



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Enzimologia

Avaliação e caracterização da atividade
holocelulolítica de isolados de
Clostridium thermocellum

LIANA REIS BLUME

2011

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Enzimologia

Avaliação e caracterização da atividade holocelulolítica
de isolados de *Clostridium thermocellum*

LIANA REIS BLUME

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Felix

Co-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 2011

Dedico a minha família, em especial aos meus amados pais,
Helio e Lia Rosa, e ao meu irmão, Guilherme, pelo amor,
apoio e incentivo incondicionais nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo e proteção em todos os caminhos da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Carlos Roberto Felix, pela oportunidade, pelos conselhos, exemplos e amizade. Obrigada pelo valioso apoio e por acreditar em mim! Nossas inúmeras conversas foram muito valiosas no meu crescimento pessoal e profissional.

A minha co-orientadora Dra Eliane Ferreira Noronha, que participou intensamente de cada acontecimento durante o mestrado, desde os experimentos na bancada até a escrita da dissertação. Obrigada pela dedicação e pela paciência!

Aos professores, alunos e técnicos do Laboratório de Bioquímica, Dr. Carlos André Ornelas Ricart, Dr. Marcelo Valle de Souza, Adelson, Carol, Diana, Jacques, Pedro e Nuno pelos conhecimentos e parceria na etapa de proteômica.

Ao Rayner Myr, sem o qual não completaria a etapa de proteômica deste trabalho, pela ajuda inestimável na utilização do espectrômetro de massa, por ser sempre prestativo e pelas incontáveis sextas-feiras que dedicou seu tempo nessa tarefa.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia, Marísia Cortes, Margarete Lima, Leonora Rios, Natália Milanezi, Sheila Thurler, Ingrid Mattos, Antonielle Monclaro, Alan Jensen, Paula Jaramillo, Caio Gorgulho, Fernanda Fop, Francilene Silva, Luiz Eduardo Araújo, Priscila Lima, Isis Souza, Luiz Vale, Félix Siqueira, Débora Parrine, Marly Carvalho, Karina Vogth e o prof. Dr. Edivaldo Ximenes pela companhia, por compartilharem seus conhecimentos e pelos bons momentos que passamos juntos.

À Jackeline Leite, companheira e confidente em longas conversas. Obrigada pela valiosa ajuda com as técnicas de proteômica, pela paciência nas explicações e por estar sempre disponível quando precisei da sua ajuda!

Ao Gilvan Duarte e sua esposa, Fernanda, por tornarem meus finais de semana de trabalho no laboratório muito mais leves e divertidos.

A minha grande amiga Juliana Braz, que desde a graduação está ao meu lado me apoiando, e também no mestrado me ajudou em todos os momentos que precisei de sua amizade, com o seu jeito doce e sincero!

À Renata Ferreira, amiga que me incentivou desde o início nas horas de estudo para passar na seleção do mestrado e com quem durante esses dois anos compartilhei momentos de desespero, mas também de boas risadas e muita diversão.

A minha família, pais, irmãos, tios e primos, pelo incentivo, torcida e carinho.

Aos meus amigos do “grupo”, Dani, Drika, Dudi, Mari, Pri e Tati, e as minhas amigas de sempre, Bel, Juju, Poca, Tici, Rá e Lari, pelos momentos de alegria que me proporcionaram, pelos encontros, festas, conversas e principalmente pelo apoio e compreensão nas inúmeras vezes que estive ausente durante essa etapa.

Aos meus colegas do MPA, por aguentarem minhas alterações de humor nessa etapa final do mestrado e por tornarem os meus dias mais agradáveis.

À Secretaria e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

A todos, que de alguma forma, me auxiliaram na realização dessa dissertação.

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da Universidade de Brasília - **UnB**, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - **CNPq**, Financiadora de Estudos e Projetos - **FINEP** e Fundação de Apoio à Pesquisa do DF - **FAPDF**.

RESUMO

O uso de biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de etanol combustível se inicia pela intensa hidrólise de suas estruturas para a obtenção de açúcares fermentáveis. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de atividades enzimáticas celulolíticas e hemicelulolíticas de dois isolados da bactéria anaeróbica termófila *Clostridium thermocellum* (ISO1 e ISO2), quando cultivados em meio de cultura contendo celulose cristalina e bagaço de cana-de-açúcar, assim como, analisar o perfil de proteínas secretadas em cada uma destas condições, visando o mapeamento de proteínas envolvidas na degradação destas biomassas. O pH e temperatura ideais para o cultivo dos isolados são pH 7 e 60°C. Os isolados secretam atividade celulolítica, xilanolítica e pectinolítica quando cultivados em meio de cultura contendo celulose cristalina ou bagaço de cana de açúcar como única fonte de carbono. Estas atividades foram detectadas no sobrenadante do meio de cultura e também associadas ao substrato residual, sendo que o maior valor de atividade 0,478 UI/mL foi detectado para a atividade xilanolítica no sobrenadante de ISO2 cultivado em bagaço de cana. Além disso, os isolados foram capazes de degradar celulose cristalina com atividades de 0,052UI/mL e 0,040 UI/mL obtidas para as proteínas eluídas do substrato residual celulósico e proteínas secretadas no meio de cultura com bagaço de cana de ISO2, respectivamente. O perfil protéico do sobrenadante e proteínas associadas ao substrato residual foi analisado por eletroforese SDS-PAGE, no qual foi observada a presença de proteínas de 160 e 220kDa, com perfil semelhante ao celulosoma de um isolado de *C. thermocellum* utilizado como controle (Cth JW). Adicionalmente, os sobrenadantes das culturas foram utilizados como fonte de proteínas para as análises em géis bidimensionais, 2-DE, nos quais foram observadas diferenças no número e volume de *spots* entre as condições de crescimento, e na comparação dos isolados ISO1 e ISO 2 com o isolado padrão. A espectrometria de massas MALDI-TOF foi utilizada na identificação de proteínas do secretoma do ISO2 cultivado em celulose como fonte de carbono.

ABSTRACT

The use of lignocellulosic biomass as feedstock for bioethanol production begins with the intense hydrolysis of its structure to obtain fermentable sugars. The present work aims the evaluation of cellulolytic and hemicellulolytic activities production from two strains of the thermophilic anaerobic bacterium *Clostridium thermocellum* (ISO1 e ISO2), after growth on crystalline cellulose and sugarcane bagasse, also, the protein profile secreted by these isolates was resolved by SDS-PAGE and 2DE electrophoresis aiming the identification of proteins that participate on the cellulosic raw material degradation. The pH and temperature for optimal growth of the isolates are pH 7 and 60 ° C. The bacterium isolates produce cellulolytic, xylanolytic and pectinolytic activities when cultured in liquid medium containing crystalline cellulose or sugar cane bagasse as the sole carbon source. These activities were detected in the supernatant of the culture medium and also associated with the residual substrate, and the highest value was obtained for the xylanolytic activity (0.478 UI/mL) from the supernatant of ISO2 grown on sugarcane bagasse. Moreover, the isolates were capable to degrade crystalline cellulose, with activities of 0.052 UI/mL and 0.040 UI/mL for the protein sample eluted from the residual substrate and secreted proteins into the culture medium with sugarcane bagasse ISO2, respectively. The protein profile of the supernatant and substrate associated proteins were analyzed by SDS-PAGE, and the presence of 160 e 220kDa proteins with a similar profile to the cellulosome of a *C. thermocellum* was observed. Additionally, the culture supernatants were used as a source of proteins for the analysis in two-dimensional gels, 2-DE, and there were differences in the number of spots and its volume between the growth conditions, and in comparison of the two strains ISO1 and ISO and the standard isolate CthJW. Mass spectrometry MALDI-TOF was used to the identification of ISO2's secretome proteins after growth in liquid medium containing cellulose as carbon sources.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS	p.
Figura 1. (a) Estrutura de um filamento de celulose (b) Esquema mostrando a organização das fibras de celulose. Modificado de Desvaux(2005).	19
Figura 2. Estrutura das hemiceluloses glucuroxilana e galatomana. Modificado de Scheller et. al.(2010).	20
Figura 3. Constituintes da lignina (Boerjan <i>et. al.</i> , 2003).	20
Figura 4. Esquema de hidrólise da celulose microcristalina e amorfa pelas enzimas livres (a) e as contidas em complexo de celulases (b) Modificado de Lynd et al.(2002).	22
Figura 5. Esquema do celulosoma da bactéria <i>Clostridium thermocellum</i> . Modificado de Demain et al. (2005).	28
Figura 6. Esquema das etapas de preparação das amostras enzimáticas de <i>C. thermocellum</i> após crescimento em meio líquido redutor contendo celulose cristalina a 2% ou bagaço de cana a 0,5%.	39
Figura 7. Curva de crescimento dos isolados de <i>C. thermocellum</i> – ISO1, ISO2 e CthJW, quando cultivados a 60°C, por 65h, em meio contendo celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância da cultura a 650 nm. * p<0,05.	46
Figura 8. Curva de crescimento dos isolados de <i>C. thermocellum</i> – ISO1, ISO2 e CthJW, quando cultivados a 60°C, por 65h, em meio contendo bagaço de cana de açúcar a 0,5% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância da cultura a 650 nm. * p<0,05.	46
Figura 9. Crescimento dos isolados de <i>C. thermocellum</i> – ISO1, ISO2 e Cth JW, quando cultivados em temperaturas variando de 37 a 70°C, por 48h - em meio contendo celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância a 650 nm. * p<0,05.	47

Figura 10. Crescimento dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e CthJW, quando cultivados a 60°C em pHs variando de 5 a 9, por 48h - em meio contendo celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância a 650 nm. * $p < 0,05$ 48

Figura 11. Determinação da atividade de CMCase nas amostras concentradas de proteínas eluídas do substrato residual (A) e sobrenadante dos meios de cultura (B) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%. * $p < 0,05$ 51

Figura 12. Determinação da atividade de AVICELase nas amostras concentradas de proteínas eluídas do substrato residual (A) e sobrenadante dos meios de cultura (B) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%. * $p < 0,05$ 52

Figura 13. Determinação da atividade de xilanase nas amostras concentradas de proteínas eluídas do substrato residual (A) e sobrenadante dos meios de cultura (B) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%. * $p < 0,05$ 53

Figura 14. Determinação da atividade de pectinase nas amostras concentradas de proteínas do sobrenadante dos meios de cultura dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%. 54

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura de amostras de celulose microcristalina fibra longa, substrato residual após o cultivo dos isolados de *C. thermocellum* por 48 h a 60°C. Celulose proveniente de meio de cultura não inoculado (A), Celulose residual provenientes das culturas dos isolados ISO1 (B), ISO2 (C) e Cth JW (D). Aumento 600x. 55

Figura 16. Análise protéica em SDS-PAGE 10% das amostras eluídas da substrato residual (A) e dos sobrenadantes (B) do meio de cultura dos isolados de *C. thermocellum* - ISO1 (L1), ISO2 (L2) e Cth JW (L3). Os crescimentos foram realizados utilizando celulose cristalina (L1-3) e bagaço de cana (L4-6) como fonte carbono. 57

Figura 17. Análise protéica em 2-DE SDS-PAGE 10% dos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1 (A); ISO2 (B) e Cth JW (C) crescidos em celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. A variação de pH da faixa ácida do pH4-7 está mostrado (IEF) e as massas moleculares (kDa) das proteínas estão representadas à esquerda de cada figura. 59

Figura 18. Análise protéica em 2-DE SDS-PAGE 10% dos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1 (A); ISO2 (B) e Cth JW (C) - crescidos em bagaço de cana a 0,5% como fonte de carbono. A variação de pH da faixa ácida do pH4-7 e as massas moleculares (kDa) das proteínas estão representadas à esquerda de cada figura. 59

Figura 19. Expressão diferencial em porcentagem de volume dos spots 197 (A), 191 (B), 29 (C), 200 (D) nos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* ISO1, ISO2 e CthJW crescidos em celulose cristalina a 2% como fonte de carbono..... 63

Figura 20. Expressão diferencial em porcentagem de volume dos spots 1 (A), 30 (B), 31 (C) e 28 (D) nos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* ISO1, ISO2 e CthJW crescidos em celulose cristalina a 2% como fonte de carbono..... 64

Figura 21. Expressão diferencial em porcentagem de volume dos spots 31 (A), 28 (B), 193 (C) e 145 (D) nos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* ISO1, ISO2 e CthJW crescidos em celulose cristalina a 2% como fonte de carbono..... 64

TABELAS

Tabela 1. Quantificação de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras dos sobrenadantes e eluídas do substrato residual do meio de cultura (celulose cristalina e bagaço de cana) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e CthJW. 49

Tabela 2. Determinação de spots totais, spots exclusivos e o coeficiente de correlação dos géis 2-DE dos secretomas dos isolados de *C. thermocellum*. Para a contagem de spot foi utilizado o programa *Image Master Platinum v.6*. 61

Tabela 3. Identificação das proteínas a partir do perfil bidimensional do secretoma do isolado de *C. thermocellum* ISO2 cultivado em celulose cristalina a 2% (m/v) como fonte de carbono..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine Serum albumin/</i> albumina sérica bovina
CMC	Carboxi metil celulose
2-DE	Eletroforese bidimensional
DHB	<i>2, 5-dihydroxybenzoic acid/</i> ácido 2,5-di-hidroxibenzóico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DTT	Ditiotreitol
HSP	<i>Heat Shock Protein/</i> Proteína de choque térmico
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization /</i> Desorção e ionização a laser assistida por matriz
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPT	Modificação pós-traducional
MS	<i>Mass Spectrometry/</i> Espectrometria de massa
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
RNA	<i>Ribonucleic acid/</i> Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	<i>SDS - polyacrylamide gel electrophoresis/</i> eletroforese em gel de poliacrilamida
TOF	<i>Time of flight /</i> tempo de voo
UI	Unidade internacional
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate/</i> Dodecil sulfato de sódio
TSA	<i>Thiol Specific Antioxidant/</i> antioxidante específico para tióis

ÍNDICE

	p.
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Produção de bioetanol	15
1.2 Biomassa vegetal.....	17
1.2.1 Biopolímeros constituintes da parede celular vegetal.....	18
1.3 Hidrólise enzimática da lignocelulose	21
1.4 Processo de produção de etanol celulósico.....	24
1.5 Hidrólise da celulose por bactérias do gênero Clostridium.....	26
1.6 A Análise proteômica no estudo de anaeróbicos	30
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Manutenção e cultivo dos microorganismos	36
4.1.1 Efeito da temperatura no crescimento dos isolados ISO1 e ISO2 e cepa CthJW.	37
4.1.2 Efeito do pH no crescimento dos isolados ISO1 e ISO2 e cepa CthJW.....	37
4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	37
4.3 Preparo das amostras enzimáticas	38
4.4 Determinação da concentração de proteínas.....	39
4.5 Quantificação da atividade enzimática.....	40
4.6 Preparo das amostras protéicas para eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e eletroforese bidimensional.	41
4.7 Eletroforese SDS-PAGE e bidimensional.....	41
4.8 Análise de imagens.....	42
4.9 Identificação de proteínas por espectrometria de massa.....	43

4.10	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Caracterização do crescimento dos isolados	45
5.2	Caracterização protéica dos isolados	49
5.3	Caracterização enzimática dos isolados	50
5.3	Análise das imagens de Microscopia Eletrônica	55
5.4	Análise protéica dos isolados em SDS-PAGE unidimensional.....	56
5.5	Proteômica	58
5.6	Análise de Imagens.....	60
5.7	Espectometria de massas MALDI-TOF.....	62
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	77
8	PERSPECTIVAS	78
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção de bioetanol

Com a alta dos preços do petróleo na década de 1970, o temor da falta desta matéria-prima e da dependência nacional em relação aos países produtores, foi estimulada a busca por combustíveis alternativos. Inicialmente, em 1975, foi lançado no Brasil o Programa Nacional do Álcool - o Pró-álcool - que foi o pioneiro e continua ainda como a iniciativa mundial melhor sucedida na produção de biocombustível em larga escala. Este programa tinha como objetivo a produção de etanol a partir de biomassa vegetal abundante e disponível, principalmente de sacarose e amido. Além da possibilidade de se produzir combustível a partir de matéria-prima não-fóssil e renovável, o uso bioetanol apresenta vantagens em relação à gasolina como a menor emissão de poluentes, queima mais eficiente, com um maior grau de octanagem e menor produção de precursores de ozônio e CO₂ (Lynd *et al.*, 1991; Demain *et al.*, 2005; Zapata *et al.*, 2009)

No entanto, ainda no final da década de 70 e início dos anos 80, o uso e produção deste combustível sofreram uma queda considerável em função de interesses econômicos da indústria sucroalcooleira. Atualmente, o crescente aumento do consumo mundial de combustível e energia produzidos a partir de matéria-prima fóssil junto à dependência que ainda existe em relação ao petróleo e seus derivados, além dos problemas ambientais, trouxe novamente a preocupação e necessidade da produção de combustíveis renováveis e menos poluentes. Desta forma, o interesse na produção e utilização do bioetanol como fonte alternativa de combustível foi retomado em nível mundial.

Os EUA e Brasil são os líderes da produção mundial de bioetanol produzidos pela fermentação de açúcares derivados de milho e cana-de-açúcar, respectivamente. Esta é a primeira geração da produção de bioetanol combustível a partir de produtos utilizados na alimentação humana e animal. Estas matérias-primas não serão adequadas para atender à crescente demanda mundial por este combustível e alternativas precisam ser buscadas (Gray *et al.*, 2006; Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006; Wyman, 2007). A biomassa vegetal de origem celulósica surge como uma fonte de matéria-prima promissora para este fim, pois são produzidas diariamente cerca de 180 milhões de toneladas por ano deste material, em função da atividade agrícola e industrial, bem como da produção diária de lixo nas cidades. A reutilização deste material para a produção de bioetanol traz também a vantagem de diminuir os problemas ambientais causados pelo seu acúmulo (Demain *et al.*, 2005).

Estes fatores tornam vantajosa a segunda geração de produção de etanol, com a utilização da biomassa lignocelulósica de origem agroindustrial. Neste caso, a palha de trigo, palha de arroz, bagaço de cana e demais rejeitos agrícolas e florestais podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de bioetanol. O etanol celulósico é particularmente promissor, pois é derivado de matérias-primas de baixo custo e abundantes, e tem alta octanagem, que são propriedades desejáveis para um combustível (Wyman, 2007). Por isto, a produção de etanol celulósico vem ganhando espaço na comunidade científica e grande atenção global (Demain *et al.*, 2005; Lomborg *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2010).

Uma resolução tomada pela União Européia (UE) para o ano de 2020 foi que 20% do consumo de energia da UE deve ser originado de fontes renováveis (biomassa, energia eólica, etc.) e, além disso, que os biocombustíveis devem representar 10% do total de combustível utilizado (EU Resolution, 2008). Dessa forma, são necessários o crescimento e o aumento da eficiência na produção de etanol a partir de biomassa vegetal. Como matéria-prima para o bioetanol, resíduos agrícolas como farelo de trigo, palha de arroz e bagaço de cana de açúcar devem ser utilizados no contexto da 2^a geração, devido a sua abundância por todo o mundo (Lomborg *et al.*, 2010).

De acordo com estudos realizados pelo Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético (Nipe) da Unicamp, dentro de duas décadas o Brasil terá capacidade de produzir etanol suficiente para substituir 10% de toda a gasolina consumida no mundo, estimada em 1,7 trilhões de litros por ano (Mota *et al.*, 2009). Portanto, as indústrias alcooleiras brasileiras precisam investir no aumento e otimização do processo de produção do etanol utilizando tecnologias de baixo custo, e desta forma, abrindo perspectiva para estudos que visem à produção melhorada de etanol.

1.2 Biomassa vegetal

A biomassa pode ser considerada o conjunto de componentes orgânicos de todo material biológico da Terra, como as plantas e os animais. Uma grande variedade de recursos da biomassa está disponível para a conversão em bioprodutos, na qual podem ser incluídas as plantas, subprodutos de origem animal, materiais de origem marinha e resíduos industriais, agrícolas, florestais e urbanos. Desta forma, a biomassa tem potencial como uma das principais fontes de energia primária e renovável, e, portanto, a sua utilização terá contribuição importante para o desenvolvimento de sistemas de energia sustentáveis aliados ao desenvolvimento econômico e social de países desenvolvidos e em desenvolvimento (Berndes *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2003).

A parte vegetal da biomassa é constituída principalmente por polissacarídeos com funções estruturais ou de armazenamento, tais como celulose, hemicelulose e amido (Schwarz, 2001 ; Kumar *et al.*, 2008). É denominada holocelulose toda a fração de carboidrato do material celulósico na biomassa vegetal depois de removida lignina. Nas células vegetais, a parede celular é uma das principais estruturas, sendo responsável por diversas funções, tais como a manutenção da forma celular proporcionada pela rigidez mecânica e a proteção contra o ataque de patógenos. A parede celular pode ser classificada em parede celular primária, composta principalmente por celulose e hemicelulose; ou

secundária, constituída por lignina e compostos pécticos presentes na lamela média. Dessa forma, esta estrutura é formada por celulose organizada em microfibrilas imersas em uma matriz contendo polissacarídeos não celulósicos: hemiceluloses e pectinas e polímeros como a lignina, sendo assim denominada de origem lignocelulósica (Raven, 1999; Sommerville et al., 2004; Keegstra, 2010).

A estrutura e proporção destes polímeros na parede celular vegetal variam de acordo com a espécie da planta, tecido ou estágio de desenvolvimento considerado, tornando o potencial de utilização variável de cada matéria prima lignocelulósica de acordo com as diferentes proporções de polímeros. Em gramíneas, por exemplo, celulose, hemicelulose e lignina e pectina representam 45–60%, 20–40%, 5–10% e 1–5% da parede celular, respectivamente. A proporção de celulose, hemicelulose e lignina no bagaço de cana de açúcar é de cerca de 37%, 28% e 21% , na palha de algodão 46%, 20% e 21%, no palha de milho 39%, 33% e 15%, na palha de trigo 35%, 22%, 21% e na palha de arroz 42%, 32% e 13% (Hadar, 1993; Howard *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2008).

