AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

CLAUDIA GROPOSO

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para Obtenção do Grau de Doutor em Ciências (*DSc*)

ORIENTADOR:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
2013

Groposo, Claudia.
Avaliação do potencial biotecnológico de *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 na produção de etanol celulósico / Claudia Julia Groposo Silveira – 2013.
261 p.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD*

1. Bioprocesso Consolidado. 2. Celulossomas. 3. *Clostridium thermocellum*. 4. Etanol 2G. I. Pereira Jr., Nei. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

CLAUDIA GROPOSO

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (*DSc.*).

Aprovada por:

_____
Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*
(Orientador Presidente)

_____
Aline Machado de Castro, *DSc*

_____
Prof[a]. Rosalie Reed Coelho, *DSc*

_____
Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, *DSc*

_____
Prof[a]. Eliana Mossé Alhadeff, *DSc*

_____
Prof[a]. Verônica Ferreira Melo, *DSc*

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Outurbo 2013

The future's in the air
I can feel it everywhere
Blowing with the wind of change

Klaus Meine (Scorpions, 1990)

AGRADECIMENTOS

- ✓ À minha família que é a base da minha existência e a motivação para seguir sempre em frente;
- ✓ Ao meu orientador, Prof. Nei Pereira Jr., por ter aceitado entrar em um mundo novo para ambos;
- ✓ Aos colegas do CENPES por todo apoio ao longo desses anos, especialmente, aqueles que dedicaram parte do seu tempo para me auxiliar na programação de experimentos, no preparo de materiais, na análise de amostras e na discussão dos resultados: Absai da Conceição Gomes, Aline Machado de Castro, Carlos Augusto Sodré Lima Júnior, Cleber Gonçalves Ferreira, Danuza Nogueira Moysés, Deivid Lucas dos Santos Migueleti, Leonardo Suhett de Souza, Milton Luiz Barroso Anterio, Renato Rocha Valério, Ronalt Leite Vidal, Vinicius Azevedo de Araújo e Yuri Pinheiro Alves de Souza;
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos que sempre me auxiliaram quando precisei;
- ✓ A minha amiga e ex-orientadora Clarice Loguercio-Leite pela revisão cuidadosa do texto;
- ✓ À Profa. Maria Isabel Rodrigues pela consultoria em Planejamento de Experimentos;
- ✓ Aos colegas da Designer Energy, por terem me recebido tão bem em Israel, onde vivi momentos únicos que levarei sempre comigo;
- ✓ A minha gerente e amiga, Gina Vazquez Sebastian, por ter me permitido realizar este trabalho;
- ✓ Ao meu ex-gerente geral, Luiz Fernando Mendonça Frutuoso, por ter viabilizado meus estudos em Israel;
- ✓ Ao Programa de Pós-graduação do CENPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

GROPOSO, Claudia. **Avaliação do potencial biotecnológico de *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 na produção de etanol celulósico.** Orientador: Nei Pereira Jr. Escola de Química- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Entre as estratégias de processo para a produção de etanol de segunda geração, a de Bioprocesso Consolidado (CBP), na qual todas as etapas são realizadas em um único reator por um mesmo microrganismo, representa uma abordagem alternativa com visível potencial e o ponto final na evolução da produção de etanol 2G. Vários microrganismos anaeróbios celulolíticos vêm sendo explorados visando à produção de etanol e outros produtos químicos a partir de materiais lignocelulósicos através da estratégia de CBP, com especial atenção à bactéria termofílica *C. thermocellum*. Essa espécie tem a capacidade de produzir enzimas celulolíticas, complexadas em uma estrutura denominada celulossoma, e fermentar açúcares a etanol e outros produtos. Visando explorar o potencial da estratégia de CBP foi estabelecido o objetivo deste trabalho o qual levou à seleção de *C. thermocellum* para o estudo das suas propriedades de utilização do substrato e formação do produto de interesse. Inicialmente, foi realizado um amplo estudo sobre a composição dos celulossomas quando a espécie cresce sobre o bagaço de cana pré-tratado para, a seguir, nos dedicarmos à compreensão do desempenho fermentativo da espécie. Através do uso de ferramentas das áreas da genômica e proteômica foram selecionados 15 genes para serem clonados e expressos em *E. coli*, representando diferentes enzimas do grupo das glicosil hidrolases que se destacaram quando *C. thermocellum* foi cultivado sobre bagaço pré-tratado. A aplicação das 15 enzimas produzidas e purificadas, reunidas em um *mix* denominado DEH, mostrou que estas tiveram uma excelente atividade sobre papel de filtro, chegando a 85% do total de glicose obtido com o preparado comercial usado como padrão de comparação. Porém, não se mostraram muito eficientes na hidrólise do bagaço pré-tratado, com apenas 22,4% dos açúcares obtidos com o preparado comercial. Com relação ao desempenho fermentativo da espécie selecionada verificou-se que a ordem de grandeza das concentrações de etanol obtidas (98,5mM ou 4,5g/L) ainda é muito pequena para justificar o uso da mesma em escala industrial. No entanto, um dos resultados mais interessantes verificados neste estudo foi a possibilidade de usar um resíduo lignocelulósico abundante como o bagaço de cana-de-açúcar sem a necessidade de um pré-tratamento. Os resultados apontaram que concentração de substrato, tamanho de inóculo, agitação e pressão de hidrogênio são variáveis importantes a serem consideradas, indicando que seria possível melhorar a conversão do substrato em etanol investindo-se na configuração de processo. Faz-se necessário investir também na estratégia de fermentação contínua, com remoção dos produtos formados, e no desenho de biorreatores que permitam a realização do processo sob pressão.

ABSTRACT

GROPOSO, Claudia. **Biotechnological potential of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 to produce cellulosic ethanol.** Supervisor: Nei Pereira Jr. School of Chemistry of Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, 2013.

Consolidated Bioprocess (CBP) – featuring cellulase production, cellulose hydrolysis and fermentation in one step – is an alternative approach with outstanding potential. Several cellulolytic anaerobic microorganisms have been used in order to produce ethanol and other chemicals from lignocellulosic materials via CBP, especially *C. thermocellum*, which has the ability to produce an extracellular multienzyme complex called cellulosome and to ferment sugars to ethanol and other end-products. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential of CBP strategy using *C. thermocellum*, previously selected. A extensive investigation was conducted to establish the cellulosome composition when *C. thermocellum* grows on pretreated sugarcane bagasse. From the genomic and proteomic analyses were selected 15 genes to be cloned and expressed in *E. coli*, representing different glycosil hydrolases. The enzymes produced and purified were added in a mix called DEH which achieved 85% of total glucose obtained with the commercial mix, used as standard of comparison. However, it was not efficient to hydrolyze pretreated bagasse, achieving only 22.4% of the total sugars obtained with the commercial mix. Regarding the fermentation performance the higher ethanol concentration obtained (98.5 mM or 4.5 g/L) is still very low to justify the use of *C. thermocellum* at industrial scale. Nevertheless, one of the most interesting results obtained in this study was the possibility to use the sugarcane bagasse without any pretreatment. The results showed that concentration of substrate, inoculum size, agitation and hydrogen pressure are important variables to be considered, indicating that it would be possible to improve the conversion of the substrate to ethanol by investing in the configuration process. There is also a need to invest in the strategy of continuous fermentation, with removal of end-products, and in the design of bioreactors to allow carrying out the process under pressure.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO DO TEMA 1

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biocombustíveis 6
2.1.1. Etanol de Segunda Geração (2G) 9
2.1.2. Pré-tratamento 15
2.2. Processos para produção de etanol 2G 17
2.2.1. Hidrólise enzimática e fermentação separadas 17
2.2.2. Sacarificação e fermentação simultâneas 19
2.2.3. Sacarificação e co-fermentação simultâneas 21
2.2.4. Bioprocesso consolidado 23
2.3. Degradação da celulose pelas bactérias celulolíticas 25
2.3.1. Colonização da celulose 29
2.4. Celulossomas 31
2.4.1. Estrutura 34
2.4.1.1. A subunidade Scaffoldin 37
2.4.1.2. Os módulos coesina e doquerina 40
2.4.1.3. O módulo de ligação aos carboidratos – CBM 42
2.4.1.4. Componentes catalíticos do celulossoma 44
2.5. Mecanismo da hidrólise da celulose 47
2.6. Metabolismo dos açúcares 49
2.7. Considerações gerais 55

CAPÍTULO 3 – SELEÇÃO DE LINHAGENS CELULOLÍTICAS DO GÊNERO *Clostridium*

3.1. Introdução 59
3.2. Materiais e métodos 61
3.2.1. Levantamento bibliográfico 61

3.2.2. Cultivo e manutenção das linhagens selecionadas 61
3.2.3. Observação ao microscópio eletrônico de varredura 63
3.2.4. Avaliação do crescimento bacteriano 64
3.2.4.1. Método indireto 64
3.2.4.2. Método direto 65
3.2.5. Avaliação comparativa das linhagens 66
3.3. Resultados e discussão 68
3.4. Conclusões parciais 77

CAPÍTULO 4 – IMPACTO DO SUBSTRATO SOBRE A COMPOSIÇÃO DO CELULOSSOMA DE *Clostridium thermocellum* ATCC 27405

4.1. Introdução 78
4.1.1. Genômica 78
4.1.2. Proteômca 80
4.2. Materiais e métodos 81
4.2.1 Cultivo do microrganismo 81
4.2.2. Análise genômica 82
4.2.2.1. Extração de RNA total 82
4.2.2.2. Microarranjo de DNA 83
4.2.2.3. Análise de dados 84
4.2.2. Análise proteômica 86
4.2.2.1. Fracionamento 86
4.2.2.2. Análise em gel bidimensional (2D gel) 87
4.2.2.3. Proteômica quantitativa por espectrometria *de massas – QP-MS* 88
4.2.2.4. 1D SDS-PAGE analítica 90
4.3. Resultados e discussão 91
4.3.1. Análise genômica 91
4.3.1.1. Genes envolvidos na hidrólise da celulose 92
4.3.1.2. Outros genes 96
4.3.2. Análise proteômica 99
4.4. Conclusões parciais 108

CAPÍTULO 5 – CLONAGEM, EXPRESSÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS DE *Clostridium thermocellum* ATCC 27405

5.1. Introdução 110
5.2. Materiais e métodos 111
5.2.1. Clonagem 111
5.2.1.1. Desenho e síntese de iniciadores 111
5.2.1.2. Extração do DNA de C. thermocellum e amplificação de genes 112
5.2.1.3. Reações de ligação ao vetor 113
5.2.1.4. Transformação e PCR de colônia 115
5.2.1.5. Minipreparação plasmidial e seqüenciamento 116
5.2.2. Expressão, purificação e caracterização das enzimas 118
5.2.3. Testes de hidrólise enzimática 119
5.3. Resultados e discussão 120
5.3.1. Clonagem 120
5.3.2. Expressão, purificação e caracterização das enzimas 122
5.3.3. Testes de hidrólise enzimática 124
5.4. Conclusões parciais 128

CAPÍTULO 6 – AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

6.1. Introdução 131
6.2. Materiais e métodos 134
6.2.1. Ensaios em frascos 134
6.2.1.1. Celobiose 134
6.2.1.2. Celulose purificada 135
6.2.1.3. Celulose microcristalina 137
6.2.1.4. Bagaço in natura 138
6.2.1.5. Bagaço pré-tratado 138
6.2.2. Estudo do meio de fermentação 139

6.2.3. Ensaios em biorreatores instrumentados **142**
6.3. Resultados e discussão **145**
6.3.1. Ensaios em frascos **145**
6.3.2. Estudo do meio de fermentação **162**
6.3.3. Ensaios em biorreatores instrumentados **167**
6.4. Conclusões parciais **178**

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS **182**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **189**

APÊNDICES
Apêndice A **204**
Apêndice B **231**
Apêndice C **244**

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA E TÉCNICA, PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS – 2008/2013 **255**

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 2.1 Diagrama esquemático mostrando a posição dos principais componentes da fibra vegetal. 10

Figura 2.2 Fórmula estrutural da molécula de celulose. 11

Figura 2.3 Exemplo de possível molécula de hemicelulose, representada pela mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, principalmente xilanas. 12

Figura 2.4 À esquerda: exemplo de uma possível estrutura molecular da lignina; à direita: os três componentes mais comumente encontrados nas moléculas de lignina. 13

Figura 2.5 Exemplo de pré-tratamento por explosão a vapor de madeira de angiosperma, mostrando os possíveis compostos (açúcares e inibidores) formados a partir da hidrólise da hemicelulose e celulose. 14

Figura 2.6 Diagrama da estratégia de Hidrólise Enzimática e Fermentação Separadas (*SHF*). 18

Figura 2.7 Diagrama da estratégia de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*SSF*). 20

Figura 2.8 Diagrama da estratégia de Sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas (*SSCF*). 22

Figura 2.9 Diagrama da estratégia de Bioprocesso Consolidado (*CBP*). 24

Figura 2.10 Reações catalisadas pelas celulases. 27

Figura 2.11 À esquerda: microfotografia de transmissão eletrônica mostrando os corredores de material fibroso conectando a célula à superfície da celulose. Barra: 100nm. À direita: interpretação esquemática da microfotografia 30

Figura 2.12 Modelo de colonização da celulose por *C. cellulolyticum*. 31

Figura 2.13 À esquerda: microfotografia de transmissão eletrônica de uma célula de *C. thermocellum* antes de entrar em contato com a celulose, mostrando as protuberâncias. À direita: visão aumentada de uma protuberância. Barras: 100nm. 35

Figura 2.14 Interpretação esquemática da superfície celular com protuberância. 35

Figura 2.15 Modelo simplificado de um celulossoma típico. 36

Figura 2.16 Modelo esquemático da arquitetura celulossomal de *C. cellulovorans* 38

Figura 2.17 Modelo esquemático da organização do celulossoma de *C. thermocellum* 39

Figura 2.18 Modelo esquemático de internalização e fosforilação dos carboidratos em *C. thermocellum*. 50

Figura 2.19 Via catabólica da celobiose em *C. cellulolyticum.* 52

Figura 2.20 Glicólise atípica em *C. thermocellum* 53

Figura 2.21 Interações entre o fluxo de carbono (setas azuis) e o fluxo de elétrons (setas vermelhas) em *C. cellulolyticum*. 55

Figura 3.1 Fotomicrografia de *C.cellulolyticum* ao microscópio eletrônico de varredura 69

Figura 3.2 Fotomicrografia de *C.phytofermentans* ao microscópio eletrônico de varredura 70

Figura 3.3 Fotomicrografia de *C.thermocellum* ao microscópio eletrônico de varredura 70

Figura 3.4 Curva de crescimento de *C. cellulolyticum* 71

Figura 3.5 Curva de crescimento de *C. phytofermentans* 71

Figura 3.6 Curva de crescimento de *C. thermocellum* 72

Figura 3.7 Concentrações de etanol (mM) obtidas ao longo de 72 horas de fermentação com celulose purificada (1%) por *C. cellulolyticum* (*quadrados*), *C. phytofermentans* (*triângulos*) e *C. thermocellum* (*círculos*) 74

Figura 3.8 Concentrações de acetato (mM) obtidas ao longo de 72 horas de fermentação com celulose purificada (1%) por *C. cellulolyticum* (*quadrados*), *C. phytofermentans* (*triângulos*) e *C. thermocellum* (*círculos*) 74

Figura 3.9 Concentrações de lactato (mM) obtidas ao longo de 72 horas de fermentação com celulose purificada (1%) por *C. cellulolyticum* (*quadrados*), *C. phytofermentans* (*triângulos*) e *C. thermocellum* (*círculos*) 75

Figura 4.1 Diagramas (*scatterplots*) gerados a partir dos valores numéricos relativos à quantidade momentânea de mRNA, após normalização *RMA*, para as réplicas de cada amostra 92

Figura 4.2 Bandas removidas dos géis de SDS-PAGE das amostras CB-SEC (A) e BAG-SEC (B) para serem enviadas para a análise 100

por espectrometria de massas (MS) .....

Figura 4.3 *Spots* selecionados para envio para análise por espectrometria de massas (MS) dos géis de SDS-PAGE das amostras CB-NCS (A) e BAG-NCS (B) 101

Figura 4.4 Abundância de enzimas relacionadas com a degradação da celulose na amostra de *C. thermocellum* crescido sobre bagaço pré-tratado 103

Figura 4.5 Gel 1D SDS-PAGE analítica das amostras CB-SEC e BAG-SEC, mostrando as bandas selecionadas 104

Figura 5.1 Método de clonagem *In-Fusion* 114

Figura 5.2 Desenho de iniciadores sequenciais para um gene com 2400bp 117

Figura 5.3 Teores de glicose (g/L) obtidos com os dois preparados avaliados (DEH – *cinza escuro*; Ctec2 – *cinza claro*) frente a 2 diferentes substratos (bagaço pré-tratado e filtro de papel) 126

Figura 6.1 Concentração final dos produtos (mM), após 24 horas de fermentação com *C. thermocellum* em diferentes concentrações iniciais de substrato (1% a 4% de celobiose) 146

Figura 6.2 Consumo de celobiose (%), após 24 horas de fermentação com *C. thermocellum* em diferentes concentrações iniciais de substrato (1% a 4% de celobiose) 147

Figura 6.3a Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio 1% de concentração inicial de celobiose 149

Figura 6.3b Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio 2% de concentração inicial de celobiose 150

Figura 6.3c Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio 3% de concentração inicial de celobiose 150

Figura 6.3d Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio 4% de concentração inicial de celobiose 151

Figura 6.4 Consumo de celulose (%), após 72 horas de fermentação em frascos *C. thermocellum* em diferentes concentrações iniciais de celulose purificada (1%, 2% e 4%) 154

Figura 6.5 Ganhos em termos de produção de etanol (mM), em função do tempo, nas fermentações em frascos com *C. thermocellum* em diferentes condições 159

Figura 6.6 Comparação das concentrações dos produtos (mM) ao final do processo de fermentação (72 horas) em biorreator 173

instrumentado em batelada simples com *C. thermocellum*, com a injeção de N_2 e H_2 .....

Figura 6.7 Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio de fermentação em batelada alimentada com *C. thermocellum*, ao longo de 72 horas de processo 175

Figura 6.8 Comparação das concentrações dos produtos (mM) ao final do processo de fermentação (72 horas) com *C. thermocellum*, em biorreator instrumentado em batelada simples com injeção de N_2 (BS c/ N_2), batelada simples com injeção de H_2 (BS c/ H_2) e batelada alimentada com injeção de N_2 (BA c/ N_2) 176

Figura 6.9 Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio de fermentação em batelada alimentada com diferentes concentrações de substrato, com *C. thermocellum*, ao longo de 330 horas (13,8 dias) de processo 177

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 2.1 Valores encontrados para concentração dos produtos formados, a partir da literatura para diferentes linhagens, estratégias de processo e substratos 57

Tabela 3.1 Lista das espécies celulolíticas de *Clostridium* de acordo com os dados disponíveis no sítio da coleção de culturas DSZM 60

Tabela 3.2 Composição do meio de manutenção e crescimento …… 62

Tabela 3.3 Composição do meio de fermentação …… 66

Tabela 3.4 Composição da solução mineral utilizada no meio de fermentação …… 67

Tabela 3.5 Principais características (temperatura, pH, substrato e produtos) das espécies selecionadas 68

Tabela 3.6 Concentração final dos produtos e açúcares (mM), após 72 horas de fermentação com celulose purificada, para as três linhagens em avaliação – *C. cellulolyticum, C. phytofermentans* e *C. thermocellum* …… 73

Tabela 4.1 Genes para glicosil hidrolases (GH), celulossomais (presença de doquerina) e não-celulossomais (sem doquerina), diferencialmente regulados quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço pré-tratado, em relação ao seu crescimento sobre celobiose 93

Tabela 4.2 Genes para potenciais enzimas acessórias do celulossoma diferencialmente regulados quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço pré-tratado, em relação ao seu crescimento sobre celobiose 93

Tabela 4.3 Resultado da análise por 2D gel dos peptídeos obtidos a partir da amostra do crescimento de *C. thermocellum* sobre bagaço pré-tratado (BAG), em comparação ao seu crescimento sobre celobiose (CB) 102

Tabela 4.4 Resultado da análise por QP-MS dos peptídeos obtidos a partir da amostra do crescimento de *C. thermocellum* sobre bagaço pré-tratado (BAG), em comparação ao seu crescimento sobre celobiose (CB) 102

Tabela 4.5 Normalização da massa molecular das bandas selecionadas a partir da análise de 1D SDS-PAGE analítica, com base na banda 2 (*scaffoldin*) 105

Tabela 4.6 Identificação das bandas selecionadas a partir da técnica de 1D SDS-PAGE analítica 105

Tabela 4.7 Sumário dos resultados obtidos através de três técnicas distintas (2D, 1D SDS-PAGE analítica e QP-MS) para avaliar a regulação de proteínas quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço pré-tratado 106

Tabela 4.8 Correspondência entre os resultados encontrados pelas análises proteômica e genômica 108

Tabela 4.9 Lista dos genes selecionados para clonagem em *E. coli* a partir dos resultados das análises genômica e proteômica 109

Tabela 5.1 Preparo do vetor linearizado por enzimas de restrição 114

Tabela 5.2 Reação de ligação usando o kit *In-Fusion* 115

Tabela 5.3 Mutações ‘sentido trocado’ ou *missense* 121

Tabela 5.4 Lista das enzimas caracterizadas de acordo com sua atividade específica 123

Tabela 5.5 Lista das enzimas selecionadas e sua respectiva concentração de proteínas (mg/mL) 124

Tabela 5.6 Lista das enzimas selecionadas e sua participação dentro do preparado DEH 125

Tabela 5.7 Caracterização das amostras, em termos de açúcares, dos ensaios de hidrólise enzimática com os preparados DEH e Ctec2, frente a filtro de papel 125

Tabela 5.8 Caracterização das amostras, em termos de açúcares, dos ensaios de hidrólise enzimática com os preparados DEH e Ctec2, frente a bagaço pré-tratado 125

Tabela 6.1 Composição do meio e condições de processo utilizadas para os testes de fermentação em frascos com concentrações gradativas de celobiose 135

Tabela 6.2 Variáveis selecionadas para o planejamento experimental (Plackett-Burman) visando a otimização do meio de fermentação 140

Tabela 6.3 Efeito da concentração do substrato na concentração dos produtos finais, no acúmulo de açúcares e no rendimento em etanol, após 72 horas de processo com *C. thermocellum* crescendo sobre celulose purificada em frascos 152

Tabela 6.4 Efeito do tamanho do inóculo (%) sobre a concentração dos produtos, acúmulo de açúcares (mM) e rendimento em etanol 155

(g/g), após 72 horas de fermentação em frascos com *C. thermocellum* crescendo sobre celulose purificada (1%) .....

Tabela 6.5 Efeito da agitação sobre as concentrações dos produtos finais, acúmulo de açúcares (mM) e rendimento em etanol (g/g), após 72 horas de fermentação em frascos com *C. thermocellum* crescendo sobre celulose purificada (1%), com 20% (v/v) de inóculo 156

Tabela 6.6 Resultados comparativos – concentrações dos produtos finais, acúmulo de açúcares (mM) e rendimento em etanol (g/g) – dos testes com celulose purificada (JT Baker) e celulose microcristalina (Avicel® PH 101) 160

Tabela 6.7 Resultados comparativos – concentrações dos produtos finais, acúmulo de açúcares (mM) e rendimento em etanol (g/g) – dos testes com celulose purificada, bagaço *in natura* e bagaço pré-tratado 161

Tabela 6.8 Resultado final (72 horas) das análises (produtos, açúcares e pH) do planejamento experimental (PB24) para otimização do meio de fermentação 163

Tabela 6.9 Efeito de cada uma das variáveis analisadas sobre a variável resposta (etanol), ao final do processo (72 horas) 164

Tabela 6.10 Resultados das análises por HPLC (produtos e açúcares em mM) das amostras do processo de fermentação em batelada simples em biorreator instrumentado com *C. thermocellum,* usando celulose purificada 167

Tabela 6.11 Resultados das análises por cromatografia de íons (dextrinas em mg/L) das amostras dos processos de fermentação em batelada simples em biorreator instrumentado 170

Tabela 6.12 Resultados das análises por HPLC (produtos e açúcares em mM) das amostras do processo de fermentação em batelada simples 172

ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

%	Porcentagem; percentual
[pH_2]	Pressão de hidrogênio
µm	Micrômetro
2G	Segunda geração
A	Absorvância
ABC	Transportadores *ATP binding cassette*
ADP	Adenosina difosfato
AFEX	Explosão com vapor amoniacal
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	Adenosina trifosfato
BAG	Bagaço
BCA	Método do ácido bicinchonínico de quantificação de proteínas
BSA	Albumina soro bovino
CAZY	*Carbohydrate-active enzyme*
CB	Celobiose
CBD	Domínio de ligação à celulose
CBH	Celobiohidrolase ou exoglucanase
CBM	Módulo de ligação aos carboidratos
CBP	Bioprocesso consolidado
Ccel	*Clostridium cellulolyticum*
cDNA	DNA complementar
CENPES	Centro de Pesquisas da Petrobras
CMC	Carboximetilcelulose
CO_2	Gás dióxido de carbono
Cphy	*Clostridium phytofermentans*

Ctec2	Preparado enzimático comercial da Novozymes
Cthe	*Clostridium thermocellum*
Da	Dalton
DEH	Preparado enzimático desenvolvido neste estudo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
DR	Diferencialmente regulado
EF	Eficiência de fermentação
FDR	*False Discovery Rate* = intervalo de condiança
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas
g/L	Gramas por litro
GDP	Guanosina difosfato
GH	Glicosil hidrolase
GTP	Guanosina trifosfato
H_2	Gás hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEF	Focalização isoelétrica
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MCC	Celulose microcristalina
MDa	Mega Dalton
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico

mRNA	RNA mensageiro
n	Grau de polimerização
N_2	Gás nitrogênio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm	Nanômetro
^oC	Graus Celsius
PB	Matriz de Plackett-Burman
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	
PI	Ponto isoelétrico
ppm	Partes por milhão
QP-MS	Proteômica quantitativa por espectrometria de massas
R^2	Coeficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de PCR
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanho
SHF	Sacarificação e fermentação separadas
SSCF	Sacarificação e cofermentação simultâneas
SSF	Sacarificação e fermentação simultâneas
v/v	Volume por volume

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA

Nos últimos anos, o uso de fontes renováveis (energia das marés, da biomassa[1], geotérmica, eólica e solar) para a produção de energia (p. ex. elétrica) tem recebido grande atenção devido à limitação das reservas de combustíveis fósseis (fonte não-renovável). Dentre as fontes renováveis a biomassa é uma das mais importantes. Seu uso fortalece a economia rural, diminui a dependência do petróleo, evita o uso de aditivos altamente tóxicos, reduz a poluição do ar e da água, bem como a emissão dos gases de efeito estufa (Karakashev *et al*., 2007).

As fontes de biomassa podem ser divididas em: resíduos de cultivos agrícolas ou processos industriais com baixo ou nenhum custo, e em cultivos agrícolas voltados unicamente para o propósito de produção de energia. Os principais cultivos agrícolas desse tipo nos dias atuais são a cana-de-açúcar e o milho. Dentre os resíduos agrícolas que podem ser convertidos a energia podemos citar como exemplos a palha de trigo e o bagaço de cana-de-açúcar (Claassen *et al*., 1999).

Os processos de produção de etanol a partir do açúcar ou do amido obtidos de cultivos como a cana-de-açúcar no Brasil, a beterraba na Europa e o milho nos Estados Unidos, estão bem estabelecidos. Já os processos para a obtenção de quantidades suplementares de etanol a partir dos resíduos vegetais gerados por

[1] Do ponto de vista da geração de energia, o termo **biomassa** abrange os derivados recentes de organismos vivos utilizados como combustíveis ou para a sua produção. Na definição de biomassa para a geração de energia excluem-se os tradicionais combustíveis fósseis.

esses mesmos cultivos ou vindos de outras fontes, ainda não estão totalmente estabelecidos.

Esses resíduos vegetais consistem de três componentes estruturais principais, a celulose – um homopolímero de resíduos β-D-glucosil, a hemicelulose – um grupo de heteropolissacarídeos que incluem xilanas, arabinanas, mananas e galactanas, e a lignina – uma macromolécula polifenólica complexa (Rajoka, 2005).

A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas a açúcares simples, por diversas enzimas, e os açúcares assim gerados podem ser usados, subseqüentemente, em processos de fermentação para produzir etanol combustível ou outros produtos de interesse industrial (Berlin *et al.*, 2007).

