* 16(11): 1002-1004.
- Wilson, W.W. (2003).Light Scattering as a Diagnostic for Protein Crystal Growth--a Practical Approach. *Journal of Structural Biology* 142(1): 56-65.
- Wu, A.J.;Jarzembowski, J.;Morag, Y.Lucas, D.R. (2008).Wagner-Meissner Neurilemmoma of the Right Cheek. *Annals of diagnostic pathology* 12(3): 204-207.
- Wyman, C.E.;Dale, B.E.;Elander, R.T.;Holtzapple, M.;Ladisich, M.R.Lee, Y.Y. (2005).Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies. *Bioresource Technology* 96(18): 1959-1966.
- Xu, C.;Qin, Y.;Li, Y.;Ji, Y.;Huang, J.;Song, H.Xu, J. (2010).Factors Influencing Cellulosome Activity in Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Ethanol. *Bioresource Technology* 101(24): 9560-9569.

Zuo, Z.;Tian, S.;Chen, Z.;Li, J.Yang, X. (2012).Soaking Pretreatment of Corn Stover for Bioethanol Production Followed by Anaerobic Digestion Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(7): 2088-2102.

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