A lignocelulose é um componente da biomassa que representa uma importante fonte de matéria orgânica e, além disto, as propriedades químicas de seus componentes a tornam um substrato de enorme valor biotecnológico. Dentre as utilizações da desse substrato podemos citar a produção de polímeros e resinas a partir dos compostos aromáticos da lignina e a produção de biocombustíveis como o etanol, resultante da fermentação dos açúcares originados da celulose e hemicelulose (Howard *et al.*, 2003)

1.2.1 Biopolímeros constituintes da parede celular vegetal

A celulose é o componente mais abundante desta matéria, correspondendo a cerca de 35 a 50% da massa seca de plantas de diferentes espécies, e sendo, portanto, o principal componente da parede celular vegetal (Lynd *et al.*, 2002). Este biopolímero possui estrutura linear composta por milhares de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4 dispostos em unidades repetitivas de

celobiose, constituindo as cadeias lineares ou filamentos de celulose (Figura 1) (Kumar *et al.*, 2008).

Estas cadeias associam-se, normalmente em torno de trinta filamentos formando as protofibrilas, que em conjunto formam as microfibrilas, e o conjunto destas por sua vez formam as fibras de celulose. As cadeias lineares são montadas no local de sua síntese e são reforçadas por ligações de hidrogênio inter e intracadeias e por forças de Van-der-Waals, as interações fracas entre os monômeros de glicose tem um efeito total considerável na estabilização das fibras. Na natureza as fibras de celulose se organizam em uma região cristalina, na qual as microfibrilas se organizam de uma forma mais compactada, e desta forma, restringem o acesso a enzimas hidrolíticas que possam catalisar a hidrólise deste polímero, e uma região de cadeias desorganizadas denominada celulose amorfa. (Lynd *et al.*, 2002).

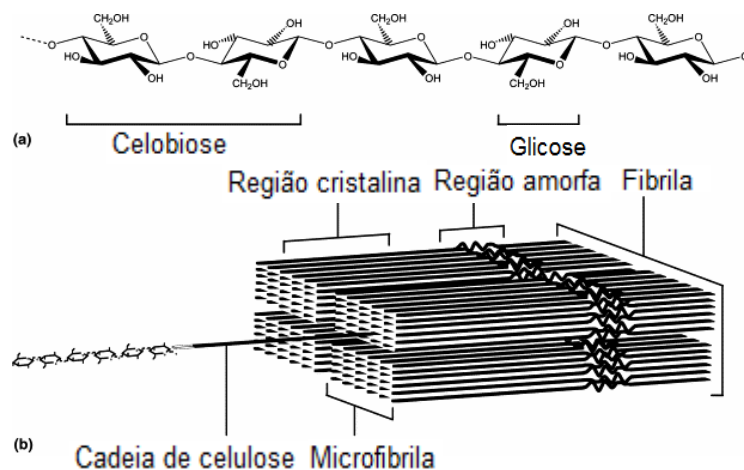


Figura 1. (a) Estrutura de um filamento de celulose (b) Esquema mostrando a organização das fibras de celulose. Modificado de Desvaux(2005).

As hemiceluloses são um grupo de polímeros heterogêneos que formam a parede celular interligados às microfibrilas de celulose, caracterizados por ligações β -1,4 entre xiloglicanas, xilanas, mananas e glicomananas, que podem ser visualizadas na Figura 2 (Scheller *et al.*, 2010). Os principais açúcares constituintes deste heteropolissacarídeo são pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e ácido urônico, e de acordo com o principal

resíduo de açúcar presente em sua estrutura polimérica pode ser denominado de xilana, glucomanana, galactana ou arabinana (Bhat *et. al.*, 2001; Howard *et. al.*, 2003).

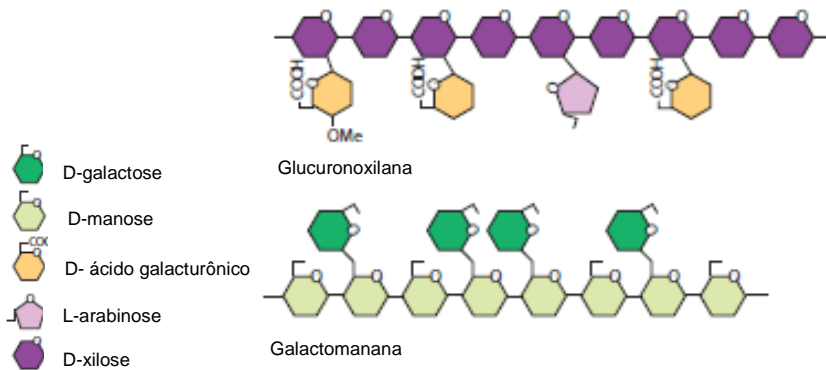


Figura 2. Estrutura das hemiceluloses glucuroxilana e galatomana. Modificado de Scheller *et. al.*(2010).

A lignina é um polímero abundante na natureza, que compõe até 20% da parede celular conferindo à planta suporte estrutural, impermeabilidade e resistência, assim como proteção contra patógenos ou pragas. Este heteropolímero aromático é constituído por unidades de fenilpropanóides, derivadas dos alcoóis coniferil, coumaril e sinapil, representadas na Figura 3. As unidades básicas são interligadas por diferentes tipos de ligações, que incluem ligações C-C, aril-éter, com aril-glicerol e β -ariléter como formas predominantes (Perez *et al.*, 2002).

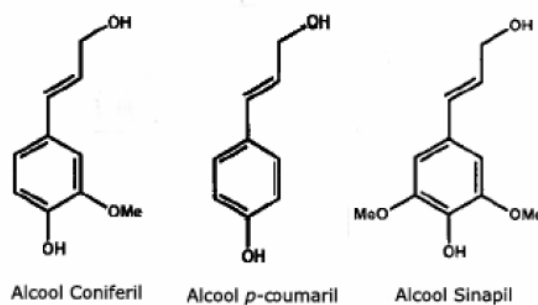


Figura 3. Constituintes da lignina (Boerjan *et. al.*. 2003).

As pectinas são polissacarídeos estruturais de alta massa molecular presentes na parede celular vegetal. As substâncias pécticas são um grupo de materiais coloidais complexos, compostos por um esqueleto de ácidos galacturônicos com cadeias laterais de açúcares como a arabinose, galactose, arabinogalactose, xilose, L-ramnose ou fucose. As pectinas estão presentes em diversas formas na parede celular e por essa razão existem várias enzimas pectinolíticas. Estes polissacarídeos possuem amplo uso comercial, especialmente na indústria alimentícia e têxtil, e como a celulose e a hemicelulose, podem ser convertidos a açúcares solúveis, etanol e biogás (Jayani *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008).

1.3 Hidrólise enzimática da lignocelulose

A hidrólise enzimática da parede celular vegetal por ação microbiana é realizada por um arsenal de hidrolases, entre as quais se destacam as celulases e hemicelulases.

As celulases são classificadas como glicosil-hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 entre os resíduos de glicose constituintes das cadeias de celulose. Esta reação é catalisada por meio de um mecanismo de hidrólise ácida, utilizando um doador de próton, como os resíduos de aminoácidos de ácido glutâmico e ácido aspártico, e um nucleófilo ou base. A hidrólise pode igualmente resultar na inversão ou retenção (mecanismo de dupla troca) da configuração do carbono anomérico do final redutor (Lehninger, 2002).

Estas enzimas podem ser divididas em três grupos em função de seus mecanismos de ação: as endoglicanases (E.C. 3.2.1.4), as exoglicanases, que incluem as celodextrinases (EC 3.2.1.74) e as celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), e as β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) (Lynd *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2008). As endoglicanases catalisam a clivagem de ligações glicosídicas aleatoriamente na

porção interna das fibras de celulose a partir da extremidade redutora, principalmente nas regiões em que as microfibrilas estão organizadas de uma forma mais frouxa (celulose amorfa), liberando oligossacarídeos e gerando conseqüentemente novas extremidades redutoras para ação das exoglicanases. As exoglicanases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose a partir das extremidades redutoras e não-redutoras, liberando unidades de glicose (celodextrinas) ou celobiose (celobiohidrolases) como produtos principais. A ação das exoglicanases também pode ocorrer na celulose cristalina, provavelmente em função do afrouxamento das cadeias de celulose de estrutura cristalina. Já as β -glicosidases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas da celobiose e celoligossacarídeos produzindo glicose (Figura 4a) (Lynd *et al.*, 2002).

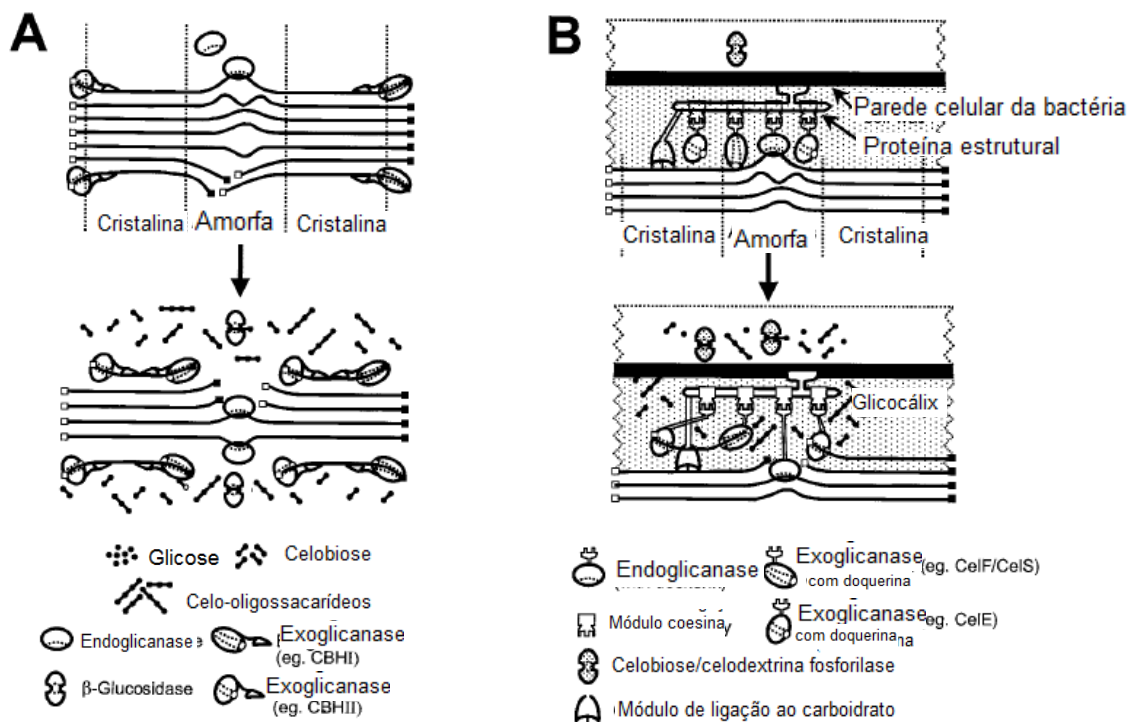


Figura 4. Esquema de hidrólise da celulose microcristalina e amorfa pelas enzimas livres (a) e as contidas em complexo de celulases (b) Modificado de Lynd *et al.* (2002).

A hemicelulose mais abundante na parede celular vegetal é a xilana, e sua completa degradação requer a atividade das: endo- β -xilanases (E.C. 3.2.1.8), α -arabinofuranosidades (E.C. 3.2.1.55) e β -xilosidades (E.C. 3.2.1.37). Dentre as

xilanases, as endo- β -xilanases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β -1-4 entre as unidades de xilose internamente no polímero liberando cadeias xilooligosacarídicas, enquanto as β -xilosidades atuam nestas cadeias produzindo xilose (Lynd *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2002). A hidrólise de polímeros de xilana pelas xilanases liberando pentoses é aparentemente mais fácil do que a hidrólise de celulose pelas celulasas, já que a xilana não forma estrutura cristalina recalcitrante como a celulose (Kumar *et al.*, 2008). No entanto, a degradação das hemiceluloses em geral é limitada pela presença de ramificações, sendo que a remoção destes substituintes requer atividades enzimáticas acessórias como as α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), manosidases (EC 3.2.1.25) e acetilesterases (EC 3.1.1.6), α -glucuronidase (EC 3.2.1.131), ácido ferúlico esterase (EC 3.2.1.73) (Keshwani *et al.*, 2009).

A lignina é considerada um substrato de difícil degradação em razão de sua complexidade estrutural, sua alta massa molecular e sua insolubilidade. As famílias de enzimas envolvidas na sua hidrólise são as peroxidases (lignina e manganês peroxidases) e lacases, que são enzimas extracelulares conhecidas como fenoloxidasas, encontradas na maioria dos fungos da podridão branca, e em algumas bactérias. Essas enzimas oxidam seus substratos pela redução de um elétron do núcleo aromático com a formação de um radical catiônico instável que passa por numerosas transformações levando à decomposição do substrato. As lacases são consideradas verdadeiras fenoloxidasas e oxidam fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas pela abstração de um elétron, com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar a despolimerização (Higuchi, 1989; Perez *et al.*, 2002).

Dentre as enzimas envolvidas na degradação da pectina, de uma forma geral, denominadas de pectinases, estão as pectina-liases, pectina-metilesterases, as endo e exo-poligaracturonases, pectina acetilesterases, ramnogalacturonases e endo e exo-arabinases. As hidrolases poligalacturonases atuam na clivagem das ligações glicosídicas entre os ácidos galacturônicos, enquanto as ramnogalacturonases hidrolisam as ramnogalacturonanas. Já as liases, pectina e pectato liases, clivam o polímero de ácido galacturônico via reação de β -eliminação (Bhat, 2000; Kumar *et al.*, 2008).

As estratégias para degradação de materiais lignocelulósicos em diferentes microorganismos são distintas. Microorganismos aeróbicos, tais como fungos (*Trichoderma reesei*) e bactérias aeróbicas (*Thermobifida fusca*) produzem componentes enzimáticos individuais em altas concentrações que se ligam ao substrato por meio de módulos de ligação com seqüências específicas. Bactérias anaeróbicas com atividades celulolíticas podem ser isoladas do rúmen de bovinos, veados e caprinos (Ferrer *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2009; Sundset *et al.*, 2009); ou ainda de algodão, como a cepa de *Clostridium thermocellum* JW20 (Freier *et al.*, 1988). Com poucas exceções, estas desenvolveram uma estratégia eficiente de degradação de biomassa vegetal, com a utilização de um sistema multienzimático extracelular denominado celulosoma (Figura 4b). As vantagens do celulosoma para a efetiva hidrólise dos substratos celulósicos são a otimização do sinergismo entre as subunidades enzimáticas, a limitação da adsorção não produtiva, a limitação da competição pelos limitados sítios de ligação, e flexibilidade para hidrólise com a presença de outras enzimas com diferentes especificidades no sítio de adsorção com o esgotamento de um tipo de celulose.

1.4 Processo de produção de etanol celulósico

A bioconversão de produtos lignocelulósicos em biocombustíveis é uma promissora estratégia para obtenção de álcool combustível, por ser sustentável e também possibilitar o reaproveitamento de resíduos vegetais de origem agrícola e industrial. Estes materiais lignocelulósicos, incluindo plantas lenhosas e não lenhosas, rejeitos e resíduos florestais e urbanos possuem diferentes quantidades de componentes celulósicos e são potencialmente adequados para produção de álcool por fermentação (Lynd *et al.*, 2002). O passo limitante na conversão de celulose a combustível é sua hidrólise a açúcares fermentáveis, principalmente o ataque inicial da estrutura altamente ordenada, insolúvel e cristalina. Sendo que a maioria dos trabalhos tem ênfase no estudo de fungos, como o *Trichoderma reesei*,

na produção de enzimas para a conversão desta biomassa a açúcares que podem ser fermentados a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O processo industrial de produção de etanol celulósico em desenvolvimento ainda é dispendioso e é realizado em três etapas principais: pré-tratamento termoquímico – um passo que favorece o acesso das enzimas à celulose, aumentando a área superficial pela remoção da lignina, solubilização da hemicelulose e/ou apenas aumentando a porosidade das fibras de celulose. Este processo pode ser realizado tanto pela utilização de ácidos, ou pela explosão a vapor; a sacarificação - na qual são utilizadas as hidrolases de fungos que atuam na parede celular vegetal, celulases e hemicelulases, para hidrólise da matéria-prima a açúcares fermentáveis; e por fim a fermentação dos açúcares liberados e produção de bioetanol, pela ação de um microrganismo, como por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Gray *et al.*, 2006; Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006).

Em processos convencionais as ligninas presentes nas matérias-primas são eliminadas por processos químicos e/ou pré-tratamento térmico seguido de hidrólise ácida/enzimática. Podem ser utilizados hidróxido de sódio, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fórmico ou solventes orgânicos como *n*-propilamina, etilenodiamina, *n*-butilamina. Estes químicos são tóxicos, corrosivos e perigosos e exigem reatores resistentes à corrosão, no caso do ácido concentrado este deve ser recuperado após hidrólise para tornar o processo economicamente viável. Desta forma, a utilização destes produtos nos processos de pré-tratamento é um dos principais inconvenientes e tratamentos biológicos têm sido propostos quer para substituir o tratamento físico-químico ou para a desintoxicação. Tal procedimento apresenta vantagens econômicas e ambientais em relação à utilização de catalisadores químicos (Perez *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008).

A realização simultânea da sacarificação e fermentação em um processo industrial denominado Bioprocessamento Consolidado (CBP) é uma alternativa ao processo em duas etapas. Este processo reúne as quatro transformações: produção de enzimas sacarolíticas (celulases e hemicelulases); a hidrólise dos carboidratos presentes na biomassa à açúcares fermentáveis; a fermentação da hexoses (glicose, manose e galactose) e a fermentação de pentoses (xilose e arabinose) em

uma única etapa. No entanto, para utilização desta estratégia é necessária a utilização de microorganismos produtores de celulasas, hemicelulasas e outras enzimas que atuam na degradação desta matéria-prima capazes também de realizar com eficiência o processo de fermentação. Além disto, estes devem apresentar crescimento equilibrado em hexoses e pentoses, tolerância a possíveis inibidores produzidos durante o pré-tratamento, tolerância ao solvente e máximos rendimento e taxa de produção (Lynd *et al.*, 2005; Elkins *et al.*, 2010). Neste sentido, novos microorganismos têm sido buscados para utilização no processo de produção de etanol, bem como, o desenvolvimento de linhagens de leveduras capazes de degradar celulose. As bactérias anaeróbicas do gênero *Clostridium* e mais especificamente a espécie *Clostridium thermocellum*, é um dos microorganismos promissores neste tipo de processo, pois é extremamente eficiente na degradação de biomassa celulósica para produção de açúcares fermentáveis e capaz de fermentá-los a etanol (Roberts *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

1.5 Hidrólise da celulose por bactérias do gênero *Clostridium*

Clostridium thermocellum é uma bactéria formadora de esporos, em forma de bastonete, flagelada, anaeróbica, termofílica e gram-positiva, conhecida pela alta capacidade de degradação de substratos celulósicos e pela presença de um complexo enzimático denominado celulosoma. No início da década de 80, Bayer e colaboradores identificaram e descreveram o primeiro celulosoma, com base nos estudos do sistema celulolítico da bactéria *C. thermocellum* (Bayer *et al.*, 1983; Lamed *et al.*, 1983). Inicialmente, o celulosoma foi considerado apenas uma estrutura para a hidrólise de celulose, mas na investigação em estudos posteriores foi reconhecido como um complexo macromolecular especialmente adaptado para a hidrólise de polissacarídeos insolúveis, com uma diversidade de atividades catalíticas (Schwarz, 2001; Lynd *et al.*, 2002; Bayer *et al.*, 2008).

A presença do celulosoma não é restrita a *C. thermocellum*, e pode ser encontrado em bactérias anaeróbicas como *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e em fungos anaeróbicos, ainda pouco caracterizados, como os do gênero *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, e *Piromyces* (Felix *et al.*, 1993; Fontes *et al.*, 2010). Nesse contexto, acredita-se que o ambiente anaeróbico apresenta uma pressão seletiva maior para a evolução de maquinarias altamente eficientes para a degradação de substratos como os polímeros recalcitrantes cristalinos da parede celular vegetal. Dessa forma, a organização de enzimas no celulosoma parece ser uma das estratégias alternativas adotadas pelos anaeróbicos para a degradação das plantas (Bayer *et al.*, 2004).

Os celulosomas de *C. thermocellum* têm massa molecular variando de 2 a 6,5 MDa, podendo formar agregados denominados policelulosomas que chegam a 100MDa. O componente mais importante do celulosoma e a maior subunidade deste complexo é o módulo não enzimático denominado *scaffolding* (CipA), que é uma proteína estrutural. Esta proteína reúne as celulases ancorando assim as subunidades catalíticas que se alinham à fibra de celulose ou ao substrato a ser degradado, com massa molecular de 210kDa. A CipA é composta de um domínio de ligação a celulose (CBD) e nove domínios coesina tipo I que interagem especificamente com um domínio de aminoácidos conservado nas enzimas constituintes do complexo, denominado domínio do querina tipo I (Figura 5) (Felix *et al.*, 1993; Bayer *et al.*, 2008). Já foram sequenciados pelo menos oito genes de proteínas estruturais: *cipA* de *C. thermocellum*, *cbpA* de *C. cellulovorans*, *cipC* de *C. cellulolyticum*, *cipA* de *C. josui*, *cipA* de *C. acetobutylicum*, *scaB* de *Ruminococcus flavefaciens*, *cipBC* de *Bacterioides cellulosolvens* e *cipV* de *A. cellulolyticus* (Demain *et al.*, 2005).