Porém, para produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos (resíduos vegetais) é preciso remover total ou parcialmente a lignina a fim de acessar a celulose e a hemicelulose (Bhalla *et al.*, 2013), hidrolisar essas moléculas obtendo seus açúcares, e utilizar organismos específicos (bactérias ou leveduras) para fermentar esses açúcares, obtendo-se o etanol (Lynd *et al.*, 2002). Sendo que, diferentes configurações de processos são definidas com base nesses eventos e de acordo com a integração dos mesmos.

Entre as estratégias de processo conhecidas aquela denominada de Bioprocesso Consolidado (*CBP – Consolidated Bioprocessing*), na qual todas as etapas de produção são realizadas em um único reator por um mesmo microrganismo (Chandrakant & Bisaria, 1998), inspirou esta tese.

Para Lynd *et al.* (2005), este processo, também conhecido como Conversão Microbiana Direta (*DMC – Direct Microbial Conversion*), representa uma abordagem alternativa com visível potencial e o ponto final na evolução da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

Vários microrganismos anaeróbios celulolíticos já foram isolados da natureza e caracterizados visando à produção de combustíveis e outros produtos químicos a partir de materiais lignocelulósicos através do Bioprocesso Consolidado. Um dos mais conhecidos e investigados com essa finalidade é a bactéria termofílica *Clostridium thermocellum*, a qual tem a capacidade de produzir enzimas celulolíticas e fermentar os açúcares gerados a etanol e outros produtos (Chandrakant & Bisaria, 1998).

O diferencial dessa espécie, bem como de outras espécies celulolíticas do gênero *Clostridium* é a produção de complexos multienzimáticos denominados celulossomas.

Esses complexos enzimáticos são compostos por um conjunto de subunidades de natureza protéica, as quais, por sua vez, são compostas por módulos funcionais que interagem entre si. Uma subunidade multifuncional integradora, chamada *scaffoldin* (= armação, esqueleto), é responsável pela organização de todas as subunidades do complexo celulolítico. Essa organização é possível através da interação de dois tipos de domínios complementares, chamados coesinas e doquerinas, situados nas extremidades de duas subunidades complementares. A interação de alta afinidade desses dois domínios define a

estrutura dos celulossomas. O *scaffoldin* também possui um domínio de ligação à celulose (*CBD*), encontrado nas enzimas livres dos fungos (Shoham *et al*. 1999).

Segundo alguns autores (Boisset *et al*., 1999; Johnson *et al.*, 1982), a forma com que esses complexos enzimáticos se apresentam torna-os muito mais eficientes, podendo chegar a apresentar uma atividade até 50 vezes superior à demonstrada pelas enzimas extracelulares livres de *Trichoderma reesei*, sobre um mesmo substrato.

Com base no exposto acima foi proposto este tema de tese, o qual não estava no momento sendo abordado por nenhum outro grupo no Brasil, a fim de explorar o potencial da estratégia de Bioprocesso Consolidado na produção de etanol de segunda geração, assim como estabelecer uma nova linha de pesquisas nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos, da Escola de Química/UFRJ, sob coordenação do Prof. Nei Pereira Jr..

Além desse interesse, surgiu no início do desenvolvimento do trabalho a necessidade de conhecer melhor a estrutura dos celulossomas e avaliar as possíveis aplicações biotecnológicas dos mesmos, o que propiciou a realização de um estágio avançado em Israel junto a diversas instituições públicas, como o Instituto Weizmann, e privadas.

Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi o de selecionar e avaliar o desempenho de linhagens de bactérias celulolíticas anaeróbias fermentativas do gênero *Clostridium*, de ocorrência natural, com a finalidade de combinar as propriedades de utilização do substrato e formação do produto.

Para alcançar esse objetivo o trabalho constou de uma etapa preliminar de seleção de linhagens do gênero *Clostridium* de interesse a partir da literatura, as quais foram submetidas a ensaios de produção de etanol a fim de selecionar a linhagem com o melhor desempenho. A partir daí o trabalho foi dedicado à caracterização dos complexos enzimáticos – celulossomas, e à avaliação do desempenho da linhagem selecionada na produção de etanol sobre diferentes substratos.

Nesse contexto, a presente tese de doutorado está estruturada da seguinte forma: após este capítulo introdutório, é apresentada uma revisão bibliográfica dos aspectos relevantes deste trabalho, trazendo informações técnicas necessárias à compreensão e ao embasamento do estudo, como etanol de segunda geração, processos de produção, bactérias celulolíticas e celulossomas.

Na sequência, o capítulo 3 - *Seleção de linhagens celulolíticas do gênero Clostridium*, aborda a primeira etapa do trabalho que consistiu na seleção das linhagens em termos de produção de etanol. Os capítulos 4 – *Impacto do substrato sobre a composição do celulossoma de Clostridium thermocellum*, e 5 – *Produção e aplicação de enzimas de Clostridium thermocellum*, são dedicados ao estudo dos celulossomas, e o capítulo 6 à avaliação do desempenho da linhagem selecionada na produção de etanol de segunda geração.

Por último, são apresentadas as conclusões do trabalho (capítulo 7), as referências bibliográficas e alguns anexos, incluindo as publicações resultantes desta tese.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biocombustíveis

Os recentes debates ao redor do mundo têm afirmado que o aquecimento global é inegável e que muito provavelmente se deve ao aumento nas emissões antropogênicas de gases de efeito estufa. As concentrações atmosféricas de CO_2 (dióxido de carbono), o gás de efeito estufa dominante, aumentaram de cerca de 280ppm no período pré-industrial para 379ppm em 2005, principalmente como resultado do uso de combustíveis fósseis (Brethauer & Wyman, 2010).

De acordo com o relatório do *Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)* 2007 o crescimento da população mundial e a demanda de energia *per capita* estão levando a um rápido crescimento nas emissões de gases de efeito estufa. Em particular, na última década, as emissões causadas pelo setor de transporte foram maiores do que as de qualquer outro setor – 27% das emissões antropogênicas de CO_2 (Holzman, 2008). A demanda mundial atual de petróleo para os diversos setores da economia é de 84 milhões de barris por dia e estima-se que em 2030 a demanda cresça para 116 milhões de barris, sendo que 60% dela será destinada ao setor de transportes (Cherubini, 2010).

Além das questões ambientais, os governos de países não produtores de petróleo também estão preocupados com a dependência dessa matéria-prima. Por essas razões, nos últimos anos, vem se tentando estabelecer cadeias de produção

alternativas, a fim de mitigar as mudanças climáticas e reduzir a dependência no petróleo. Porém, aqueles que participam dos debates a nível mundial reconhecem que não existe uma solução única para esses problemas, mas que é necessário um conjunto de ações, passando pela mudança de comportamento, mudanças nos veículos, expansão do transporte público e introdução de tecnologias e combustíveis inovadores (The Royal Society, 2008).

Nesse sentido, na década de 1970, o Brasil iniciou um programa para substituir a gasolina por etanol com a finalidade de diminuir a dependência do petróleo. Nesse programa, a cana-de-açúcar foi escolhida como matéria-prima para a produção, e como consequência, estudos nas áreas de agricultura e de tecnologia foram intensificados, colocando o país em uma posição favorável em termos de segurança energética (Soccol *et al*., 2010; Demain, 2009).

No entanto, no Brasil assim como em outros países, a construção de toda a infraestrutura necessária para o estabelecimento de uma indústria depende de subsídios para permitir que o produto entre no mercado com um preço competitivo. A produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil foi fortemente regulada e subsidiada até a década de 1990. Em 1999 a produção foi liberada da regulação governamental e nos últimos anos os produtores desfrutam de uma confortável situação. Desde o início do programa a produção de etanol aumentou 30 vezes, o rendimento por hectare aumentou em 60%, e os custos de produção diminuíram em 75%. Além disso, as pequenas quantidades de nitrogênio usadas no cultivo da cana-de-açúcar, juntamente com outras melhorias tecnológicas, têm conduzido a um balanço energético positivo para o etanol de cana-de-açúcar sendo utilizada uma unidade de energia proveniente de combustível fóssil para cada oito unidades de

energia do biocombustível produzido (Nass *et al*., 2007). Se a energia excedente da eletricidade gerada com a queima do bagaço for incluída no balanço energético, o valor sobe para mais de 10 unidades de energia produzida para cada unidade de combustível fóssil consumida (Urquiaga *et al.*, 2005).

De acordo com os dados disponíveis no *site* da UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar (http://www.unicadata.com.br) o Brasil produziu na safra 2011/2012, aproximadamente 560 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo processadas em mais de 400 unidades produtoras de etanol. Em média cada usina produz 270-280 kg de bagaço (50% de umidade) – resíduo da cana-de-açúcar após os processos de moagem e extração do caldo – por tonelada métrica de cana-de-açúcar processada. Estima-se que a produção atual de bagaço no Brasil seja de 186 milhões de toneladas/ano (Soccol *et al*., 2010).

Atualmente, o bagaço de cana-de-açúcar é considerado, por uma série de razões, o recurso mais promissor para a produção de etanol de segunda geração (2G). Cerca de 50% do bagaço gerado nas usinas é usado para cogeração de eletricidade (Corrales *et al.*, 2012) para abastecer a própria planta, o restante fica empilhado na área da usina. Portanto, existe um grande interesse em desenvolver métodos para a produção biológica de combustíveis e produtos químicos que ofereçam vantagens econômicas, ambientais e estratégicas (Cardona *et al*., 2010).

A exploração da tecnologia de produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil é favorecida porque o processo pode ser anexado às unidades produtoras de etanol de primeira geração já existentes, necessitando de menos investimento em infraestrutura, logística e suprimento de energia. Além disso,

o bagaço é gerado na própria unidade e, portanto, estaria livre dos custos de transporte. Este é um cenário promissor visto que a cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca, poderiam ser produzidos 600 milhões de galões de etanol, considerando somente o uso da fração celulósica (Macrelli *et al.*, 2012; Soccol *et al.*, 2010).

2.1.1. Etanol de segunda geração (2G)

A produção convencional de etanol baseia-se na fermentação do amido e dos açúcares contidos em alguns cultivos como os da cana-de-açúcar, milho e mandioca, os quais podem ter impacto sobre o suprimento de alimento (Bhalla *et al.*, 2013). Para evitar tal competição, recentes avanços biotecnológicos levaram ao aumento no interesse na utilização da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol e outros produtos químicos. O bagaço de cana-de-açúcar, resíduo da produção de etanol de primeira geração, é um dos principais resíduos vegetais nos países tropicais e o principal resíduo no Brasil. Contudo, assim como outros substratos lignocelulósicos, o uso do bagaço como matéria-prima para a produção de etanol ou outros compostos químicos é ainda limitado devido a sua estrutura química e à presença de lignina que o torna recalcitrante à hidrólise enzimática a menos que ele receba algum tipo de pré-tratamento. Portanto, o desenvolvimento de um processo que combine etapas de pré-tratamento, sacarificação e fermentação é de grande interesse para um uso eficiente do bagaço para a produção de etanol (Corrales *et al.*, 2012; Macrelli *et al.*, 2012; Buaban *et al.*, 2010).

A lignocelulose (figura 2.1) é composta em grande parte de paredes celulares, as quais são formadas por sua vez por proteínas, lignina e

polissacarídeos. O polissacarídeo mais abundante na maioria dos tecidos vegetais é a celulose – uma cadeia não ramificada de até 15.000 moléculas de glicose ligadas entre si por ligações do tipo β-(1,4). Ao contrário da celulose, as moléculas de hemicelulose – outro polissacarídeo presente nas paredes vegetais, são mais curtas e química e fisicamente mais complexas, podendo conter glicose, xilose, arabinose, galactose, fucose ou ácido glicurônico (Lee *et al.*, 2012).

A celulose e a hemicelulose, os quais tipicamente compreendem dois terços da massa seca, podem ser hidrolisados a açúcares e estes, eventualmente, serem fermentados a etanol. Já a lignina não pode ser usada para a produção de etanol (Hamelinck *et al*., 2005), pela rota de hidrólise enzimática.

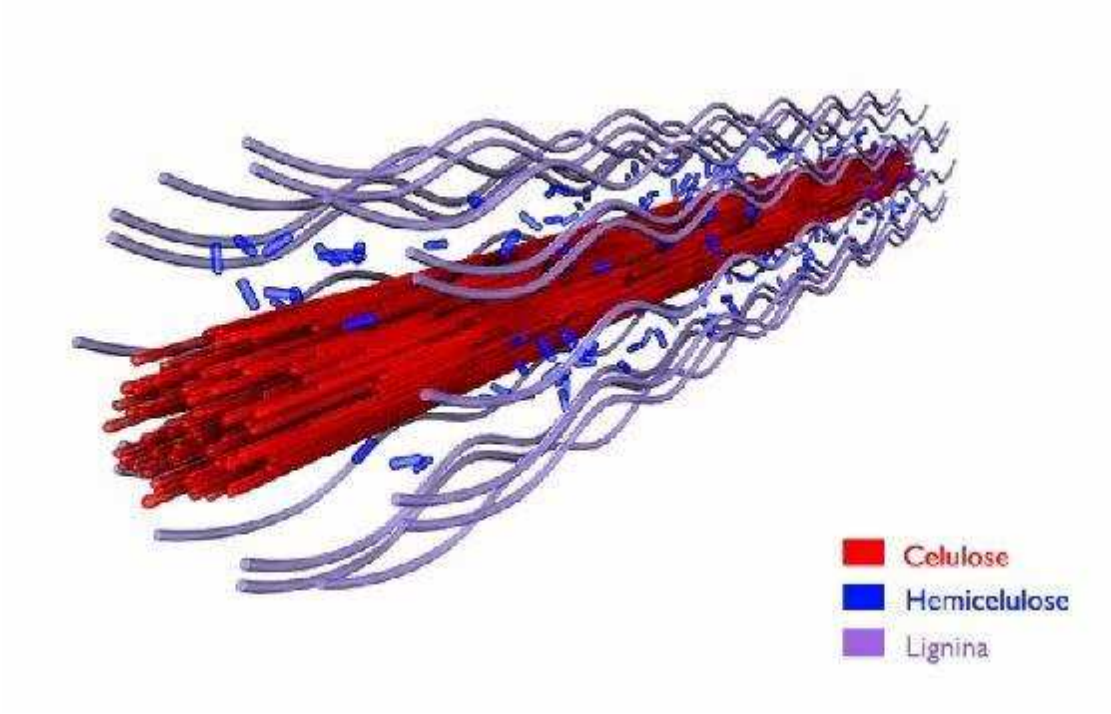


Figura 2.1 – Diagrama esquemático mostrando a posição dos principais componentes da fibra vegetal, após pré-tratamento. Fonte: Petrobras.

Aproximadamente, 30 moléculas de celulose (figura 2.2) se reúnem formando as fibrilas elementares ou protofibrilas, as quais por sua vez são

empacotadas em unidades maiores chamadas microfibrilas. A união de várias microfibrilas forma o que é chamado de fibra de celulose (Lynd *et al.*, 2002). Entre as moléculas lineares de celulose existem ligações de hidrogênio o que resulta em uma forte estrutura cristalina (Duff & Murray, 1996).

Embora a celulose forme uma distinta estrutura cristalina, na natureza o grau de cristalinidade das fibras é variável, existindo também regiões amorfas nas quais as moléculas não estão tão ordenadas, o que as torna mais suscetíveis à hidrólise (Lemos, 2001).

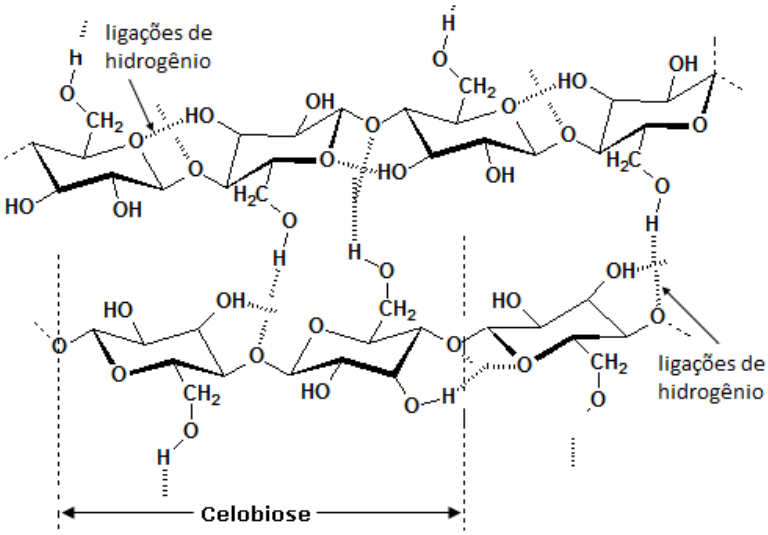


Figura 2.2 – Fórmula estrutural da molécula de celulose. Fonte: Pereira Jr., 1991.

A hemicelulose é um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados (figura 2.3), que circunda a celulose e penetra nesta através dos poros formados nas fibras. A estrutura da hemicelulose caracteriza-se por um arcabouço longo e linear de um tipo de açúcar repetido, com ramificações laterais curtas compostas de acetato e outros açúcares. A composição da hemicelulose pode variar entre

espécies e difere particularmente entre gimnospermas e angiospermas (Duff & Murray, 1996).

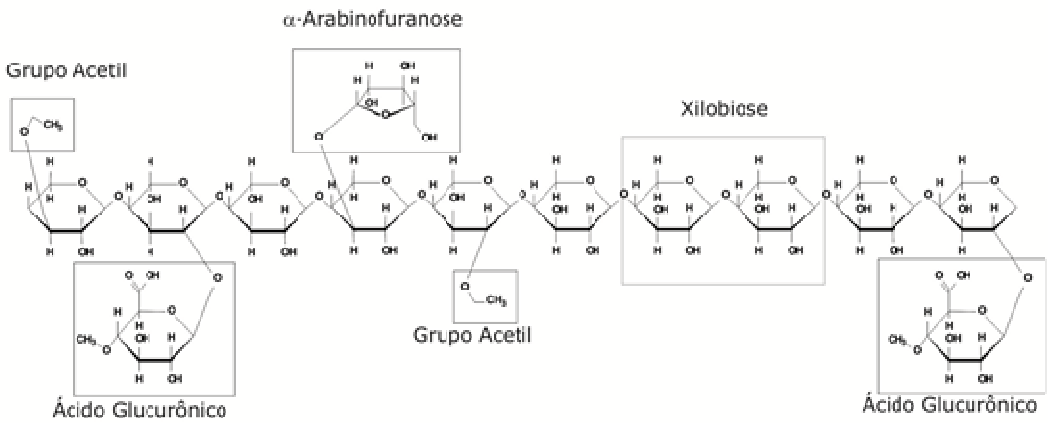


Figura 2.3. – Exemplo de possível molécula de hemicelulose, representada pela mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, principalmente xilanas. Fonte: Mussatto, 2002.

A lignina (figura 2.4) é a principal fonte de carbono aromático na biosfera. Como macromolécula aromática complexa, ela fornece resistência e rigidez à parede celular e aos tecidos das plantas vasculares, atuando como uma cola entre os filamentos e fibras de polissacarídeos. Do ponto de vista químico, a lignina é uma macromolécula heterogênea, opticamente inativa, consistindo de interunidades de fenilpropanóides, as quais estão ligadas por diversas ligações covalentes. Por causa do tipo de ligação química e de sua heterogeneidade, a lignina não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas como a maioria dos outros polímeros naturais (celulose, amido, proteínas etc). No curso da evolução, os *Agaricomycetes* desenvolveram enzimas (exs. lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase) capazes de degradar a lignina substancialmente. Também, alguns *Ascomycetes*, especialmente da ordem *Xylariales*, desenvolveram a capacidade de degradar a lignina até certo grau (Morgenstern *et al.*, 2008).

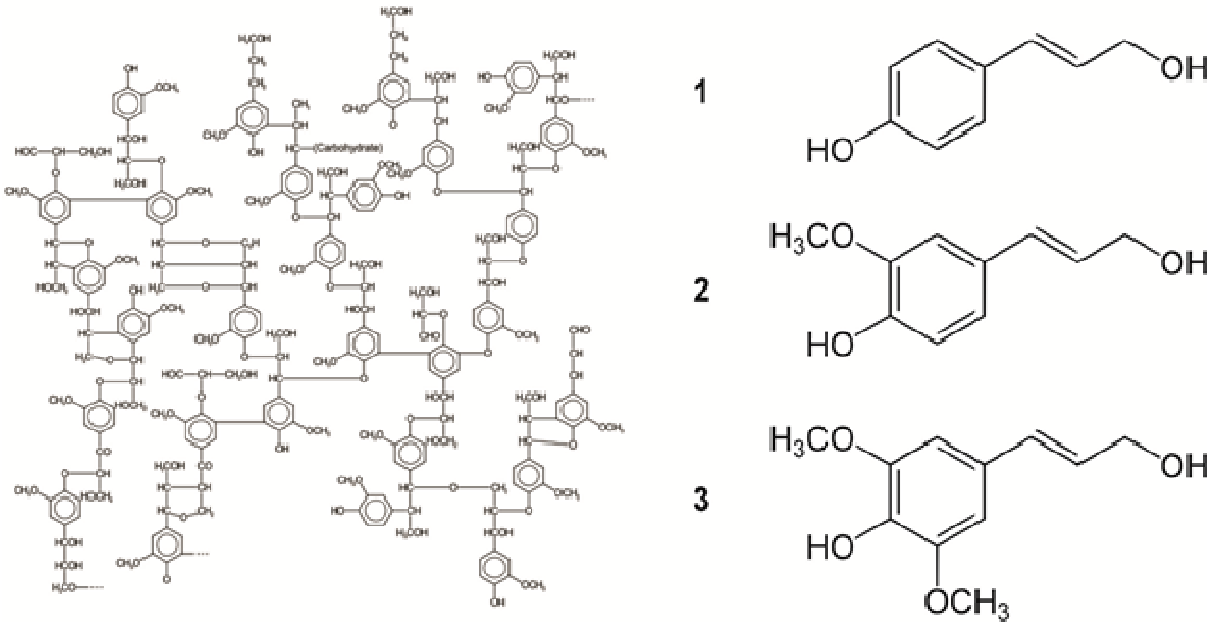


Figura 2.4 – À esquerda: exemplo de uma possível estrutura molecular da lignina; à direita: os três componentes mais comumente encontrados nas moléculas de lignina (1) álcool p-cumarílico; (2) álcool coniferil; (3) álcool sinapil. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin.

Para poder produzir etanol a partir dos constituintes da fibra vegetal é necessário hidrolisar a celulose e a hemicelulose para obter os açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática é uma via promissora para a obtenção de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos, porém a baixa acessibilidade das enzimas à celulose é um problema-chave para o desenvolvimento de processos de conversão de biomassa a etanol. Nas plantas a celulose está intimamente associada à hemicelulose e à lignina. A lignina está parcialmente associada à hemicelulose, covalentemente, prevenindo o acesso de agentes hidrolíticos à celulose. Além disso, a estrutura cristalina da celulose por si só representa um obstáculo extra na hidrólise (Demain, 2009; Martín *et al*., 2007).

Portanto, um pré-tratamento é requerido para remover a lignina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material, aumentando a suscetibilidade enzimática da celulose. O pré-tratamento

deve ser efetivo para preservar a utilidade da hemicelulose e evitar a formação de inibidores (figura 2.5) e, em termos econômicos, o pré-tratamento deve usar reagentes baratos e requerer equipamentos e procedimentos simples (Cardona *et al*., 2010).

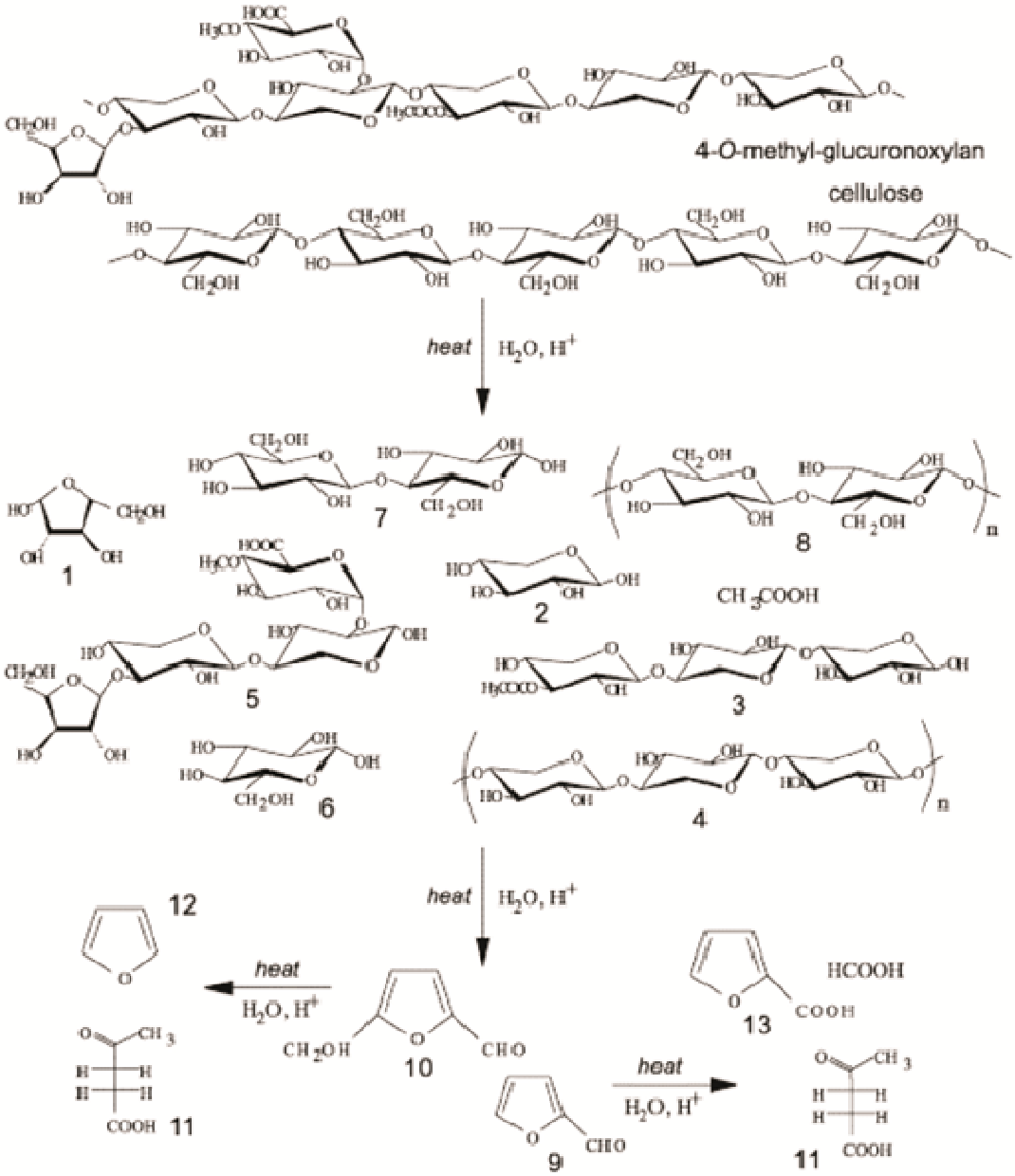


Figura 2.5 – Exemplo de pré-tratamento por explosão a vapor de madeira de angiosperma, mostrando os possíveis compostos (açúcares e inibidores) formados a partir da hidrólise da hemicelulose e celulose: (1) arabinose; (2) xilose; (3 e 4) xilooligômeros; (5) oligossacarídeos ramificados; (6) glicose; (7) celobiose; (8) celooligômeros; (9) furfural; (10) hidroximetilfurfural; (11) ácido levulínico; (12) furano; (13) ácido 2-furóico. Ácidos acético e fórmico também podem ser formados. Fonte: Ramos, 2003.

2.1.2. Pré-tratamento

De forma geral, os processos de pré-tratamento podem ser divididos em:

- ✓ Físicos – como a cominuição mecânica, que diminui o tamanho das partículas;
- ✓ Físico-químicos – englobam a explosão a vapor (*steam explosion*), a explosão com vapor amoniacal (AFEX) e a explosão com CO_2. Na explosão a vapor ou autohidrólise, a biomassa é exposta a vapor saturado com altas pressões e então a pressão é reduzida rapidamente o que faz com que os materiais sofram uma descompressão explosiva. Na AFEX, os materiais lignocelulósicos são expostos à amônia líquida a altas temperatura e pressão por um determinado período de tempo, e então a pressão é reduzida rapidamente. A explosão com CO_2 é similar aos processos anteriores, com a vantagem de não ter o custo da amônia e não formar os inibidores do processo de explosão a vapor;
- ✓ Químicos – ozonólise, pré-tratamento ácido, pré-tratamento alcalino, deslignificação oxidativa, processo organosolv e fracionamento por líquidos iônicos. A ozonólise – quebra de um alceno causada pelo ozônio (O_3) gerando como produtos uma cetona e/ou um aldeído – é um processo caro devido à grande quantidade de ozônio requerida. Porém, por outro lado, esse processo remove a lignina efetivamente, não produz resíduos tóxicos e pode ser realizada à temperatura e pressão ambientes. Na hidrólise ácida, os materiais são submetidos à temperatura elevada, por um determinado período de tempo, na

presença de um ácido diluído, geralmente ácido sulfúrico. Embora seu custo seja mais alto do que alguns tratamentos físico-quimicos como a explosão a vapor e a AFEX, o pré-tratamento ácido pode melhorar significativamente a hidrólise enzimática da celulose, além de conseguir altas conversões de xilana em xilose. Isso torna o processo favorável economicamente visto que a xilana representa um terço dos carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos. O mecanismo do pré-tratamento alcalino é a saponificação das ligações éster intermoleculares que ligam, por exemplo, a lignina e hemicelulose. Este tipo de tratamento causa o inchaço dos materiais, aumentando a superfície interna dos mesmos, diminui o grau de polimerização e de cristalinidade, separa a lignina dos carboidratos e rompe a estrutura da lignina. Todos esses fatores aumentam a porosidade dos materiais colaborando na hidrólise enzimática. Na deslignificação oxidativa a biodegradação da lignina (~50%) é catalisada pela enzima peroxidase na presença de H_2O_2, aumentando consideravelmente a suscetibilidade dos materiais à hidrólise enzimática. O processo organosolv e o fracionamento por líquidos iônicos se baseiam no conceito de solubilização diferencial e do fracionamento dos vários componentes da parede celular, incluindo a celulose, pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas; e,

- ✓ Biológicos – nos processos biológicos, fungos da podridão branca (*White-rot*), da podridão marrom (*Brown-rot*) ou da podridão mole (*Soft-rot*) são usados para degradar a lignina e a hemicelulose

existentes nos resíduos. As vantagens dos processos biológicos incluem o baixo consumo de energia e as condições ambientais brandas. Contudo, a taxa de hidrólise na maioria dos processos de pré-tratamentos biológicos é muito baixa (Harmsen *et al.*, 2010; Sun & Cheng, 2002)..

2.2. Processos para produção de etanol 2G

Para produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos (etanol 2G) é necessário desorganizar as fibras a fim de acessar a celulose e a hemicelulose, o que pode ser alcançado através do pré-tratamento escolhido.

Após o pré-tratamento é possível hidrolisar os polímeros de hemicelulose e celulose para obter seus açúcares e estes, por sua vez, podem então ser fermentados por organismos específicos a etanol (Lynd *et al.*, 2002).

Diferentes configurações de processos podem ser definidas com base nesses eventos e de acordo com a integração dos mesmos. Sendo assim, temos as seguintes possibilidades de estratégias de processo:

2.2.1. Hidrólise enzimática e fermentação separadas

(Separate Enzymatic Hydrolysis and Fermentation - SHF) Esta é a estratégia de processo mais antiga (figura 2.6), na qual a hidrólise da celulose, depois do pré-tratamento da biomassa para solubilização e hidrólise da hemicelulose, ocorre em um estágio separado da fermentação (Pereira Jr. *et al.*,

2008). Neste tipo de estratégia os açúcares provenientes da solubilização da hemicelulose durante o pré-tratamento podem ser convertidos a etanol em um fermentador separado.

A principal vantagem desse método é que ele permite que tanto a hidrólise quanto a fermentação possam ser conduzidas nas condições ótimas para cada etapa. Geralmente, a temperatura ótima para as celulases está entre 45 e 50°C, dependendo do microrganismo produtor. Contudo, a temperatura ótima para a maior parte dos microrganismos produtores de etanol (fermentadores) está entre 30 e 37°C (Olsson *et al.*, 2006).

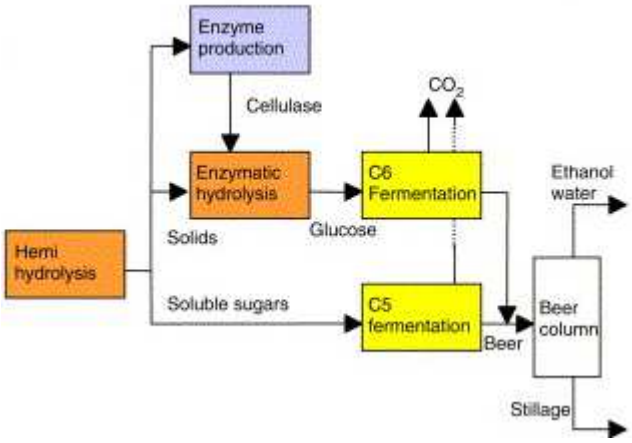


Figura 2.6 – Diagrama da estratégia de Hidrólise Enzimática e Fermentação Separadas (SHF). Fonte: Hamelinck *et al.*, 2005.

Por outro lado, a principal desvantagem deste processo é a inibição da atividade celulásica pelos açúcares liberados, principalmente celobiose e glicose. Sabe-se que concentrações de celobiose tão baixas quanto 6,0g/L, já podem reduzir a atividade das celulases em até 60%. Embora a glicose também reduza a atividade das celulases, seu efeito inibitório é menor do que o da celobiose. Porém, ela é um

forte inibidor da celobiase. Apenas 3,0 g/L de glicose, são suficientes para diminuir em 75% a atividade dessa enzima (Philippidis *et al*., 1993).

Segundo Taherzadeh & Karimi (2007), outra desvantagem do SHF é a possibilidade de contaminação. Como o tempo envolvido na etapa de hidrólise é muito longo, a solução de açúcares formada torna-se uma fonte disponível ao ataque de microrganismos indesejados, mesmo na faixa de temperatura empregada nesta etapa. Além disso, as próprias enzimas podem ser uma fonte potencial de contaminação.

2.2.2. Sacarificação e fermentação simultâneas

(Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF) Uma das estratégias de processo de obtenção de etanol a partir de lignocelulose mais bem sucedida até o momento é a que combina a hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados e a fermentação em um único evento.

Neste tipo de estratégia a fração hemicelulose é hidrolisada e fermentada em um estágio separado, assim como a produção de enzimas (figura 2.7). Já a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação dos seus açúcares ocorrem em um mesmo reator.

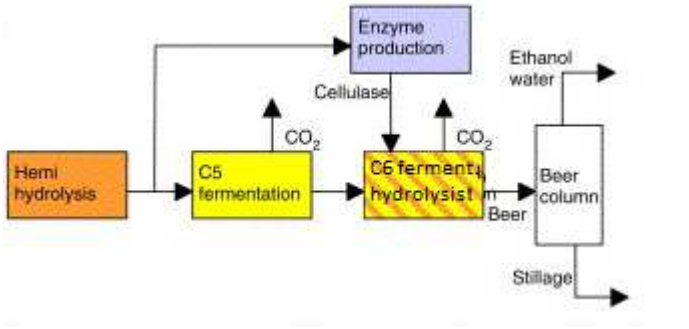


Figura 2.7 – Diagrama da estratégia de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*SSF*). Fonte: Hamelinck *et al.*, 2005.

Neste tipo de processo, a glicose produzida através da atividade das celulases é imediatamente consumida pelo microrganismo fermentador. Esta é a principal vantagem do SSF sobre o SHF, visto que os efeitos inibitórios da celobiose e da glicose são minimizados mantendo-se as concentrações desses açúcares baixas. Além disso, através do SSF é possível obter uma maior produtividade em etanol e usar menor quantidade de enzimas (McMillan *et al*, 1999).

O risco de contaminação no SSF também é menor do que no SHF, pois a presença de etanol reduz essa possibilidade. Além disso, em termos de investimento este processo se mostra mais vantajoso já que o número de vasos requeridos é menor do que no SHF (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Por outro lado, as condições ótimas de processo para uma eficiente hidrólise enzimática não são as mesmas do processo de fermentação (Pereira Jr. *et al.*, 2008). Podemos considerar que esta é a principal desvantagem do SSF tendo em vista a dificuldade de se encontrar o ponto ideal para seu funcionamento. Realizar a hidrólise enzimática em temperaturas inferiores a 50ºC diminui as taxas de hidrólise, o rendimento em açúcares (devido à hidrólise incompleta), requer

dosagens mais altas de enzimas e aumenta a probabilidade de contaminações do sistema (Bhalla *et al.*, 2013).

Esforços vêm sendo realizados para sobrepor esses problemas, existindo duas correntes distintas: (1) o uso de organismos termotolerantes para aproximar a temperatura da fermentação à temperatura ótima de atividade das celulases (Taherzadeh & Karimi, 2007); (2) produção de enzimas que atuem em temperaturas e valores de pH próximos do ótimo da fermentação (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Uma variante deste processo, conhecida como *HSF – Hybrid Saccharification and Fermentation*, na qual uma primeira etapa de sacarificação até uma determinada obtenção de açúcares é seguida de uma etapa de sacarificação e fermentação simultâneas, pode ser usada para evitar esses problemas.

Outra possível desvantagem do SSF está relacionada à inibição das enzimas pelo etanol produzido. Há registros de que concentrações de etanol de 30g/L reduzem a atividade enzimática em 25%. Contudo, esse tema não tem recebido muita atenção porque, geralmente, neste tipo de processo não é possível trabalhar com concentrações muito altas de substrato devido aos problemas com mistura mecânica e transferência de massa insuficiente (Wu & Lee, 1997).

2.2.3. Sacarificação e co-fermentação simultâneas

(Simultaneous Saccharification and Cofermentation – SSCF) Este processo envolve três estágios, dos quais a hidrólise da hemicelulose e a produção das celulases acontecem separadamente (figura 2.8). De acordo com este conceito, o

hidrolisado, rico em pentoses, e a celulose não são separados após a etapa de pré-tratamento, permitindo que os açúcares da hemicelulose sejam convertidos a etanol juntamente com a sacarificação e fermentação da celulose. A principal vantagem desta estratégia reside no fato de que somente um reator é utilizado para a produção de etanol (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Nas estratégias anteriores a hexose é convertida a etanol em um reator, e as pentoses têm que ser fermentadas em outro reator por um organismo diferente. Portanto, dois reatores são necessários, além da necessidade da geração de biomassa de dois organismos diferentes. Já no processo de SSCF, tanto as hexoses quanto as pentoses são fermentadas por um único microrganismo em um mesmo reator (McMillan, 1997).

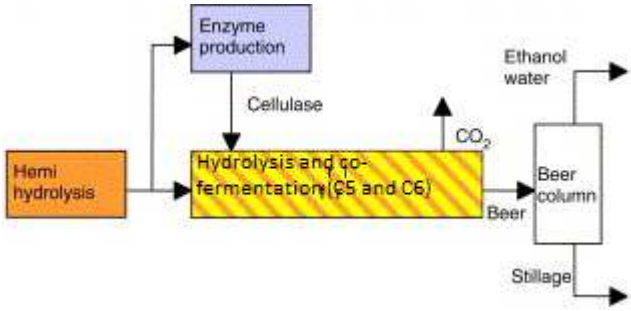


Figura 2.8 – Diagrama da estratégia de Sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas (*SSCF*). Fonte: Hamelinck *et al*., 2005.

É claro que neste caso é necessária a intervenção da biologia molecular para conferir a um único microrganismo as características necessárias para fermentar ambos os açúcares ou a utilização de consórcios de microrganismos. Existem vários exemplos na literatura de microrganismos engenheirados com essa finalidade. Porém, os mais citados são *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* (Lawford & Rousseau, 1998; McMillan *et al*., 1999; Teixeira *et al*., 2000).

Um exemplo dessa abordagem é a linhagem industrial de *S. cerevisiae* TMB3400 que contem os genes de fungos que codificam as enzimas xilose redutase (XR), xilitiol desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK), a qual é capaz de cofermentar xilose e glicose de hidrolisados lignocelulósicos (Erdei *et al.*, 2012).

2.2.4. Bioprocesso consolidado

(Consolidated Bioprocessing – CBP) Esta é a estratégia de processo mais avançada (figura 2.9), na qual todas, ou pelo menos três etapas, podem ser realizadas em um mesmo equipamento. No CBP, etanol e todas as enzimas requeridas para o processo são produzidos no mesmo reator por uma mesma comunidade microbiana (Pereira Jr. *et al*., 2008).

De acordo com Lynd *et al.* (2005), este processo, também conhecido como Conversão Microbiana Direta (*Direct Microbial Conversion – DMC*), baseia-se na utilização de mono- ou coculturas de microrganismos que fermentam celulose a etanol, sendo o ponto final na evolução da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

O CBP tem potencial para diminuir o custo do processamento da biomassa, se comparado às demais estratégias, pela eliminação dos custos operacionais e de capital ligados à etapa de produção de enzimas. Da mesma forma, as estimativas de custos para a adição de enzimas comerciais ao processo não tem mostrado uma tendência de queda muito grande nos últimos 20 anos, apesar dos investimentos nessa área (Olson *et al.*, 2011).

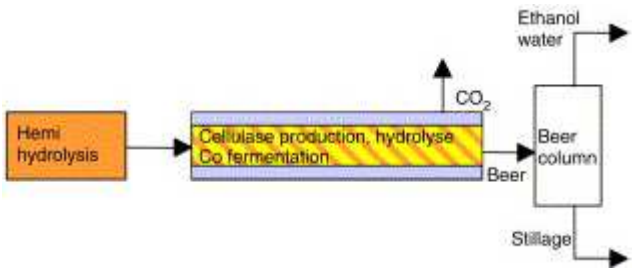


Figura 2.9 – Diagrama da estratégia de Bioprocesso Consolidado (*CBP*). Adaptado de: Hamelinck *et al.*, 2005.

Duas estratégias podem ser seguidas para a obtenção de organismos para o CBP. A primeira estratégia envolve a modificação de microrganismos naturalmente produtores de etanol, a fim de torná-los também eficientes produtores de celulases. A segunda estratégia segue o caminho contrário, ou seja, modificar excelentes produtores de celulases com a finalidade de transformá-los também em eficientes produtores de etanol (Olson *et al.*, 2011; Lynd *et al.*, 2005).

No passado, vários microrganismos anaeróbios celulolíticos foram isolados e caracterizados visando a produção de combustíveis e outros produtos químicos a partir de materiais lignocelulósicos pelo CBP. Um dos microrganismos mais conhecidos e investigados com essa finalidade é *Clostridium thermocellum*, o qual tem a capacidade de produzir enzimas celulolíticas e fermentar os açúcares gerados a etanol e outros produtos. Contudo, os processos que utilizam esse tipo de organismo costumam ser mais demorados (3 a 12 dias) e a produtividade de etanol é baixa, visto que outros produtos, como acetato e lactato também são formados (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Alguns pesquisadores vêm buscando desde então opções de microrganismos que não produzam ácidos orgânicos e que sejam mais resistentes a altas concentrações de etanol. Porém, até o momento não existem organismos ou

consórcios de microrganismos capazes de produzir celulases nos níveis desejados e também produzir etanol com alta produtividade e altas concentrações, embora vários organismos já combinem ambas as funções (Olson *et al.*, 2011).

Fujita *et al*. (2004), desenvolveram uma linhagem de *S. cerevisiae* em cuja superfície celular foram expressos três tipos de enzimas celulolíticas, obtendo um rendimento de 0,45 g/g (gramas de etanol por grama de carboidrato consumido), o que corresponde a 88,5% do rendimento teórico. Outros trabalhos similares têm demonstrado a possibilidade de se desenvolver linhagens de leveduras capazes de crescer e de converter celulose em etanol em uma única etapa (Ilmén *et al.*, 2011; Den Haan *et al*., 2007).

Por outro lado, alguns pesquisadores têm deletado algumas enzimas do metabolismo de espécies capazes de fermentar celulose, como *C. thermocellum* e *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a fim de diminuir a produção de ácidos orgânicos e aumentar a produção de etanol (Deng *et al.,* 2013; Argyros *et al*., 2011; Shaw *et al.*, 2008).

2.3. Degradação da celulose pelas bactérias celulolíticas

Os mecanismos amplamente aceitos para a degradação enzimática da celulose baseiam-se nos estudos do sistema celulásico de espécies mesofílicas de fungos. Nesses organismos, o sistema capaz de degradar a forma cristalina da celulose é composto essencialmente de três tipos de enzimas – endo-β-1,4-glucanase (ou endoglucanase), exo-β-1,4-glucanase (ou exoglucanase) e β-glicosidase (ou celobiase) (Robson & Chambliss, 1989). Essas três enzimas

trabalham sinergicamente para efetuar a hidrólise da celulose cristalina, de acordo com o exposto abaixo (Pereira Jr., *et al*., 2008):

- ✓ As endoglucanases (EC 3.2.1.4)[2] atuam nas regiões amorfas da fibra, formando terminais redutores e não-redutores para a ação das exoglucanases CBH I e CBH II, respectivamente;

- ✓ As exoglucanases (EC 3.2.1.91)[1] atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não-redutores liberados pela ação das endoglucanases, formando seqüencialmente a glicose na forma de dímero (celobiose) ou monômero.

- ✓ As celobiases (EC 3.2.1.21)[1] catalisam a hidrólise da celobiose em D-glicose, ou seja, disponibilizam os monômeros de glicose.

Assim, as endoglucanases atuam ativamente sobre as microfibrilas de celulose nas regiões amorfas, criando locais de atuação para as exoglucanases. As celobiases por outro lado impedem o acúmulo de celobiose, cuja presença inibe a atuação das exoglucanases (figura 2.10).

Relativamente pouco foi feito no passado com outros sistemas celulolíticos, principalmente aquele encontrado nas bactérias anaeróbias (Lamed & Bayer, 1988). No entanto, nos últimos anos, bactérias que metabolizam celulose têm recebido um grande interesse visto que elas podem utilizar materiais lignocelulósicos e gerar etanol, uma propriedade rara entre os organismos vivos existentes (Demain, 2006).

---

[2] EC = *Enzyme Classification* (Classificação Enzimática), ver endereço http://www.ebi.ac.uk/intenz/.

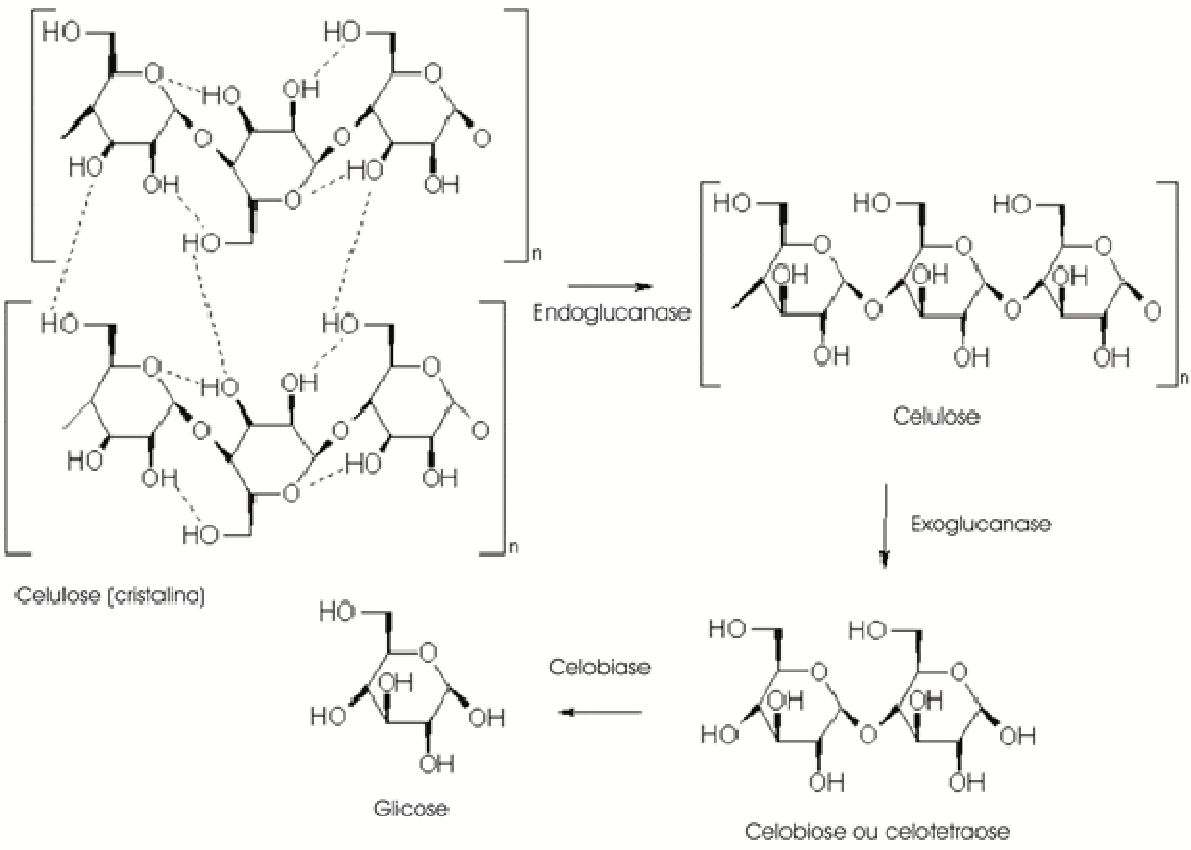


Figura 2.10 – Reações catalisadas pelas celulases: as regiões cristalinas da celulose são intermediadas por regiões menos compactas, denominadas amorfas, onde atuam as endoglucanases rompendo as interações não-covalentes; hidrólise das extremidades redutoras e não-redutoras da celulose pelas exoglucanases gerando oligossacarídeos; hidrólise dos oligossacarídeos em glicose pelas celobiases. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase.

As bactérias celulolíticas anaeróbias degradam a celulose formando celobiose e celodextrinas como principais produtos. As celodextrinas e a celobiose são posteriormente utilizadas pelo organismo. Os produtos finais da fermentação desses açúcares podem ser: o etanol, o acetato, o lactato, o formiato, o hidrogênio e o dióxido de carbono (Demain, 2006).

Esses organismos tendem a produzir complexos multi-enzimáticos chamados ‘celulossomas’, os quais estão ligados à superfície celular e carregam as enzimas necessárias para a hidrólise da celulose, além de proteínas com função

estrutural (Ximenes & Felix, 2003). A descrição desses complexos será comentada em detalhes no capítulo 5.

Schwarz (2001), afirma que 75 espécies válidas de bactérias que crescem sobre celulose cristalina como única fonte de carbono e que degradam substancialmente esse substrato, foram reportadas na literatura. Somente cinco filos bacterianos dos 23 existentes contem espécies celulolíticas verdadeiras. Sendo que a grande maioria (80%) é encontrada em dois filos de bactérias gram-positivas: filo Actinobacteria, com organismos aeróbios (ordem *Actinomycetales*) e filo Firmicutes, com organismos anaeróbios (ordem *Clostridiales*). Enquanto as bactérias aeróbias produzem celulases livres similares àquelas produzidas pelos fungos, a maioria dos clostrídios celulolíticos produz suas enzimas na forma complexada nos celulossomas.

Dentre as espécies de bactérias anaeróbias celulolíticas podemos citar como exemplos: *Ruminococcus albus, R. flavefaciens, Eubacterium cellulosolvens, Clostridium cellulolyticum, C. thermocellum* (todas gram-positivas), *Bacteroides cellulosolvens, B. succinogenes* e *Acetivibrio cellulolyticus* (todas gram-negativas).

Especial atenção vem sendo dada, desde 1970, às espécies do gênero *Clostridium.* Notadamente para *C. thermocellum*, uma espécie anaeróbia e termofílica. Com base nas observações dessa e outras espécies foram desenvolvidos vários conceitos (Shoham *et al*. 1999) que distanciam esses organismos dos modelos desenvolvidos com base nos estudos com fungos.

2.3.1. Colonização da celulose

Durante a crise do petróleo da década de 1970, vários laboratórios direcionaram seus esforços para a produção de etanol e outras substâncias químicas úteis a partir de fontes renováveis como a celulose. *C. thermocellum* e outras espécies aparentadas foram escolhidas para realizar fermentações de culturas mistas na tentativa de desenvolver um sistema estável para a produção de etanol a partir de celulose. Durante esses estudos foi investigado o efeito da agitação sobre as culturas, o que levou à conclusão de que *C. thermocellum* aderia fortemente à celulose antes de degradá-la. Com base nessas observações iniciais, vários outros estudos foram feitos com o objetivo de identificar o mecanismo de aderência da célula ao substrato (Shoham *et al.*, 1999).

A adesão das células à celulose parece ser uma estratégia importante para a utilização da celulose pelas bactérias anaeróbias, e o complexo formado (celulose-enzima-microrganismo) é provavelmente o principal agente da hidrólise (Lynd *et al*., 2002).

Em 1986, Lamed & Bayer, demonstraram que, na presença de celulose, as estruturas celulossomais existentes na superfície celular de *C. thermocellum* se desdobravam em estruturas fibrilares que entravam em contato com a celulose a uma distância aproximada de 400 a 500nm a partir da superfície bacteriana. Os autores propuseram que esses ‘corredores de contato’ fibrilares serviam como meio de canalização dos produtos da hidrólise para a superfície celular, fornecendo uma vantagem competitiva às bactérias celulolíticas aderentes (figura 2.11).

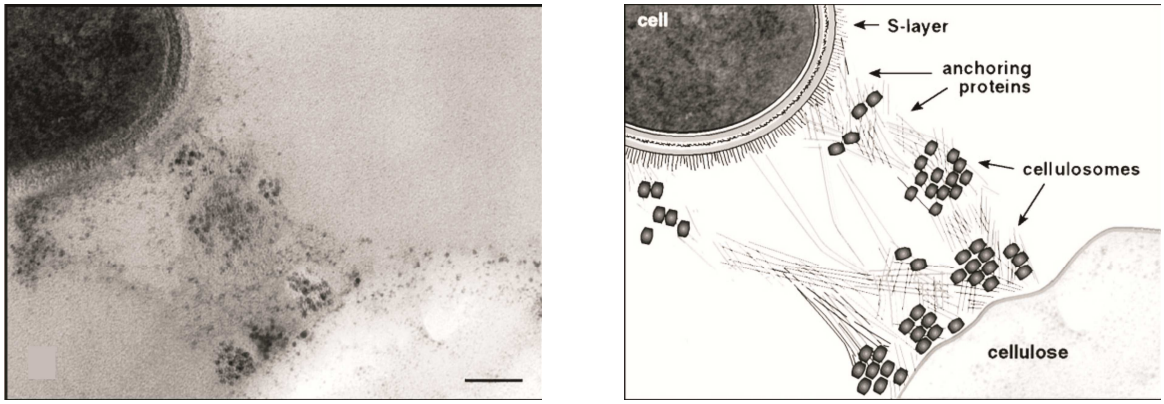


Figura 2.11 – À esquerda: microfotografia de transmissão eletrônica mostrando os corredores de material fibroso conectando a célula à superfície da celulose. Barra: 100nm. À direita: interpretação esquemática da microfotografia. Fonte: Bayer *et al.*, 1998.

Uma característica dos clostrídios celulolíticos durante a colonização da celulose é a produção de grandes quantidades de uma substância amarela (Shiratori *et al.*, 2006). Essa propriedade foi observada pela primeira vez por Ng & Zeikus (1982) durante o crescimento de *C. thermocellum* sobre celobiose. Essa substância, um pigmento de estrutura carotenóide ($C_{52}H_{94}O_{19}N$) designado *yellow affinity substance – YAS*, adere à fibra de celulose e parece facilitar a ligação do celulossoma ao substrato insolúvel. Como sua produção é iniciada pouco antes dos celulossomas começarem a se formar, especula-se que sua função seja a de sinalizar a síntese/secreção das celulases (Felix & Ljungdahl, 1993).

Utilizando *C. cellulolyticum*, como espécie-modelo, Desvaux (2005) propôs que o processo de colonização da celulose ocorre através de um sistema cíclico de adesão – colonização – liberação – readesão (figura 2.12).