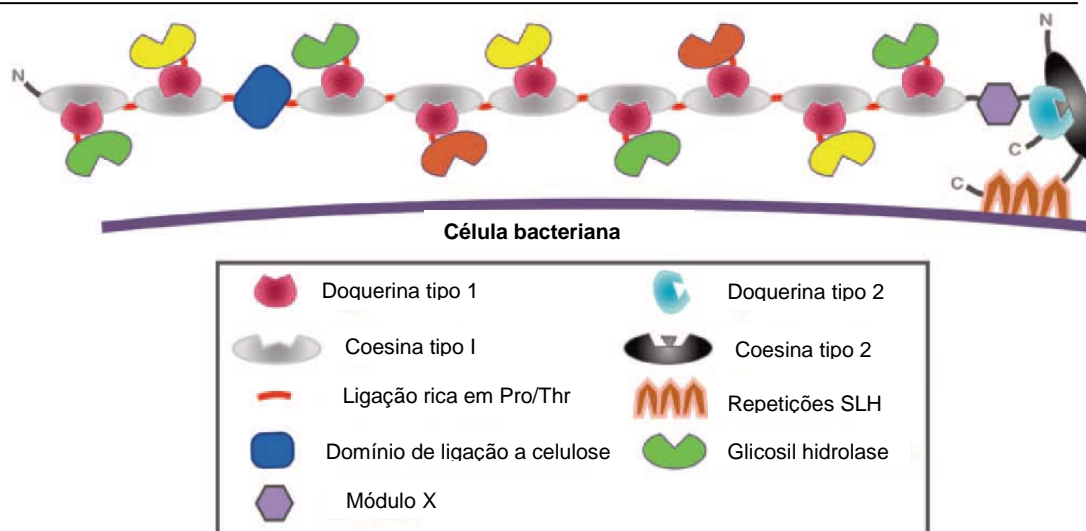


Figura 5. Esquema do celulosossoma da bactéria *Clostridium thermocellum*. Modificado de Demain et al. (2005).

A montagem do celulosossoma ocorre com a interação entre os módulos doquerina das unidades catalíticas celulosossomais e os módulos coesina da proteína estrutural. As doquerinas tipo I não desempenham função catalítica e consistem de aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos que contém dois segmentos duplicados, com cerca de 20 resíduos cada; resíduos cálcio-ligantes (ácido aspártico e asparagina) são altamente conservados. Os módulos coesina tipo I, formados por uma seqüência de aminoácidos conservada e repetitiva, são responsáveis pela ligação específica dos módulos doquerina tipo I de forma muito estável, embora sejam incapazes de distinguir entre as doquerinas presentes nas diversas enzimas celulosossomais (Tokatlidis *et al.*, 1991; Salamitou *et al.*, 1992; Bomble *et al.*, 2010).

A ligação da proteína estrutural à superfície das células bacterianas é feita por meio de um módulo doquerina tipo II e um módulo coesina-doquerina tipo II que interagem diretamente com os domínios de ancoramento de membrana encontrados na camada de proteínas S (SLH- *S layer homology*), que podem ser OlpB, OlpA, OlpC, Orf2p ou SdbA (Raman *et al.*, 2009; Fontes *et al.*, 2010). Vários genes de enzimas celulosossomais já foram descritos e estes possuem em comum a presença do domínio ligante à coesina do tipo I (domínio doquerina tipo I). As atividades

catalíticas e o número de subunidades constituintes dos celulosomas variam entre as diferentes espécies de bactérias anaeróbicas (Zverlov *et al.*, 2005).

O complexo enzimático de *C. thermocellum* apresenta uma alta atividade em celulose cristalina, também chamada de atividade celulolítica verdadeira, caracterizada pela completa solubilização de formas cristalinas da celulose como algodão e Avicel. Uma característica particular no crescimento de *C. thermocellum* em celulose é a produção de uma substância amarela que reveste este substrato em específico. Essa substância é conhecida como *yellow affinity substance* (YAS) e foi caracterizada como um pigmento semelhante aos carotenóides; sua possível função pode ser facilitar a ligação da bactéria ao substrato insolúvel ou ainda agir como um sinal de síntese e/ou secreção de celulasas (Felix *et al.*, 1993; Kopečný, 1997).

As vantagens da degradação de biomassa vegetal pelos celulosomas estão baseadas em duas hipóteses: 1) A proximidade de isoformas de enzimas podendo promover a ação sinérgica na hidrólise do substrato cristalino, o que possibilitaria uma ação hidrolítica mais efetiva quando comparadas às enzimas na forma livre e 2) enzimas que apresentam alta taxa de hidrólise de determinados substratos reunidas em no complexo, ancoradas na proteína estrutural, aumentaria as taxas de conversão (Bomble *et al.*, 2010).

Como forma de testar as hipóteses apresentadas, foram iniciados estudos para a construção de celulosomas quiméricos. Os celulosomas foram construídos primeiramente com apenas dois módulos coesina e duas celulasas, em seguida foi testada a substituição da celulase por uma hemicelulase, o que foi comprovadamente mais eficaz na atividade catalítica de substratos com organização mais complexa. Com o estudo do efeito de número de coesinas observou-se um aumento de atividade com o maior número desses módulos, porém, a chave da eficiência está relacionada com a concentração enzimática (Fierobe *et al.*, 2002; Cha *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008).

Mingardon (2007) observou o efeito de ligação e proximidade com a construção de celulosomas com várias geometrias, ou seja, diferentes organizações da proteína estrutural e dos módulos de ligação aos carboidratos.

Nesse estudo, concluiu-se que a mobilidade e flexibilidade das enzimas é um parâmetro crítico na eficiência do celossoma. Em estudos com a reunião das enzimas livres que apresentam alta atividade em uma proteína estrutural de diferentes espécies, como as celulases de *Thermobifida fusca*, foi observado melhor atividade quando comparada as enzimas em sua forma livre (Caspi *et al.*, 2008). Dessa forma, estão abertas as possibilidades para a construção de celossomas quiméricos com uma proteína estrutural que abriga uma variedade de enzimas de interesse.

Outro fator que pode ser utilizado nos celossomas quiméricos é a modificação de propriedade de enzimas como, por exemplo, o aumento da termoestabilidade. Yi e colaboradores (2011) observaram que a endoglicanase CelA de *C. thermocellum* teve sua termoestabilidade aumentada devido a introdução de resíduos de glicina (Gly) e prolina (Pro) em três posições da superfície protéica. Este tipo de alteração poderá ser estendida para a modificação de outras proteínas termofílicas de interesse.

1.6 A Análise proteômica no estudo de anaeróbicos

O termo proteoma foi usado pela primeira vez em 1995 para descrever o complemento protéico do genoma, que logo em seguida deu origem à área de pesquisa denominada proteômica. A proteômica é o estudo de um conjunto de proteínas podendo relacionar com o seus níveis de expressão, modificações pós-traducionais e interações. Esta análise é realizada em larga escala para obter uma visão global e integrada de uma rede de processos celulares, podendo ser também considerado como o genoma funcional a nível protéico (Blackstock *et al.*, 1999).

O proteoma é dinâmico, pois é definido pela combinação do genoma, do meio ambiente e até do histórico celular, possibilitando o monitoramento, em paralelo, do nível de expressão de genes e proteínas em diferentes condições de cultivo e estágios de desenvolvimento. Desta forma, as células possuem diferentes

proteomas dependendo da situação à qual está submetida, e sua análise pode possibilitar a identificação de proteínas especificamente expressas nestas situações, assim como, a sua abundância, estado de modificação e componente de complexos protéicos (Issaq, 2001).

Dentre as tecnologias de análise proteômica, a eletroforese em poliacrilamida gel bidimensional (2DE) descrita inicialmente por O'Farrel (O'farrell, 1975) é a mais utilizada atualmente. Esta técnica baseia-se na separação de proteínas em função de sua carga elétrica e massa molecular, o que aumenta a resolução de separação destas, possibilitando assim, uma melhor caracterização das proteínas presentes em uma determinada condição (Issaq *et. al.*, 2008).

A análise em espectrometria de massas é um método de escolha para a identificação de proteínas e caracterização das suas modificações pós-traducionais. O funcionamento do espectrômetro de massas é baseado na fase gasosa de analitos iônicos, sendo formado por uma fonte de íons, um analisador de massas, que mede a relação massa-carga (m/z) dos analitos ionizados, e um detector que registra o número de íons, em cada valor m/z . A identificação de proteínas por *peptide mass fingerprint* (PMF), conhecida como mapeamento de peptídeos geralmente é realizada utilizando a desorção e ionização a laser assistida por matriz com analisadores por tempo de voo (MALDI-TOF), como resultado de sua simplicidade, precisão de massa excelente e da alta resolução. Neste método, as proteínas são identificadas pela correspondência das massas de peptídeos derivadas de uma digestão proteolítica "in-gel" com uma lista de massas teóricas de peptídeos obtidos de proteínas digeridas utilizando a mesma enzima (geralmente tripsina), utilizando o programa MASCOT (www.matrixscience.com) (Aebersold e Mann, 2003).

As modificações pós-traducionais (MPT) são eventos covalentes que promovem alterações nas propriedades protéicas por clivagem protéica ou adição de um grupo de um ou mais aminoácidos, como por exemplo, glicosilação, fosforilação, acetilação e metilação. Essas MPT podem determinar o estado ativo, a localização, função, estabilidade, ou interações com outras proteínas. Por exemplo, as fosforilações mudam a carga protéica e normalmente são indicadas por uma

seqüência de *spots* de proteínas na horizontal no gel bidimensional. A massa geralmente não é suficiente para determinar a natureza da modificação, e os peptídeos devem ser fragmentados por MS para identificar o peptídeo e localizar sua modificação (Mann *et al.*, 2003).

Para o estudo do proteoma funcional, geralmente este é dividido em conjuntos específicos do proteoma total, os chamados sub-proteomas. Dentre estes existem os sub-proteomas de organelas (mitocôndria, núcleo), de proteínas com modificações pós-traducionais (glicoproteoma, fosfoproteoma) e o secretoma (conjunto de proteínas secretadas por um organismo e maquinaria celular envolvida em sua secreção) (Tjalsma *et al.*, 2000; Godovac-Zimmermann *et al.*, 2001).

Poucos trabalhos de proteômica foram realizados com anaeróbicos, a maioria para o estudo de virulência de bactérias patogênicas como as *C. sordellii* e *C. perfringens* (Alam *et al.*, 2008; Alam *et al.*, 2009; Kachman *et al.*, 2010). A análise das proteínas da fração associada à celulose para verificar a presença de proteínas celulosômicas foi inicialmente realizada utilizando eletroforese unidimensional desnaturante (SDS-PAGE). Um dos primeiros trabalhos de análise protéica do celulosoma, ainda denominado fator de ligação à celulose, foi feito por Lamed e colaboradores (1983), no qual foram encontrados quatorze polipeptídeos distintos, com massa molecular variando de 48 a 210KDa. Em seguida, Bayer (1985) analisou a expressão distinta das proteínas celulosômicas de *C. thermocellum* crescido em Avicel e celobiose.

No entanto, este tipo de análise limita o número de proteínas a ser analisada e está sendo substituída pelo mapeamento de proteínas celulosômicas utilizando a eletroforese bidimensional. Trabalhos realizados com as bactérias anaeróbicas mesofílicas *C. cellulovorans* e *C. cellulolyticum* indicaram que a expressão de enzimas celulosômicas e não celulosômicas variam de acordo com a fonte de carbono disponível (Han *et al.*, 2004; Blouzard *et al.*, 2007; Blouzard *et al.*, 2010).

Trabalhos visando a caracterização do secretoma de *C. thermocellum* já foram descritos. Em 2005 foi realizada a primeira análise das proteínas secretadas por esta bactéria em meio de cultura contendo celulose microcristalina como única

fonte de carbono, sendo identificadas treze proteínas celulosômicas secretadas em meio de cultura (Zverlov *et al.*, 2005). Em seguida, foram mapeadas as proteínas de membrana diferencialmente expressas em linhagens tolerantes e não tolerantes a etanol (Williams *et al.*, 2007). Gold e colaboradores (2007) forneceu uma visão global do celulosoma em *C. thermocellum* quando cultivada em meio de cultura contendo celulose e celobiose como fonte de carbono, sendo observada a maior expressão de proteínas ancoradoras de membrana OlpB, exoglicanases, glicosil hidrolases da família 9 (GH9), endoglicanase CelJ para as culturas em celulose e de GH8 endoglicanase Cel A, GH5, endoglicanases CelB, CelE, CelG, e hemicelulases XynA, XynC e XghA para culturas em celobiose.

O perfil de proteínas secretadas, secretoma, de bactérias anaeróbicas como *C. thermocellum*, *C. cellulovorans* e *C. cellulolyticum* tanto de celulasas como de outras subunidades celulosômicas é dependente de diferentes fontes de carbono (Dror *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2010). As análises para verificar a expressão diferencial dessas enzimas foram realizadas para culturas provenientes de cultivos em celobiose, celulose microcristalina, pectina, xilana e misturas destes componentes, como fonte de carbono. O perfil de proteínas secretadas na presença de biomassa lignocelulósica foi descrito apenas na degradação de fibra de milho e de uma gramínea de crescimento rápido (*switchgrass*) (Raman *et al.*, 2009).

Estudos realizados com a bactéria *Cellulomonas flavigena* mostram a expressão diferencial de celulasas e xilanas de filtrados provenientes de culturas contendo diferentes fontes de carbono como xilana e bagaço de cana de açúcar, sendo o secretoma neste último o que apresentou maior diversidade de proteínas (Sánchez-Herrera *et al.*, 2007). Sendo assim, ainda são necessários estudos que abordem o conhecimento de controle da expressão dos genes que codificam enzimas hidrolíticas de biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana de açúcar, e que desta forma contribuam para a otimização da produção industrial de etanol a partir de resíduos agrícolas.

2 JUSTIFICATIVA

O uso de biomassa lignocelulósica na produção de etanol se inicia pela intensa hidrólise de suas estruturas para a obtenção de açúcares fermentáveis, sendo este um dos processos alvo de pesquisa mundial. Bactérias anaeróbicas produzem um complexo enzimático eficiente na hidrólise de celulose em monômeros de glicose, ou seja, açúcares fermentáveis, e, portanto, possuem grande potencial para utilização na pré-hidrólise desta biomassa para produção de bioetanol. O estudo destas bactérias tornar-se-á cada vez mais atrativo haja vista a possibilidade de gerar conhecimentos que resultem na redução do custo de produção do bioetanol celulósico.

A bactéria anaeróbica, termofílica e gram-positiva *Clostridium thermocellum* possui um complexo enzimático denominado celulosoma, que apresenta atividade celulolítica verdadeira, ou seja, este complexo é capaz de hidrolisar totalmente a celulose cristalina. Além disso, microorganismos termofílicos possuem a grande vantagem de suportar altas temperaturas, o que diminui o risco de contaminação e possuem enzimas termoestáveis, alguns dos fatores importantes em processos industriais. Dessa forma esta bactéria anaeróbica se torna um candidato atraente para aplicação na bioconversão de celulose a etanol combustível.

Neste contexto, o presente projeto tem como principal objetivo a investigação da produção de enzimas holocelulolíticas por isolados de *Clostridium thermocellum* (ISO1 e ISO2), utilizando técnicas clássicas de enzimologia, assim como análise proteômica dos secretomas produzidos em diferentes fontes de carbono.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a produção de atividades enzimáticas celulolíticas e hemicelulolíticas por dois isolados da bactéria anaeróbica termofílica celulolítica *Clostridium thermocellum*, ISO1 e ISO2, quando cultivados em meio de cultura contendo celulose cristalina e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, e analisar o perfil de proteínas secretadas em cada uma destas condições.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento dos isolados ISO1 e ISO2 crescidos em diferentes fontes de carbono em comparação com a cepa de *C. thermocellum* JW 20 (ATCC 31549).
- Quantificar a atividade enzimática holocelulolítica dos isolados ISO1 e ISO2, obtida pelas proteínas secretadas no meio de cultura e ligadas ao substrato residual.
- Analisar por eletroforese unidimensional e bidimensional o perfil de proteínas secretadas no meio de cultura e ligadas ao substrato residual, celulose ou bagaço de cana.
- Comparar o perfil protéico para os isolados crescidos em diferentes fontes de carbono e identificar as proteínas secretadas no meio de cultura por espectrometria de massas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção e cultivo dos microorganismos

Foram utilizados neste trabalho os isolados ISO1 e ISO2, obtidos de dejetos de caprinos, por Eduardo de Aquino Ximenes e Carlos Roberto Felix, e identificados pelo seqüenciamento do DNA ribossômico 16S como *C. thermocellum* e a cepa de *C. thermocellum* JW20 (ATCC 31549) (CthJW), cedida gentilmente pelo Dr. Lars G. Ljungdahl (*Georgia Power Distinguished Professor of Biotechnology*), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade de Georgia, nos Estados Unidos. Os isolados foram mantidos em meio redutor líquido (Freier *et al.*, 1988), com modificações, utilizando como substrato celulose microcristalina fibra longa (Sigma Aldrich®) a 2% e bagaço de cana de açúcar a 0,5%, em condições anaeróbicas. O bagaço de cana provém da espécie *Saccharum officinarum* e foi obtido na Fazenda Monjolo, em Cabeceiras-GO, no ano de 2007. Para utilização como fonte de carbono no cultivo das bactérias anaeróbicas o bagaço foi tratado da seguinte forma: autoclavado 1h a 120°C, seco em estufa a 60°C por 12h e em seguida moído.

O meio redutor foi manipulado da seguinte forma: nos frascos de cultivo de 30 e 100mL contendo o meio de cultura foi adicionado nitrogênio gasoso (N₂) para manutenção da condição anaeróbica e em seguida estes foram lacrados e selados com anéis de alumínio. Para a obtenção da curva de crescimento dos isolados em diferentes tempos foi realizado o cultivo a 60°C e o crescimento celular foi quantificado medindo-se a densidade ótica do sobrenadante da cultura com espectrofotômetro a 650nm.

4.1.1 Efeito da temperatura no crescimento dos isolados ISO1 e ISO2 e cepa CthJW.

Amostras dos isolados ISO1 e ISO2 e cepa CthJW foram inoculadas no meio de cultura redutor (30mL) ajustado para o pH 7, e em seguida foram incubadas nas temperaturas de 37, 50, 60 e 70°C, por 48h. O inóculo inicial foi feito a partir de 3mL de uma cultura de cada um dos isolados previamente cultivada por 48 horas. Os frascos de cultivo inoculados com as bactérias foram agitados três vezes ao dia e a taxa de crescimento avaliada ao final das 48 horas medindo-se a absorbância a 650nm.

4.1.2 Efeito do pH no crescimento dos isolados ISO1 e ISO2 e cepa CthJW.

Amostras dos isolados ISO1 e ISO2 e cepa CthJW foram inoculadas no meio de cultura redutor (30mL) com o pH ajustado para 5, 6, 7, 8 ou 9 inoculados e foram incubados por 48h a 60°C. Os frascos de cultivo inoculados com as bactérias foram agitados três vezes ao dia e a taxa de crescimento avaliada ao final das 48 horas medindo-se a absorbância a 650nm.

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A celulose residual do meio de cultura líquido contendo as bactérias foi secada em estufa a 60°C e analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília – UnB, sob a supervisão da Prof. Dra. Sônia Nair Bão, no mês de novembro de 2009.

A amostra foi secada ao ponto crítico no equipamento CPD 030-Balzers e metalizada com ouro no equipamento Sputter Coater 050-Balzers, para posterior visualização no microscópio de varredura JSM 840. O mesmo foi feito para uma amostra controle de substrato (sem ter sido submetida à hidrólise enzimática).

4.3 Preparo das amostras enzimáticas

Para avaliação da atividade holocelulolítica as culturas obtidas pelo cultivo a 60°C, pH 7,0 por 48 horas foram filtradas à vácuo utilizando papel de filtro (tamanho do poro da membrana), os filtrados em seguida foram submetidos a centrifugação à 5000rpm por 10min para a separação das células. Os sobrenadantes obtidos foram dialisados utilizando membranas de diálise com retenção de 7kDa, contra dois litros de água destilada por 24h. Estas amostras foram então concentradas dez vezes por ultrafiltração utilizando membranas com retenção de 10 kDa (PM10 Millipore Co., MA, EUA), pressão de 2,5 kgf/cm² e temperatura de 10°C. As amostras concentradas em seguida foram armazenadas a 4°C para sua utilização na quantificação de proteínas, nos ensaios enzimáticos e análises eletroforéticas. (Figura 6).

Para a obtenção das proteínas ligadas ao substrato residual, a celulose microcristalina e o bagaço de cana retidos no papel de filtrado foram lavados separadamente duas vezes com 50mL de Tampão Tris-HCl 0,5M pH 8,0 para retirada apenas das proteínas associadas ao substrato de forma inespecífica. Nesse sentido, é importante destacar que as proteínas celulosômicas permanecem ligadas ao substrato, devido ao tipo de ligação que estas apresentam que não é desfeita em contato com o tampão de alta salinidade. Em seguida foi feita a eluição das proteínas celulosômicas, pela lavagem com 30mL de água destilada, a mistura de cada substrato residual/água destilada foi centrifugada à 5000rpm por 20min, e o sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte de atividade enzimática, repetindo-se este processo duas vezes. Estas amostras foram concentradas dez vezes por ultrafiltração utilizando membranas com retenção de 10 kDa (PM10 Millipore Co., MA, EUA), pressão de 2,5 kgf/cm², e temperatura de 10°C. As amostras concentradas em seguida foram armazenadas a 4°C para sua utilização na quantificação de proteínas, nos ensaios enzimáticos e análises eletroforéticas. (Figura 6).