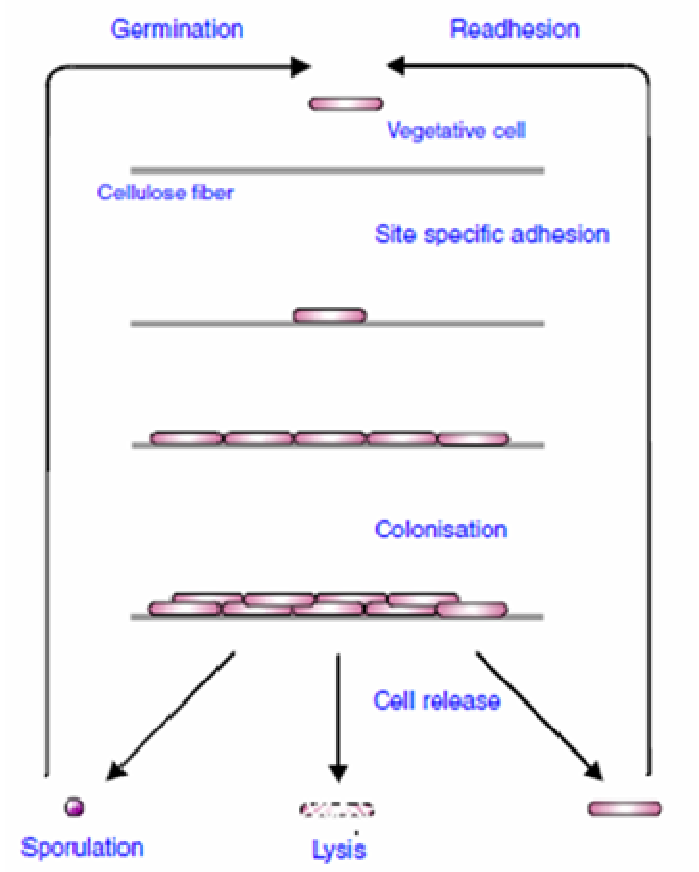


Figura 2.12 – Modelo de colonização da celulose por *C. cellulolyticum*. Fonte: Desvaux, 2005.

De acordo com esse modelo, primeiramente, as células se aderem a um local específico na fibra de celulose e então colonizam o local. Após a saturação ou exaustão dos locais de adesão, as células são liberadas da superfície ou sofrem lise. Após a liberação, provavelmente as células encontram condições de falta de alimento, readerindo-se em outro local ou sofrendo esporulação até que as condições de crescimento adequadas retornem. Especula-se que a esporulação possa assegurar a perenidade da espécie no seu nicho ecológico (Desvaux, 2005).

2.4. Celulossomas

Durante muitos anos acreditou-se que os sistemas celulásicos microbianos consistiam somente de numerosos tipos de celulases livres que atuavam

sinergicamente sobre o substrato insolúvel. Na verdade, muitos sistemas celulásicos, particularmente nos organismos aeróbios, parecem estar caracterizados por enzimas livres. No entanto, um complexo enzimático multicomponente, o celulossoma, foi identificado e descrito para a espécie anaeróbia *C. thermocellum*, em 1983 (Bayer *et al*., 1998).

A descoberta original ocorreu por acaso quando os pesquisadores Edward Bayer e Raphael Lamed tentavam isolar o fator de adesão de *C. thermocellum* à celulose. A pesquisa estava fundamentada em observações anteriores que mostravam que essa bactéria se aderia fortemente e seletivamente às fibras de celulose antes e durante a degradação do substrato (Bayer & Lamed, 2006). Para tal, os pesquisadores realizaram estudos bioquímicos, imunoquímicos, ultraestruturais e genéticos (Bayer *et al*., 1998). As evidências obtidas através dessas análises levaram-nos as seguintes conclusões:

> *"Nossa atual percepção do fator de ligação à celulose (CBF – cellulose binding factor) em C. thermocellum é de que este pode ser visto como um grande complexo de multisubunidades o qual exibe atividade antigênica e celulolítica... O complexo aparentemente compreende várias formas distintas de celulases, cada qual podendo sustentar diferentes especificidades contra diferentes estruturas quaternárias da celulose. O principal papel organizacional desse complexo pode ser designado como sendo a adesão ao substrato bem como manter próximas várias enzimas complementares. Além disso, o complexo pode estar estruturado de tal forma a possibilitar a proteção de vários produtos intermediários*

> *e facilitar sua transferência para outros componentes celulásicos para posterior hidrólise. De qualquer forma, as subunidades celulásicas parecem estar arranjadas dentro do complexo CBF em uma forma supramolecular definida visando uma degradação altamente eficiente da celulose."*

Após a apresentação e publicação desses resultados, na década de 1980, os autores propuseram o termo 'celulossoma' para descrever a estrutura multicelulásica altamente organizada do complexo, a qual parecia ser responsável tanto pela aderência à célula quanto pela economia na secreção de enzimas (Bayer & Lamed, 2006).

Mais tarde, análises moleculares levaram à clonagem, sequenciamento e expressão de numerosas celulases, algumas das quais deixaram de ser consideradas componentes do celulossoma (Béguin, 1990).

O celulossoma mais estudado até o momento é o de *C. thermocellum*, diferindo um pouco em relação ao de outras espécies em composição. Em algumas linhagens, os celulossomas se agregam em grandes supercomplexos, chamados policelulossomas, com massas moleculares chegando até a 100 MDa. O padrão de proteínas encontrado para celulossomas e policelulossomas, através de análises de eletroforese em gel de poliacrilamida, é idêntico, podendo apresentar até 50 componentes (bandas de proteínas), dependendo da linhagem e das condições de crescimento (Béguin & Lemaire, 1996).

Outra característica dos celulossomas dessa espécie é que eles são glicosilados, contendo de 6-13% de carboidratos. Sendo que grande quantidade está associada ao *scaffoldin*. A glicosilação poderia funcionar como uma proteção contra o ataque de proteases nas regiões ricas em treonina entre os módulos catalítico e de ligação (Schwarz, 2001).

2.4.1. Estrutura

Estudos de microscopia eletrônica de transmissão em bactérias produtoras de celulossomas mostram a presença de protuberâncias extracelulares (figuras 2.13 e 2.14). Acredita-se que essas protuberâncias contenham os celulossomas, os quais consistem de uma proteína fibrilar, denominada *scaffoldin* (= andaime), responsável pela organização das subunidades celulolíticas no complexo (Doi & Kosugi, 2004). O *scaffoldin* – principal componente do celulossoma – é uma grande proteína de integração, sem atividade enzimática, que contém módulos coesinas (geralmente em múltiplas cópias) para incorporação das diferentes enzimas e outros componentes celulossomais. As enzimas por sua vez contêm um tipo de módulo complementar – o domínio doquerina – que se liga tenazmente aos módulos coesina da subunidade *scaffoldin* (Bayer *et al*., 2004).

A interação coesina-doquerina define a arquitetura celulossomal (figura 2.15), mediando a incorporação das enzimas individuais no complexo através da ligação das enzimas ao *scaffoldin*, conectando *scaffoldins* entre si no caso de celulossomas mais intricados, e fixando os complexos às superfícies das células. Análises verificaram que essa interação é de alta afinidade, com constante de dissociação (K_D) estimada em 10^{-9} a 10^{-12} M ou ainda menores. Consequentemente,

a interação entre a coesina do tipo I e a doquerina de *C. thermocellum* é uma das mais tenazes interações proteína-proteína já descrita (Nakar *et al*., 2006).

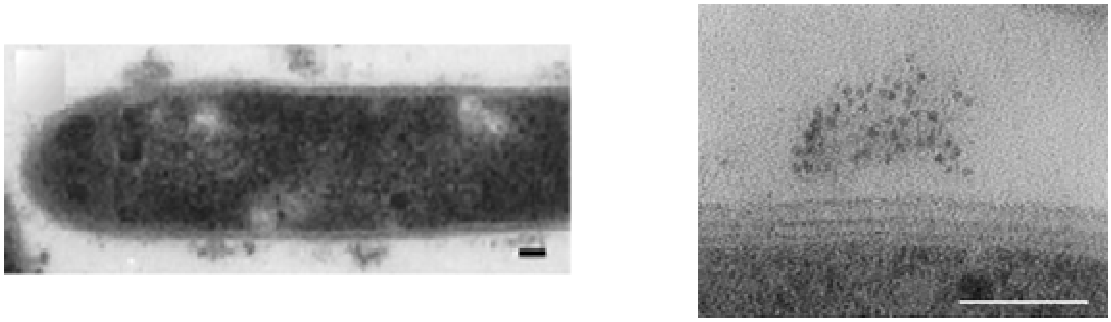


Figura 2.13 – À esquerda: microfotografia de transmissão eletrônica de uma célula de *C. thermocellum* antes de entrar em contato com a celulose, mostrando as protuberâncias. À direita: visão aumentada de uma protuberância. Barras: 100nm. Fonte: Bayer *et al*., 1998.

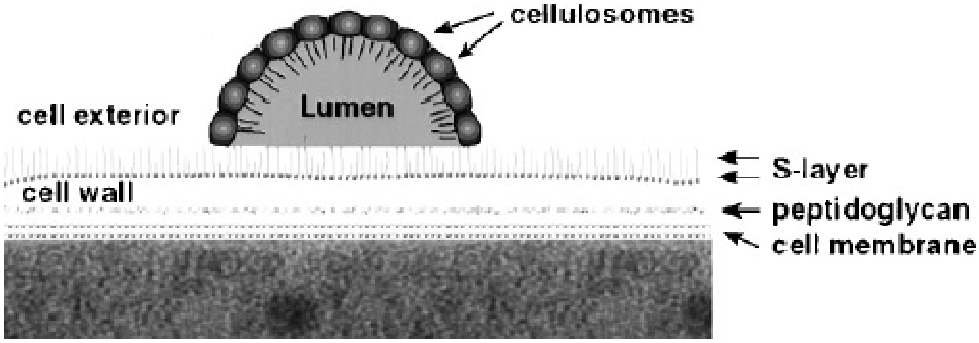


Figura 2.14 – Interpretação esquemática da superfície celular com protuberância. Fonte: Bayer *et al*., 1998.

Os componentes catalíticos dos celulossomas também são representados por proteínas complexas, as quais consistem de módulos catalíticos e não-catalíticos. Contudo, além do domínio doquerina, somente alguns poucos componentes celulossomais possuem um módulo de ligação aos carboidratos ou CBM (*carbohydrate-binding module*). Este fato contrasta com o padrão encontrado nas celulases dos sistemas não-celulossomais (Schwarz, 2001).

Por outro lado, freqüentemente, o *scaffoldin* inclui um CBM, através do qual o complexo reconhece e se liga à celulose cristalina (Doi & Kosugi, 2004; Bayer *et al*., 2004).

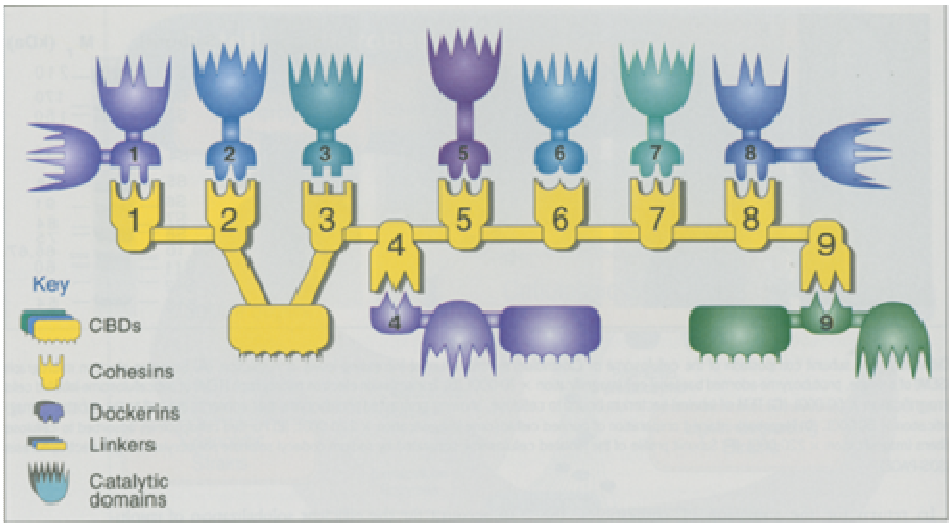


Figura 2.15 – Modelo simplificado de um celulossoma típico. A estrutura em amarelo é o *scaffoldin*, as subunidades catalíticas são mostradas em tons de azul, verde e violeta. O *scaffoldin* compreende dois tipos principais de subcomponentes: o domínio de ligação à celulose (CBD) ou módulo de ligação aos carboidratos (CBM) e múltiplas cópias de coesinas. As subunidades catalíticas compreendem um ou mais domínios catalíticos e um domínio doquerina. Além disso, algumas subunidades catalíticas também podem conter CBDs ou CBMs. Fonte: Bayer *et al*., 1994.

A produção de celulossomas por certos organismos apresenta algumas vantagens com relação à eficácia da hidrólise da celulose:

- ✓ O sinergismo é otimizado pela razão correta entre os componentes, a qual é determinada pela composição do complexo;

- ✓ A absorção não produtiva é evitada pelo ótimo espaçamento dos componentes trabalhando juntos de forma sinérgica;

- ✓ A competitividade para ligar-se a um número limitado de locais de ligação é evitada através da ligação do complexo como um todo a um

único local através de um domínio forte, porém com baixa especificidade;

- ✓ A interrupção da hidrólise pela depleção de um tipo estrutural de celulose no local da absorção é evitada pela presença de outras enzimas com diferentes especificidades (Schwarz, 2001).

2.4.1.1. A subunidade scaffoldin

O *scaffoldin* (ou proteína de integração celulossomal) de *C. cellulovorans* foi o primeiro a ser sequenciado, em 1992. Nesse trabalho pioneiro, a função de ligação à celulose foi reconhecida, mas o significado dos elementos repetidos ainda era desconhecido na época. Sua relação com as sequências duplicadas de enzimas celulossomais foi compreendida mais tarde quando um segundo *scaffoldin*, derivado de *C. thermocellum*, foi sequenciado (Gerngross *et al*., 1993).

Até o momento, foram descritas as subunidades *scaffoldin* de quatro espécies de *Clostridium*. Essas subunidades são polipeptídeos modulares muito grandes, contendo um módulo de ligação aos carboidratos, um ou mais módulos hidrofílicos conservados de função desconhecida, e múltiplas cópias de módulos coesinas (Bayer *et al.*, 1998).

A princípio, qualquer proteína que contenha coesina pode ser considerada um *scaffoldin*. No entanto, as evidências disponíveis sugerem que os sistemas celulossomais bacterianos podem ser categorizados em dois tipos principais:

aqueles que exibem múltiplos tipos de *scaffoldins* interagindo e aqueles que contem um único *scaffoldin* (Bayer *et al*., 2004).

Nos sistemas celulossomais simples, como o de *C. cellulovorans* (figura 2.16), o *scaffoldin* contém um único CBM, um ou mais módulos hidrofílicos e numerosas coesinas (de 5 a 9). Esse tipo de *scaffoldin* é chamado de *scaffoldin* primário, o qual incorpora as doquerinas que carregam as enzimas formando um complexo. Em vários casos, esses celulossomas simples estão associados com a superfície celular, mas os mecanismos moleculares responsáveis por isso ainda não estão claros. É possível que os módulos hidrofílicos exerçam algum papel na ligação do celulossoma à parede celular.

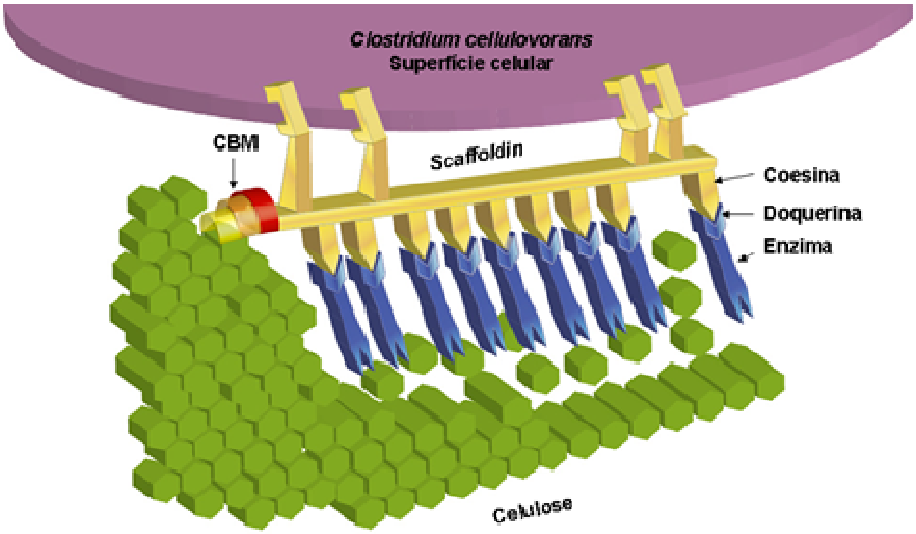


Figura 2.16 – Modelo esquemático da arquitetura celulossomal de *C. cellulovorans* (sistema celulossomal simples). Adaptado de: Hyeon *et al.,* 2013.

Já nos sistemas celulossomais complexos, como o de *C. thermocellum* (figura 2.17), mais do que um *scaffoldin* se unem de várias formas para produzir uma arquitetura complexa. Porém, a estrutura básica é formada por um *scaffoldin* primário, o qual incorpora as subunidades enzimáticas diretamente no celulossoma

e, geralmente, possui um único CBM; e uma proteína de ancoragem para ligação do celulossoma à superfície celular, assim como *C. cellulovorans* (Bayer *et al*., 2004).

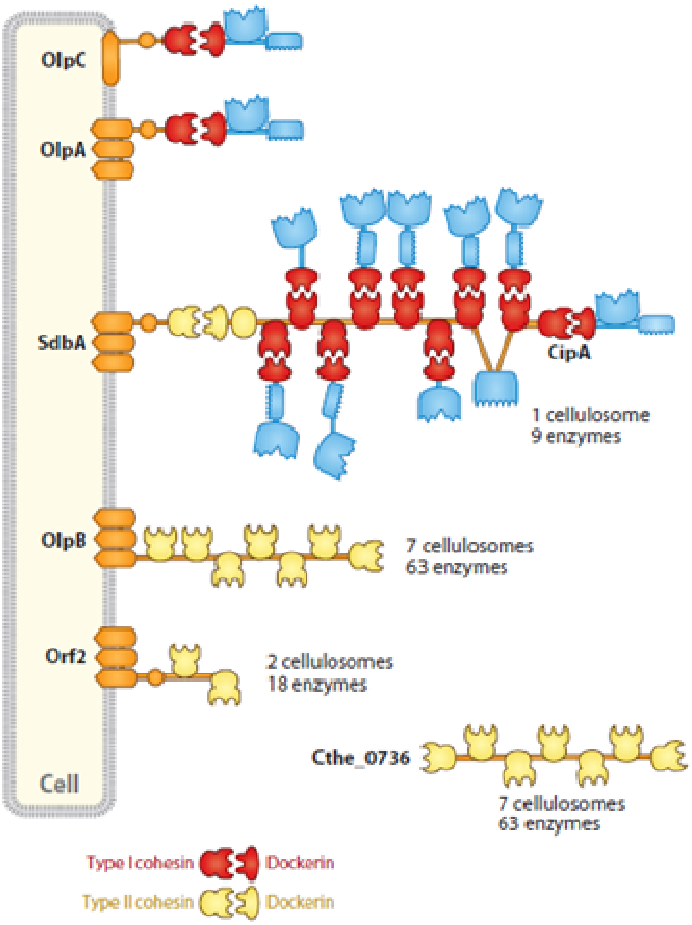


Figura 2.17 – Modelo esquemático da organização do celulossoma de *C. thermocellum* (sistema celulossomal complexo). O *scaffoldin* CipA contem 9 enzimas e pode se ligar à coesina da proteína de ancoragem SdbA ou à coesina da proteína Cthe_0736. As proteínas OlpB, Orf2 e Cthe_0736 contem várias coesinas, contribuindo para a formação dos policelulossomas. Fonte: Fontes & Gilbert, 2010.

O modelo de celulossoma de *C. thermocellum* (figura 2.17) consiste de uma doquerina individual contendo enzimas integradas nas 9 coesinas do *scaffoldin* primário. Um conjunto de proteínas de ancoragem possuem 1 (SdbA), 2 (Orf2) e 7 (OlpB) coesinas, respectivamente, para ligação do número correspondente de *scaffoldins* primários CipA e suas enzimas complementares à superfície celular, formando assim os policelulossomas.

2.4.1.2. Os módulos coesina e doquerina

Os módulos coesinas são os principais blocos de construção dos *scaffoldins*, os quais, por sua vez, são responsáveis pela organização das subunidades celulolíticas nos complexos multienzimáticos (celulossomas). O *scaffoldin* do celulossoma de *C. thermocellum* contém nove módulos coesinas muito similares, separados um dos outros por segmentos de ligação (Shimon *et al*., 1997).

Os módulos doquerinas têm como função ancorar as subunidades catalíticas ao *scaffoldin*. Todos os módulos doquerinas descritos até o momento consistem de uma sequência duplicada de 22 aminoácidos, conectados por 9 a 16 resíduos de ligação (Pagès *et al.*, 1997). Experimentos com doquerinas recombinantes truncadas mostraram que ambos segmentos são necessários para a ligação (Nakar *et al*., 2006).

Os primeiros 12 resíduos de cada segmento duplicado revelam homologia com o motivo em mão EF (*EF-hand*)[3] encontrado em uma grande família de proteínas ligantes de cálcio como a calmodulina. Este fato foi corroborado pela demonstração de que a interação coesina-doquerina é dependente de cálcio. Outros estudos também demonstraram que o cálcio é necessário para induzir o dobramento da proteína e para estabilizar a estrutura terciária (Fontes & Gilbert, 2010).

[3] Motivo em mão EF: um dos motivos espaciais adquiridos pelas proteínas durante seu enovelamento para aquisição da estrutura nativa. Contem uma topologia *helix-loop-helix*, muito parecida com a do formato entre o polegar e o dedo indicador da mão humana, na qual os íons cálcio se ligam.

A interação coesina-doquerina é uma das interações proteína-proteína mais forte conhecida na natureza e é responsável pela reunião das partes do celulossoma, bem como pela sua adesão à superfície celular (Pinheiro, 2009).

Apesar da total similaridade nas sequências das coesinas de diferentes espécies, a ligação destas com as doquerinas é altamente específica. Por exemplo, as coesinas do celulossoma de *C. thermocellum* não interagem com as doquerinas de *C. cellulolyticum* e vice-versa (Schwarz, 2001).

Os íons cálcio são críticos nessa interação devido à presença do motivo ligante de cálcio do módulo doquerina, o qual lembra o motivo mão EF (*EF-hand*) das proteínas ligantes de cálcio dos eucariontes (Nakar *et al*., 2006).

Pagès *et al.* (1997) propuseram que existe uma correlação com posições definidas dentro da subunidade doquerina que parecem determinar a especificidade dessa interação. Os pesquisadores examinaram duas espécies (*C. thermocellum* e *C. cellulolyticum*) e verificaram que essas posições eram constantes dentro de uma mesma espécie, mas divergentes entre elas.

Para confirmar essa hipótese, trabalhos subsequentes tentaram converter a especificidade da doquerina de uma espécie para a de outra espécie. A mutagênese dos resíduos que se acreditava serem responsáveis por essa característica levou a criação de uma nova especificidade, com as doquerinas mutadas reconhecendo as coesinas da espécie oponente. Contudo, essas doquerinas ainda continuavam reconhecendo as coesinas da mesma origem. Essa observação sugeriu que outros resíduos também tinham um papel importante na exclusividade da interação.

Estudos de mutagênese realizados a seguir revelaram que vários resíduos de aminoácidos estavam envolvidos no reconhecimento, com as mutações resultando na perda da atividade de ligação sem, contudo, acontecer a conversão interespecífica (Pinheiro, 2009).

O objetivo final dessas pesquisas visa a compreensão da interação coesina-doquerina para a própria arquitetura do celulossoma e seu significado com relação à tolerância dos organismos produtores de celulossomas na natureza. Além disso, se o controle dessa interação for compreendido, seria possível utilizar esses componentes com propósitos biotecnológicos e nanotecnológicos (Nakar *et al*., 2006).

2.4.1.3. O módulo de ligação aos carboidratos – CBM

Primeiramente, conhecidos como domínios de ligação à celulose (*cellulose-binding domains - CBDs*), devido a que os primeiros exemplos dessas proteínas foram encontrados ligados à celulose cristalina, mais tarde foram denominados módulos de ligação aos carboidratos (*carbohydrates binding modeule – CBM*) para refletir a diversidade das possíveis ligações (Pinheiro, 2009).

A função essencial dos CBMs foi demonstrada pela primeira vez por Lee & Brown (1997) para a exoglucanase (celobiohidrolase) CBHI de *Trichoderma reesei*. Os autores concluíram que sem o módulo, a CBHI estaria restrita às regiões mais acessíveis da celulose e rapidamente esgotaria os locais disponíveis no substrato. Da mesma forma, a deleção dos CBMs não teria efeito sobre os substratos solúveis, onde os possíveis locais de atividade sobre o substrato não são limitados. Nos anos

seguintes, esse comportamento foi confirmado para outras celulases pela caracterização de mutantes geneticamente engenheirados (Schwarz, 2001; Mattinen *et al.*, 1997).

Em termos de função, podem ser distinguidos três tipos de CBMs. O tipo A se liga especificamente à superfície plana da celulose cristalina através dos resíduos aromáticos que se situam no mesmo plano, enquanto o tipo B se liga a uma única cadeia de polissacarídeos, posicionando-se dentro de um sítio. Este é o caso dos CBMs que se ligam aos polissacarídeos da hemicelulose. Nesses CBMs, os resíduos de ligação se adaptam geometricamente dentro do sítio às restrições estereoquímicas do substrato. Em contraste com os CBMs do tipo A, os do tipo B, em grande parte, mostram uma mesma especificidade por carboidrato assim como os módulos catalíticos aos quais eles estão ligados. Uma terceira classe, chamada tipo C, se liga a oligossacarídeos solúveis. Os CBMs encontrados nos componentes dos celulossomas pertencem aos tipos A e B (Alzari & Béguin, 2006).

As seqüências dos CBMs estudados até o momento estão agrupadas em 59 famílias, de acordo com a similaridade de suas sequências de aminoácidos. Uma lista continuamente atualizada está disponível no endereço eletrônico http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html.

Provavelmente, o CBM mais importante do celulossoma é o CBM do tipo A sustentado pelo *scaffoldin*, o qual é responsável por acoplar as várias glicosil hidrolases à fibra de celulose. As estruturas tridimensionais para os CBMs dos *scaffoldins* de *C. thermocellum* e *C. cellulolyticum* já foram determinadas, mostrando-se muito similares. A estrutura inclui um íon cálcio, o qual não participa

diretamente na ligação e, provavelmente, tem um papel estrutural. Os CBMs do tipo B também são comuns nos celulossomas, particularmente entre as hemicelulases (Alzari & Béguin, 2006).

Os CBMs dos celulossomas exibem uma afinidade menor pela celulose cristalina, porém com um comportamento de ligação voltado para um espectro mais amplo de locais sobre a celulose, o que os torna especialmente úteis em aplicações industriais (Schwarz, 2001).

2.4.1.4. Componentes catalíticos do celulossoma

A multiplicidade dos componentes enzimáticos nos sistemas celulásicos já é conhecida há décadas. Foi E. T. Reese quem originalmente sugeriu a presença de pelo menos dois componentes em *Trichoderma reesei* – o fator amorfogênico C_1 e o componente hidrolítico C_x. Desde então, o número de diferentes proteínas envolvidas no processo de degradação da celulose foi bastante ampliado. A maioria dos microrganismos celulolíticos verdadeiros conhecidos até o momento produzem pelo menos quatro ou cinco diferentes endoglucanases, uma ou duas celobiases, e duas exoglucanases complementares. Além disso, também produzem um conjunto de glicosil hidrolases necessárias para degradar e metabolizar os componentes da fração hemicelulósica da parede celular vegetal: xilanases, mananases, arabinofuranosidases, acetilxilana esterases e pectinases (Alzari & Béguin, 2006).

Desde o começo, ficou claro que a complexidade bioquímica dos celulossomas era considerável. O artigo original de Lamed *et al*. (1983) que estabeleceu a existência do celulossoma como um complexo biologicamente

específico relevante também mostrou que este continha pelo menos 14 componentes que podiam ser separados por SDS-PAGE[4].

Atualmente, a sequência genômica de *C. thermocellum* mostra que grande parte de suas enzimas celulolíticas se enquadra na família 9 das glicosil hidrolases (GH-9, 16 membros), seguida pela família GH-5 (8 membros). Além disso, existem dois genes codificando celulases da família 48 e um gene codificando uma endoglucanase da família 8. As famílias 6 e 7 não estão representadas. Enquanto a ausência da família 7 seria esperada, visto que a mesma é encontrada exclusivamente em fungos, a ausência da família 6 é intrigante, já que as celulases desse tipo tem sido encontradas em uma ampla variedade de microrganismos, desde fungos até bactérias Gram positivas. Com relação às hemicelulases, existem numerosos genes codificando enzimas com possíveis ou já demonstradas atividades contra os vários polissacarídeos presentes na parede celular vegetal (xilanases, liquenases, mananases, arabinofuranosidases, pectina esterase, pectato liase etc). Os grupos mais conspícuos são o das xilanases GH-10 (5 genes), das α-arabinofuranosidases GH-43 (4 genes), e das feruloil esterases (3 genes, dois dos quais estão fundidos com os genes da xilanase). Embora os dados ainda não estejam completos, os genes das glicosil hidrolases clonados de *C. cellulolyticum, C. cellulovorans* e *C. josui* parecem seguir um padrão similar (Schwarz, 2001).

Uma exoglucanase da família 48 é o principal componente catalítico nos celulossomas de *C. thermocellum, C. cellulolyticum, C. josui, C. cellulovorans* e no fungo anaeróbio *Piromyces*. A Cel48A de *C. thermocellum* foi a primeira subunidade catalítica que teve sua ação sinérgica com a subunidade *scaffoldin* CipA na

[4] SDS-PAGE: técnica utilizada para separar proteínas de acordo com sua mobilidade eletroforética.

degradação da celulose cristalina demonstrada, indicando que esta enzima é um componente chave do celulossoma. Assim como a Cel48A, a Cel48F de *C. cellulolyticum*, também foi extensivamente estudada. Ambas mostram características típicas de exoglucanases e de enzimas processivas, e suas estruturas 3-D são substancialmente equivalentes (Guimarães *et al.*, 2002; Reverbel-Leroy *et al.*1997).

As celulases da família 9 são as mais bem representadas no genoma de *C. thermocellum*, com pelo menos 16 membros diferentes. As enzimas desta família podem se comportar como endoglucanases estritas, endo/exoglucanases ou exoglucanases estritas, o que pode ser explicado pelas diferenças encontradas na forma do sítio ativo (Alzari & Béguin, 2006).

Quando o conceito de celulossoma foi cunhado há vinte anos atrás, muito pouco se sabia sobre a bioquímica deste misterioso complexo. Na época, um atraente modelo foi proposto sugerindo que os celulossomas poderiam dispensar as exoglucanases, as quais eram tidas como essenciais nos sistemas celulásicos fúngicos, alinhando as endoglucanases de tal forma que elas pudessem cortar simultaneamente a cadeia de celulose. Sabe-se agora que, de fato, os celulossomas incluem os mesmos tipos de glicosil hidrolases dos sistemas celulásicos não-complexados clássicos. Além das endoglucanases, eles contêm os dois tipos de exoglucanases que hidrolisam a celulose a partir dos terminais redutores e não-redutores da cadeia, e os sinergismos observados nos sistemas clássicos estão sendo agora reproduzidos com os componentes celulossomais, tanto na forma livre, quanto incorporados em mini-celulossomas. Em termos de estrutura e mecanismo, os componentes catalíticos dos celulossomas também diferem muito pouco daqueles dos sistemas clássicos. Eles se enquadram dentro das mesmas famílias

de glicosil hidrolases, e suas atividades e especificidades são moduladas por características estruturais similares (Alzari & Béguin, 2006).

2.5. Mecanismo da hidrólise da celulose

A partir do trabalho pioneiro de Reese, em 1950, com *T. reesei*, vários modelos para o mecanismo da hidrólise da celulose foram propostos. Todos os modelos envolviam um grupo de enzimas que convertia a celulose insolúvel a uma forma reativa (porém, ainda insolúvel) e um segundo grupo de enzimas que convertia a celulose insolúvel reativa a um ou mais produtos solúveis. O mecanismo amplamente aceito atualmente inclui as endoglucanases, exoglucanases e celobiases. Trabalhos *in vitro*, com essa mesma espécie, registraram o acúmulo de celobiose no meio quando as exoglucanases estão presentes e as celobiases não são suplementadas a níveis mais elevados do que os produzidos naturalmente pelo organismo. Esses estudos forneceram evidências diretas de que a celobiose é o principal produto da hidrólise mediada pelas CBHI e CBHII, as principais exoglucanases de *T. reesei* (Lynd *et al.*, 2006).

Está claro que os sistemas celulásicos complexos desenvolvidos pelos microrganismos anaeróbios – tanto procariontes quanto eucariontes – tem uma arquitetura diferente em relação aos organismos aeróbios. A despeito dessa profunda diferença, a hidrólise da celulose pelos anaeróbios tem frequentemente sido considerada da mesma forma que nos organismos aeróbios. Ou seja, através da liberação da celobiose pelas exoglucanases. Essa suposição é compreensível à luz dos modelos já bem estabelecidos para os organismos aeróbios, além das

observações de acúmulo de celobiose em experimentos livres de células envolvendo sistemas celulásicos anaeróbios (Lynd *et al*., 2002).

No entanto, estudos recentes sustentam a proposição de que a solubilização da celulose por *C. thermocellum* não ocorre, essencialmente, através da ação das exoglucanases. Com base em estudos de bioenergética e com o uso de marcadores, Zhang & Lynd (2005), concluíram que *C. thermocellum* assimila celodextrinas com $n \cong 4$ (grau de polimerização) durante seu crescimento sobre celulose, o que implica que os primeiros produtos da solubilização da celulose têm em média grau de polimerização de pelo menos esse valor (4).

O consumo de celodextrinas ($n \cong 4$) pode ser conciliado com as observações do acúmulo de celobiose nos experimentos livres de células envolvendo as celulases de *C. thermocellum* notando que a formação das celodextrinas a partir da celulose insolúvel acontece em taxas mais baixas do que da hidrólise de celodextrinas a celobiose. Portanto, na ausência de células, as celodextrinas reagem logo após sua formação, resultando no acúmulo de celobiose. O consumo de celodextrinas com massas moleculares maiores do que a da celobiose tem implicações significativas em relação ao consumo de energia e às estratégias ecológicas de *C. thermocellum* (Lynd *et al*., 2006).

Sabe-se que os processos metabólicos geradores de ATP (adenosina trifosfato) em *C. thermocellum* incluem a clivagem fosforolítica intracelular das ligações β-glicosídicas pelas celobiose e celoddextrina fosforilases, a via glicolítica e a ação da acetato quinase (Strobel *et al*., 1995). Já os processos metabólicos de consumo de ATP incluem o transporte do substrato, a síntese celular, a síntese de

enzimas e todas as funções envolvidas na manutenção do organismo (Zhang & Lynd, 2005).

Quanto às estratégias ecológicas, sabe-se que *C. thermocellum* atua como um primeiro agente de hidrólise da parede celular vegetal, nos ambientes em que ele é naturalmente encontrado, suprindo outros membros da comunidade microbiana com carboidratos na forma de oligômeros e produtos da fermentação. Essa espécie interage simbioticamente com outras espécies, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento das múltiplas funções encontradas nos celulossomas. A presença de enzimas degradadores da hemicelulose é um exemplo disso. A maioria dos produtos da hidrólise da fração hemicelulósica não é consumida por *C. thermocellum*. O benefício de produzir essas enzimas pode estar ligado à habilidade das mesmas 'limparem o caminho', através da remoção dessas hemiceluloses da parede vegetal, melhorando a acessibilidade dos celulossomas à celulose. Contudo, em culturas mistas é obtida uma melhor degradação das paredes vegetais do que em monoculturas, atestando a importância das interações entre os habitantes de uma comunidade microbiana, sugerindo que os componentes dos celulossomas possam ter evoluído juntamente com a maquinaria enzimática desses simbiontes (Lynd *et al*., 2006).

2.6. Metabolismo dos açúcares

Existem relativamente poucos registros descrevendo o transporte de nutrientes pelas bactérias celulolíticas anaeróbias. Strobel *et al*. (1995), desenvolveram um estudo cujos resultados demonstram claramente que o transporte e a clivagem da celobiose e celodextrinas maiores não estão diretamente

ligados entre si. Também demonstraram que as atividades das celobiose e celodextrina fosforilases não estão associadas com a membrana celular, como havia sido citado por outros autores anteriormente. A presença de dextrinas marcadas dentro da célula indicou que a celobiose e as dextrinas maiores são internalizadas, antes da clivagem fosforolítica, a qual ocorre dentro da célula.

O modelo desenvolvido pelos autores (figura 2.18) mostra o transporte e a utilização dos carboidratos em *C. thermocellum*, incorporando os elementos de transporte ativo (ATP) e a clivagem fosforilítica interna dos carboidratos com ligações glicosídicas do tipo β. De acordo com o modelo, se uma molécula de ATP é requerida para a entrada de glicose ou de outros carboidratos maiores, seriam obtidos maiores rendimentos com a utilização de oligossacarídeos em comparação ao uso dos monossacarídeos.

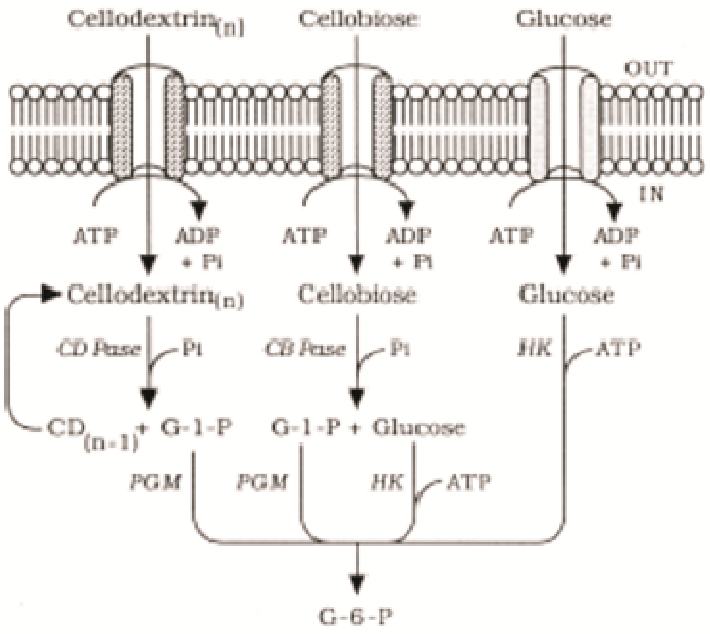


Figura 2.18 – Modelo esquemático de internalização e fosforilação dos carboidratos em *C. thermocellum*. G-1-P, glicose-1-fosfato; G-6-P, glicose-6- fosfato; Pi, fosfato inorgânico; CB Pase, celobiose fosforilase; CD Pase, celodextrina fosforilase; HK, hexoquinase; PGM, fosfoglicomutase. Fonte: Strobel *et al*., 1995.

De acordo com Ng & Zeikus (1982), após entrarem na célula as celodextrinas são fosforiladas a glicose-1-fosfato (G1P) pelas celobiose e celodextrina fosforilases e a celobiose é hidrolisada a glicose pela ação das celobiases. A glicose e a G1P são então fosforiladas a glicose-6-fosfato (G6P), pela ação da glicoquinase e da fosfoglicomutase, a qual é direcionada para o metabolismo central – via de Embden-Meyerhof-Parnas ou glicólise (figura 2.19).

Porém, no estudo realizado por Zhou *et al*. (2013), os autores verificaram, através da deleção de genes alvos, um comportamento atípico na glicólise de *C. thermocellum* quando este cresce sobre celobiose. Segundo os autores, a glicose intracelular foi fosforilada pela glicoquinase usando GTP (guanosina trifosfato) ao invés de ATP. Também não foi verificado o uso de ATP, como doador de grupos fosforil, na reação catalisada pela enzima fosfofrutoquinase (frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato). Apenas pirofosfato (PP_i) foi detectado nesta etapa. A enzima fosfoglicerato quinase (1,3-bifosfoglicerato a 3-fosfoglicerato) usou tanto GDP quanto ADP como aceptores de grupos fosforil. Não foi detectada atividade da enzima piruvato quinase, o que corrobora com a ausência da sequência gênica dessa enzima no genoma de *C. thermocellum*. A formação do piruvato a partir do fosfoenolpiruvato (PEP) se dá através de um desvio da via do malato (figura 2.20).

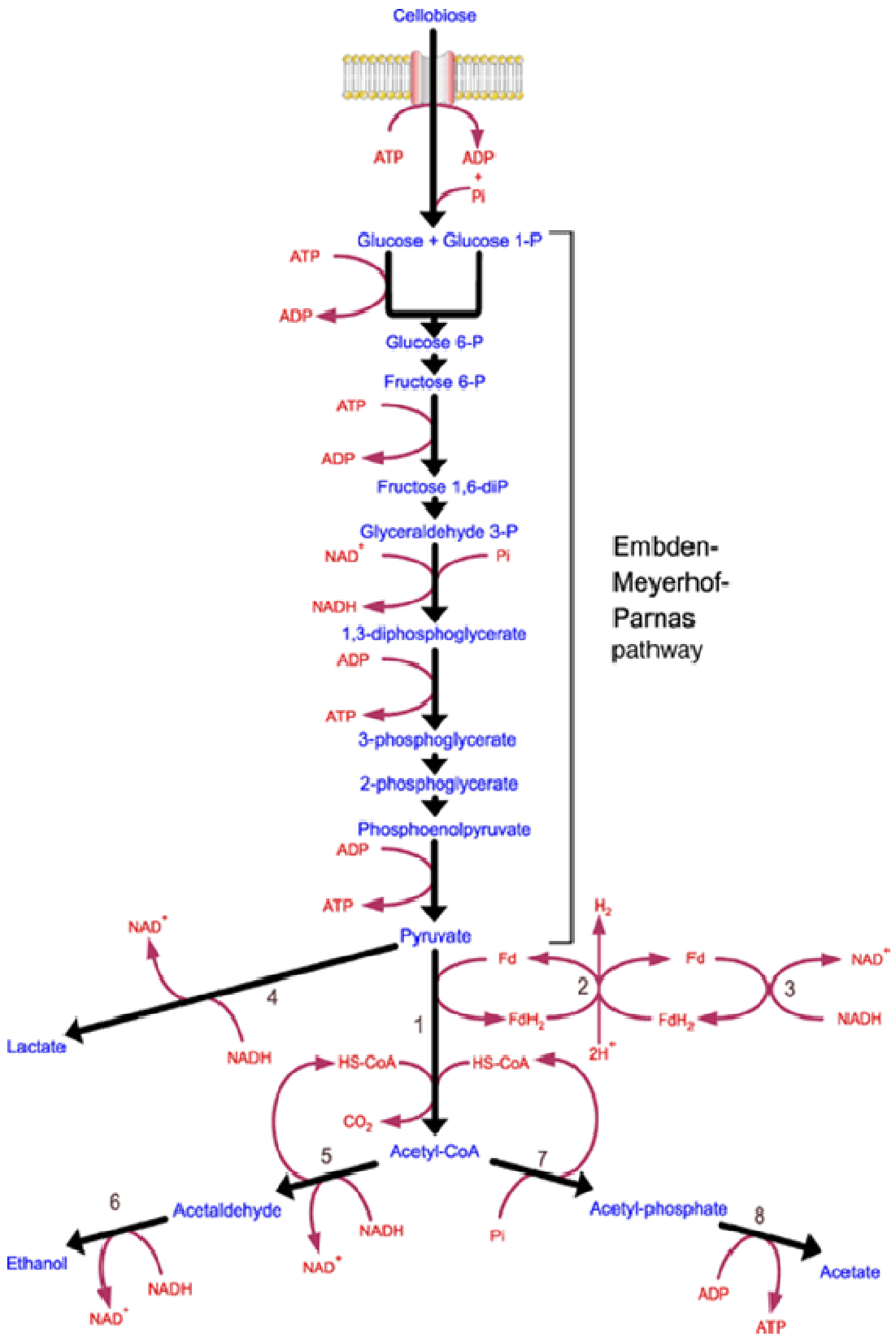


Figura 2.19 – Via catabólica da celobiose em *C. cellulolyticum.* (1) piruvato-ferredozina oxidoredutase; (2) hidrogenase; (3) NADH-ferredoxina oxidoredutase; (4) lactato desidrogenase; (5) acetaldeído desidrogenase; (6) álcool desidrogenase; (7) fosfotransacetilase; (8) acetato quinase. Fonte: Desvaux, 2005.

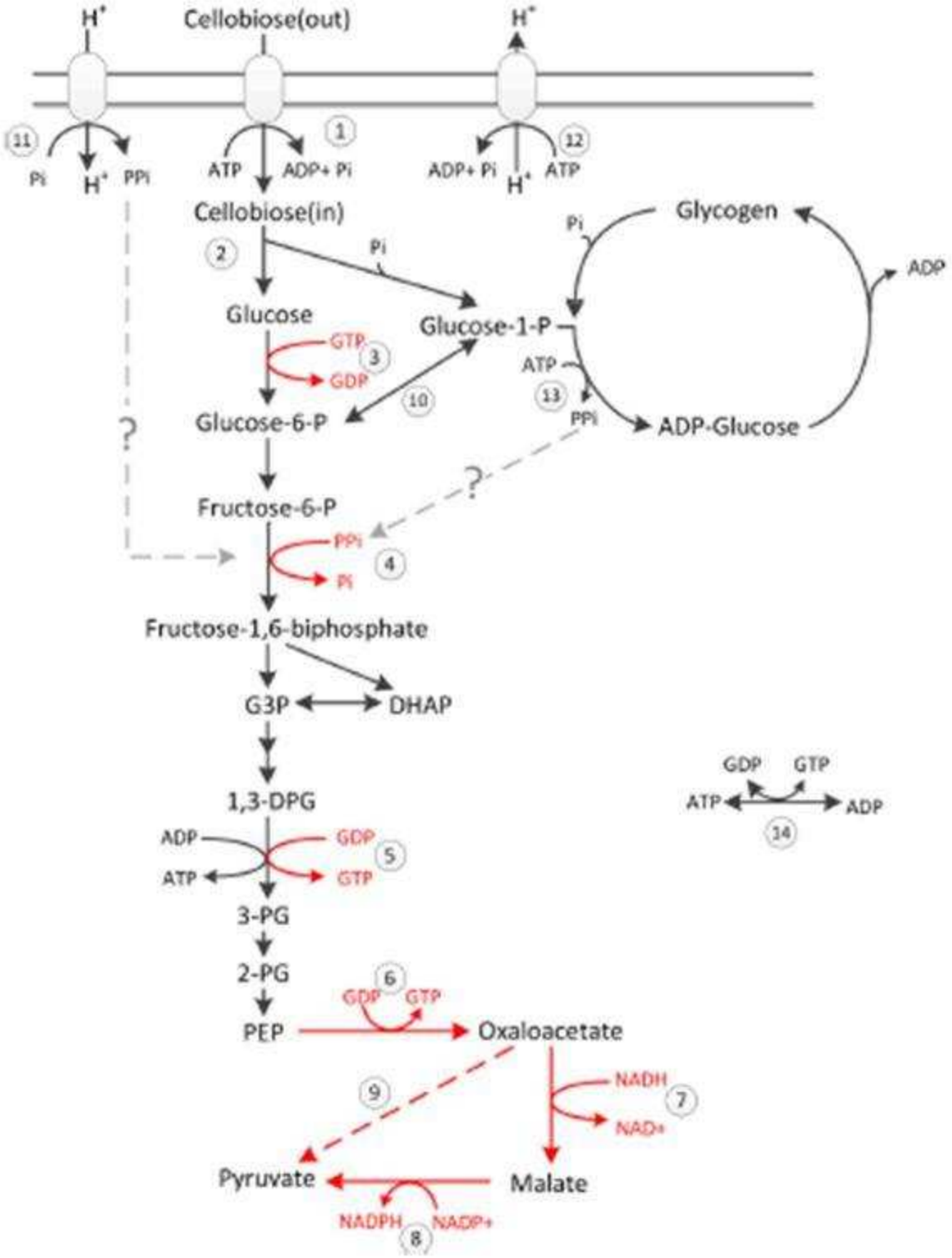


Figura 2.20 – Glicólise atípica em *C. thermocellum.* Os números nos círculos indicam as seguintes enzimas: (1) transportador ABC, (2) celobiose fosforilase, (3) glucoquinase, (4) fosfofrutoquinase, (5) fosfoglicerato quinase (6) PEP carboxiquinase, (7) malato desidrogenase, (8) enzima málica, (9) oxaloacetato descarboxilase, (10) fosfoglicomutase (11) pirofosfatase, (12) bomba de próton, (13) ADP-glicose sintase, (14) NDP-quinase. Os tracejados em cinza indicam possíveis fontes de pirofosfato na glicólise. Fonte: Zhou *et al.*, 2013.

Com base na via glicolítica proposta por Desvaux (2005), observa-se que os fluxos de elétrons e de carbono estão intimamente ligados nos clostrídios (figura 2.21). Durante a glicólise, é gerado NADH e ocorre uma segunda oxidação quando o piruvato é convertido em acetil-CoA pela piruvato-ferredoxina oxidorredutase (PFO) com a concomitante formação de ferredoxina reduzida (FD). Essa reação tioclástica[5] tem um papel chave no metabolismo visto que o acetil-CoA pode ser direcionado através de várias vias de fermentação (formação de ácido ou solvente) ou vias anabólicas como a biossíntese de ácidos graxos. A partir da FD reduzida, os elétrons podem ser transferidos para a hidrogenase, NADPH-FD oxidorredutase ou NADH-FD oxidorredutase. O NADH também pode ser reoxidado pela via do etanol e/ou pela via do lactato (Desvaux, 2006).

Normalmente, os clostrídios celulolíticos usam baixas quantidades de açúcares, o que pode ser confirmado pela prematura inibição do metabolismo e do crescimento. Considerando que muitos ecossistemas naturais raramente contêm todos os nutrientes em grandes quantidades – este é especialmente o caso dos biótopos ricos em celulose nos quais a hidrólise da celulose é um fenômeno lento – as bactérias celulolíticas estão adaptadas a crescer sobre condições de baixos níveis de açúcares solúveis. Quando cultivado em meio com altas concentrações de substrato solúvel, *C. cellulolyticum* encontra grandes dificuldades para regular seu metabolismo, o que leva ao acúmulo intracelular de nutrientes e produtos do metabolismo a níveis tóxicos. Por causa desse fato, foi sugerido que no curso da evolução, esse organismo evoluiu de forma a otimizar o catabolismo da celobiose e

[5] Reação em que ocorre a cisão de uma ligação de maneira análoga à hidrólise, exceto que os elementos de um sulfeto de hidrogénio substituído (geralmente coenzima A) são adicionados através da cisão.

o anabolismo do nitrogênio para sobreviver em ambientes pobres em nutrientes (Tardif *et al.*, 2006).

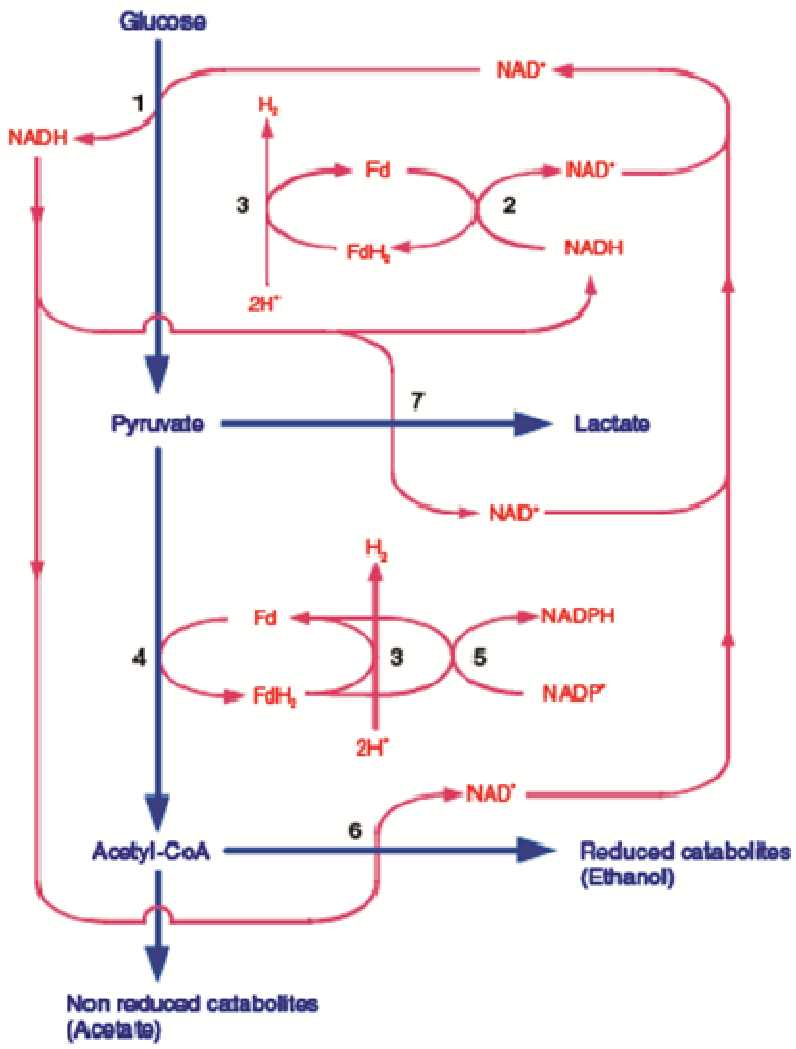


Figura 2.21 - Interações entre o fluxo de carbono (setas azuis) e o fluxo de elétrons (setas vermelhas) em *C. cellulolyticum*. (1) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; (2) NADH-ferredoxina oxidoredutase; (3) hidrogenase; (4) piruvato-ferredoxina oxidoredutase; (5) NADPH-ferredoxina oxidoredutase; (6) acetaldeído desidrogenase e alcool desidrogenase; (7) lactato desidrogenase. Fonte: Desvaux, 2006**.**

2.7. Considerações gerais

Visto que a celulose é o material orgânico mais abundante na Terra, os microrganismos envolvidos na sua degradação são de grande interesse não só do ponto de vista ecológico, por sua importância no ciclo global do carbono, como

também em termos econômicos, por seu possível uso nos processos que envolvem a conversão dos resíduos vegetais a produtos valoráveis tais como o etanol.

A produção de substâncias químicas desejadas a partir da fermentação anaeróbica da biomassa oferece uma abordagem promissora para o uso dessas biomassas residuais de composição lignocelulósica.

Contudo, a principal desvantagem do uso de microrganismos anaeróbios em condições industriais é a tolerância relativamente baixa ao etanol e ao estresse osmótico, e a perda de uma parte significativa do carbono catabolizado que se transforma em outros produtos, como o lactato, acetato e formiato (tabela 2.1), além de H_2 e CO_2, reduzindo a produtividade (Chandrakant & Bisaria, 1998; Lin & Xu, 2013).

Alguns pesquisadores vêm buscando opções de microrganismos e usando ferramentas da engenharia genética ou metabólica para transformar esses organismos de forma que não produzam ácidos orgânicos e que sejam mais resistentes a altas concentrações de etanol (Hasunuma *et al.*, 2013). No entanto, segundo Lynd *et al*. (2002), ainda não existem organismos ou consórcios de microrganismos capazes de produzir celulases nos níveis desejados e também produzir etanol com alta produtividade e altas concentrações, embora vários organismos combinem ambas funções.

Tabela 2.1 – Valores encontrados para concentração dos produtos formados, a partir da literatura para diferentes linhagens, estratégias de processo e substratos.