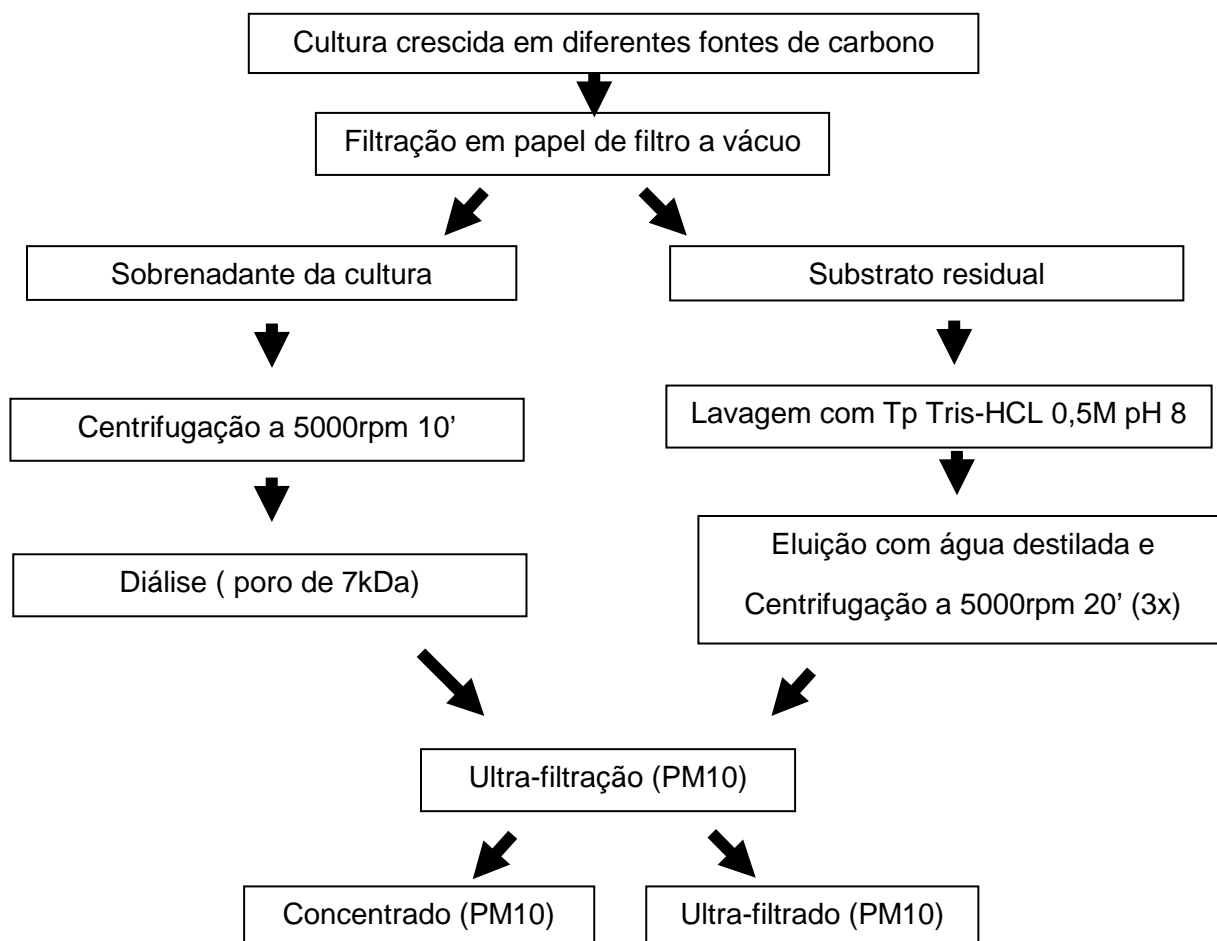


Figura 6. Esquema das etapas de preparação das amostras enzimáticas de *C. thermocellum* após crescimento em meio líquido redutor contendo celulose cristalina a 2% ou bagaço de cana a 0,5%.

4.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976) e albumina sérica bovina como padrão. O ensaio foi realizado com a incubação de 100 μ L de amostra protéica e 1mL do reagente de Bradford por 5 min, seguido da leitura de absorbância a 595nm.

4.5 Quantificação da atividade enzimática

As determinações das atividades de endoglicanase, exoglicanase, xilanase e pectinase foram realizadas utilizando CMC (carboximetil celulose), celulose microcristalina (AVICEL), xilana e pectina como substrato, respectivamente, detectando a concentração de açúcares redutores produzidos de acordo com procedimento descrito por Miller (1959).

Nos ensaios para endoglicanase, xilanase e pectinase foram incubados 100µL dos respectivos substratos a 1% (m/v) em tampão fosfato de sódio 0,5M pH 6,0 com 50µL de amostra enzimática a 60°C durante 30 minutos. No ensaio para AVICELase foram incubados 100 µL de AVICEL a 1% (m/v) em tampão fosfato de sódio 0,5M pH 6,0 DTT (2,5mM) e CaCl₂ (2,5mM) com 100µL de amostra enzimática a 60°C durante 2 horas. Após o tempo de reação adequado de cada ensaio, 300µL do reagente de DNS foram adicionados, a solução com o reagente foi fervida por 10 minutos. Ao final, 1mL de água destilada foi adicionado à cada tubo de ensaio e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

As atividades enzimáticas foram expressas como unidades internacionais (UI) que corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto de reação (Mandels *et al.*, 1976). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas as curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos - glicose, xilose e ácido galacturônico.

4.6 Preparo das amostras protéicas para eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e eletroforese bidimensional.

As amostras utilizadas nas análises eletroforéticas foram obtidas de um *pool* de proteínas correspondendo a três cultivos de cada isolado. Para a análise em gel unidimensional, SDS-PAGE, 20 µg de proteínas dos sobrenadantes das culturas e fração de proteínas eluídas do substrato residual, obtidos como descrito no item 4.1, foram liofilizados e ressuspensos em tampão de amostra. Para a eletroforese bidimensional (2DE), 500µg de proteínas dos sobrenadantes das culturas dos isolados ISO1 e ISO2, e da cepa CthJW foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (v/v) em 80% de acetona, por 1h à -20°C . Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 20min a 4°C. O precipitado foi lavado três vezes com o mesmo volume de acetona. As amostras foram acondicionadas à -20°C até a sua utilização na focalização isoeletrica.

4.7 Eletroforese SDS-PAGE e bidimensional

As análises em SDS-PAGE foram realizadas conforme procedimento descrito por Laemmli (1970), utilizando gel de poliacrilamida a 10% (m/v), à temperatura ambiente e com corrente constante de 30mA. Foram aplicados os 20µg de proteína liofilizados ressuspensos em 10µL de tampão de amostra. O gel foi corado com prata como descrito por (Blum *et al.*, 1987).

Para a análise em gel bidimensional, 500µg de proteínas precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) foram ressuspensas em 250µL de tampão de re-hidratação composto por 8M de uréia, 2M de tiouréia, 2% (v/v) de CHAPS, 0,5% (m/v) de anfólitos e traços de azul de bromofenol. Em seguida as amostras foram aplicadas em uma tira de gradiente de pH (*strips*) de 18 cm com faixa de pH linear (4-7). As tiras embebidas com as amostras foram incubadas por 14 horas a temperatura ambiente, e posteriormente utilizadas na focalização isoeletrica

(primeira dimensão). A corrida da primeira dimensão foi realizada utilizando o aparelho Ettan IPGphor III (GE[®] Healthcare Life Sciences) nas seguintes condições: 500 V 30 min, 1000 V por 1h, 3500 V por 1h e 8000 V com acúmulo de 45000Vh, totalizando 54000Vh, com corrente elétrica de 30mA e potencial de 5W, a 15°C totalizando 11 horas de corrida. Após a focalização isoeletrica as tiras de gradiente de pH foram reduzidas em solução de equilíbrio com DTT 125mmol/L, durante 15 minutos, e em seguida alquilados na mesma solução de equilíbrio com iodoacetamida 300mmol/L. Para a segunda dimensão as tiras de gradiente de pH foram incubadas em tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM pH 8,8 contendo 6M de uréia, 30% (v/v) de glicerol, 2% (p/v) de SDS, 0,002% (m/v) de azul de bromofenol e 2,5% (m/v) de iodoacetamida, 0,5% (m/v) de agarose e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Após este processo, as tiras foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida a 10% (m/v) utilizando a cuba de eletroforese “DALTI-six” (GE[®] Healthcare Life Sciences), e submetido à corrente elétrica constante de 40mA por 4 horas sob refrigeração a 20°C. Os géis foram realizados em triplicata para cada uma das condições de cultivo e corados com *comassie blue* G-250 como descrito por Neuhoff *et al.* (1988).

4.8 Análise de imagens

Os géis resultantes foram digitalizados utilizando o “Image Scanner” (GE Healthcare Life Sciences) e o programa “Powerlook 1120” (GE Healthcare Life Sciences). A análise das imagens foi realizada utilizando-se o software “ImageMaster Platinum” versão 6.0 para detecção dos pontos protéicos *spots* presentes em cada gel, assim como para avaliar o padrão diferencial de *spots* em cada uma das condições de cultivo e para os diferentes isolado de *C. thermocellum*. Neste caso as comparações foram realizadas utilizando o volume relativo dos *spots*. Para verificar a significância estatística entre os volumes relativos dos *spots* foi aplicado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA).

4.9 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Os *spots* foram recortados dos géis bidimensionais e submetidos a três lavagens sucessivas com água milli Q, solução de acetonitrila 50% (v/v) e em seguida duas lavagens sucessivas com solução de bicarbonato de amônio 50mM e acetonitrila 100%. Após secagem a vácuo por 20min os *spots* foram rehidratados com 8 μ l da solução de tripsina (PromegaTM) (12,5ng/ μ l) em tampão bicarbonato de amônio 25mM e cloreto de cálcio 2,5mM. Após a incubação a solução excedente foi retirada e novamente adicionado 8 μ l do tampão de bicarbonato de amônio 25mM e cloreto de cálcio 2,5mM utilizado acima e os *spots* foram incubados durante a noite à 37°C. Para a análise no espectrômetro de massa foi adicionado 1ul de TFA 1% às amostras digeridas, e uma alíquota de 1 μ l do sistema de digestão foi aplicada na placa AnchorchipTM (Bruker). Após a secagem da amostra foi adicionado 0,5 μ L da solução de matriz DHB (2,5 ácido dihidroxibenzoico) 5 μ g/ μ L em acetonitrila 30% (m/v) e ácido trifluoroacético 0,1% (m/v).

Os espectros dos peptídeos trípticos foram adquiridos utilizando o equipamento MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics). As massas dos espectros foram calibradas externamente com o “kit Pep Mix” (PromegaTM). Os espectros foram analisados para retirada de fragmentos queratina e tripsina e de fontes não protéicas, como detergentes e plásticos, e as listas de peptídeos trípticos gerados para cada *spot* foram utilizadas para a sua identificação por comparação com sequências de proteínas depositadas na base de dados não redundante NCBI, utilizando o software MASCOT (Matrix Science). Seguindo os seguintes parâmetros de busca: categoria taxonômica Firmicutes (gram positiva), erro máximo permitido de 200 ppm, oxidação da metionina e consideração de máximo uma perda na clivagem da tripsina. Foram consideradas identificações as proteínas com escore maior que 70.

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância com o teste t de Student não-pareado a um nível de significância fixado de $p < 0,05$ (5%), para comparar a média entre dois grupos independentes, utilizando-se o programa estatístico PAST *Paleontological Statistics* v.2.07. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do crescimento dos isolados

O crescimento dos isolados de *C. thermocellum* foi monitorado pela leitura da densidade óptica do sobrenadante das culturas em diferentes tempos de cultivo e em meio de cultura contendo celulose cristalina ou bagaço de cana como fonte de carbono. Todos os isolados apresentaram taxas de crescimento aumentando progressivamente em relação ao tempo de cultivo até o tempo de 48h. Após este tempo a taxa de crescimento dos isolados ISO1, ISO 2 e CthJW, em meio contendo celulose como fonte de carbono permaneceu inalterada, e decaiu para culturas contendo o bagaço de cana de açúcar pré-tratado como fonte de carbono (figura 7 e 8).

A partir de 39h de cultivo em meio contendo celulose cristalina o ISO1 apresentou taxa de crescimento significativamente maior em relação aos demais isolados, para o meio contendo bagaço de cana esta diferença foi observada para o ISO 2. No tempo de 48h, o maior valor de absorbância observado foi para o ISO1 ($1,932 \pm 0,234$ nm), que apresentou uma diferença significativa em relação aos demais isolados, ISO2 ($1,364 \pm 0,420$ nm) e o controle CthJW ($1,375 \pm 0,211$ nm).

Na Figura 8, está representado o crescimento dos isolados utilizando bagaço de cana como fonte de carbono. Assim como nos meios contendo celulose microcristalina, o tempo de 48h foi o que apresentou o maior crescimento para os três isolados, mas com diferença significativa do ISO2 ($1,618 \pm 0,043$ nm) em relação ao ISO1 ($1,069 \pm 0,022$ nm) e CthJW ($1,225 \pm 0,009$ nm).

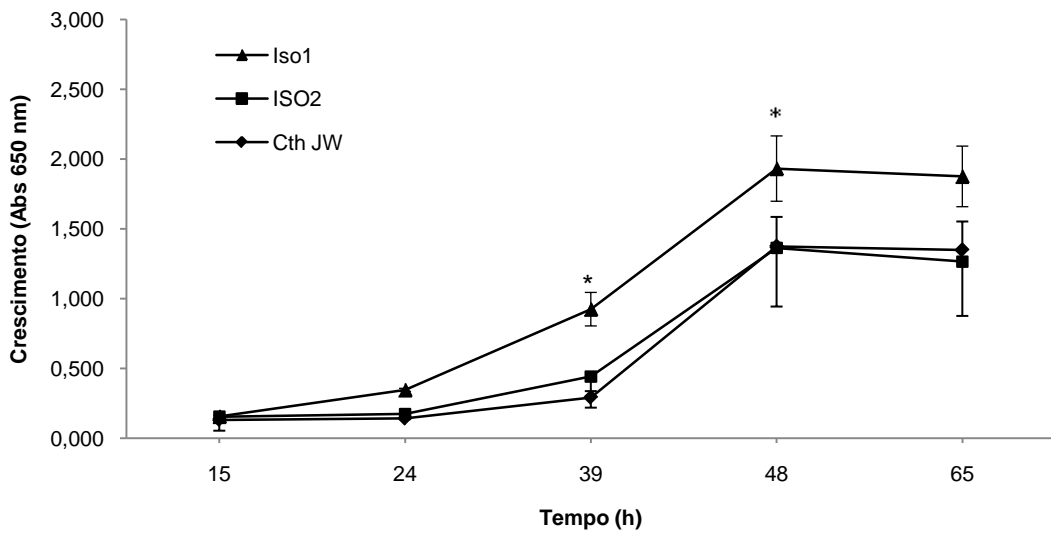


Figura 7. Curva de crescimento dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e CthJW, quando cultivados a 60°C, por 65h, em meio contendo celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância da cultura a 650 nm. * $p < 0,05$.

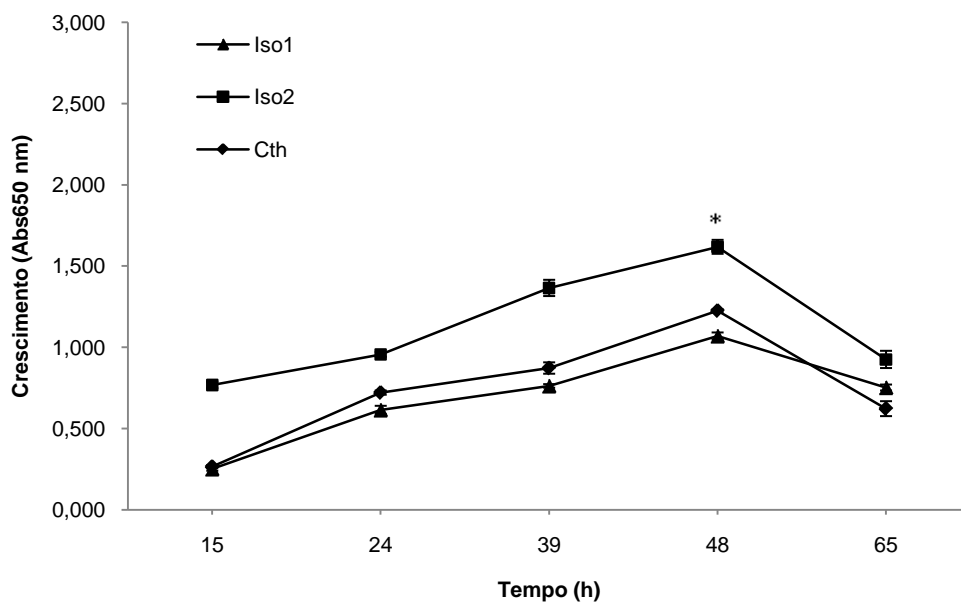


Figura 8. Curva de crescimento dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e CthJW, quando cultivados a 60°C, por 65h, em meio contendo bagaço de cana de açúcar a 0,5% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância da cultura a 650 nm. * $p < 0,05$.

No tempo de 65h do crescimento em bagaço de cana foi observado uma queda significativa no valor da absorbância indicativa do crescimento, diferente da manutenção desses valores observados em celulose microcristalina.

A mesma medida da densidade óptica do sobrenadante das culturas utilizada para determinar o melhor tempo de crescimento dos isolados de *C. thermocellum* ISO1, ISO2 e cepa CthJW, foi utilizada para analisar o crescimento destes isolados utilizando celulose microcristalina como fonte de carbono em diferentes temperaturas (figura 9) e pHs (figura 10).

As figuras 9 e 10 representam o crescimento dos isolados em celulose microcristalina como fonte de carbono em temperaturas variando de 37 a 70°C e pH's de 5 a 9, respectivamente. Os valores mais significativos de densidade óptica foram obtidos na temperatura de 60°C e pH 7,0. Não sendo observadas diferenças entre os isolados com relação à temperatura e pH adequados para seu cultivo.

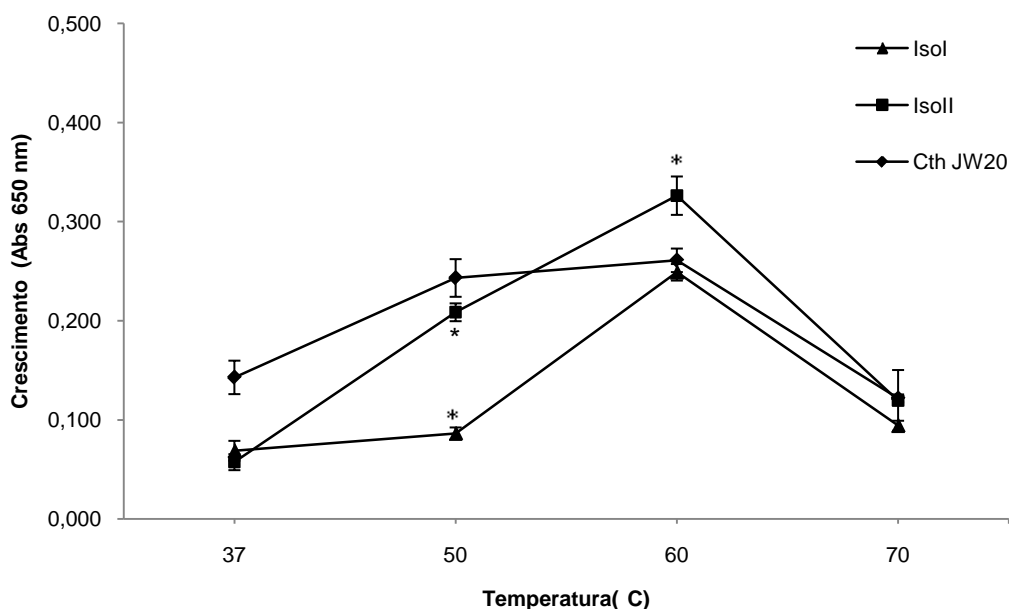


Figura 9. Crescimento dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW, quando cultivados em temperaturas variando de 37 a 70°C, por 48h - em meio contendo celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância a 650 nm. * $p < 0,05$.

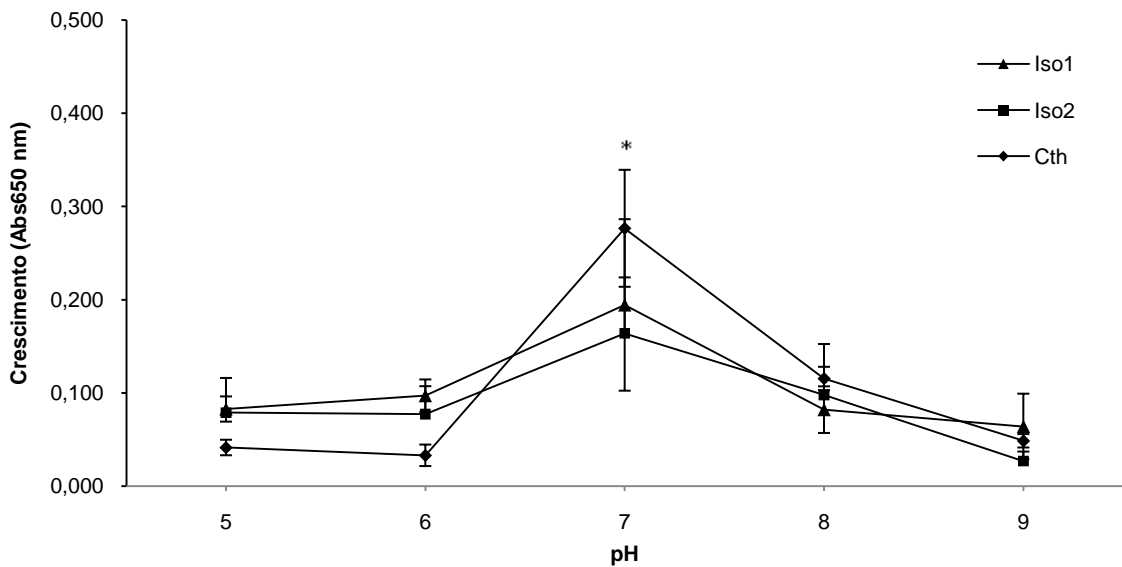


Figura 10. Crescimento dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e CthJW, quando cultivados a 60°C em pHs variando de 5 a 9, por 48h - em meio contendo celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. O crescimento foi acompanhado pela leitura da absorvância a 650 nm. * $p < 0,05$.