Linhagem	**Estratégia de Processo**	**Substrato**	**Concentração (mM)**				**Referência**
			Etanol	**Acetato**	**Lactato**	**Formiato**	
C. thermocellum I-1-B	Batelada	Celulose	512,0	48,0	94,0	20,0	Sato *et al.*, 1993
C. thermocellum JYT01	Batelada alimentada	Celulose	491,0	234,0	132,0	64,0	Xu *et al.*, 2010
C. thermocellum SS11	Batelada	Celulose	13,45	29,6	-	-	Sudha *et al.*, 1996
C. thermocellum SS12			9,6	21,8	-	-	
C. thermocellum SS13			7,8	13,7	-	-	
C. thermocellum SS14			16,3	8,2	-	-	
C. thermocellum SS15			21,1	19,8	-	-	
C. thermocellum SS16			23,9	20,0	-	-	
C. thermocellum SS17			26,3	10,7	-	-	
C. thermocellum SS18			21,7	13,7	-	-	
C. thermocellum SS19			46,7	20,8	-	-	
C. thermocellum SS20			27,4	22,5	-	-	
C. thermocellum SS21			60,8	21,1	-	-	
C. thermocellum SS22			53,8	16,8	-	-	
C. thermocellum ATCC 27405	Batelada	Cellulose	20,0	21,6	12,2	-	Özpinar & Ozkan, 2007
C. thermocellum DSM1313	Batelada	Cellulose	26,1	46,6	26,6	-	Argyros *et al.*, 2011
C. thermocellum DSM1313 e *T. saccharolyticum* ALK2			45,6	66,6	28,9	-	
C. thermocellum modificado			121,8	nd	nd	-	
C. thermocellum modificado e *T. saccharolyticum* ALK2			145,5	3,3	1,1	-	
C. thermocellum ATCC27405	Batelada	Celulose	69,5	32,0	4,0	5,0	Islam *et al.*, 2013
C. thermocellum JW20	Batelada	Celobiose	68,5	18,3	8,2	-	Freier *et al.*, 1988
Thermoanaerobacter ethanolicus 39E	Batelada	Xilose	36,2	7,0	9,2	-	He *et al.*, 2009
C. phytofermentans ATCC700394	Batelada	*Corn stover* pré-tratado	30,2	42,9	n.d.	-	Jin *et al*, 2011
C. cellulolyticum ATCC35319	Batelada	Celulose	24,0	26,0	19,0	-	Desvaux *et al.*, 2000
C. cellulolyticum CC-500F	Batelada	Celulose	11,0	40,0	95,0	-	Guedon *et al.*, 2002
C. cellulolyticum CC-pMG8			18,0	77,0	50,0	-	

n.d. – não detectado. Batelada = batelada simples.

Como pode ser observado na tabela 2.1, a otimização de um processo e/ou a modificação genética de uma linhagem podem levar a mudanças significativas nas concentrações dos produtos gerados e, por isso, vem sendo tópicos constantes de várias pesquisas nos últimos anos. Porém, para alcançar esses resultados é preciso ter um grande conhecimento sobre o metabolismo do microrganismo de escolha.

Nesse contexto, propusemos o desenvolvimento do presente estudo com a finalidade de gerar conhecimento sobre a capacidade fermentativa da linhagem selecionada, bem como sobre as enzimas produzidas pela mesma, visando seu uso, no futuro, em uma configuração de bioprocesso consolidado.

CAPÍTULO 3

SELEÇÃO DE LINHAGENS CELULOLÍTICAS DO GÊNERO *Clostridium*

3.1. Introdução

Dentro do gênero *Clostridium* Prazmowski, 1880 (coletivamente denominados 'clostrídios') encontram-se bacilos gram-positivos, anaeróbios, formadores de endoesporos, não redutores de sulfato (Collins *et al.*, 1994). Com ampla distribuição na natureza, podem ser encontrados desde o solo até o trato intestinal de humanos e animais (Robson & Chambliss, 1989). Por isso, são considerados de grande importância (1) para a saúde humana e animal, (2) na degradação anaeróbica de carboidratos simples e complexos, incluindo a celulose, (3) nos ciclos do carbono e da acidogênese, e (4) na degradação/biorremediação de complexos orgânicos (Tracy *et al.*, 2011).

O gênero é um dos maiores entre as bactérias e atualmente contem mais de 100 espécies com uma considerável diversidade fenotípica (Collins *et al.*, 1994). Dentro da classificação científica aceita atualmente o gênero situa-se dentro do Filo *Firmicutes*, Classe *Clostridia*. Esta Classe contem um grande número de ordens, famílias e gêneros e evoluiu antes do aparecimento do oxigênio livre na atmosfera da Terra a, aproximadamente, 2400 milhões de anos atrás. Portanto, os clostrídios (Ordem *Clostridiales*) podem ser vistos como os predecessores dos firmicutes aeróbicos, tais como o gênero *Bacillus* (Ordem *Bacillales*). Apesar de não poderem crescer sob aerobiose e, portanto, terem um metabolismo estritamente fermentativo,

produzindo muitos metabólitos de interesse, algumas espécies do gênero são aerotolerantes e seus endoesporos podem sobreviver por longos períodos de exposição ao oxigênio (Tracy *et al.*, 2011).

De acordo com os dados encontrados no sítio (http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/clostridium.html) da coleção de culturas da Alemanha (DSZM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), existem pelo menos 19 espécies celulolíticas de *Clostridium* (tabela 3.1), sendo 16 mesofílicas, com temperatura ideal de crescimento variando de 20 a 37°C, e três termofílicas (*C. stercorarium, C. straminisolvens* e *C. thermocellum*), podendo crescer entre 50 e 60°C. Os produtos da fermentação podem variar de acordo com as espécies, bem como os açúcares que são fermentados. Algumas espécies produzem acetato em maior quantidade, outras etanol, ou ainda butirato ou formiato.

Tabela 3.1 – Lista das espécies celulolíticas de *Clostridium* de acordo com os dados disponíveis no sítio da coleção de culturas DSZM.

Espécies celulolíticas de *Clostridium*	
C. algidixylanolyticum Broda *et al.* 2000	*C. alkalicellulosi* Zhilina *et al*. 2006
C. carboxidivorans Liou *et al.* 2005	*C. cellobioparum* Hungate 1944
C. cellulolyticum Petitdemande *et al.* 1984	*C. cellulovorans* Sleat *et al.* 1985
C. chartatabidum Kelly *et al.* 1996	*C. herbivorans* Varel *et al.* 1995
C. hungatei Monserrate *et al.* 2001	*C. lentocellum* Murray *et al.* 1987
C. papyrosolvens Madden *et al.* 1982	*C. phytofermentans* Warnick *et al.* 2002
C. polysaccharolyticum (van Gylswyk 1981) van Gylswyk *et al*. 1983	*C. saccharolyticum* Murray *et al.* 1982
C. stercorarium Madden 1983	*C. straminisolvens* Kato *et al*. 2004
C. termitidis Hethener *et al*. 1992	*C. thermocellum* Viljoen *et al*. 1926
C. xylanolyticum Rogers & Baecker 1991 emend. Chamkha *et al*. 2001	

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Levantamento bibliográfico

Para o desenvolvimento desta etapa do trabalho foi realizada uma seleção preliminar de linhagens celulolíticas, mesófilas e termófilas, do gênero *Clostridium*, citadas na bibliografia. As linhagens foram selecionadas levando em consideração a existência de dados de produção de etanol que permitissem realizar comparações com os resultados a serem obtidos ao longo do desenvolvimento do trabalho.

3.2.2. Cultivo e manutenção das linhagens selecionadas

As linhagens selecionadas a partir da literatura foram adquiridas da coleção de culturas DSMZ e foram reativadas em câmara de fluxo laminar, sem uso de câmara de anaerobiose, seguindo as orientações da própria coleção, usando o meio de manutenção e crescimento apresentado na tabela 3.2.

Para o preparo do meio todos os componentes, com exceção da celobiose (fonte de carbono) e da solução de tioglicolato de sódio ($C_2H_3NaO_2S$), foram misturados em um frasco Schott, o pH foi ajustado para 7,2 e o frasco foi levado para autoclavação a 121°C, por 15 minutos. Ao mesmo tempo a celobiose foi dissolvida em parte da água do meio e foi autoclavada separadamente para evitar a caramelização. A solução de tioglicolato de sódio também foi autoclavada em separado para ser, posteriormente, adicionada ao meio, evitando assim a formação de precipitados.

Após atingir a temperatura ambiente, o meio, a solução de celobiose e o tioglicolato de sódio foram misturados em fluxo laminar. O meio foi então estocado sob refrigeração (4°C).

No momento da reativação o meio foi distribuído em frascos de penicilina de 50,0mL, com um volume de meio estéril de 20,0mL, sob fluxo laminar e espargidos com nitrogênio, por aproximadamente 5 minutos, tampados com septos de borracha e selados com selos de alumínio, com auxílio de lacrador.

Tabela 3.2 – Composição do meio de manutenção e crescimento.

Componentes	Quantidade
K_2HPO_4	4,3g
KH_2PO_4	1,3g
$MgCl_2$ x $6H_2O$	0,5g
$CaCl_2$ x $2H_2O$	0,1g
$(NH_4)_2SO_4$	1,3g
MOPS	10,0g
Extrato de levedura	5,0g
$FeSO_4$ x $7H_2O$*	1,0mL
Resazurina*	1,0mL
$C_2H_3NaO_2S$*	10,0mL
Celobiose	6,0g
Água destilada	988,0mL

*Resazurina: solução 1,0g/L; Sulfato ferroso: 1,25mg/L; tioglicolato de sódio: 12,4g/L.

Ainda sob fluxo laminar, o local do corte da ampola com a cultura liofilizada foi marcado com uma lixa afiada, e a ampola externa foi então quebrada para a retirada da ampola interna contendo a cultura. Uma cânula de metal ligada à saída de N_2 foi inserida pela lateral do tampão de algodão da ampola interna e 0,5mL de meio, retirado de um dos frascos lacrados com o auxílio de agulha e seringa, pelas quais já havia sido passado fluxo de N_2, foram adicionados dentro da ampola pela lateral do tampão. Sob fluxo constante de N_2, o *pellet* foi sendo misturado ao meio e

a suspensão obtida foi transferida, usando a mesma agulha e seringa, para o frasco de onde o meio havia sido retirado. A partir desse frasco foram feitas duas diluições sequenciais, transferindo 1,0mL do mesmo para um segundo frasco (1:10) e, 1,0mL deste para um terceiro frasco (1:100). Os frascos foram em seguida colocados em incubadora na temperatura ótima de crescimento de cada microrganismo, sem agitação.

Após a reativação, as linhagens foram mantidas através de repiques periódicos para o meio de manutenção e crescimento (tabela 3.2), utilizando seringas descartáveis para a transferência de material entre os frascos, sem a necessidade de uma câmara de anaerobiose.

3.2.3. Observação ao microscópio eletrônico de varredura

As linhagens selecionadas foram visualizadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), utilizando a metodologia proposta por Lamed *et* al. (1997a,b) que permitiria visualizar os celulossomas formados na superfície celular. Para isso, células de cada linhagem, crescidas em celobiose, foram coletadas (1,0mL), centrifugadas e ressuspensas em NaCl 0,9%. A suspensão obtida foi filtrada em filtros de 0,22µm e lavada com solução salina 0,85%. Sobre o filtro foram aplicados 0,2mL de solução de ferritina cationizada (1,0mg/mL) e o mesmo foi deixado em repouso por 10minutos. Após, o filtro foi novamente lavado com solução salina e as células ali contidas foram fixadas com glutaraldeído *overnight*. No dia seguinte o filtro foi novamente lavado e o material desidratado em série crescente de etanol. O material foi seco pelo método do ponto crítico do CO_2, em um equipamento Bal-Tee

CPD030. A seguir o material foi montado em um suporte de alumínio e metalizado com ouro.

As etapas de desidratação (série crescente de etanol) e secagem (ponto crítico de CO_2) foram realizadas no laboratório de microscopia do Centro de Ciências da Saúde, da UFRJ, por técnico especializado. Já as etapas de montagem do material no suporte de alumínio, metalização e observação das células foram realizadas no laboratório de Bio-estratigrafia e Paleoecologia do CENPES (Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello), em dois equipamentos distintos Jeol, modelo JSM-6490LV (*C. cellulolyticum* e *C. phytofermentans*) e ZEISS, modelo EVO-40 (*C. thermocellum*).

3.2.4. Avaliação do crescimento bacteriano

3.2.4.1. Método indireto – Densidade ótica

Para a realização deste procedimento foram utilizados tubos Hach de 10,0mL aos quais foram adicionados 5,0mL do meio de manutenção e crescimento, em triplicata. Os tubos foram espargidos com N_2, para alcançar a anaerobiose, tampados com septos de borrachas e recobertos com parafilme. A seguir foi realizada a transferência de 0,5mL (10% - v/v) ou 1,0mL (20% - v/v) de meio dos frascos com as culturas previamente preparadas. Os tubos foram então fechados com a tampa padrão para tubos Hach, colocados em estantes e levados à incubadora, na temperatura ótima de crescimento de cada linhagem. A leitura das absorvâncias foi feita de hora em hora, em um comprimento de onda de 600

nanômetros (A_{600}), usando um espectrofotômetro Hach DR5000, zerando o equipamento com água.

3.2.4.2. Método direto – Massa seca

Para o método da massa seca, também realizado em triplicata, primeiramente, 3 cadinhos foram secos em estufa a 105°C até peso constante (massa inicial). Paralelamente, 3 frascos com 35,0mL de meio de manutenção e crescimento foram inoculados com cada uma das linhagens estudadas com 10% (v/v) ou 20% (v/v) de uma cultura previamente preparada. Quando o crescimento do microrganismo alcançou o final da fase exponencial, de acordo com a curva obtida pelo método indireto, foram tomados 20,0mL de cada frasco, lavados três vezes com solução salina 0,85% e então adicionados a cada um dos cadinhos. Os cadinhos foram retornados à estufa para secarem novamente até peso constante. Após a secagem, a massa final dos cadinhos foi descontada da massa inicial, para obter o total referente à biomassa celular.

Paralelamente, com os 15,0mL restantes de cada frasco, foram feitas várias diluições (2,5, 5, 10, 20, 25 e 50x). A absorvância (A_{600}) de cada diluição foi lida no espectrofotômetro Hach DR5000, em cubeta de quartzo, zerando o equipamento com água.

A partir do valor obtido para a biomassa celular, obteve-se a massa relativa para cada diluição, através de regra de três simples. Os resultados foram plotados em um gráfico de densidade ótica *vs* massa seca.

3.2.5. Avaliação comparativa das linhagens

A fim de definir com qual das espécies, previamente selecionadas, seria dada continuidade ao trabalho, foi realizado um teste de fermentação comparativo, sendo a variável de resposta o etanol, usando como fonte de carbono, a celulose purificada da J.T.Baker (#1528-1).

Ao contrário do procedimento adotado no preparo do meio de manutenção e crescimento, no meio de fermentação (tabelas 3.3 e 3.4) todos os componentes podem ser misturados antes da autoclavação, com exceção da solução de tioglicolato de sódio.

Tabela 3.3 – Composição do meio de fermentação.

Componentes	Quantidade
K_2HPO_4	4,3g
KH_2PO_4	1,3g
$MgCl_2$ x $6H_2O$	0,5g
$CaCl_2$ x $2H_2O$	0,1g
$(NH_4)_2SO_4$	1,3g
MOPS	10,0g
Extrato de levedura	5,0g
Resazurina	1,0mL
$C_2H_3NaO_2S$	10,0mL
Celulose	10,0g
Solução mineral*	10,0mL
Água destilada	979mL

*Ver tabela 3.4.

Primeiramente, foram preparados frascos de pré-inóculo (meio de manutenção e crescimento com celobiose) de onde o material foi coletado para inocular os frascos do teste de fermentação (celulose) de acordo com a fase exponencial de cada linhagem, determinada na etapa anterior.

Tabela 3.4 – Composição da solução mineral utilizada no meio de fermentação.

Componentes	Quantidade
EDTA dissódico	400mg
$MnSO_4.H_2O$	258mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	400mg
$CoCl_2 . 6H_2O$	40mg
$NiCl_2.6H_2O$	20mg
$ZnSO_4.7H_2O$	20mg
$CuSO_4.5H_2O$	3,2mg
$FeSO_4.7H_2O$	400mg
Água destilada	1000mL

O teste foi realizado em duplicata, em frascos de penicilina de 50mL, com 20mL de meio estéril espargido com N_2. A fermentação foi mantida por 72 horas com amostragens a cada 24 horas, pela retirada de frascos (total de 6 frascos para cada linhagem), para não interferir no volume e na atmosfera gerada dentro dos mesmos pela produção de CO_2 e H_2.

O volume de inóculo foi calculado para que o processo iniciasse com a mesma concentração celular, independente da linhagem e, após a inoculação todos os frascos foram levados para incubadoras rotatórias (*shaker*), a 80rpm, na temperatura ideal de cada linhagem.

A análise dos produtos gerados ao longo das 72 horas avaliadas foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando um equipamento Agilent 1260 Infinity equipado com detector RI e coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H, nas seguintes condições: fluxo de 0,7mL.min^{-1}; H_2SO_4 5mM como fase móvel; volume de injeção de 20µl; temperatura da coluna de 65°C.

3.3. Resultados e discussão

A partir do levantamento bibliográfico foram selecionadas as seguintes linhagens: *C. cellulolyticum* (ATCC 35319), *C. phytofermentans* (ATCC 700394) e *C. thermocelum* (ATCC 27405), as quais foram adquiridas da coleção de culturas DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas de Células), e reativadas de acordo com a metodologia indicada no item 3.2.2.

A tabela 3.5 apresenta as principais características das linhagens selecionadas.

Tabela 3.5 – Principais características (temperatura, pH, substrato e produtos) das espécies selecionadas.

	Temperatura (°C)	**pH**	**Principais substratos**	**Principais produtos**
C. cellulolyticum	32-35	5,2-5,5	Celobiose, celulose, glicose	CO_2, H_2, acetato, etanol, lactato, formiato
C. phytofermentans	37	6,0-9,0	Celulose, amido, xilana, arabinose, celobiose, frutose, glicose, xilose	CO_2, H_2, acetato, etanol, lactato, formiato
C. thermocellum	60-64	7,2	Celulose, celobiose, hemicelulose	CO_2, H_2, acetato, etanol, lactato

Fontes: Petitdemange *et al.*, 1984 (*C. cellulolyticum*), Warnick *et al.*, 2002 (*C. phytofermentans*), Garrity *et al.*, 2005 (*C. thermocellumi).*

As células das três linhagens foram observadas ao MEV através da metodologia proposta por Lamed *et al*. (1987a,b). De acordo com os autores, a utilização da ferritina cationizada permitiria a visualização das estruturas exocelulares (celulossomas) formadas na superfície celular as quais se apresentariam como grandes protuberâncias.

Nas fotomicrografias apresentadas nas figuras 3.1 e 3.2 é possível ver, além de protuberâncias, muitas estruturas fibrilares. Estruturas semelhantes aparecem nas fotomicrografias apresentadas por Lamed *et al.* (1987a), porém os autores não fizeram nenhum comentário a respeito.

Na fotomicrografia 3.3 não é possível identificar nenhuma protuberância e pouquíssimas estruturas fibrilares são visualizadas. Além desta amostra (*C. thermocellum*) ter sido observada em um microscópio diferente das anteriores (*C. cellulolyticum* e *C. phytofermentans*) é possível que o reagente (ferritina cationizada) não estivesse mais ativo.

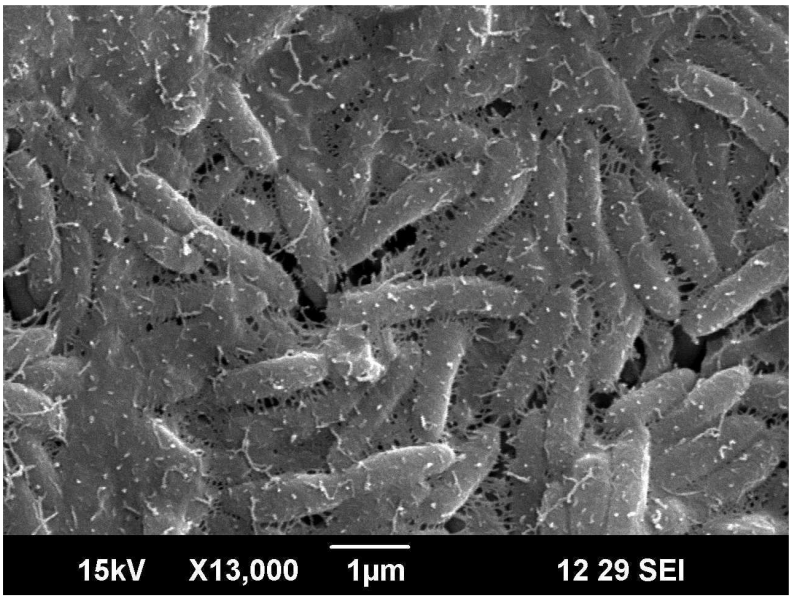


Figura 3.1 – Fotomicrografia de *C.cellulolyticum* ao microscópio eletrônico de varredura (MEV – Jeol JSM-6490LV). Aumento de 13.000x.

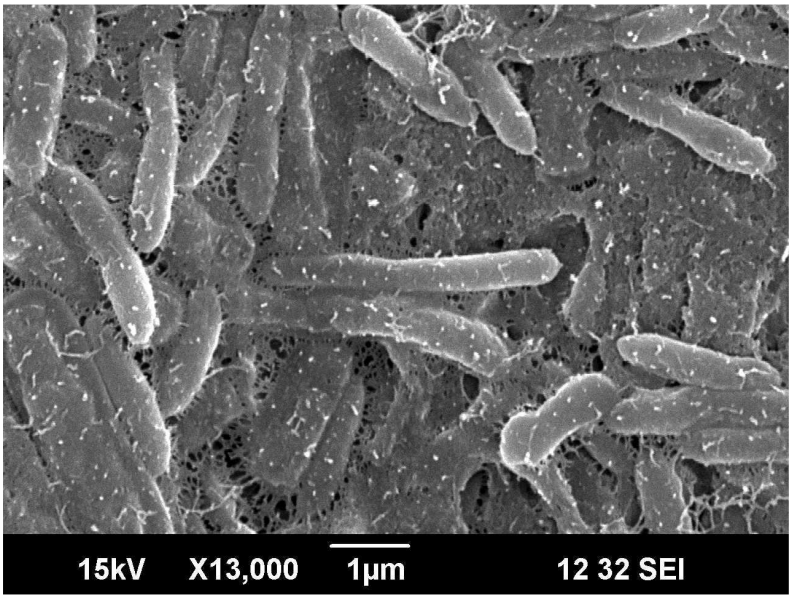


Figura 3.2 – Fotomicrografia de *C.phytofermentans* ao microscópio eletrônico de varredura (MEV – Jeol JSM-6490LV). Aumento de 13.000x.

A avaliação do crescimento bacteriano pelo método de densidade ótica é importante para definir qual o melhor momento (de preferência próximo ao final da fase exponencial) para a inoculação dos demais experimentos, bem como para a aplicação do método direto. As figuras 3.4 a 3.6 apresentam as curvas de crescimento encontradas para cada linhagem selecionada através desse método.

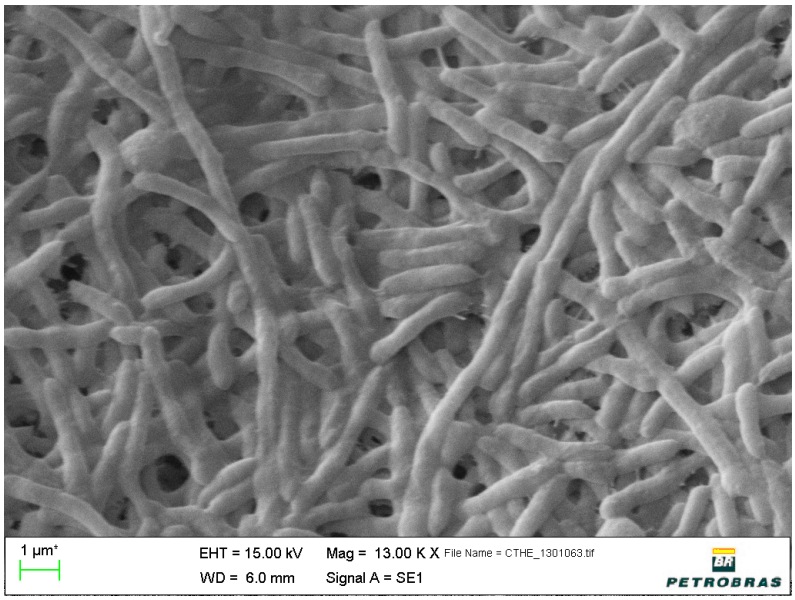


Figura 3.3 – Fotomicrografia de *C.thermocellum* ao microscópio eletrônico de varredura (MEV – ZEISS EVO-40). Aumento de 13.000x.

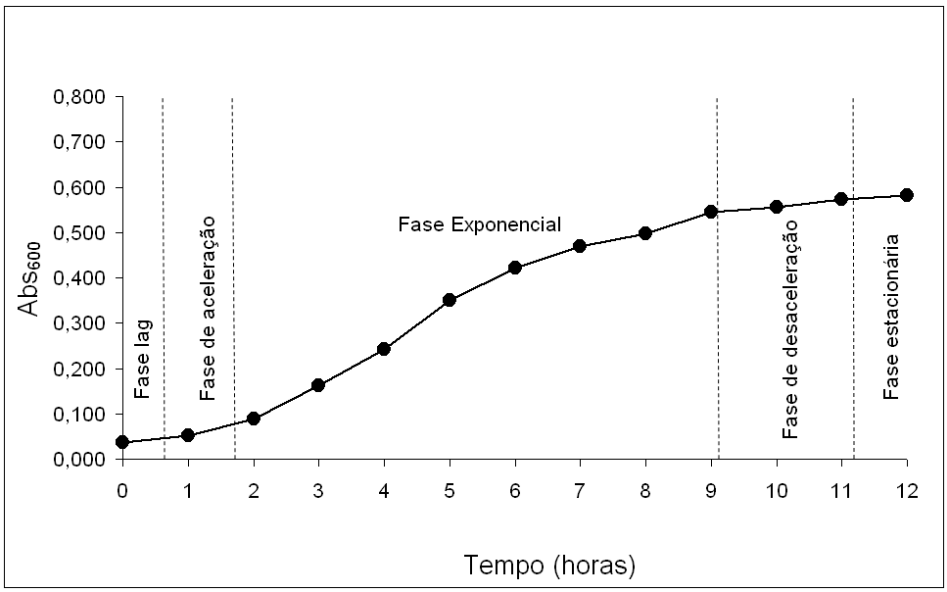


Figura 3.4 – Curva de crescimento de *C. cellulolyticum*, válida para crescimento em celobiose (6,0g/L), com inóculo correspondendo a 10% do volume inicial de meio.

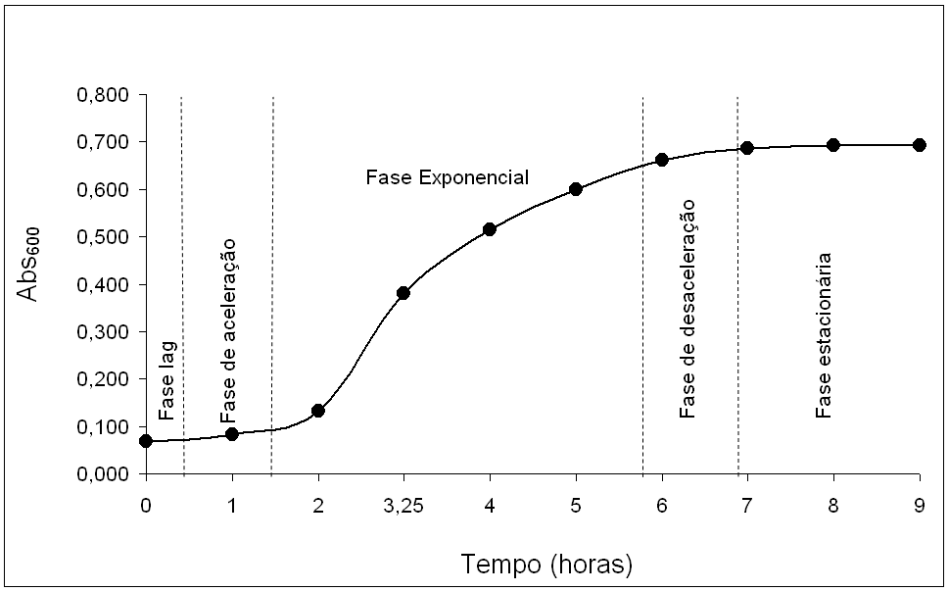


Figura 3.5 – Curva de crescimento de *C. phytofermentans*, válida para crescimento em celobiose (6,0g/L), com inóculo correspondendo a 10% do volume inicial de meio.

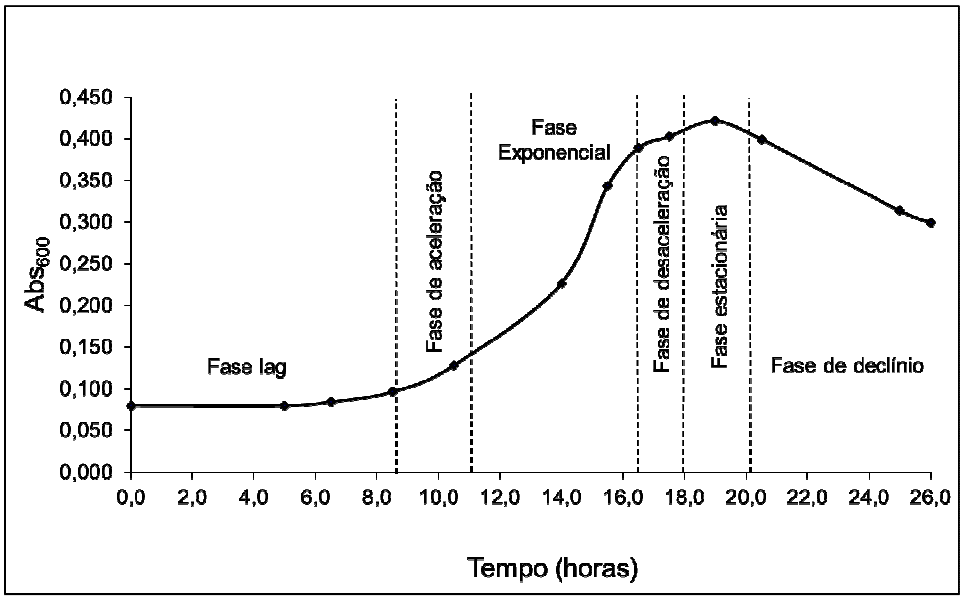


Figura 3.6 – Curva de crescimento de *C. thermocellum*, válida para crescimento em celobiose (6,0g/L), com inóculo correspondendo a 20% do volume inicial de meio.

Após a obtenção das curvas de crescimento característica de cada linhagem, foi possível aplicar o método da massa seca para avaliação da biomassa celular. A equação da reta obtida para cada linhagem passou a ser usada para o cálculo de inóculo dos demais experimentos:

C. cellulolyticum	y = 0,0322x + 0,0022	R^2 = 0,9995
C. phytofermentans	y = 0,0584x + 0,0064	R^2 = 0,9997
C. thermocellum	y = 0,5707x + 0,0057	R^2 = 0,999

A diferença encontrada na equação da reta para *C. thermocellum* pode ter sido causada pela presença do pigmento amarelo, citado no item 2.3.1. da revisão bibliográfica, o qual pode ter interferido na leitura das absorvâncias.

O ensaio de fermentação, realizado com o objetivo de definir com qual das três linhagens selecionadas seria dada continuidade ao trabalho, foi iniciado com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,65g/L. Para tanto, cada frasco do

ensaio com *C. cellulolyticum* foi inoculado com 1,0mL do cultivo de pré-inóculo. Enquanto os cultivos para os ensaios com *C. phytofermentans* e *C. thermocellum*, foram inoculados com 2,0mL e 0,8mL, respectivamente.

A tabela 3.6 apresenta a concentração final de cada um dos produtos analisados – etanol, acetato e lactato, bem como o acúmulo de açúcares no meio (celobiose e glicose), após 72 horas de processo, para cada uma das espécies avaliadas.

As figuras 3.7 a 3.9 apresentam os gráficos comparativos com as médias dos resultados obtidos para cada espécie avaliada com relação aos produtos analisados (etanol, acetato e lactato), ao longo do tempo.

Tabela 3.6 – Concentração final dos produtos e açúcares (mM), após 72 horas de fermentação com celulose purificada, para as três linhagens em avaliação – *C. cellulolyticum, C. phytofermentans* e *C. thermocellum*.

Espécie	**Concentração final de açúcares e produtos (mM)**				
	Celobiose	**Glicose**	**Acetato**	**Lactato**	**Etanol**
C. cellulolyticum	0,0	0,0	4,0±0,0[a]	3,7±0,0[a]	3,3±0,4
C. phytofermentans	0,0	0,0	4,6±0,1	4,1±0,0[a]	2,8±0,1
C. thermocellum	1,8±0,0[a]	4,1±0,0[a]	13,9±0,0[a]	18,8±0,0[a]	29,3±0,3

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção.

Os resultados alcançados com a linhagem de *C. cellulolyticum* corroboram com os resultados reportados por Guedon *et al.* (1999) para a mesma linhagem – 5,0mM de etanol, após 55 horas de fermentação em batelada simples, utilizando celobiose (8,0g/L) como substrato.

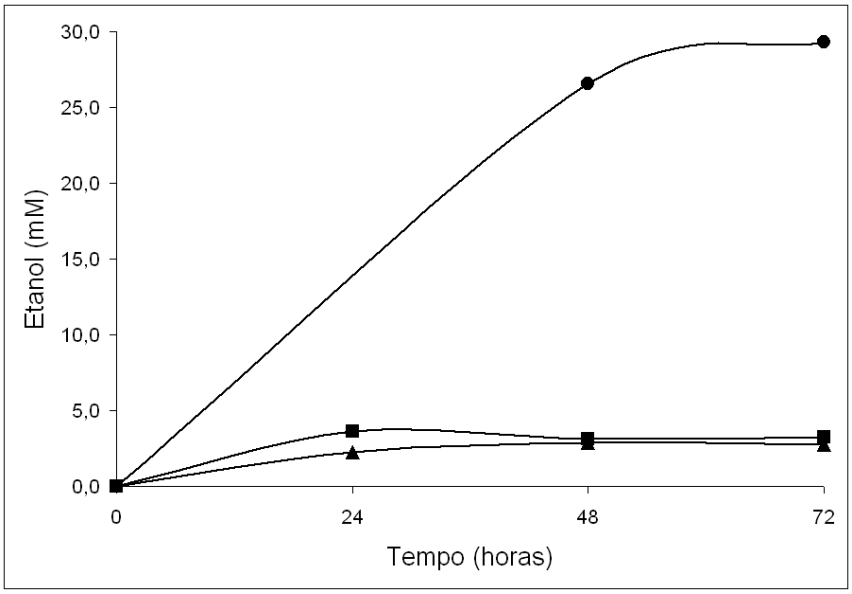


Figura 3.7 – Concentrações de etanol (mM) obtidas ao longo de 72 horas de fermentação com celulose purificada (10g/L) por *C. cellulolyticum* (*quadrados*), *C. phytofermentans* (*triângulos*) e *C. thermocellum* (*círculos*). Obs.: não foi possível efetuar as análises das amostras com 24 horas de processo para *C. thermocellum*.

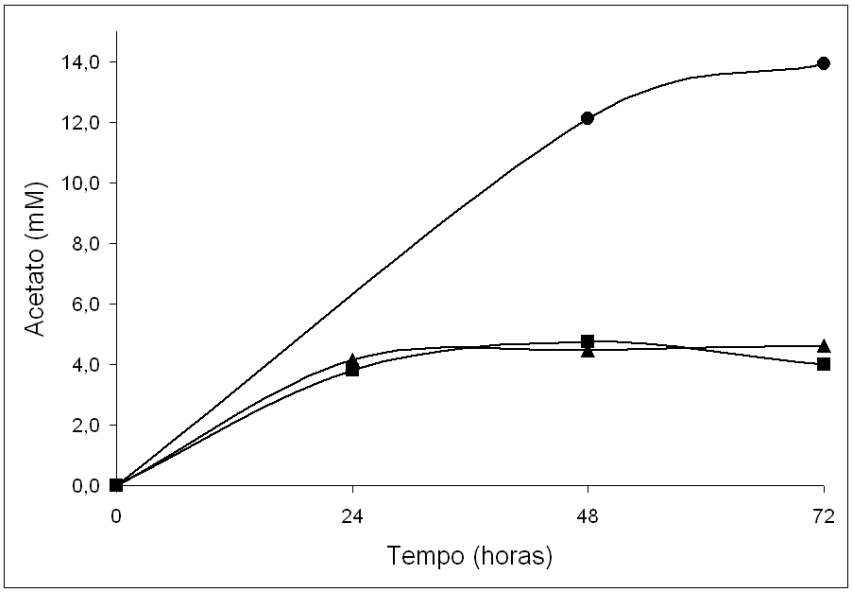


Figura 3.8 – Concentrações de acetato (mM) obtidas ao longo de 72 horas de fermentação com celulose purificada (10g/L) por *C. cellulolyticum* (*quadrados*), *C. phytofermentans* (*triângulos*) e *C. thermocellum* (*círculos*). Obs.: não foi possível efetuar as análises das amostras com 24 horas de processo para *C. thermocellum*.

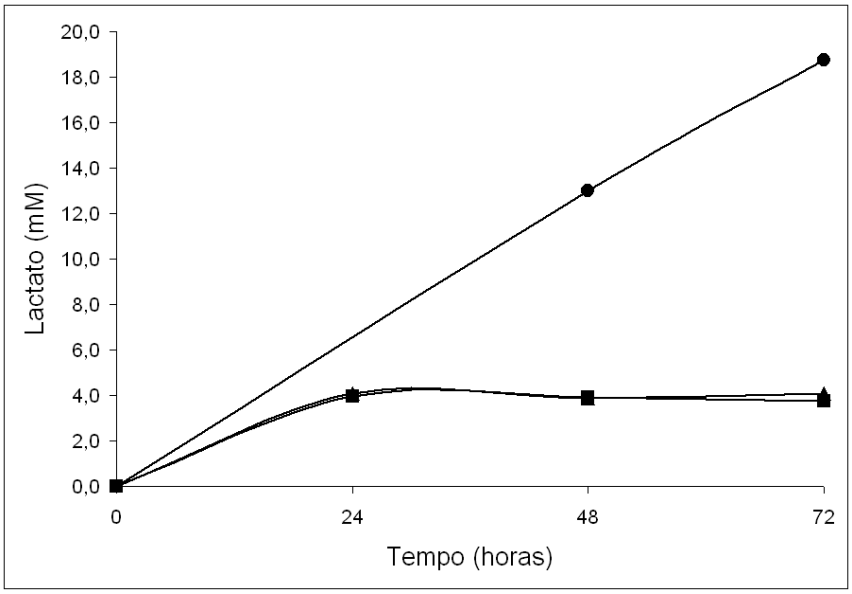


Figura 3.9 – Concentrações de lactato (mM) obtidas ao longo de 72 horas de fermentação com celulose purificada (10g/L) por *C. cellulolyticum* (*quadrados*), *C. phytofermentans* (*triângulos*) e *C. thermocellum* (*círculos*). Obs.: não foi possível efetuar as análises das amostras com 24 horas de processo para *C. thermocellum*.

Desvaux *et al.* (2000) também citam resultados similares para a mesma linhagem. Usando celulose (29,1g/L) como substrato, após 120 horas de fermentação em batelada simples, os autores obtiveram 5,6mM de etanol. Porém, os mesmos autores alcançaram 24mM de etanol com a redução da concentração de substrato para 6,7g/L. Isso indica que, possivelmente, houve inibição pelo substrato.

Já os resultados alcançados com a linhagem de *C. phytofermentans* foram inferiores aos reportados na literatura. Jin *et al.* (2011) realizaram ensaios com a mesma linhagem (ATCC 700394) usando *corn stover* (resíduos do processamento de milho) pré-tratado pelo método AFEX (ver capítulo 2) e moído (0,5mm) como substrato. Considerando uma concentração inicial de glucana de 5,0g/L eles obtiveram após 10 dias de processo uma concentração de 60,8mM de etanol.

Segundo os autores, 76% da glucana e 88,6% da xilana presentes no substrato foram convertidos a etanol.

No trabalho de Tolonen *et al.* (2011) foram realizados 3 ensaios distintos usando a mesma linhagem. No ensaio com 3,0g/L de glicose os autores chegaram a uma conversão de 77% do substrato, com uma concentração final (30 horas) de ≅24mM. Já no ensaio usando 3,0g/L de xilose (xilana obtida de madeira de bétula) foi alcançada uma conversão de 27%, com ≅10mM de etanol, após 24 horas de processo. Os autores também usaram celulose (filtro de papel Whatman n° 1) como substrato (10g/L), obtendo 68% de conversão, com uma concentração final de etanol de ≅64mM, após 30 dias de fermentação.

Os resultados alcançados neste ensaio preliminar com a linhagem ATCC 27405 de *C. thermocellum* (29,3mM) foram similares aos encontrados por Argyros *et al*. (2011), com a mesma linhagem, no mesmo tempo, porém usando celulose microcristalina (Avicel®) como substrato (28,6mM).

Já Balusu *et al.* (2004) obtiveram 46,7mM de etanol em 5 dias de fermentação, usando 4,0g/L de celulose (filtro de papel Whatman n° 1), com a linhagem SS19. Porém, após otimização da composição do meio de fermentação os autores conseguiram melhorar o rendimento do processo obtendo 69,7mM de etanol.

Da mesma forma, Rani *et al.* (1997) obtiveram 68,6mM de etanol após 5 dias de fermentação, usando 8,0g/L de celulose (filtro de papel Whatman n° 1).

Porém, o ensaio foi realizado com uma co-cultura de duas linhagens distintas de *C. thermocellum* – SS21 e SS22, e com a adição de gás hidrogênio (1,0atm).

Resultados superiores podem ser encontrados na literatura para *C. thermocellum*, porém todos se referem a linhagens geneticamente modificadas. Como exemplo, podemos citar o resultado alcançado por Argyros *et al*. (2011) com a linhagem M1570 – 121,6mM de etanol. Essa linhagem foi obtida por evolução dirigida (2000 horas) da linhagem modificada geneticamente com deleção dos genes *ldh* (lactato desidrogenase) e *pta* (fosfotransacetilase). A evolução dirigida foi feita por consecutivas transferências para concentrações graduais de Avicel®, de 10g/L até 60g/L.

3.4. Conclusões parciais

Com base nos resultados apresentados na tabela 3.6 e na figura 3.7, *C. thermocellum* (ATCC 27405) foi a linhagem selecionada para dar continuidade ao trabalho, tendo em vista sua capacidade de produzir etanol em níveis mais elevados dos que as demais linhagens avaliadas.

CAPÍTULO 4

IMPACTO DO SUBSTRATO SOBRE A COMPOSIÇÃO DO CELULOSSOMA DE *C. thermocellum* ATCC 27405

4.1. Introdução

C. thermocellum é um dos microrganismos que degrada a celulose através de um grande polipeptídeo multifuncional (de 2 a 16.000 kDa) que reúne enzimas extracelulares e proteínas estruturais, chamado celulossoma. A quantidade de celulossomas produzidos por *C. thermocellum* pode variar consideravelmente (Roberts *et al.*, 2010) bem como sua constituição em resposta a condições específicas como disponibilidade ou tipo de substrato (Raman *et al.*, 2011).

Sendo assim, esta parte do trabalho teve como objetivo analisar a composição do celulossoma quando a linhagem selecionada – *C. thermocellum* (capítulo 3) cresce sobre bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído. Para tal, foram usadas ferramentas da genômica e da proteômica.

4.1.1. Genômica

A genômica funcional é o estudo da função dos genes através da medição paralela de sua expressão, cujo objetivo final é associar a função de cada gene de um determinado organismo com sua regulação em diferentes condições (Cerqueira, 2004).

Entre os recursos já desenvolvidos para implementar a genômica funcional, o microarranjo de DNA foi escolhido, nesta etapa do trabalho, para analisar o genoma total de *C. thermocellum* e investigar, especificamente, quais genes para glicosil hidrolases são expressos de forma diferenciada, durante a fase exponencial de crescimento celular, quando este cresce sobre bagaço pré-tratado, em comparação com seu crescimento sobre celobiose.

Neste caso, a composição dos celulossomas está sendo considerada como a 'linha de base' em termos de composição dos complexos. Sabe-se que a produção de celulossomas é constitutiva em *C. thermocellum* e que a natureza do substrato parece ditar a composição dos mesmos (Bayer *et al.*, 2000). Isso explicaria porque mesmo crescendo sobre seu açúcar primário (celobiose) e, portanto, sem ter necessidade do uso de enzimas para a degradação da celulose, *C. thermocellum* continua formando celulossomas em sua superfície celular.

Os microarranjos de DNA consistem em um conjunto de sondas de ácidos nucléicos imobilizados em uma superfície sólida, geralmente vidro ou uma membrana de náilon ou nitrocelulose. As amostras a serem analisadas são convertidas para uma população de ácidos nucléicos marcados com fluoróforos. Estas são colocadas em contato com a lâmina carimbada com os ácidos nucléicos sob condições definidas para que se dê a hibridização pela complementaridade das fitas simples, formando fitas duplas. O número de fitas duplas formadas reflete o número relativo de cada amostra específica marcada (Cheung *et al.*, 1999).

Através da medição dos sinais emitidos pelos fluoróforos de cada *spot* hibridado, a relativa abundância das sequências específicas de cada amostra pode ser determinada (Cheung *et al.,* 1999).

A leitura do sinal é feita por um *scanner* óptico constituído por *lasers* que emitem diferentes comprimentos de onda, apropriados para excitar os fluoróforos que então emitem fluorescência detectada pelo aparelho. A análise das imagens obtidas desses sinais é feita por *softwares* especializados que extraem os dados das lâminas lidas pelo *scanner.*

4.1.2. Proteômica

Embora importante, a análise das sequências de nucleotídeos nem sempre reflete uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, consequentemente, de atividade biológica (Rocha *et al.*, 2005).

Para avaliar quais proteínas estão sendo expressas diferencialmente quando a linhagem selecionada cresce sobre bagaço pré-tratado foram selecionadas três técnicas distintas: análise em gel bidimensional, proteômica quantitativa por espectrometria de massas e 1D SDS-PAGE analítica.

Com o uso dessas técnicas buscou-se elaborar um mapa global de todos os produtos gênicos envolvidos na degradação da celulose, direta ou indiretamente, presentes nas células no momento da coleta do material.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Cultivo do microrganismo

A linhagem selecionada – *C. thermocellum* ATCC 27405, foi crescida em meio de manutenção e crescimento (tabela 3.2, capítulo 3) e as células foram usadas para inocular (10% v/v) frascos de penicilina de 170mL, com 100mL de meio de fermentação (tabelas 3.3 e 3.4, do capítulo 3), usando como substrato bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (10g/L, base seca).

O processo de pré-tratamento do bagaço utilizado para estes ensaios foi realizado com uma relação sólido:líquido de 1:2, usando ácido sulfúrico 1% (v/v), durante 30 min, a 121°C, em reator de 80L com agitação, na planta piloto do CENPES (Centro de Pesquisas da Petrobras), de acordo com a patente Petrobras PI0605017-4.

Após inoculação os frascos foram incubados *overnight* (≅15 horas) em estufa rotatória (*shaker*) a 60°C e 80 rpm. A seguir 10% do volume do frasco foi transferido para um novo frasco com o mesmo meio e nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido seis vezes, com a finalidade de adaptar o microrganismo ao substrato e propiciar a expressão de enzimas específicas para degradá-lo.

As células do último ciclo foram usadas para alimentar dois biorreatores instrumentados (Sartorius Stedim Biotech, Biostat A plus), com vaso encamisado de 2L (volume total). Os vasos foram autoclavados com 1,3L de meio de fermentação cada, usando bagaço pré-tratado (10g/L) como substrato.

Após esfriarem, os biorreatores foram colocados nos suportes, os controles foram ligados, foi adicionada a solução de tioglicolato de sódio estéril, e ligado o fluxo de N_2. Após atingirem a anaerobiose (verificada pela mudança da coloração do meio) foi feita a inoculação (10% v/v), com o inóculo previamente adaptado, e iniciou-se o processo a 60°C, 150rpm e controle de pH em 7,2±0,1.

O mesmo processo em biorreatores foi realizado usando celobiose (10g/L) como substrato, sem necessidade de realizar os ciclos de adaptação das células.

Os cultivos foram realizados junto à empresa Designer Energy (Israel) e os materiais gerados (bagaço pré-tratado e celobiose) foram usados para ambas as análises – genômica e proteômica.

4.2.2. Análise genômica

4.2.2.1. Extração de RNA total

A extração do RNA foi realizada através do uso de um composto fenólico – reagente Trizol, a partir das células coletadas no meio da fase exponencial de crescimento de *C. thermocellum* sobre bagaço pré-tratado e celobiose, de acordo com o protocolo 1, do apêndice A. Além da etapa de lise celular com Trizol, são apresentadas no mesmo protocolo as etapas de separação, purificação e tratamento do RNA com DNAse.

Para verificar a integridade do RNA extraído, o material foi testado no equipamento *Bioanalyzer 2100* da Agilent, para determinar a qualidade e quantidade de amostra.

Para avaliar funcionalmente os RNAs para os testes de microarranjo de DNA, foram construídas fitas simples de DNA complementar (cDNA), através do processo conhecido como *RT-PCR* (protocolo 2, apêndice A). Os produtos obtidos por *RT-PCR* foram aplicados em gel de agarose a 1% (protocolo 3, apêndice A), corados com brometo de etídio e visualizados no equipamento BioDoc-It Imaging System (UVP).

Ambos procedimentos (*Bioanalyzer* e *RT-PCR*) foram usados para assegurar que o RNA extraído estava em boas condições para a marcação do cDNA e hibridização. Com exceção do procedimento no *Bioanalyzer*, realizado no Instituto Weizmann (Israel), todos os demais foram realizados nas dependências da empresa Designer Energy (Israel).

As amostras coletadas (em duplicata) e avaliadas foram estocadas a -80°C, até o momento do envio para a empresa NimbleGen, na Islândia, onde a técnica de microarranjo de DNA foi aplicada.

4.2.2.2. Microarranjo de DNA

Na empresa contratada para a realização desta etapa do trabalho foi dado seguimento à confecção das placas com os arranjos, segundo seus próprios protocolos (formato 4x72K – com o genoma total de *C. thermocellum* – 3191

sequências representadas por 6 sondas de 45 a 60 unidades de bases (45-60*mer*), com 4 cópias de cada sonda), à síntese do DNA complementar (*cDNA*) das amostras enviadas e à marcação do cDNA com o fluoróforo Cy3 (fluorocromo cianina 3).

Hibridizações, lavagens das placas, *scanning*, coleta de dados e normalização dos mesmos foram realizados conforme metodologias da NimbleGen. Versões resumidas desses protocolos e suas características podem ser acessadas em: http://www.nimblegen.com/products/expression/index.html.

4.2.2.3. Análise de dados

A complexidade dos procedimentos técnicos de um experimento de microarranjo se caracteriza pela presença de diferentes fontes de erro sistemático, as quais contribuem para a modificação dos valores de intensidade das sondas (Cerqueira, 2004).

Para atenuação desses erros sistemáticos foi realizada uma etapa de normalização dos dados através do algoritmo denominado *Robust Multi-Array Analysis (RMA)*.

Os valores referentes à intensidade de cada uma das 72000 sondas imobilizadas nas placas foram analisados e os valores de intensidade referentes às 6 sondas de cada gene foram transformados em um único valor de intensidade final, para cada réplica, dentro de cada amostra analisada (bagaço pré-tratado e celobiose). Ao final da análise, obteve-se um valor numérico relativo à quantidade

momentânea de mRNA da amostra alvo para cada um dos genes, em escala log2, para cada amostra analisada.

Com os valores obtidos para cada réplica foram traçados diagramas (*scatterplots*) para verificar a correlação da expressão diferencial entre as réplicas de cada amostra (bagaço e celobiose).

A seguir, foram obtidos os valores de regulação relativos para a amostra crescida em bagaço pré-tratado (BAG) em relação à amostra crescida em celobiose (CB). Para isso a média dos dados normalizados para as réplicas BAG foi dividida pela média dos dados normalizados para as réplicas CB. Esse procedimento foi realizado para cada gene.

Todos os genes que tivessem seus valores de expressão relativos na amostra BAG duas vezes superiores (≥2,0) ou duas vezes inferiores (≤0,5) em relação à amostra CB foram considerados supra ou infrarregulados, respectivamente. Para facilitar a localização desses genes foi estabelecido o seguinte filtro:

- ✓ Se a média das réplicas BAG, dividida por 2, for ≥ a média das réplicas CB → 1 (suprarregulado);
- ✓ Se a média das réplicas BAG, dividida por 2, for ≤ a média das réplicas CB → 0 (não diferencialmente regulado);
- ✓ Se a média das réplicas CB, dividida por 2, for ≥ a média das réplicas BAG → 1 (infrarregulado);

- ✓ Se a média das réplicas CB, dividida por 2, for ≤ a média das réplicas BAG → 0 (não diferencialmente regulado).

Portanto, todos os genes para os quais foi atribuído o número 1, após esse cálculo, foram considerados 'diferencialmente regulados' – DR (supra ou infrarregulados).

4.2.3. Análise proteômica

A primeira etapa em um estudo proteômico é o preparo da amostra, ou fracionamento das proteínas. Ao final desse processo as proteínas devem estar parcialmente purificadas, completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas (Rocha *et al.*, 2005).

4.2.3.1. Fracionamento

Os materiais coletados dos biorreatores foram submetidos a centrifugação e os sobrenadantes foram filtrados através de sistema de ultrafiltração tangencial Pellicon (Millipore), usando primeiro um cassete de 300kDa e, posteriormente, um de 30kDa. O filtrado obtido foi submetido à cromatografia de exclusão por tamanho (*SEC- Size Exclusion Chromatography*), nas dependências do Instituto Weizmann (Israel). A SEC foi escolhida com a finalidade de separar a fração celulossomal (maior) da não-celulossomal (enzimas livres, menores), e foi realizada em uma coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 (protocolo 4, apêndice A).

As frações celulossomal e não-celulossomal das amostras crescidas em celobiose e bagaço pré-tratado foram enviadas para a empresa Archaezyme (Israel), onde foi realizada a análise em gel bidimensional (2D gel).

4.2.3.2. Análise em gel bidimensional (2D gel)

A técnica de 2D gel é usada no campo da proteômica devido à sua capacidade inigualável para separar milhares de proteínas simultaneamente. A técnica também é única para detectar modificações pós- e co-traducionais, as quais não podem ser previstas a partir da sequencia do genoma (Ribeiro, 2011).

A primeira dimensão é denominada de focalização isoelétrica *(IEF*) e consiste basicamente na aplicação de um campo elétrico a uma fita de gel polimerizado consistindo de um gradiente de pH imobilizado. Uma vez que uma amostra esteja uniformemente depositada ao longo de um gradiente de pH, ocorre migração das proteínas carregadas até que atinjam seu ponto isoelétrico (PI). A segunda dimensão compreende a separação das proteínas em gel desnaturante de acordo com seu tamanho ou massa molecular. Para evitar que a migração nesta dimensão seja afetada pela carga de cada proteína, tanto o gel quanto a amostra são saturados com SDS que forma complexos aniônicos com as proteínas da amostra e mascara sua carga, pois resulta em complexos com aproximadamente a mesma razão de carga por unidade de massa. Uma vez que as ligações dissulfeto existentes sejam quebradas com DTT (ditiotreitol) e bloqueadas com IAA (iodoacetamida), a migração sob a ação de um campo elétrico ocorre em função do peso molecular de cada proteína. Uma vez concluídas as duas dimensões, o

resultado é um gel no qual cada ponto ou *spot* protéico separado por eletroforese representa potencialmente uma única proteína (Almeida *et al.*, 2010).

Por causa do limitado sucesso em observar os *spots* das proteínas da fração celulossomal, um método alternativo foi aplicado de forma a aumentar a concentração de proteínas durante a corrida. Para essas amostras uma nova corrida IEF foi realizada aplicando 4 réplicas. As bandas resultantes das 4 réplicas foram cortadas e combinadas para serem usadas diretamente no gel de SDS-PAGE

Assim como na análise genômica, as amostras crescidas em celobiose foram usadas como padrão de comparação com as amostras crescidas sobre bagaço pré-tratado. As condições ideais para a análise das diferentes amostras foram definidas pela empresa contratada, com base em ensaios preliminares.

Os *spots* ou bandas selecionados a partir da análise 2D foram analisados por LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas), no Instituto Weizmann (Israel), no espectrômetro de massas Orbitrap, da Thermo, e identificadas pelo *software* Sequest 3.31, através da comparação com os dados contidos no *nr nucleotide database*, mantido pelo NCBI (*National Center for Biotechnoly Information*).