Não foi observada diferença significativa para o crescimento do isolado CthJW na temperatura de 50°C ($0,243 \pm 0,008$ nm) quando comparado para o cultivo a 60°C. Entretanto, os outros dois isolados apresentaram crescimento significativamente menor a 50°C em comparação a 60°C. Foi observado crescimento dos isolados a 37°C, com uma diferença significativa do CthJW ($0,143 \pm 0,010$ nm) em relação ao ISO 1 ($0,069 \pm 0,017$ nm) e ISO2 ($0,057 \pm 0,008$ nm). Na temperatura de 70°C houve crescimento dos três isolados, porém, significativamente menor em relação ao observado a 50°C e 60°C.

A figura 10 representa o crescimento dos isolados em celulose microcristalina como fonte de carbono em diferentes pHs. O padrão para o maior valor de densidade óptica observado nos sobrenadantes das culturas contendo celulose microcristalina foi em pH 7 para o isolado CthJW ($0,277 \pm 0,092$ nm), com uma variação significativa comparado aos isolados ISO1 ($0,194 \pm 0,063$ nm) e ISO2 ($0,164 \pm 0,060$ nm). Não houve diferença significativa dos crescimentos dos isolados em meios de cultura com os pHs 5, 6, 8 e 9, tanto entre si, como nos diferentes pHs, com todos as absorvâncias apresentando valores inferiores a $0,115 \pm 0,025$ nm.

5.2 Caracterização protéica dos isolados

A concentração de proteínas nas amostras obtidas dos concentrados dos sobrenadantes das culturas e eluídas do substrato residual foi realizada utilizando o método de Bradford. Os valores obtidos dos sobrenadantes foram significativamente maiores que os obtidos na eluição do substrato residual, em ambas as fontes de carbono (Tabela 1). Sendo a concentração de proteínas eluídas do bagaço de cana de açúcar a menor observada. Além disto, foi detectada uma concentração menor de proteínas nos sobrenadantes das culturas dos isolados ISO1 e ISO2 em relação ao controle CthJW.

Tabela 1. Quantificação de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras dos sobrenadantes e eluídas do substrato residual do meio de cultura (celulose cristalina e bagaço de cana) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e CthJW.

Fonte de carbono	Isolados	Proteínas do sobrenadante	Proteínas eluídas do substrato residual
Celulose cristalina	ISO1	220,51 \pm 7,61	174,93 \pm 1,89
	ISO2	304,13 \pm 11,25	169,73 \pm 4,32
	CthJW	347,66 \pm 20,25*	122,20 \pm 11,04
Bagaço de cana	ISO1	308,92 \pm 5,14	4,40 \pm 2,03
	ISO2	315,42 \pm 7,19	14,88 \pm 5,41*
	CthJW	405,83 \pm 8,33*	5,68 \pm 2,43

Valores \pm desvio-padrão. * $p < 0,05$.

5.3 Caracterização enzimática dos isolados

A produção de enzimas holocelulolíticas foi avaliada para os isolados de *C. thermocellum* ISO1, ISO2 e cepa CthJW cultivados em meios contendo celulose microcristalina e bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono, tanto para os sobrenadantes como para as proteínas eluídas do substrato residual. As amostras de sobrenadantes das culturas de todos os isolados de *C. thermocellum* apresentaram atividade celulolítica, xilanolítica e pectinolítica. Para a fração de proteínas eluídas do substrato residual foram detectadas as atividades celulolítica e xilanolítica, tanto em celulose como em bagaço de cana.

Valores mais significativos de atividade de CMCase foram obtidos para as proteínas eluídas do substrato residual e provenientes do cultivo em celulose. Em comparação com o controle CthJW os isolados ISO1 e ISO2 apresentaram atividade de endoglicanase significativamente menor (figura 11A). Observa-se um padrão para as atividades de endoglicanase (CMCase) das amostras eluídas do substrato residual, com os isolados ISO1, ISO2 e cepa CthJW apresentando valores de atividade enzimática significativamente maiores para o grupo da celulose ($0,0131 \pm 0,002$ UI/mL, $0,205 \pm 0,011$ UI/mL e $0,282 \pm 0,025$ UI/mL, respectivamente) do que para o grupo do bagaço de cana ($0,095 \pm 0,007$ UI/mL, $0,110 \pm 0,020$ UI/mL e $0,174 \pm 0,006$ UI/mL, respectivamente).

As atividades de endoglinase para os sobrenadantes em ambas fontes de carbono estão representadas na figura 11B. Os sobrenadantes dos meios de cultura crescidos em celulose de ISO1 e CTH não apresentaram variação significativa das atividades em relação aos crescidos em bagaço de cana. Porém, para ISO2 a atividade em celulose ($0,130 \pm 0,008$ UI/mL) foi significativamente maior que a observada em bagaço de cana ($0,097 \pm 0,007$ UI/mL).

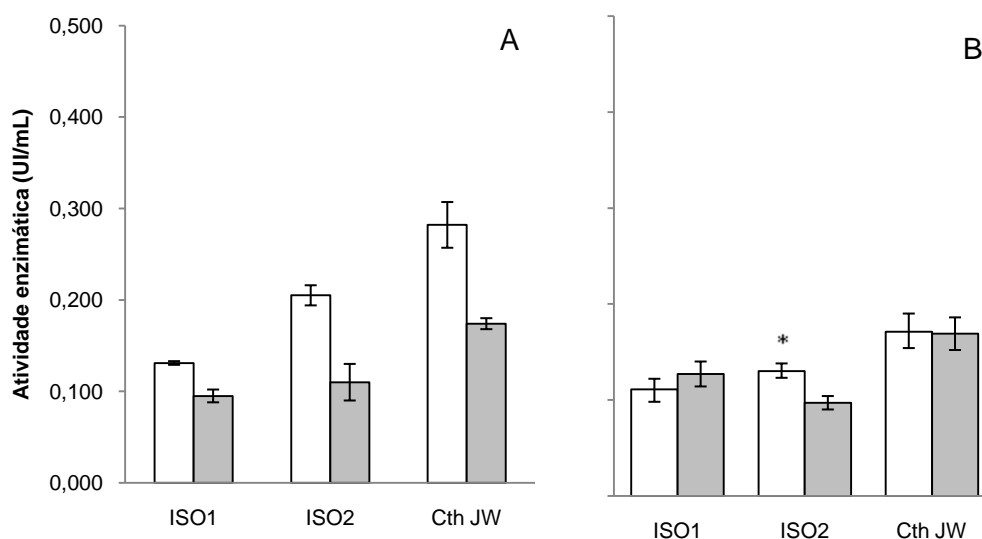


Figura 11. Determinação da atividade de CMCase nas amostras concentradas de proteínas eluídas do substrato residual (A) e sobrenadante dos meios de cultura (B) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%. * $p < 0,05$.

A avaliação da hidrólise de celulose cristalina foi realizada utilizando o ensaio de AVICELase, que possibilita a determinação da atividade celulolítica verdadeira. A atividade de AVICELase foi detectada nos sobrenadantes das culturas e na fração de proteínas eluídas do substrato residual, para as culturas contendo celulose ou bagaço de cana como fonte de carbono. No entanto, para as amostras de proteínas eluídas do substrato residual as atividades foram significativamente menores que as obtidas nos sobrenadantes das culturas (figura 12).

Na comparação das fontes de carbono utilizadas é observado um padrão de maior atividade enzimática das amostras obtidas da celulose que as de bagaço de cana. Na figura 12, os sobrenadantes dos isolados ISO1, ISO2 e CthJW não apresentaram diferença significativa quando crescidos em celulose. No entanto, o controle CthJW ($0,080 \pm 0,024$ UI/mL) teve um resultado de atividade de degradação de celulose microcristalina significativamente maior que o ISO1 ($0,050 \pm 0,009$ UI/mL) e ISO2 ($0,040 \pm 0,014$ UI/mL).

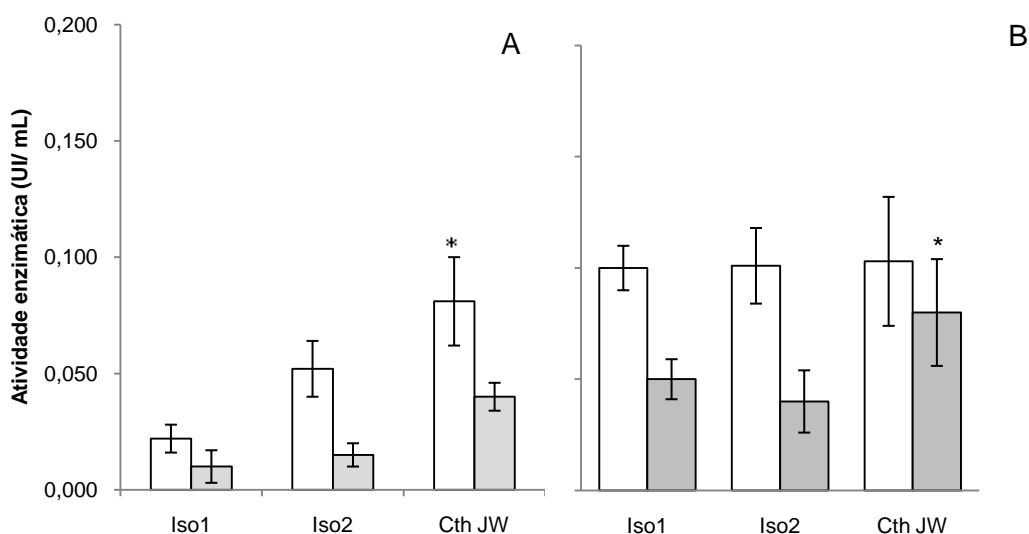


Figura 12. Determinação da atividade de AVICELase nas amostras concentradas de proteínas eluídas do substrato residual (A) e sobrenadante dos meios de cultura (B) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%. * $p < 0.05$.

Os ensaios enzimáticos realizados utilizando como substrato a xilana, para os sobrenadantes e amostras eluídas do substrato residual dos meios de cultura, possibilitaram a avaliação da atividade xilanolítica de cada isolado. Na figura 13A, observa-se para as amostras eluídas da celulose atividade xilanolítica do CthJW ($0,289 \pm 0,007$ UI/mL) com um aumento significativo em relação aos demais isolados, ISO2 ($0,223 \pm 0,017$ UI/mL) e ISO1 ($0,197 \pm 0,028$ UI/mL).

As atividades das amostras dos sobrenadantes apresentaram valores superiores aos encontrados para a fração de proteínas eluídas da celulose, assim como quando compara-se as fontes de carbono celulose e bagaço de cana. Este comportamento não foi observado apenas para o sobrenadante de CthJW. O ISO2 apresentou a maior atividade de $0,478 \pm 0,020$ UI/mL, significativamente maior que as do ISO1 ($0,248 \pm 0,030$ UI/mL) e do CthJW ($0,408 \pm 0,015$ UI/mL). Comparando-se os valores de atividades xilanolíticas dos sobrenadantes das culturas em bagaço de cana, observa-se que o valor obtido para o controle CthJW ($0,409 \pm 0,012$ UI/mL) é significativamente maior que as dos isolados ISO1 ($0,141 \pm 0,009$ UI/mL) e ISO2 ($0,214 \pm 0,017$ UI/mL). As atividades xilanolíticas não apresentaram variação significativa do CthJW em ambas fontes de carbono.

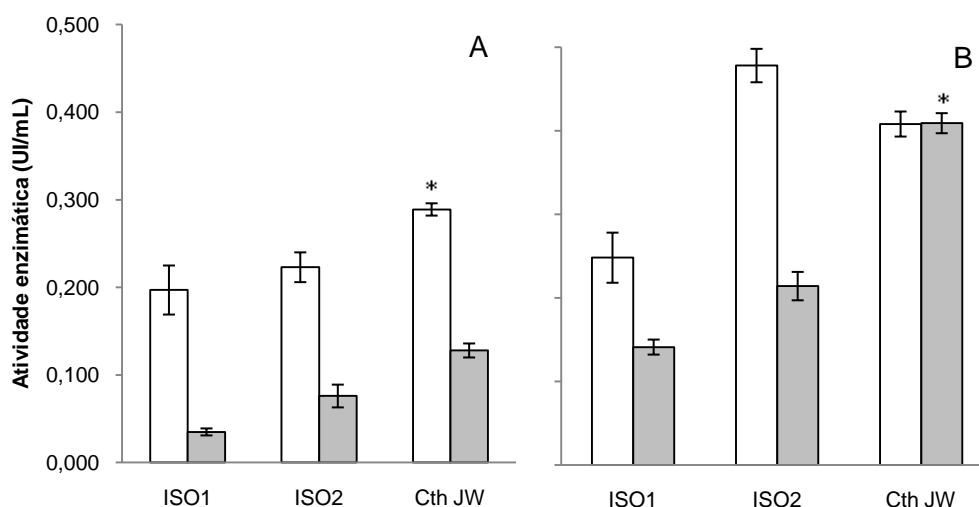


Figura 13. Determinação da atividade de xilanase nas amostras concentradas de proteínas eluídas do substrato residual (A) e sobrenadante dos meios de cultura (B) dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%. * $p < 0,05$.

Conforme pode ser observado na figura 14, as pectinases do sobrenadante dos meios de cultura, tanto com celulose microcristalina como bagaço de cana, são capazes de hidrolisar pectina. Os valores de atividade pectinolítica dos sobrenadantes dos meios de cultura com celulose dos três isolados não apresentaram variação significativa. Para os sobrenadantes dos meios com bagaço de cana observa-se a atividade de ISO1 ($0,229 \pm 0,026$ UI/mL) com um aumento significativo em relação as atividades de ISO2 ($0,168 \pm 0,035$ UI/mL) e CthJW ($0,173 \pm 0,056$ UI/mL).

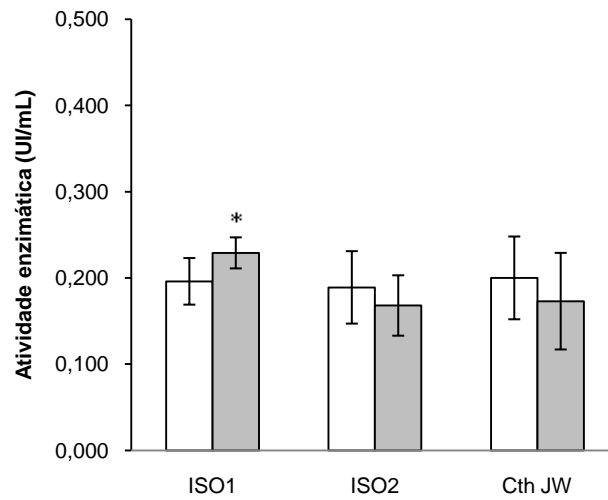


Figura 14. Determinação da atividade de pectinase nas amostras concentradas de proteínas do sobrenadante dos meios de cultura dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e Cth JW. As barras brancas correspondem ao crescimento em celulose microcristalina a 2% e as barras cinzas em bagaço de cana a 0,5%.

5.3 Análise das imagens de Microscopia Eletrônica

A ação dos isolados na degradação de celulose microcristalina fibra longa foi evidenciada em análise por análise das imagens de MEV, visualizando o substrato residual das culturas dos isolados de *C. thermocellum*. É possível notar a presença da bactéria sobre a celulose nos isolados ISO1 (figura 15B), ISO2 (figura15C) e CthJW (figura15D), indicado pelas setas, bem como a degradação das fibras em relação ao controle (figura 15A). Nas imagens do substrato residual da cultura do ISO1 observa-se também a presença da bactéria aderida ao substrato (figura 15 B).

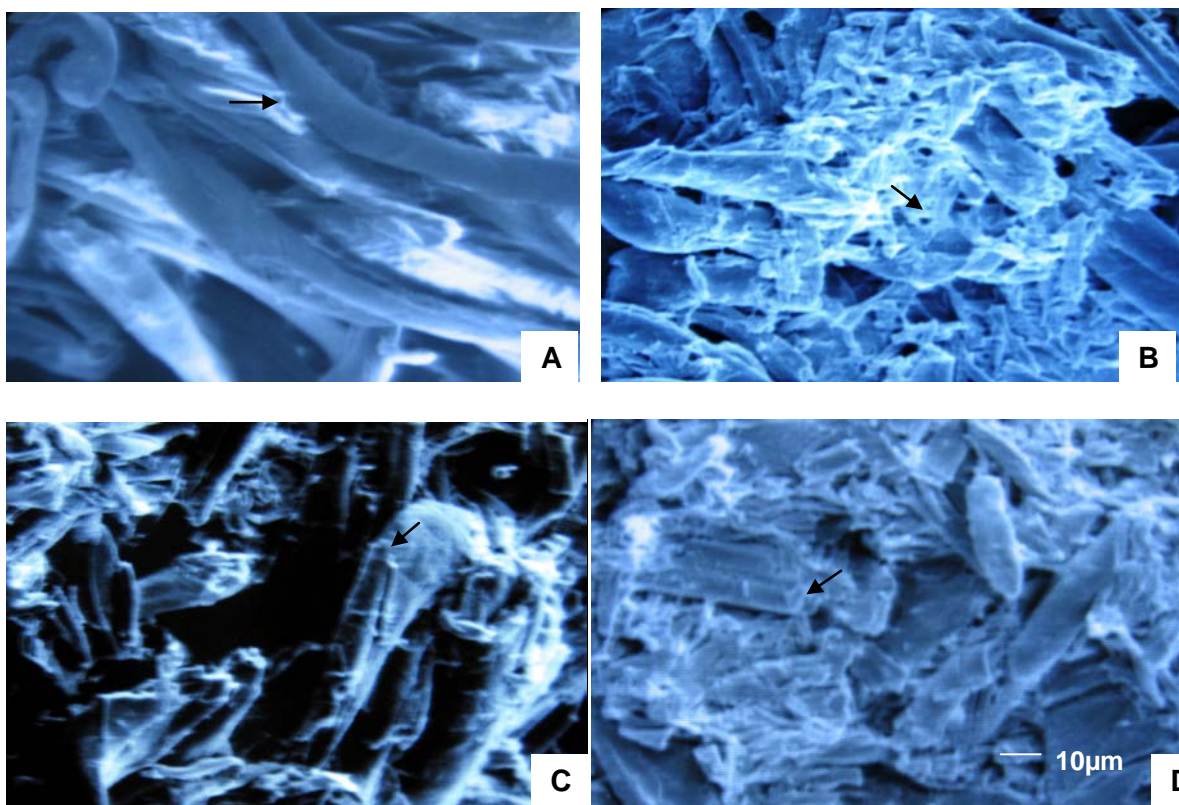


Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura de amostras de celulose microcristalina fibra longa, substrato residual após o cultivo dos isolados de *C. thermocellum* por 48 h a 60°C. Celulose proveniente de meio de cultura não inoculado (A), Celulose residual provenientes das culturas dos isolados ISO1 (B), ISO2 (C) e Cth JW (D). Aumento 600x.

5.4 Análise protéica dos isolados em SDS-PAGE unidimensional

Os perfis protéicos dos sobrenadantes e das amostras eluídas do substrato residual dos meios de cultura contendo celulose microcristalina e bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono, do crescimento dos isolados de *Clostridium thermocellum* ISO1, ISO2 e cepa CthJW foram analisados em eletroforese unidimensional e bidimensional em gel de poliacrilamida a 10%.

Na fração de proteínas eluídas do substrato residual o perfil apresentou proteínas comuns a todos os géis, tais como as bandas protéicas de 220, 160, 50 e 40kDa, indicadas por setas na figura 16A. Observa-se que bandas protéicas estão presentes tanto da celulose microcristalina como de bagaço de cana, indicando uma semelhança no perfil dessas proteínas. No entanto, bandas indicadas em ISO1 e ISO2 crescidos em celulose (L1 e L2) se mostraram com uma intensidade menor em relação as mesmas bandas no controle CthJW, o qual apresentou um perfil protéico mais complexo que as demais.

As bandas de massa molecular 220 e 160 kDa, de alta massa molecular, não foram detectadas ou apresentam bandas menos intensas nos sobrenadantes das culturas. Dessa forma, observa-se um perfil diferente da fração das proteínas eluídas do substrato residual quando comparada as proteínas dos sobrenadantes.

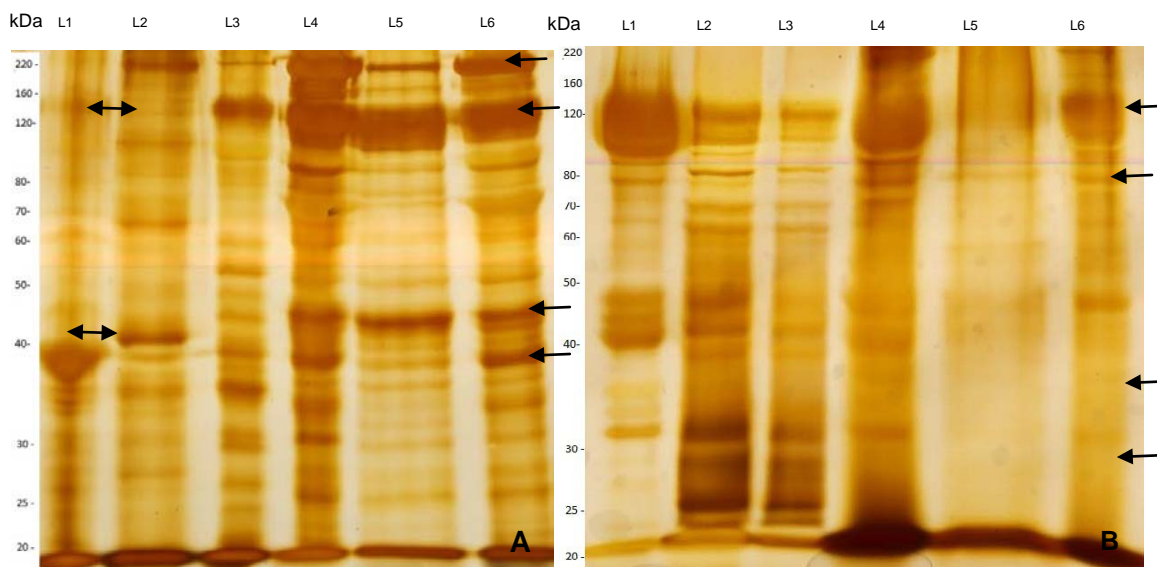


Figura 16. Análise protéica em SDS-PAGE 10% das amostras eluídas da substrato residual (A) e dos sobrenadantes (B) do meio de cultura dos isolados de *C. thermocellum* - ISO1 (L1), ISO2 (L2) e Cth JW (L3). Os crescimentos foram realizados utilizando celulose cristalina (L1-3) e bagaço de cana (L4-6) como fonte carbono.

Na figura 16B, o perfil dos sobrenadantes apresentou bandas em todas as amostras, indicadas pelas setas (120, 80 e 50 kDa), mas com intensidades que variaram de acordo com o isolado e meio de cultura. As setas inclinadas indicam uma alta concentração protéica observada entre as massas moleculares de 40 e 50 kDa, principalmente nos isolados crescidos em celulose, que podem ser melhor visualizadas no gel bidimensional.

5.5 Proteômica

Os perfis bidimensionais das proteínas secretadas nos meios de cultura dos diferentes isolados de *C. thermocellum*, ISO1, ISO2 e CthJW, crescidos em celulose e bagaço de cana de açúcar, foram obtidos na faixa de pH 4-7 e estão representados nas figuras 17 e 18, respectivamente. Nos secretomas de *C. thermocellum* nas diferentes fontes de carbono, em concordância com os resultados do SDS-PAGE unidimensional, a distribuição dos *spots* apresentou uma maior concentração na faixa de 40 a 50 kDa.

Também foram observados conjunto de *spots* de mesma massa e diferentes pls, indicando serem isoformas do mesmo polipeptídeo, destacadas na região ácida do PI na figura 17. O controle CthJW apresentou o mapa protéico com maior complexidade em comparação com os isolados ISO1 e ISO2. Quando comparados entre si, observa-se uma maior concentração de *spots* no perfil protéico do ISO2 em relação ao ISO1, corroborado na análise de imagens.

A faixa protéica apresentada em todos os perfis protéicos analisados, com massa molecular de aproximadamente 120 kDa, se deve provavelmente a carboidratos presentes no meio de cultura. O padrão nas diferentes concentrações de *spots* dos secretomas analisados é o mesmo tanto em celulose, como em bagaço de cana. Como o esperado, o mapa protéico distinto de CthJW em relação aos isolados ISO1 e ISO2 sugere que os isolados de *C. thermocellum* obtidos em nosso laboratório são diferentes do isolado já descrito CthJW, embora possuam capacidades de degradação de biomassa celulósica similares, indicadas pelas atividades celulolíticas que produziram.

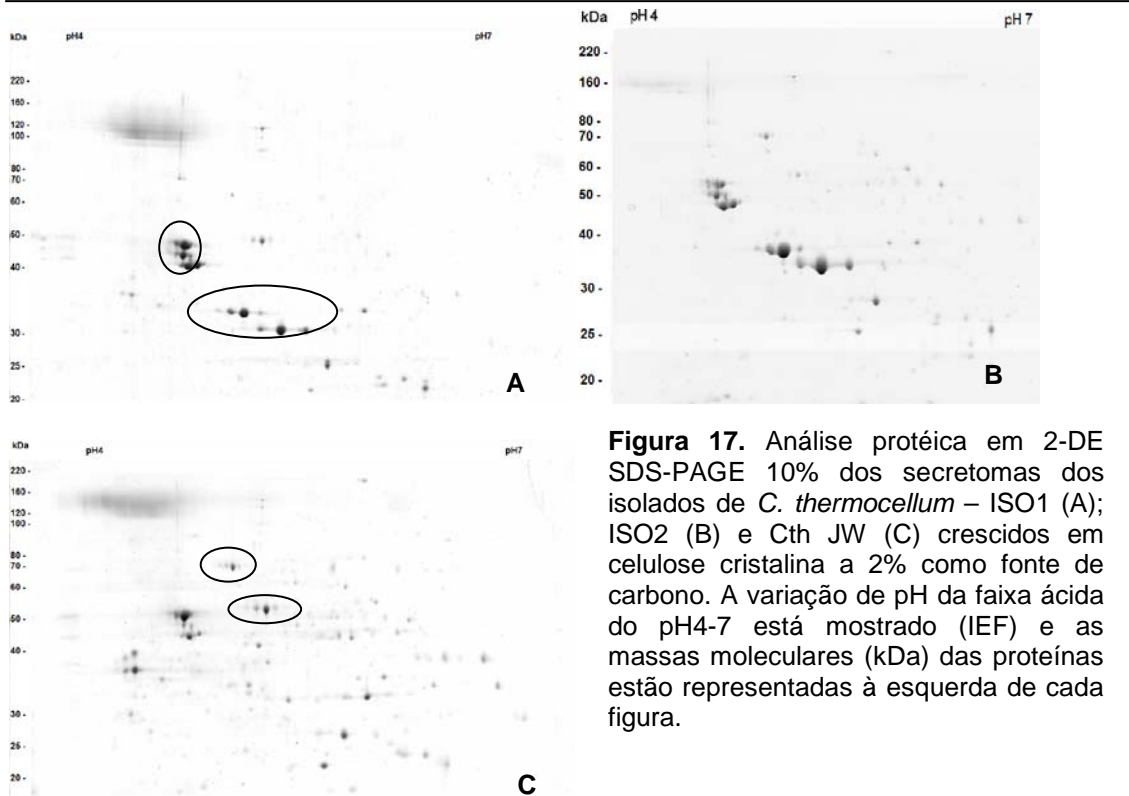


Figura 17. Análise protéica em 2-DE SDS-PAGE 10% dos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1 (A); ISO2 (B) e Cth JW (C) crescidos em celulose cristalina a 2% como fonte de carbono. A variação de pH da faixa ácida do pH4-7 está mostrado (IEF) e as massas moleculares (kDa) das proteínas estão representadas à esquerda de cada figura.

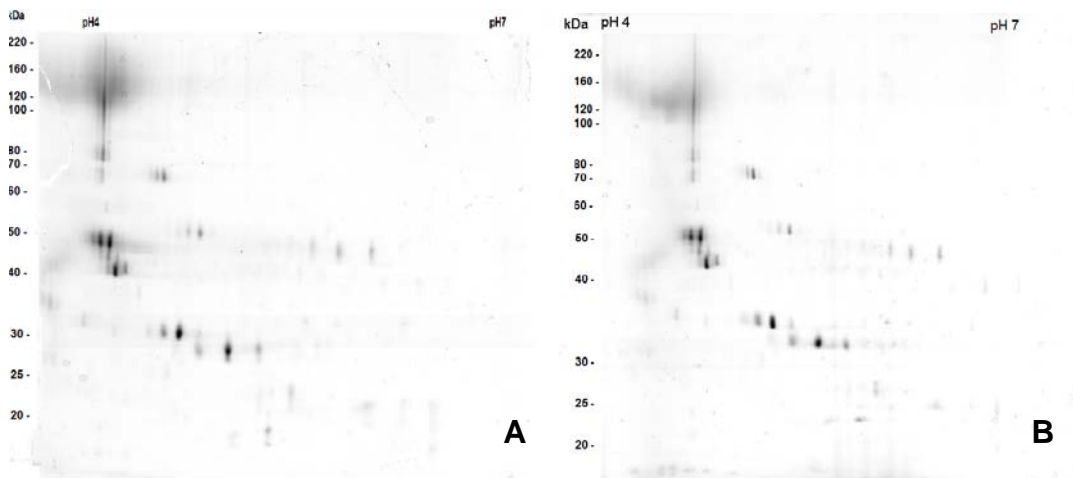
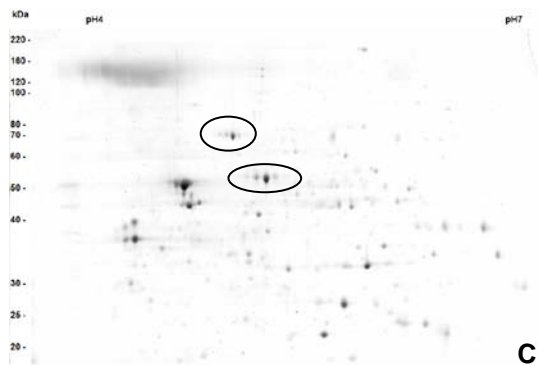
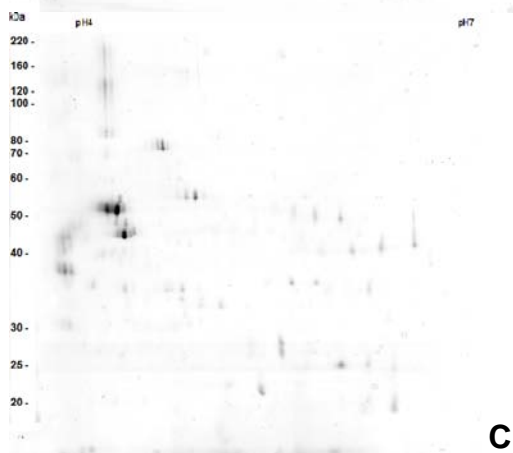


Figura 18. Análise protéica em 2-DE SDS-PAGE 10% dos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* – ISO1 (A); ISO2 (B) e Cth JW (C) - crescidos em bagaço de cana a 0,5% como fonte de carbono. A variação de pH da faixa ácida do pH4-7 e as massas moleculares (kDa) das proteínas estão representadas à esquerda de cada figura.



5.6 Análise de Imagens

A análise das imagens do mapa protéico dos secretomas de isolados de *C. thermocellum* – ISO1, ISO2 e CthJW - crescidos em celulose 2% (m/v) e bagaço de cana 0,5% (m/v) como fonte de carbono foi realizada com a utilização do programa *Image Master Platinum* v.6. Os géis bidimensionais foram feitos em triplicatas e para verificar a reprodutibilidade dos perfis protéicos foi analisado o coeficiente de correlação para cada uma das triplicatas realizadas.

Nas amostras crescidas em celulose cristalina, a média dos coeficientes de correlação para os isolados ISO1, ISO2 e CthJW foi de 0,98; 0,98 e 0,97; respectivamente. Observa-se que a média dos coeficientes de correlação das triplicatas dos secretomas crescidos em bagaço de cana foram de 0,96 para o ISO1, 0,98 para o ISO2 e 0,97 para o CthJW.

Na Tabela 2 estão representados número de *spots* totais, *spots* exclusivos de diferentes condições de crescimento. Quando a celulose microcristalina a 2% (m/v) foi utilizada como fonte de carbono, o perfil bidimensional do secretoma do ISO1 mostrou 59 *spots* totais detectados na triplicata dos géis, sendo 23 exclusivos para esta condição. Para o ISO2 foi obtido o maior número de *spots* totais (134), 98 dos quais se identificaram exclusivos em relação aos demais isolados nessa condição de crescimento. O CthJW apresentou 117 *spots* totais, dos quais 100 são exclusivos deste isolado.

Para os isolados que cresceram usando bagaço de cana 0,5% (m/v) como fonte de carbono o ISO1 apresentou 70 *spots* comuns as triplicatas dos géis e 34 exclusivos à condição, o ISO2 obteve 83 *spots* totais e 45 exclusivos e observa-se 88 *spots* totais e 61 exclusivos para o CthJW.

Por meio do coeficiente de correlação entre cada uma das amostras analisadas foi comparado o grau de similaridade dos mapas protéicos. Na comparação dos perfis bidimensionais do secretoma produzido em celulose microcristalina pelo ISO1 com os demais géis observa-se um coeficiente de correlação de 0,72 e 0,83 com os isolados ISO2 e CthJW crescidos em celulose e 0,62 e 0,50 com os mesmos isolados crescidos em bagaço de cana. Comparando o ISO1 quando celulose ou bagaço de cana foi obtido um coeficiente de correlação de 0,86.

Na comparação dos géis de secretomas do ISO2 e CthJW o coeficiente de correlação foi de 0,18 quando os isolados utilizaram celulose microcristalina como fonte de carbono e 0,27 quando o bagaço de cana foi utilizado. O ISO2 em celulose apresentou um coeficiente de correlação de 0,81 em relação ao ISO2 bagaço de cana e o CthJW em celulose 0,82 em relação ao CthJW em bagaço de cana.

Tabela 2. Determinação de spots totais e spots exclusivos dos géis 2-DE dos secretomas dos isolados de *C. thermocellum*. Para a contagem de spot foi utilizado o programa *Image Master Platinum* v.6.

Fonte de carbono		Spots totais	Spots exclusivos
Celulose microcristalina	ISO1	59	23
	ISO2	134	98
	CthJW	117	100
Bagaço de cana	ISO1	70	34
	ISO2	83	45
	CthJW	88	61

5.7 Espectrometria de massas MALDI-TOF

Um total de 50 *spots* foram recortados manualmente do gel do secretoma do isolado de *C. thermocellum* ISO2 crescido em celulose microcristalina (2%) e analisados por MALDI-TOF, sendo identificadas 26 proteínas (**Tabela 3**). Esses *spots* apresentaram expressão diferencial entre os mapas secretômicos de ISO1, ISO2 e Cth JW, ou estão presentes exclusivamente em ISO2 e/ou ISO1.

A expressão diferencial em porcentagem de volume dos principais *spots* identificados pode ser visualizada nas figuras 19 e 20, sendo representadas no gel de cada um dos isolados assim como no gráfico com os valores correspondentes a expressão dos mesmos em ISO1, ISO2 e Cth JW.

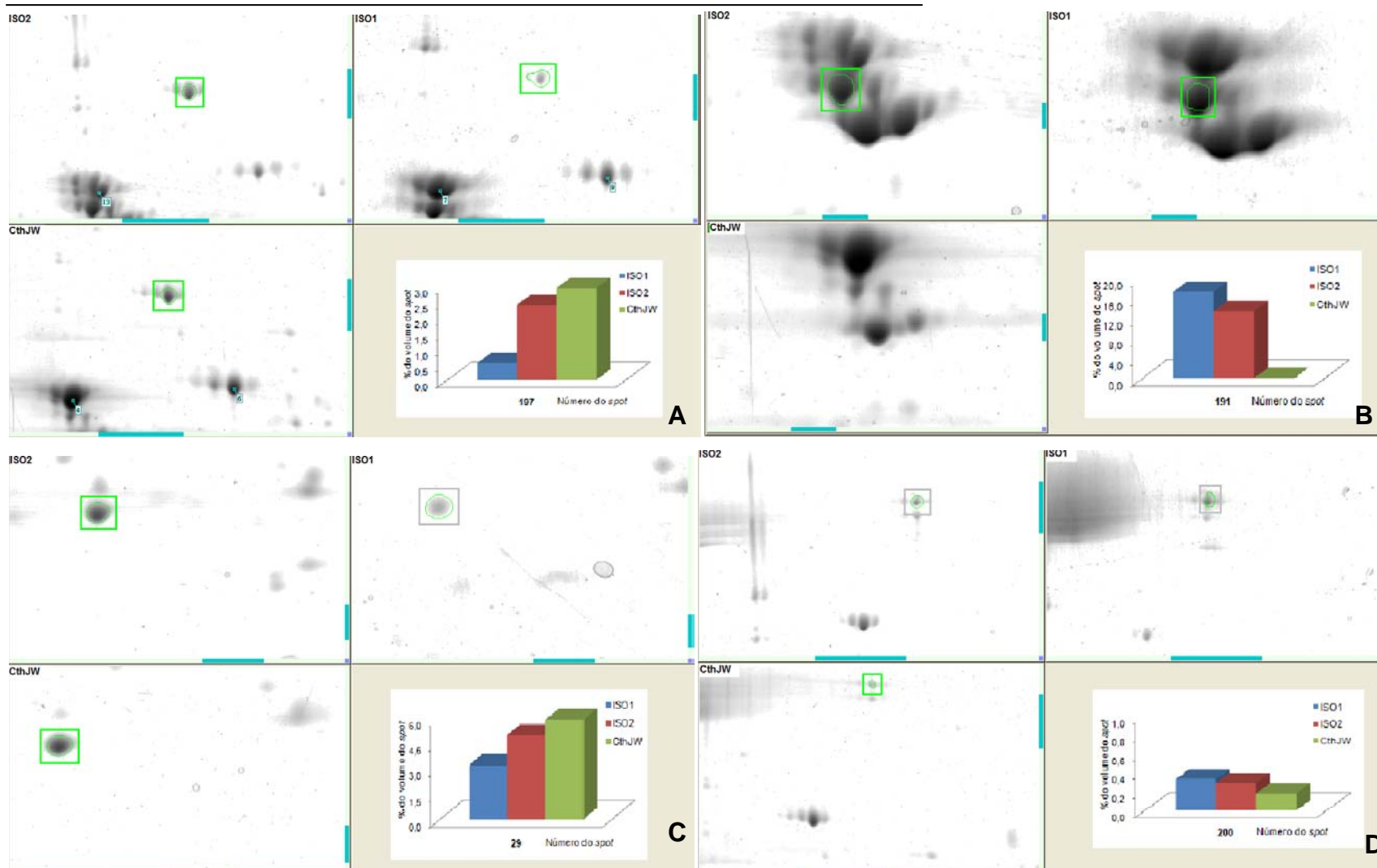


Figura 19. Expressão diferencial em porcentagem de volume dos spots 197 (A), 191 (B), 29 (C), 200 (D) nos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* ISO1, ISO2 e CthJW crescidos em celulose cristalina a 2% como fonte de carbono.

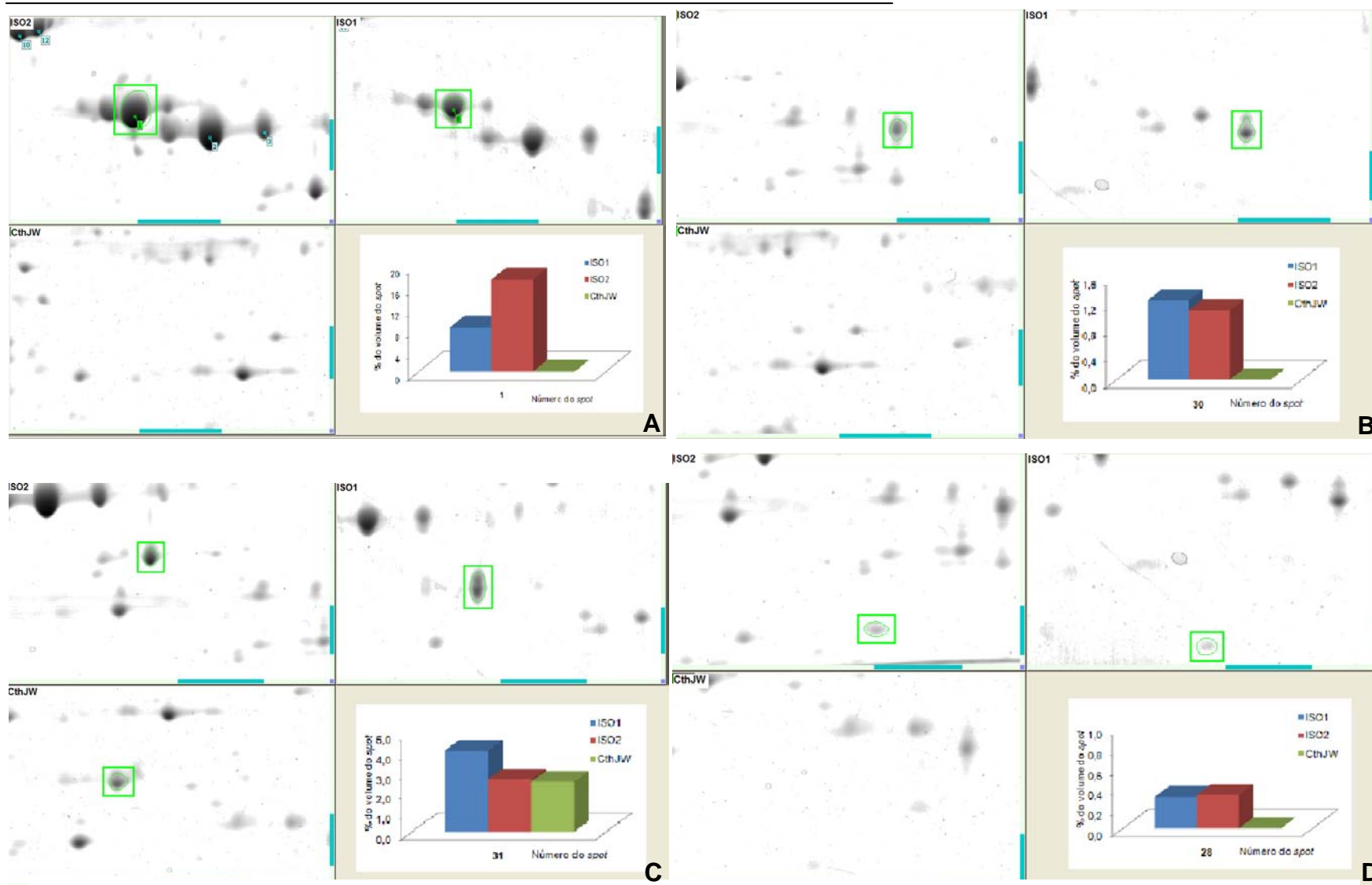


Figura 20. Expressão diferencial em porcentagem de volume dos spots 1 (A), 30 (B), 31 (C) e 28 (D) nos secretomas dos isolados de *C. thermocellum* ISO1, ISO2 e CthJW crescidos em celulose cristalina a 2% como fonte de carbono.

Tabela 3. Identificação das proteínas a partir do perfil bidimensional do secretoma do isolado de *C. thermocellum* ISO2 cultivado em celulose cristalina a 2% (m/v) como fonte de carbono

ID spot	Proteína	Mr	pl	Z (score) MASCOT	Número de acesso NCBI	Organismo	Cobertura de sequência (%)
200	Glicosil hidrolase da família 9	101275	5,08	97	gi 281417128	<i>Clostridium thermocellum</i> JW20	15
191	Proteína de ligação solúvel extracelular da família 1	50054	4,74	78	gi 256003353	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	30
192	Proteína de ligação solúvel extracelular da família 1	50054	4,74	77	gi 256003353	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	21
51	Proteína de ligação solúvel extracelular da família 1	50054	4,74	115	gi 256003353	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	40
197	Chaperona GroEL	57495	4,89	290	gi 125975373	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	66
37	Proteína da família Csh2 associada à CRISPR	34861	5,67	76	gi 125975680	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	34
41	Proteína da família Csh2 associada à CRISPR	34861	5,67	133	gi 125975680	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	54
43	Enolase	47130	5,02	150	gi 125972667	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	44
01	Proteína do domínio flagelina	29577	5,24	75	gi 256005621	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	38
02	Proteína do domínio flagelina	29413	7,93	71	gi 125714947	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	29
36	Proteína do domínio flagelina	29577	5,24	100	gi 256005621	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	40
05	Proteína do domínio flagelina	29577	5,24	76	gi 256005621	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	44

04	Proteína do domínio flagelina	29577	5,24	84	gi 256005621	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	38
35	Frutose bifosfato aldolase	33896	5,44	155	gi 125972870	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	44
40	Glicose -6- fosfato isomerase	50370	5,61	104	gi 125972741	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	31
145	Proteína bacteriocina linocina M18	30410	4,96	153	gi 125974015	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	49
193	Piruvato flavodoxina/ ferredoxina oxidorreductase	43605	5,20	116	gi 281418657	<i>Clostridium thermocellum</i> JW20	37
28	Proteína rubredoxina-tipo Fe(Cys) ₄	13061	6,81	77	gi 125972587	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	37
30	Rubreritrina	20609	5,89	109	gi 125974275	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	44
42	Rubreritrina	22669	5,91	138	gi 125973377	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	45
114	Fator de alongação Tu	44249	5,36	90	gi 256003126	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	39
149	Fator de alongação Tu	44249	5,36	163	gi 256003126	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	47
31	Triosefosfato isomerase	27345	5,43	95	gi 125972663	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	43
119	Proteína ribossomal 50S	13287	4,94	86	gi 125975205	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	37
29	Alquil hidroperóxido redutase/ antioxidante específico para Tiol	20906	5,35	77	gi 125974466	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	50

6 DISCUSSÃO

As bactérias anaeróbicas termofílicas da espécie *C. thermocellum* são conhecidas pela capacidade de degradação da parede celular de células vegetais utilizando um complexo enzimático extracelular, o celulosoma, eficiente na degradação de biomassa vegetal holocelulósica. E, portanto, com potencial reconhecido e explorado na hidrólise deste tipo de biomassa e na conversão dos açúcares liberados em etanol. No entanto, ainda faltam descrições desse microorganismo acerca de seu metabolismo e cultivo em substratos lignocelulósicos como o bagaço de cana, resíduo agrícola abundante e de considerável importância na produção de etanol de segunda geração.

Visando a caracterização de duas bactérias isoladas de dejetos de caprino e identificadas como *C. thermocellum*, ISO1 e ISO2, foram realizados experimentos a fim de obter as condições adequadas de cultivo, como temperatura e pH, de verificar a produção de atividades enzimáticas para degradação de celulose, xilana e pectina, e principalmente verificar o efeito da fonte de carbono no conjunto de proteínas secretado em meios de cultura contendo celulose microcristalina a 2% ou bagaço de cana de açúcar a 0,5%. Sendo esta última análise realizada com a utilização de técnicas de proteômica.

Os isolados da bactéria *C. thermocellum* - ISO1 e ISO2 - foram caracterizados com um tempo ideal para cultivo de 48h, assim como o a bactéria controle CthJW, tanto em celulose cristalina como em bagaço de cana (Figura 7 e 8). Estudos anteriores mostram o mesmo tempo de crescimento para as bactérias termófilas *C. thermocellum* JW20 e ATCC 2705 em meios contendo celulose e celobiose, respectivamente (Freier *et al.*, 1988; Chinn *et al.*, 2008). A bactéria mesofílica *C. cellulovorans* também apresentou crescimento a 48 h em meio contendo xilana (Kosugi *et al.*, 2001). Não há trabalhos para comparação de *C. thermocellum* crescido em meio de cultura que contenha bagaço de cana como fonte de carbono.

Na caracterização dos isolados de *C.thermocellum* quando cultivados em diferentes temperaturas, utilizando celulose como fonte de carbono, ISO1, ISO2 e CthJW apresentaram maior taxa de crescimento a 60°C (Figura 9) . Este resultado permite a classificação dessas bactérias como organismos termofílicos, e, portanto, apresentam potencial para aplicação em processos industriais, por suportar altas temperaturas, o que diminui o risco de contaminação em processos fermentativos, e possuem enzimas termoestáveis. A temperatura ideal de crescimento dos isolados de *C. thermocellum* de 60°C também foi obtida em outros trabalhos (Freier *et al.*, 1988; Choi *et. al.*, 1996; Zverlov *et al.*, 1999; Zverlov *et al.*, 2005; Dharmagadda *et al.*, 2010).

Assim como a temperatura, o pH ideal de crescimento é um parâmetro que deve ser estabelecido no cultivo de qualquer microorganismo. Nos isolados do presente trabalho observa-se uma maior taxa de crescimento na faixa de 6,5 a 7,5; sendo o máximo em pH 7 (Figura 10). Estando de acordo com o valor de pH ideal para o cultivo de outros isolados de *C. thermocellum*, descritos por Freier (1988), Choi (1996), Dror (2003) e Dharmagadda e colaboradores (2010) e Xu e colaboradores (2010).

Para as culturas contendo celulose cristalina como fonte de carbono observou-se além da turbidez característica do crescimento de microorganismos uma alteração da coloração inicial da celulose, de branca para amarela. Isso indica a presença do pigmento carotenóide conhecido como substância amarela de afinidade (YAS), produzido por bactérias anaeróbicas durante a degradação da celulose, anteriormente relatada nas bactérias *C. thermocellum* e *Ruminococcus flavefaciens*. Esta substância é considerada como atuante não somente na adsorção das enzimas celulolíticas ao substrato como também na sinalização para a bactéria da presença da celulose. Além disso, já foi demonstrado que na presença de YAS a eficiência de adsorção de uma celobiohidrolase e uma endoglicanase de *R. flavefaciens* é aumentada (Ljungdahl *et al.*, 1988; Kopečný *et. al.*, 1997).

A degradação de celulose microcristalina pelos ISO1, ISO2 e CthJW observada nas imagens de MEV (Figura 15) permite a visualização dessas bactérias ligadas ao substrato e de sua ação sobre as fibras de celulose. Shiratori e

colaboradores (2006) obtiveram resultados semelhantes mostrados em imagens de MEV para degradação de papel observada para uma nova linhagem de *Clostridium* (EBR45), em *C. thermocellum* e *Clostridium straminisolvens*.

Na análise da produção de enzimas holocelulolíticas observa-se que todos os isolados de *C. thermocellum* secretam atividade celulolítica e xilanolítica quando cultivados em meio de cultura contendo celulose cristalina ou bagaço de cana como fonte de carbono, tanto para as amostras de sobrenadantes quanto de proteínas eluídas do substrato residual. Indicando o potencial de utilização destes isolados como fonte de enzimas com aplicação em diversas indústrias, que incluem a produção de cerveja, alimentos e vinho, rações produtos têxteis e roupas, papel e celulose, assim como, na produção de açúcares fermentáveis a partir de resíduos agrícolas (Bhat, 2000; Kirk *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2005; Polizeli *et al.*, 2005).

As bactérias anaeróbicas produtoras de celulasas, possuem atividade celulolítica verdadeira, uma vez que são capazes de degradar completamente formas cristalinas de celulose, como algodão e Avicel (Demain *et al.*, 2005). No presente estudo observa-se a degradação da celulose microcristalina (AVICEL) pelos isolados ISO1, ISO2 e CthJW, nas amostras que utilizaram celulose e nas que cresceram em bagaço de cana como fonte de carbono (Figura 12 e 13). Resultados semelhantes foram obtidos para atividades secretadas por diferentes espécies de *Clostridium* (Vazana *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

Além da atividade celulolítica verdadeira foram detectadas também nos sobrenadantes e na fração de proteínas eluídas do substrato residual as atividades celulolíticas de: endoglicanase (CMCase), hemicelulolítica de xilanase e pectinolítica para as culturas provenientes de meios contendo celulose cristalina ou bagaço de cana. Estudos anteriores identificaram essas atividades tanto em *C. thermocellum* quanto em bactérias como *Clostridium cellulolyticum* e *Clostridium cellulovorans* (Choi *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2004; Fendri *et al.*, 2009; Raman *et al.*, 2009).

O perfil das frações de proteínas eluídas do substrato residual apresentou (figura 16) bandas de alta massa molecular (maior que 160kDa), indicando a

possível presença da proteína estrutural do celulosoma (CipA) de *C. thermocellum*, responsável pelo ancoramento das subunidades catalíticas que atuam na degradação dos substratos celulósicos. Considerando-se apenas as amostras do sobrenadante, a maior intensidade é observada no gel nas bandas em torno de 50kDa, com um perfil de proteínas com menor massa molecular, relacionadas provavelmente ao metabolismo dessas bactérias.

As análises do perfil de proteínas constituintes de celulosomas de bactérias como *C. thermocellum*, *C. cellulovorans* e *C. cellulolyticum* são realizadas em sua maioria por eletroforese unidimensional, indicando uma diferença entre diferentes fontes de carbono (Dror *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2010). Dessa forma, podemos observar que apesar da semelhança no perfil das bandas protéicas eluídas do substrato residual, as bandas de 220, 160, 50 e 40kDa se mostraram mais intensas no gel de bagaço em comparação com o gel de celulose, indicando que uma maior quantidade dessas proteínas seriam necessárias na degradação de substratos lignocelulolíticos mais complexos como o bagaço de cana.

Gold e colaboradores (2007) observaram diferenças quantitativas no perfil de subunidades do celulosoma de *C. thermocellum* crescidos em Avicel ou celobiose como fontes de carbono. Houve menor expressão no crescimento em celulose em relação à celobiose das glicosil hidrolases da família 8, endoglicanase CelA, GH5, endoglicanase CelB, CelE, CelG e hemicelulases XynA, XynC, XynZ e XynA. Sendo as hemicelulases mais expressas na presença do substrato menos complexo (celobiose) e as celulases da família 9 são as mais abundantes para amostras provenientes de culturas contendo celulose.

A análise do perfil de proteínas secretadas dos isolados modelo deste trabalho é realizado para verificar o conjunto de proteínas com provável ação na degradação de biomassa lignocelulósica, assim como avaliar se a fonte de carbono utilizada no meio de cultura influencia na expressão diferencial destas proteínas. Experimentos semelhantes já foram descritos para espécies de *Clostridium* cultivadas em celobiose, celulose microcristalina, pectina, xilana e misturas destes componentes, como fonte de carbono. Entretanto, o perfil de proteínas secretadas

na presença de biomassa lignocelulósica foi descrito apenas na degradação de fibra de milho e de uma gramínea de crescimento rápido (*switchgrass*), sendo que nenhum estudo foi realizado com a utilização de bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono (Raman *et al.*, 2009).

Embora a caracterização protéica utilizando eletroforese bidimensional permita a melhor visualização das proteínas em uma determinada amostra, ainda são poucos os trabalhos realizados em *C. thermocellum* com essa técnica, sendo o primeiro deles desenvolvidos em 2005, por Zverlov e colaboradores (2005). Vale ressaltar ainda que estes se restringem a caracterização específica das proteínas celossomais e nenhum destes analisou o perfil geral das proteínas secretadas no meio de cultura (secretoma), tanto em celulose cristalina, como em bagaço de cana.

A média dos coeficientes de correlação de regressão linear entre os volumes dos “spots” foi superior a 0,96 para a comparação de todas as réplicas das triplicatas realizadas. Este valor de correlação entre as repetições garante a confiabilidade nas diferenças observadas na comparação dos isolados em diferentes condições de crescimento, uma vez que estas variações estarão relacionadas às variações no mapa protéico entre as amostras analisadas. A correlação entre as réplicas técnicas e a normalização das imagens dos géis bidimensionais dependem de vários fatores experimentais como coloração dos géis, concentração de proteínas nas amostras, assim como pela curva padrão de coloração feita durante a análise da imagem pelo software (Berth *et al.*, 2007).

As amostras do secretoma de ISO1 e ISO2 apresentaram um coeficiente de correlação quando crescidos em celulose no valor entre si de 0,72 e valores de 0,83 e 0,18 na comparação entre ISO1 e CthJW e ISO2 e CthJW, respectivamente, sugerindo se tratarem de isolados diferentes. Da mesma forma, os coeficientes de correlação entre ISO1 e ISO2, ISO1 e CthJW, e ISO2 e CthJW crescidos em bagaço de cana foram de 0,85; 0,81 e 0,82; respectivamente. A escolha da identificação dos spots do secretoma do ISO2 em celulose foi fundamentada pela maior diferença observada entre este isolado e o controle, com um coeficiente de correlação de 0,18.

Foram identificados 26 *spots* do mapa protéico do sobrenadante de ISO2 quando cultivado em celulose cristalina a 2%, utilizando espectrometria de massa em MALDI-TOF, sendo a maioria relacionada ao metabolismo celular como a proteína ribossomal 50S, a chaperona GroEL, carboxil transferase, proteína da família Csh2 associada a CRISPR (2 isoformas), enolase, proteínas de ligação solúvel extracelular da família 1 (3 isoformas), flagelinas (5 isoformas), alquil hidroperóxido redutase (AhpC), frutose-1,6-bifosfato aldolase, glicose 6-fosfato isomerase, glicosil hidrolase da família 9 (GH9), bacteriocina do tipo linocina L-18, piruvato flavodoxina (ferrodoxina) oxirredutase, rubredoxina, rubreritina (2 isoformas), fator de alongação (Ef-Tu) e triosefosfato isomerase.

As peroxirredoxinas são proteínas que utilizam suas cisteínas para catalisar a redução de hidroperóxidos. Dentre elas, a alquil hidroperóxido redutase (AhpC) é responsável pela redução direta dos hiperóxidos orgânicos na sua forma reduzida ditiol. *Clostridium perfringens*, uma bactéria patogênica obrigatória é capaz de sobreviver quando exposta ao ar devido a uma resposta adaptativa complexa às EROS, que envolve a produção de enzimas como AhpC (Jean *et al.*, 2004). Dessa forma, essa enzima identificada nos três isolados de *C. thermocellum* (figura 19 C) no presente estudo pode desempenhar papel semelhante na limpeza de espécies de peróxido em condições de estresse oxidativo.

O antioxidante específico para tiol (TSA) foi conhecido inicialmente pela especificidade devida a uma suposta capacidade de desativação de radicais livres centrados no enxofre, importante na ação como defesa contra os radicais que contém grupos sulfidríla (Yim *et al.*, 1994). No entanto, foi demonstrado posteriormente que TSA é uma peroxidase dependente de tiol e que sua especificidade por tióis se devia ao fato de que somente esses redutores são capazes de regenerar a sua forma oxidada (Chae *et al.*, 1994; Netto *et al.*, 1996).

A proteína ribossomal 50S se refere à maior subunidade do ribossomo que não interage diretamente com o rRNA. Esta proteína intracelular foi observada apenas no secretoma do ISO2 com uma expressão baixa, sugerindo ser proveniente de possível lise celular na preparação do secretoma.

A proteína rubredoxina possui um domínio de ligação de ferro contendo um centro de [Fe(Cys)₄] presente na rubreritrina e também na ferredoxina-tioredoxina redutase. Nas rubredoxinas, o átomo de ferro é coordenado por quatro resíduos de cisteína, e parece estar envolvido na transferência de elétrons. Rubreritriminas são pequenas proteínas homodiméricas, geralmente constituídas por dois domínios com atividade putativa de peroxidase (Papavassiliou *et al.*, 1985; Calusinska *et al.*, 2010). Rubredoxinas em *C. thermocellum* e *Morella acetica* mostraram ser boas candidatas para a seleção de diaforases (Chakraborty *et al.*, 2008; Ljungdahl, 2009). Foram obtidas em *Clostridium difficile* e em *C. thermocellum* como proteínas de resposta a condições de estresse (Carere *et al.*, 2008; Lawley *et al.*, 2009). As proteínas rubreritrina (figura 20 B) e rubredoxina (figura 20 D) identificadas foram observadas apenas nos secretomas de ISO1 e ISO2 sugerindo que estes isolados foram submetidos a condições de estresse diferentes das de Cth JW.

As proteínas da família Csh2 associadas à CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) compreendem um sistema hereditário de defesa do hospedeiro nas células procarióticas contra fagos e outros DNAs externos e foram identificadas em dois *spots* do secretoma de ISO2, também presentes em ISO1, mas com uma expressão baixa que sugere a provável lise celular no preparo dos secretomas (NCBI). A proteína bacteriocina linocina M18 é encontrada em eubactérias e arqueias e são as encapsulinas, formando nanocompartimentos dentro da bactéria contendo proteínas semelhantes as ferritinas ou peroxidases, enzimas envolvida na resposta ao estresse oxidativo, ligadas por uma via única de extensão C-terminal (Valdes-Stauber *et al.*, 1994).

Uma chaperona GroEL, da família das proteínas de choque térmico (Hsp60), foi identificada no secretoma de ISO2 (figura 19 A) crescido em celulose com uma massa molecular de aproximadamente 58kDa, semelhante a estudada em *Clostridium difficile*, bactéria patogênica responsável por infecções intestinais. O perfil dessa chaperona GroEL foi analisado como tendo relação com a aderência celular e posterior colonização dos tecidos infectados, principalmente em situações de estresse do meio. Vale destacar ainda que, como em ISO2, essa proteína foi encontrada no sobrenadante do meio de cultura (análise em imunoblot), o que não

estaria relacionado a lise celular, uma vez que as bactérias continuaram intactas e viáveis mesmo na presença desta proteína (Hennequin *et al.*, 2001). Vale ressaltar que essa proteína foi expressa pelo três isolados de *C. thermocellum*, corroborando a importância da mesma em alguma das funções apresentadas.

Em *C. thermocellum*, proteínas de 65 e 12 kDa foram identificadas com significativa similaridade as proteínas GroEI e GroES da família chaperona. A remoção das celulases crescidas em celobiose com tampão de lavagem, seguida de sonicação resultou na purificação dessas proteínas, que estiveram relacionadas com uma possível função na produção e translocação dos componentes celulosômicos. Esse mecanismo ainda pouco entendido é altamente organizado pela ligação da proteína estrutural (CipA) à célula mediada proteínas homólogas ao componentes da camada S (similares as chaperonas). Em outros organismos o sistema da chaperonas apresenta funções relacionada a vários outros complexos protéicos e enzimas multiméricas. Dessa forma, ainda é necessária uma melhor investigação deste aspecto na função das chaperonas em *C. thermocellum* (Cross *et al.*, 1996).

Na degradação da celulose por *C. thermocellum* são produtos da fermentação dos açúcares liberados acetato, lactato e etanol, em diferentes condições de crescimento, com a liberação concomitante de H₂ e CO₂. A elucidação das vias de catabolismo do piruvato e síntese de H₂ são importantes para desenvolver estratégias que aumentem a produção de hidrogênio com a utilização da biomassa. No sobrenadante do crescimento de *C. thermocellum* em alfa celulose foram identificadas enzimas chaves nesse processo, como a piruvato ferredoxina (flavodoxina) oxirredutase (POR - EC 1.2.7.1), observadas em anaeróbicos eucariotos, arqueias e bactérias do gênero *Clostridium* (Carere *et al.*, 2008; Riederer *et al.*, 2010). Da mesma forma, essa enzima foi identificada nos secretomas do ISO2 e CthJW (*spot* 29) crescidos em celulose cristalina como fonte de carbono, sugerindo uma possível utilização desses isolados na melhor compreensão da síntese de hidrogênio.

Foram identificadas no sobrenadante de cultura de *C. thermocellum* enzimas da glicólise, possivelmente provenientes da lise celular na preparação da amostra. No segundo passo da glicólise, a enzima glicose 6-fosfato isomerase (*spot* 40) catalisa a interconversão reversível de glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato. Este produto é fosforilado e em seguida clivado em diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, pela enzima frutose-bifosfato aldolase (*spot* 35). A conversão do gliceraldeído-3-fosfato em diidroxiacetona fosfato para ser utilizado na etapa posterior é realizada pela triosefosfato isomerase (*spot* 31). Após alguns passos, a enolase (*spot* 43) catalisa a conversão reversível de 2- fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato e é essencial na degradação de carboidratos na glicólise. (Riederer *et al.*, 2010),

A enzima carboxil transferase (*spot* 162) foi identificada no secretoma dos três isolados e já havia sido identificada por Peng e colaboradores (2011), com a mesma massa molecular de 56 kDa, em estudo recente dos complexos de proteína de membrana em *C. thermocellum*. Três proteínas de ligação solúveis extracelulares da família 1 foram identificadas como isoformas no mapa protéico do ISO2, sendo estas proteínas de membrana relacionadas ao transporte de moléculas e íons. Em estudo de identificação de proteínas de membrana de *C. thermocellum* por MS foram obtidos resultados semelhantes, sendo encontradas chaperona, proteína de ligação solúvel extracelular da família 1 e glicosil hidrolase da família 1 (Williams *et al.*, 2006). O sistema de transporte de açúcares ABC em *C. thermocellum* é constituído por proteínas de ligação solúveis extracelulares, uma ou mais proteínas integrais de membrana e na maioria dos casos um sítio de ligação a ATP (Nataf *et al.*, 2008).

As proteínas flagelinas (*spots* 1, 2, 4, 5 e 36) apresentaram o maior número de isoformas, sendo uma delas o *spot* de maior volume do gel 2DE, quatro presentes apenas no ISO1 e ISO2 e uma delas presente também no controle CthJW. Essas proteínas estão relacionadas a motilidade das bactérias assim como na estrutura do flagelo das bactérias. A glicosilação é uma MPT freqüente nessas proteínas, assim como nas proteínas camada S e nas enzimas que realizam hidrólise de polissacarídeos (Moens *et. al.*, 1997). A diversidade das flagelinas, e as

regiões variáveis do gene que a codifica, também é importante na genotipagem de grupos em linhagens das bactérias patogênicas *Clostridium botulinum* (Paul *et al.*, 2007).

A combinação da ação de glicosil hidrolases da família 48 e família 9 resulta na conhecida como atividade celulolítica verdadeira (Vazana *et al.*, 2010). A identificação de uma glicosil hidrolase da família 9 (*spot* 200) têm significativa importância no presente trabalho, pois corrobora a produção de enzimas celulolíticas pelos isolados de *C. thermocellum* obtidos no laboratório, ISO1 e ISO2 , observada igualmente nos resultados de atividades enzimáticas realizados.

7 CONCLUSÕES

- Os isolados de *C. thermocellum* ISO1 e ISO2, assim como a cepa Cth JW, usada como controle utilizam celulose microcristalina e bagaço de cana de açúcar como fontes de carbono, como pode ser visto pelo crescimento destes isolados em meio contendo tais substratos;
- Diferentes espécies protéicas são produzidas e secretadas no meio de cultura destes isolados conforme perfis apresentados pelas amostras de sobrenadante das culturas destes isolados;
- As proteínas eluídas dos substratos residuais são cataliticamente ativas pois apresentaram atividades de CMCase, AVICELase, xilanase e pectinase, já que tais proteínas hidrolisaram estes substratos;
- A espectrometria de massas MALDI-TOF revelou que nestas condições, tendo celulose microcristalina como substrato, o ISO2 secretou 26 proteínas de diferentes massas moleculares, inclusive uma glicosil hidrolase.

8 PERSPECTIVAS

- Os resultados obtidos no presente trabalho permitirão concluir a definição da existência de complexo celulolíticos (celulossoma) nos isolados de *Clostridium thermocellum*, e caracterizar cinética e molecularmente as formas protéicas presentes no sobrenadante das culturas destes isolados, nos complexos proteicos (celulossoma) e as formas protéicas dos complexos produzidos durante o crescimento na presença dos substratos celulose microcristalina e bagaço de cana;
- Adicionalmente, os resultados obtidos fornecerão subsídios para concluir o mapa protéico destes dois isolados (ISO1 e ISO2) de *Clostridium thermocellum*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* [S.I.], v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

ALAM, S.; BANSOD, S.; KUMAR, R., SENGUPTA, N.; SINGH, L. Differential proteomic analysis of *Clostridium perfringens* ATCC13124; identification of dominant, surface and structure associated proteins. *BMC Microbiology* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 162, 2009.

ALAM, S.; BANSOD, S.; SINGH, L. Immunization against *Clostridium perfringens* cells elicits protection against *Clostridium tetani* in mouse model: identification of cross-reactive proteins using proteomic methodologies. *BMC Microbiol* [S.I.], v. 8, p. 194, 2008.

BAYER, E. A. BELAICH, J. P.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* [S.I.], v. 58, p. 521-54, 2004.

BAYER, E. A. KENIG, R; LAMED, R. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.* [S.I.], v. 156, n. 2, p. 818-827, 1983.

BAYER, E. A. LAMED, R.; WHITE, B.A.; FLINT, H.J. From cellulosomes to cellulosomes. *The Chemical Record* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 364-377, 2008.

BERNDES, G., HOOGWIJK, M.; VAN DEN BROEK, R. *et al.* The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. *Biomass and Bioenergy* [S.I.], v. 25, n. 1, p. 1-28, 2003.

BERTH, M. MOSER, F.M.; KOLBE, M.; BERNHARDT, J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Applied Microbiology and Biotechnology* [S.I.], v. 76, n. 6, p. 1223-1243, 2007.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* [S.I.], v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BOERJAN, W.; RALPH J; BAUCHER M. LIGNIN BIOSYNTHESIS. *Annual Review of Plant Biology* [S.I.], v. 54, n. 1, p. 519-546, 2003.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.

BLOUZARD, J. C.; BOURGEOIS, C.; DE PHILIP, P.; VALETTE, O.; BELAICH, A.; TARDIF, C.; BELAICH, J. P.; PAGES, S. . Enzyme diversity of the cellulolytic system produced by *Clostridium cellulolyticum* explored by two-dimensional analysis: identification of seven genes encoding new dockerin-containing proteins. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 189, n. 6, p. 2300-9, 2007.

BLOUZARD, J. C.; COUTINHO, P. M.; FIEROBE, H. P.; HENRISSAT, B.; LIGNON, S.; TARDIF, C.; PAGES, S.; DE PHILIP, P. Modulation of cellulosome composition in *Clostridium cellulolyticum*: adaptation to the polysaccharide environment revealed by proteomic and carbohydrate-active enzyme analyses. *Proteomics* [S.I.], v. 10, n. 3, p. 541-54, 2010.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J.. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BOMBLE, Y. J.; BECKHAM, G. T.; MATTHEWS, J. F.; NIMLOS, M. R.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M. F. Modeling the self assembly of the cellulosome enzyme complex. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [S.I.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CALUSINSKA, M.; HAPPE, T.; JORIS, B.; WILMOTTE, A. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. *Microbiology* [S.I.], v. 156, n. 6, p. 1575-1588, 2010.

CARERE, C.; KALIA, V.; SPARLING, R.; CICEK, N.; LEVIN, D.B. Pyruvate catabolism and hydrogen synthesis pathway genes of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Indian Journal of Microbiology* [S.I.], v. 48, n. 2, p. 252-266, 2008.

CASPI, J.; IRWIN, D.; LAMED, R.; LI, Y.; FIEROBE, H.; WILSON, D.B.; BAYER, E. A. Conversion of *Thermobifida fusca* free exoglucanases into cellulosomal components: Comparative impact on cellulose-degrading activity. *Journal of Biotechnology* [S.I.], v. 135, n. 4, p. 351-357, 2008.

CHA, J.; MATSUOKA, S.; CHAN, H.; YUKAWA, H.; INUI, M.; DOI, R. H. Effect of multiple copies of cohesins on cellulase and hemicellulase activities of *Clostridium cellulovorans* mini-cellulosomes. *J Microbiol Biotechnol* [S.I.], v. 17, n. 11, p. 1782-8, 2007.

CHAKRABORTY, S.; SAKKA, M.; KIMURA, T.; SAKKA, K. Two Proteins with Diaphorase Activity from *Clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [S.I.], v. 72, n. 3, p. 877-879, 2008.

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

CHINN, M. S.; NOKES, S.E.; STROBEL, H.J. Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end-product formation in solid substrate cultivation on Avicel. *Bioresource Technology* [S.I.], v. 99, n. 7, p. 2664-2671, 2008.

CHO, W.; JEON, S.D.; SHIM, H.J.; DOI, R.H.; HAN, S.O. Cellulosomic profiling produced by *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources explored by the cohesin marker. *Journal of Biotechnology* [S.I.], v. 145, n. 3, p. 233-239, 2010.

CHOI, S. K.; LJUNGDAHL, L. G. Dissociation of the cellulosome of *Clostridium thermocellum* in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid occurs with the formation of truncated polypeptides. *Biochemistry* [S.I.], v. 35, n. 15, p. 4897-905, 1996.

CROSS, S. J.; CIRUELA, A.; POOMPUTSA, K.; ROMANIEC, M. P.; FREEDMAN, R. B. Thermostable chaperonin from *Clostridium thermocellum*. *Biochemical Journal* [S.I.], v. 316 (Pt 2), p. 615-22, 1996.

DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [S.I.], v. 69, n. 1, p. 124-54, 2005.

DESVAUX, M. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiology Reviews* [S.I.], v. 29, n. 4, p. 741-64, 2005.

DING, S. Y.; XU, Q.; CROWLEY, M.; ZENG, Y.; NIMLOS, M.; LAMED, R.; BAYER, E. A.; HIMMEL, M. E. A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion. *Current Opinion in Biotechnology* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 218-27, 2008.

DROR, T. W.; MORAG, E.; ROLIDER, A.; BAYER, E.A.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. Regulation of expression of scaffoldin-related genes in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 185, n. 17, p. 5109-16, 2003.

ELKINS, J. G.; MORAG, E.; ROLIDER, A.; BAYER, E.A.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology* [S.I.], v. 21, n. 5, p. 657-62, 2010.

EU Resolution. Promotion of the use of Energy from renewable energy sources (P6_TA-PROV(2008)0609). 2008

FELIX, C. R.; LJUNGDAHL, L. G. The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. *Annual Reviews in Microbiology* [S.I.], v. 47, p. 791-819, 1993.

FENDRI, I.; TARDIF, C.; FIEROBE, H.; LIGNON, S.; VALETTE, O.; PAGÈS, S.; PERRET, S. The cellulosomes from *Clostridium cellulolyticum*. *FEBS Journal* [S.I.], v. 276, n. 11, p. 3076-3086, 2009.

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

FIEROBE, H.-P.; BAYER, E. A.; TARDIF, C.; CZJZEK, M.; MECHALY, A.; BÉLAICH, A.; LAMED, R.; SHOHAM, Y.; BÉLAICH, J. Degradation of Cellulose Substrates by Cellulosome Chimeras. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 277, n. 51, p. 49621-49630, 2002.

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

FREIER, D.; MOTHERSHED, C. P.; WIEGEL, J. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 54, n. 1, p. 204-211, 1988.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BROWN, L. R. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* [S.l.], v. 20, n. 1, p. 1-57, 2001.

GOLD, N. D.; MARTIN, V. J. Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *Journal of Bacteriology* [S.l.], v. 189, n. 19, p. 6787-95, 2007.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* [S.l.], v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* [S.l.], v. 24, n. 12, p. 549-56, 2006.

HAN, S. O.; CHO, H. Y.; YUKAWA, H.; INUI, M.; DOI, R. H.. Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (hemi)cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. *Journal of Bacteriology* [S.l.], v. 186, n. 13, p. 4218-27, 2004.

HENNEQUIN, C.; PORCHERAY, F.; WALIGORA-DUPRIET, A.J.; COLLIGNON, A. BARC, M.C.; BOURLIOUX, P.; KARJALAINEN, T. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* [S.l.], v. 147, n. 1, p. 87-96, 2001.

HIGUCHI, T. Mechanisms of Lignin Degradation by Lignin Peroxidase and Laccase of White-Rot Fungi. *Plant Cell Wall Polymers*, American Chemical Society. v. 399, p. 482-502, 1989.

HOWARD, R.L., ABOSTI, E., JANSEN, E.L.. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. v. 2, p. 602-619; 2003.

ISSAQ, H.; VEENSTRA, T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques* [S.I.], v. 44, n. 5, p. 697-8, 700, 2008.

ISSAQ, H. J. The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis* [S.I.], v. 22, n. 17, p. 3629-3638, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* [S.I.], v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JEAN, D.; BRIOLAT, V.; REYSSET, G.. Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*. *Microbiology* [S.I.], v. 150, n. 6, p. 1649-1659, 2004.

KACHMAN, M. T.; HURLEY, M. C.; THIELE, T.; SRINIVAS, G.; ARONOFF, D. M. Comparative analysis of the extracellular proteomes of two *Clostridium sordellii* strains exhibiting contrasting virulence. *Anaerobe* [S.I.], v. 16, n. 4, p. 454-460, 2010.

KEEGSTRA, K. Plant Cell Walls. *Plant Physiology* [S.I.], v. 154, n. 2, p. 483-486, October 1, 2010 2010.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Bioresource Technology* [S.I.], v. 100, n. 4, p. 1515-1523, 2009.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* [S.I.], v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KOPEČNÝ, J.; HODROVÁ, B. The effect of yellow affinity substance on cellulases of *Ruminococcus flavefaciens*. *Letters in Applied Microbiology* [S.I.], v. 25, n. 3, p. 191-196, 1997.

KOSUGI, A.; MURASHIMA, K.; DOI, R.H. Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 183, n. 24, p. 7037-43, 2001.

KUMAR, R. ; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [S.I.], v. 35, n. 5, p. 377-91, 2008.

LAMED, R.; SETTER, E; BAYER, E A. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 156, n. 2, p. 828-836, 1983.

LAWLEY, T. D.; CROUCHER, N.J.; YU, L.; CLARE, S.; SEBAIHIA, M.; GOULDING, D.; PICKARD, D.J.; PARKHILL, J.; CHOUDHARY, J.; DOUGAN, G. Proteomic and Genomic Characterization of Highly Infectious *Clostridium difficile* 630 Spores. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 191, n. 17, p. 5377-5386, 2009.

LJUNGDAHL, L. G. A Life with Acetogens, Thermophiles, and Cellulolytic Anaerobes. *Annual Review of Microbiology* [S.I.], v. 63, n. 1, p. 1-25, 2009.

LJUNGDAHL, L. G.; COUGHLAN, M.P.; MAYER, F.; MORI, Y.; HON-NAMI, H.; HON-NAMI, K. Macrocellulase complexes and yellow affinity substance from *Clostridium thermocellum*. In: WILLIS A. WOOD, S. T. K. (Ed.). *Methods in enzymology*. Academic Press, 1988. p. 483-500.

LOMBORG, C. J.; THOMSEN, M. H.; JENSEN, E. S.; ESBENSEN, K. H. Power plant intake quantification of wheat straw composition for 2nd generation bioethanol optimization - A Near Infrared Spectroscopy (NIRS) feasibility study. *Bioresource Technology* [S.I.], v. 101, n. 4, p. 1199-1205, 2010.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 510-516, 2005.

LYND, L. R.; CUSHMAN, J. H.; NICHOLS, R. J.; WYMAN, C. E. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* [S.I.], v. 251, n. 4999, p. 1318-23, 1991.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [S.I.], v. 66, n. 3, p. 506-77, 2002.

LYND, L. R.; ZYL, W.H.; VAN MCBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology* [S.I.], v. 16, n. 5, p. 577-583, 2005.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. MEASUREMENT OF SACCHARIFYING CELLULASE. *Biotechnology and Bioengineering* [S.I.], n. 6, p. 21-33, 1976.

MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* [S.I.], v. 21, n. 3, p. 255-261, 2003.

MINGARDON, F.; CHANAL, A.; TARDIF, C.; BAYER, E. A.; FIEROBE, H. P. Exploration of new geometries in cellulosome-like chimeras. *Applied Environmental Microbiology* [S.I.], v. 73, n. 22, p. 7138-49, 2007.

MOENS, S.; VANDERLEYDEN, J. Glycoproteins in prokaryotes. *Archives of Microbiology* [S.I.], v. 168, n. 3, p. 169-175, 1997.

MOTA, J.C., ALMEIDA, M.M., ALENCAR, V.C.; CURI, W.F. Impactos e benefícios ambientais, econômicos e sociais dos biocombustíveis: uma visão global. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, Brasília - DF, 6.3, 05 02 2010. Disponível em: <<http://189.20.243.4/ojs/engenhariaambiental/viewarticle.php?id=289>>. Acesso em: 03 02 2011

NATAF, Y.; YARON, S.; STAHL, F.; LAMED, R.; BAYER, E.A.; SCHEPER, T.; SONENSHEIN, A.L.; SHOHAM, Y. Cellodextrin and Laminaribiose ABC Transporters in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*. [S.I.], p. JB.01190-08, 2008.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

PAPAVASSILIOU, P.; HATCHIKIAN, E. C. Isolation and characterization of a rubredoxin and a two-(4Fe-4S) ferredoxin from *Thermodesulfobacterium commune*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [S.I.], v. 810, n. 1, p. 1-11, 1985.

PAUL, C. J.; TWINE, S.M.; TAM, K.J.; MULLEN, J.A.; KELLY, J.F.; AUSTIN, J.W. LOGAN, S.M.. Flagellin Diversity in *Clostridium botulinum* Groups I and II: a New Strategy for Strain Identification. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 73, n. 9, p. 2963-2975, 2007.

PENG, Y.; LUO, Y.; YU, T.; XU, X.; FAN, K.; ZHAO, Y.; YANG, K. A Blue Native-PAGE analysis of membrane protein complexes in *Clostridium thermocellum*. *BMC Microbiology* [S.I.], v. 11, n. 1, p. 22, 2011.

PEREZ, J.; MUNOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* [S.I.], v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

POLIZELI, M. L. T. M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [S.I.], v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

QIU, H. G.; HUANG, J. K.; YANG, J.; ROZELLE, S.; ZHANG, Y. H.; ZHANG, Y. L. Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy. *Applied Energy* [S.I.], v. 87, n. 1, p. 76-83, 2010.

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

RIEDERER, A.; TAKASUKA, T. E.; MAKINO, S. I.; STEVENSON, D. M.; BUKHMAN, Y. V.; ELSEN, N. L.; FOX, B. G. Global gene expression patterns in *Clostridium thermocellum* from microarray analysis of chemostat culture on cellulose or cellobiose. *Applied Environmental Microbiology* [S.I.], 2010.

ROBERTS, S. B.; GOWEN, C. M.; BROOKS, J. P.; FONG, S. S. Genome-scale metabolic analysis of *Clostridium thermocellum* for bioethanol production. *BMC Systems Biology* [S.I.], v. 4, p. 31, 2010.

SALAMITOU, S.; TOKATLIDIS, K.; BÉGUIN, P.; AUBERT, J. Involvement of separate domains of the cellulosomal protein S1 of *Clostridium thermocellum* in binding to cellulose and in anchoring of catalytic subunits to the cellulosome. *FEBS Letters* [S.I.], v. 304, n. 1, p. 89-92, 1992.

SÁNCHEZ-HERRERA, L.; RAMOS-VALDIVIA, A.; DE LA TORRE, M.; SALGADO, L.; PONCE-NOYOLA, T. Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* [S.I.], v. 77, n. 3, p. 589-595, 2007.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* [S.I.], v. 61, n. 1, p. 263-289, 2010.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology* [S.I.], v. 56, n. 5-6, p. 634-49, 2001.

SHIRATORI, H.; IKENO, H.; AYAME, S.; KATAOKA, N.; MIYA, A.; HOSONO, K.; BEPPU, T.; UEDA, K. Isolation and Characterization of a New Clostridium sp. That Performs Effective Cellulosic Waste Digestion in a Thermophilic Methanogenic Bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 72, n. 5, p. 3702-3709, 2006.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* [S.I.], v. 306, n. 5705, p. 2206-2211, 2004.

SUNDSET, M. A.; EDWARDS, J. E.; CHENG, Y. F.; SENOSIAIN, R. S.; FRAILE, M. N.; NORTHWOOD, K. S.; PRAESTENG, K. E.; GLAD, T.; MATHIESEN, S. D.; WRIGHT, A. D. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecology* [S.I.], v. 57, n. 2, p. 335-48, 2009.

TJALSMA, H.; BOLHUIS, A.; JONGBLOED, J.; BRON, S.; VAN DIJL, J.M. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. [S.I.], v. 64, n. 3, p. 515-547, 2000.

TOKATLIDIS, K.; SALAMITOU, S.; BÉGUIN, P.; DHURJATI, P.; AUBERT, J. Interaction of the duplicated segment carried by *Clostridium thermocellum* cellulases with cellulosome components. *FEBS Letters* [S.I.], v. 291, n. 2, p. 185-188, 1991.

VALDES-STAUBER, N.; SCHERER, S. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Applied Environmental Microbiology* [S.I.], v. 60, n. 10, p. 3809-14, 1994.

VAZANA, Y.; MORAIS, S.; BARAK, Y.; LAMED, R.; BAYER, E.A. Interplay between *Clostridium thermocellum* Family 48 and Family 9 Cellulases in Cellulosomal versus Noncellulosomal States. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 76, n. 10, p. 3236-3243, 2010.

WILLIAMS, T. I.; COMBS, J. C.; LYNN, B. C.; STROBEL, H. J. Proteomic profile changes in membranes of ethanol-tolerant *Clostridium thermocellum*. *Applied Microbiology Biotechnology* [S.l.], v. 74, n. 2, p. 422-32, 2007.

WILLIAMS, T. I. *et al.* A novel Bicine running buffer system for doubled sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* [S.l.], v. 27, n. 14, p. 2984-2995, 2006.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology* [S.l.], v. 25, n. 4, p. 153-157, 2007.

XU, C. ;SMITH, J. C.. Factors influencing cellulosome activity in Consolidated Bioprocessing of cellulosic ethanol. *Bioresource Technology* [S.l.], v. 101, n. 24, p. 9560-9569, 2010.

YI, Z. L.; PEI, X. Q.; WU, Z. L. Introduction of glycine and proline residues onto protein surface increases the thermostability of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*. *Bioresources Technology* [S.l.], v. 102, n. 3, p. 3636-8, 2011.

YIM, M. B.; CHAE, H.Z.; RHEE, S.G.; CHOCK, P.B.; STADTMAN, E.R. On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. *Journal of Biological Chemistry* [S.l.], v. 269, n. 3, p. 1621-1626, 1994.

ZAPATA, C.; NIEUWENHUIS, P. Driving on liquid sunshine – the Brazilian biofuel experience: a policy driven analysis. *Business Strategy and the Environment* [S.l.], v. 18, n. 8, p. 528-541, 2009.

ZVERLOV, V. V.; KELLERMANN, J.; SCHWARZ, W.H. Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics* [S.l.], v. 5, n. 14, p. 3646-3653, 2005.

ZVERLOV, V. V.; VELIKODVORSKAYA, G. A.; SCHWARZ, W. H.; KELLERMANN, J.; STAUDENBAUER, W. L. *et al.* Duplicated *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase gene encoding cellulosomal subunits S3 and S5. *Applies Microbiology Biotechnology* [S.l.], v. 51, n. 6, p. 852-9, 1999.