4.2.3.3. Proteômica quantitativa por espectrometria de massas (QP-MS)

O primeiro passo desta técnica é fragmentar as proteínas em solução por digestão tríptica para que seus fragmentos (peptídeos), não as proteínas inteiras,

possam ser submetidos à análise por espectrometria de massa (protocolo 5, apêndice A).

As amostras constituídas de peptídeos obtidos por digestão tríptica foram dessalinizadas, utilizando os discos de extração da Empore (Empore High Performance Extraction Disks), com adsorvente C18, secas e ressuspensas em 50mM de tampão Hepes (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico), pH 6,4.

Para poder realizar uma análise proteômica comparativa as duas amostras de peptídeos foram marcadas com formaldeído leve (CB – 35% Frutaron cat#5551810, 12,3M) ou pesado (BAG – 20% m/m, Cambridge Isotope Laboratories cat#CDLM-4599-1, 6,5M), à concentração final de 20mM.

Após uma hora de incubação em temperatura ambiente o pH foi ajustado para 8,0 e a reação foi incubada por mais uma hora. A neutralização das amostras foi feita com 500mM de bicarbonato de amônio por 30 minutos e quantidades iguais de peptídeos obtidos a partir de cada amostra (CB e BAG) foram misturadas, limpas usando o sistema de Empore com adsorvente C18 e ressupensas em ácido fórmico 0,1%.

Os peptídeos foram separados por cromatografia de fase reversa, em coluna capilar de sílica fundida de 0,075 x 200 mm (J&W), empacotada com resina da Reprosil (Dr. Maisch GmbH, Alemanha). A seguir foram eluídos em gradientes lineares de 214 minutos com acetonitrila 5 a 40% e 8 minutos com acetronitrila 95% com ácido fórmico 0,1% em água, com fluxo de 0,25µl/min.

A espectrometria de massas foi realizada em um espectrômetro de massas *íon-trap* (aprisionador de íons) Orbitrap (Thermo), com repetidas varreduras, seguidas de dissociação por colisão induzida dos sete principais íons selecionados a partir da primeira varredura.

A identificação e quantificação dos peptídeos foram feitas através do *software Discoverer* versão 1.3 por comparação com a seção de *Clostridium* do banco de dados do NCBI_NR (*National Center for Biotechnology Information_non redundant*). Além disso, para reduzir o número de falso-positivos, foram realizadas buscas no banco randômico DECOY com as identificações obtidas, usando a ferramenta *sequest search engine* – um nível de confiança alto de identificação é referido como 0,01 FDR; um nível médio como 0,05 FDR.

Todos os procedimentos e análises foram realizados no *Smoler Proteomics Center* do Instituto Technion (Israel).

4.2.3.4. 1D SDS-PAGE analítica

O termo 1D SDS-PAGE analítica é usado quando se utiliza um gel de SDS-PAGE 3 a 4 vezes mais longo do que o normal. Essa estratégia é usada para obter uma resolução maior na separação das proteínas, apesar da separação ser feita apenas com base na massa molecular.

Usando o programa ImagequantTL (GE Healthcare) e a massa molecular da proteína correspondente ao *scaffoldin* como controle, todas as outras bandas foram normalizadas, em termos de volume e intensidade, como um percentual da banda

do *scaffoldin*. Dessa forma, foi possível determinar quais as proteínas que apresentaram uma variação na sua expressão nas amostras crescidas em bagaço, em relação às amostras crescidas em celobiose, e assim definir quais bandas seriam enviadas para análise por espectrometria de massas.

A análise por espectrometria de massas foi realizada no Instituto Weizmann (Israel), seguindo os mesmos procedimentos citados na análise 2D gel.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Análise genômica

Após o recebimento dos dados obtidos pela técnica de microarranjo de DNA, já normalizados, os valores numéricos relativos à quantidade momentânea de mRNA, foram utilizados para traçar diagramas (*scatterplots*) a fim de verificar a correlação da expressão diferencial entre as réplicas de cada amostra (bagaço pré-tratado e celobiose), obtendo-se uma excelente correlação em ambos os casos (figura 4.1).

Com os valores de regulação relativos, obtidos através do filtro apresentado na seção de materiais e métodos, do total de 3191 genes de *C. thermocellum*, 349 apresentaram-se infrarregulados e 408 suprarregulados (ver listas 1 e 2 do Apêndice B).

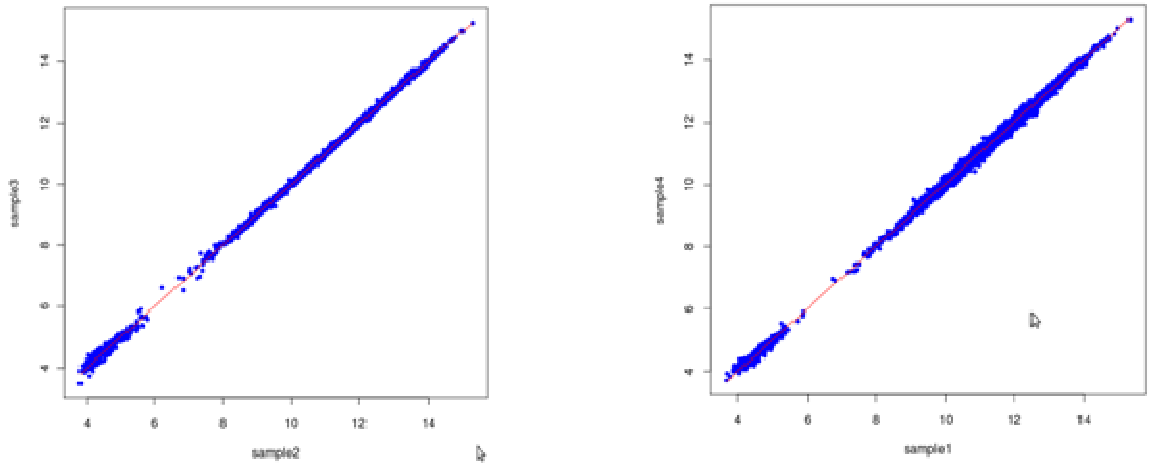


Figura 4.1 – Diagramas (*scatterplots*) gerados a partir dos valores numéricos relativos à quantidade momentânea de mRNA, após normalização *RMA*, para as réplicas de cada amostra: à esquerda – réplicas da amostra de células crescidas em celobiose (*samples 2* e *3*); à direita – réplicas da amostra de células crescidas em bagaço pré-tratado (*samples 1* e *4*).

Do total de 757 genes que apresentaram mudanças na expressão 21 são genes para glicosil hidrolases – GH (tabela 4.1) e 10 genes correspondem a potenciais enzimas acessórias do celulossoma (tabela 4.2).

4.3.1.1. Genes envolvidos na hidrólise da celulose

C. thermocellum codifica inúmeras enzimas que permitem uma eficiente degradação da celulose como, endoglucanases, exoglucanases e β-glicosidases. Porém, muitas outras enzimas importantes na degradação dos polissacarídeos associados à celulose também podem ser encontradas, tanto na forma de enzimas livres, quanto associadas aos celulossomas: xilanases, liquenases, laminarinases, β-xilosidases, β-galactosidases, e β-manosidases, além das enzimas que processam a pectina ligada aos polissacarídeos, como pectina-liases, poligalacturonases e pectina-metilesterases, (Lynd *et al.*, 2002).

Tabela 4.1 – Genes para glicosil hidrolases (GH), celulossomais (presença de doquerina) e não-celulossomais (sem doquerina), diferencialmente regulados quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço pré-tratado, em relação ao seu crescimento sobre celobiose.

Genes	**Presença de doquerina I**	**Atividade**	**Família GH**	**Valores de regulação**
Cthe_0032	X	Mananase	26	2,4439
Cthe_0797 (CelE)	X	Endoglucanase	5	4,6175
Cthe_0821	X	β-galactosidase	5	8,9492
Cthe_1256		β-glicosidase	3	4,2290
Cthe_1271	X	Não estabelecida	43	2,5866
Cthe_1273		α-L-arabinofuranosidase B	?	5,2174
Cthe_1398 (XghA)	X	Xilanase	74	4,3461
Cthe_1428		β-glicosidase	1	2,4619
Cthe_1472 (CelH)	X	Endoglucanase	5/26	2,7878
Cthe_2137	X	β-xilosidase	5/39	2,6460
Cthe_2138	X	α-L-arabinofuranosidase B	43	3,1887
Cthe_2139	X	α-L-arabinofuranosidase B	30	3,2585
Cthe_2193	X	Não estabelecida	5	0,4615
Cthe_2194	X	Xilanase	6	2,2810
Cthe_2196	X	Endo-1,4-β-xilanase	43	2,1370
Cthe_2197	X	β-galactosidase	2	2,7388
Cthe_2590 (XynD)	X	Xilanase	10	2,9252
Cthe_2807 (CelC)		Endoglucanase	2/5	4,9100
Cthe_2809		Liquinase	16	2,2192
Cthe_2811 (ManA)	X	Mananase	26	8,1687
Cthe_2972 (Xyn11A)	X	Xilanase	11	4,6461

Obs.: Atividades supostas por similaridade.

Tabela 4.2 – Genes para potenciais enzimas acessórias do celulossoma diferencialmente regulados quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço pré-tratado, em relação ao seu crescimento sobre celobiose.

Genes	**Presença de doquerina**	**Presença de coesina**	**Atividade**	**Valores de regulação**
Cthe_0044	X		Não estabelecida	2,8999
Cthe_0246	X		Não estabelecida	3,1262
Cthe_0736		X	ancoramento	0,4314
Cthe_0798	X		Lipolítica	6,5074
Cthe_1080			Não estabelecida	2,3746
Cthe_1890	X		Não estabelecida	4,0608
Cthe_2195	X		Não estabelecida	2,2065
Cthe_2949	X		Pectinesterase	2,5268
Cthe_2950	X		Pectato liase	3,9034
Cthe_3141	X		Lipolítica*	2,9518

*Atividade suposta, por similaridade.

Como citado no capítulo 2, o celulossoma é composto por uma proteína estrutural chamada *scaffoldin* – CipA (Cthe_3077), a qual se liga à superfície celular e à qual estão ligadas as subunidades catalíticas.

Nesta análise, nenhuma proteína estrutural mostrou-se suprarregulada nas amostras do crescimento em bagaço, quando comparadas às amostras em celobiose, e apenas uma proteína de ancoragem (Cthe_0736) apresentou valores inferiores (infrarregulação) aos encontrados em celobiose (tabela 4.2).

De acordo com Rydzak *et al.* (2012), *C. thermocellum* codifica 73 enzimas celulossomais, contendo doquerinas do tipo I, e 35 não celulossomais (sem doquerinas), envolvidas na degradação da celulose. Desse total (108), 31 apresentaram-se diferencialmente reguladas nesta análise (tabelas 4.1 e 4.2), sendo 24 celulossomais e 7 enzimas livres (não celulossomais).

O gene glyR3 (Cthe_2808, 3,1211), caracterizado por Newcomb & Wu (2007), regula o operon CelC que consiste da endoglucanase CelC (Cthe_2807), da glyR3 (Cthe_2808) e da liquenase licA (Cthe_2809), todos suprarregulados neste estudo, e é induzido pela laminaribiose.

Modulando a biossíntese desses componentes enzimáticos a bactéria poderia melhorar a degradação do substrato disponível, visto que a CelC e a LicA são ativas sobre a β-1,3-glicana. Os resultados obtidos por Newcomb & Wu (2007) indicaram que a regulação das enzimas pode ser conseguida através dos açúcares liberados e não necessariamente pela característica de insolubilidade do substrato. Raman *et al.* (2011), consideram possível que outros oligossacarídeos derivados da

celulose possam atuar como indutores desse operon ou ainda que outros mecanismos regulatórios possam estar envolvidos.

Cabe salientar que estudos anteriores só haviam detectado níveis expressivos desses genes na fase estacionária do crescimento de *C. thermocellum* (Raman *et al.*, 2011; Mishra *et al*., 1991).

Vários genes que codificam xilanases apresentaram-se suprarregulados quando o microrganismo cresceu sobre o bagaço pré-tratado. Por se tratar de um substrato natural que, apesar de ter sofrido um pré-tratamento brando para abertura da fibra, ainda podia conter parte da hemicelulose a expressão das xilanases era esperada. No entanto, Rydzak *et al.* (2012) encontraram o mesmo padrão quando avaliaram diferentes estágios do crescimento de *C. thermocellum* sobre celobiose, o que os levou a sugerir que, mesmo na ausência de hemicelulose, pode haver uma pré-disposição para a expressão de xilanases.

Apesar da presença das xilanases, nenhum gene para as enzimas do metabolismo da xilose (xilose redutase, xilitol desidrogenase, xilose isomerase ou xiluloquinase) foi encontrado, comprovando que a espécie não tem a capacidade de usar esse açúcar (xilose) no seu metabolismo. Supõe-se, portanto, que nos ambientes naturais *C. thermocellum* disponibiliza esse açúcar para outras espécies.

É interessante notar que alguns genes que compõem o celulossoma codificam proteínas com funções diferentes daquelas das famílias das glicosil hidrolases (tabela 4.2), cujas funções na sacarificação ainda não foram totalmente

explicadas. No entanto, espera-se que essas proteínas tenham um papel importante na degradação eficiente da biomassa (Morisaka *et al.*, 2012).

Não foi detectada nesta análise uma regulação diferenciada das exoglucanases. Apenas alguns genes para endoglucanases aparecem como suprarregulados. As endoglucanases atuam internamente na fibra, de forma aleatória, iniciando a degradação da celulose através da liberação de oligossacarídeos de diversos comprimentos, liberando terminais na cadeia de celulose para ação das exoglucanases. É possível que a capacidade de *C. thermocellum* de internalizar oligossacarídeos com grau de polimerização de até 4 ou mais torne menos necessário o uso de exoglucanases por esse microrganismo se comparado a outros microrganismos que só conseguem internalizar açúcares simples (p. ex. glicose).

4.3.1.2. Outros genes

Em *C. thermocellum* os oligossacarídeos derivados da hidrólise da celulose são transportados com gasto de ATP através dos transportadores de oligossacarídeos tipo ABC (*ATP binding cassette*). Do total de 14 genes que codificam esses transportadores, 8 apresentaram-se suprarregulados (Cthe_0391-0393, 1579, 1819-1820, 1862 e 2573) quando o microrganismo cresceu sobre o bagaço. Os genes Cthe_0391-0393 e 1862 também foram detectados em quantidades significativas nos estudos realizados por Raman *et al.* (2011) e Rydzak *et al*. (2012).

Durante o processo de transporte da celobiose e outras celodextrinas para dentro da célula, estas são hidrolisadas a glicose pelas enzimas β-glicosidases perisplasmáticas ou diretamente a glicose-1-fosfato (G-1-P) pela ação das enzimas celobiose- e celodextrina-fosforilases através de uma reação ATP-independente que permite uma economia substancial de energia para o organismo (Gefen *et al*., 2012). Nesta análise o gene para β-glicosidase (Cthe_1256) apresentou altos níveis de expressão (4,2229).

O catabolismo microbiano da glicose e da celobiose vem sendo estudado há décadas. No entanto, a utilização de celodextrinas com grau de polimerização superior ao da celobiose é muito pouco conhecida, talvez por causa do alto custo das celodextrinas puras comercialmente disponíveis (Lynd *et al.*, 2002).

A conversão de glicose a fosfoenolpiruvato (PEP), em *C. thermocellum*, ocorre pela via *Embden-Meyerhoff-Parnas*. Dos 20 genes envolvidos nesta via, apenas dois apresentaram-se suprarregulados (Cthe_0389-0390) e quatro infrarregulados (Cthe_0138, 1265, 1292 e 2938). Os demais genes foram expressos nos mesmos níveis em ambos os substratos.

Os genes suprarregulados – Cthe_0390 e Cthe_0389 codificam, respectivamente, uma glicose quinase e uma fosfofrutoquinase ATP-dependente. Os genes infrarregulados codificam uma fosfoglicomutase (Cthe_1265), uma glicose quinase (Cthe_2938), uma fosfoglicerato quinase (Cthe_0138) e uma fosfoglicerato mutase (Cthe_1292).

Dois *clusters* de genes, Cthe_2390-2393 e Cthe_2794_2797, codificam as subunidades alfa, beta, delta e gama da tiamina pirofosfato e da piruvato-ferredoxina oxidorredutase que catalisam a oxidação do piruvato a acetil-CoA. Três genes (Cthe_2390, 2391 e 2797) apresentaram-se infrarregulados neste estudo, enquanto Raman *et al.* (2011) informaram altos níveis de expressão para a fase estacionária de crescimento.

A síntese dos produtos finais a partir do piruvato é mediada pelas enzimas que compreendem as duas principais ramificações da rota – piruvato/acetil-CoA/lactato e acetil-CoA/etanol/acetato. Já, o hidrogênio (H_2) pode ser gerado a partir da ferredoxina reduzida (Fd_r), NADH ou NADPH, usando múltiplos complexos de hidrogenases (Rydzak *et al*., 2012).

Nesta análise, com relação aos genes das duas principais ramificações citadas, apenas os genes Cthe_0388, 0394 e 2445, que codificam álcool desidrogenases, responsáveis pela produção de etanol a partir de acetaldeído, apresentaram níveis aumentados de expressão – 2,8865; 6,9969 e 4,8704, respectivamente. Porém, vários clusters de genes ligados à produção de hidrogênio molecular (H_2), apresentaram-se infrarregulados. São eles: Cthe_3003-3004 e Cthe_3016, 3019-3021 e 3024 (genes para hidrogenases), Cthe_2431-2434 (genes para NADH:ferredoxina oxidorredutase – *rnf*) e Cthe_2606, 2608 e 2263-2269 (genes para síntese de ATP).

Em *C. thermocellum*, muitos dos genes envolvidos na formação dos flagelos estão agrupados em uma região genômica contendo as ORFs de Cthe_0462 a 0496 (Raman *et al*., 2011). Do total de 35 genes desse cluster, 14 foram

coordenadamente suprarregulados (Cthe_0462-0474 e 0476) durante o crescimento em bagaço. Estes resultados, bem como os citados por Raman *et al.* (2011) sugerem uma estratégia celular orientada para melhorar a habilidade das células de perceberem e responderem apropriadamente às mudanças ambientais através da ativação do sistema de motilidade.

Os dados obtidos a partir do microarranjo de DNA forneceram várias informações a respeito da participação dos genes na via celulolítica, além de terem mostrado a formação de agrupamentos de genes hierarquizados por um perfil de expressões comuns, o que poderá abrir novas perspectivas de investigação para esta ou outras vias do metabolismo.

4.3.2. Análise proteômica

Os resultados das análises por espectrometria de massas dos *spots* e bandas selecionados a partir dos géis bidimensionais (figuras 4.2. e 4.3) mostraram que apenas 7 enzimas do grupo das glicosil hidrolases (3 endoglucanases, 3 exoglucanases e 1 mananase), foram diferencialmente expressas quando *C. thermocellum* cresceu sobre bagaço pré-tratado, em comparação ao seu crescimento sobre celobiose (tabela 4.3).

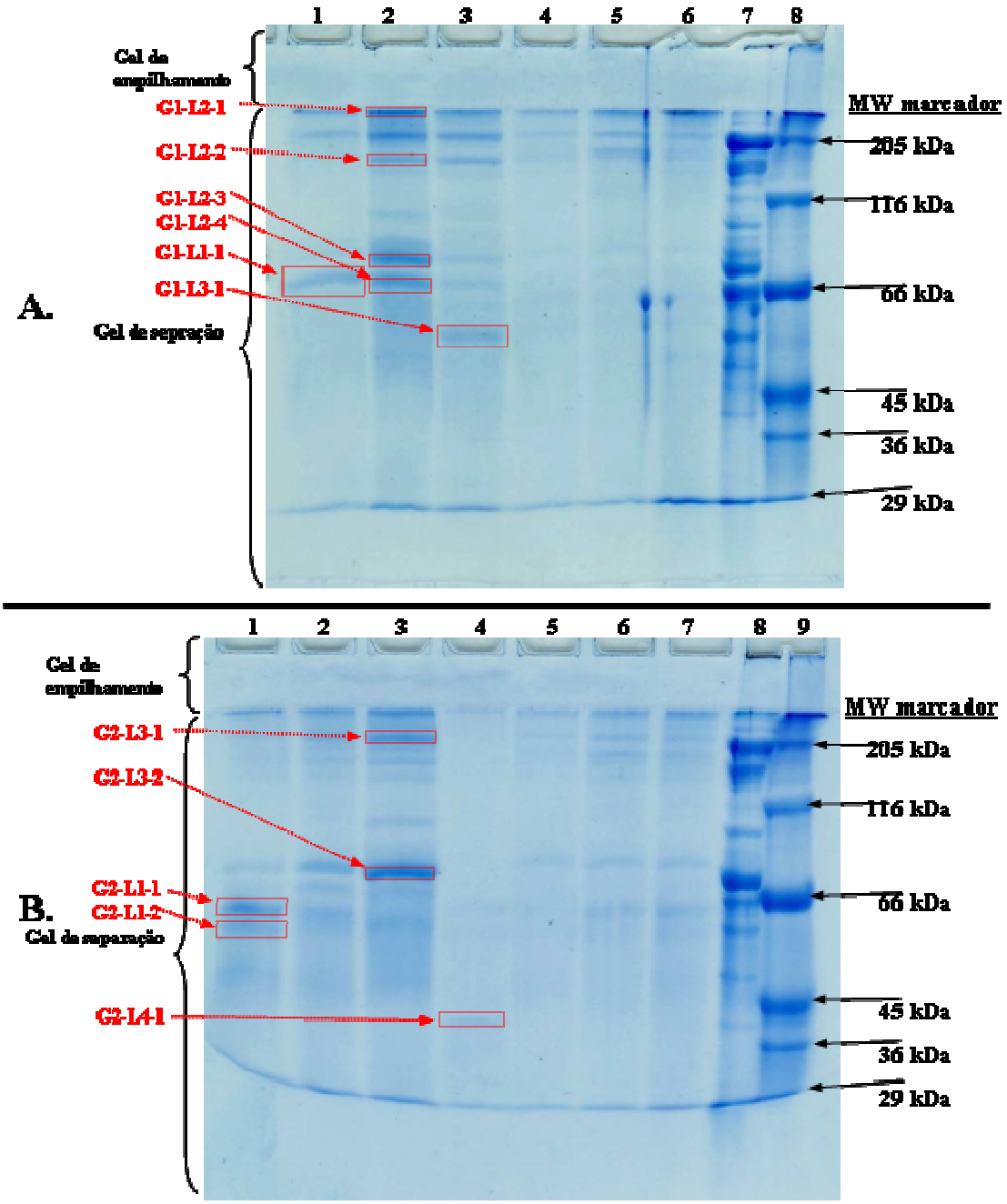


Figura 4.2 – Bandas removidas dos géis (em vermelho) de SDS-PAGE das amostras CB-SEC (A) e BAG-SEC (B) para serem enviadas para a análise por espectrometria de massas (MS). CB-SEC: fração celulossomal da amostra do cultivo em celobiose; BAG-SEC: fração celulossomas da amostra do cultivo em bagaço. Poços da figura A –1 a 6, bandas removidas do gel IEF; 7, CB-SEC; 8, marcador. Poços da figura B – 1 a 7, bandas removidas do gel IEF; 8, BAG-SEC; 9, marcador.

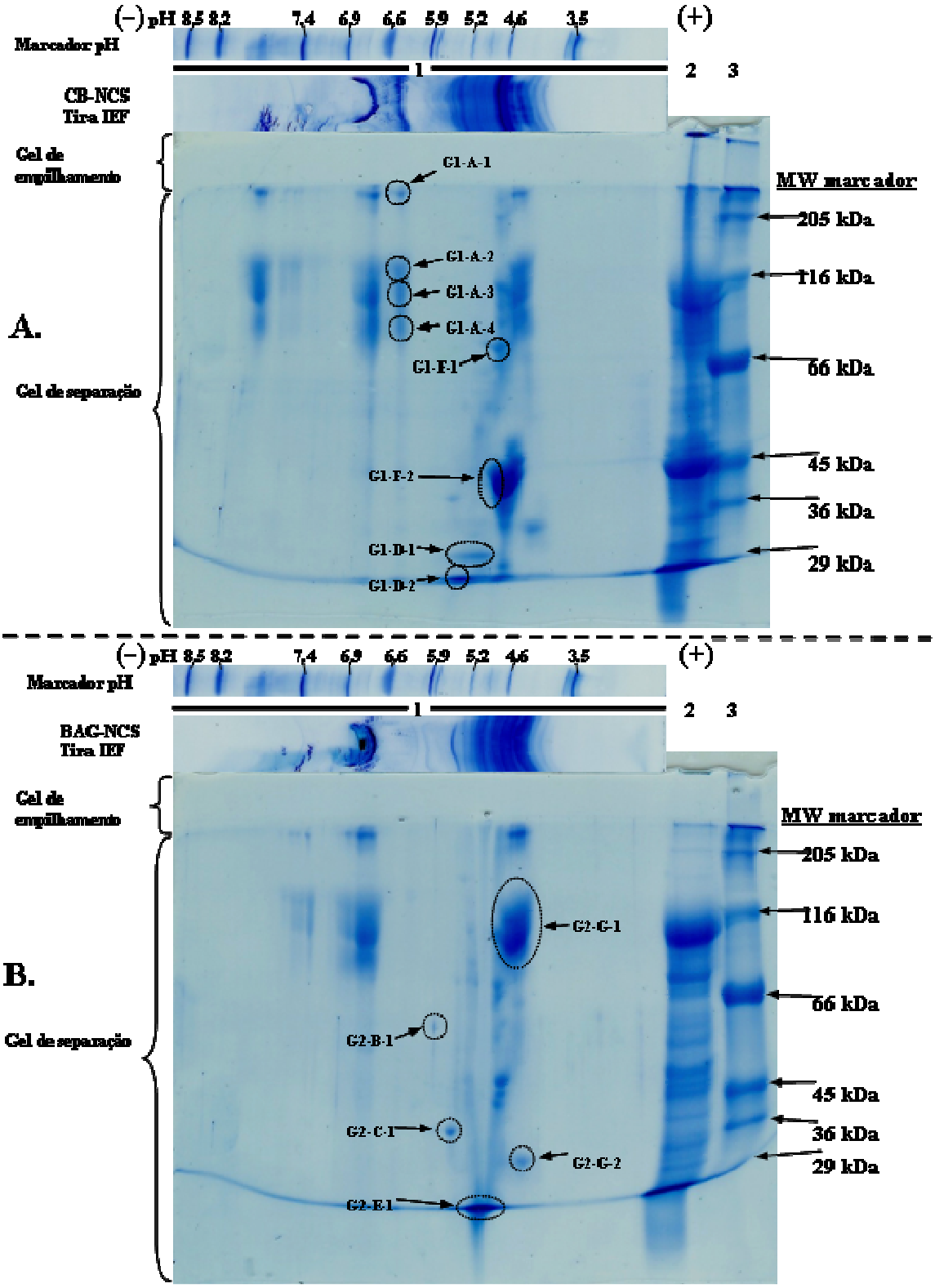


Figura 4.3 – *Spots* selecionados para envio para análise por espectrometria de massas (MS) dos géis de SDS-PAGE das amostras CB-NCS (A) e BAG-NCS (B). CB-NCS: fração não celulossomal da amostra do cultivo em celobiose; BAG-NCS: fração não celulossomas da amostra do cultivo em bagaço.

Tabela 4.3 – Resultado da análise por 2D gel dos peptídeos obtidos a partir da amostra do crescimento de *C. thermocellum* sobre bagaço pré-tratado (BAG), em comparação ao seu crescimento sobre celobiose (CB).

Proteína	Código	Possível função
CelF	P26224	Endoglucanase
CelG	Q05332	Exoglucanase
CelK	A3DCH1	Exoglucanase
CelQ	A3DD31	Endoglucanase
CelS	A3DH67	Exoglucanase
CelT	A3DJ82	Endoglucanase
ManA	A3DJ81	Mananase

Com o intuito de aumentar a identificação de outras enzimas importantes na degradação do bagaço pré-tratado foi usada a técnica de *QP-MS*. A análise resultou na identificação de 8 relacionadas com a degradação da celulose – 3 exoglucanases, 2 endoglucanases, 2 xilanases e 1 mananase (tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Resultado da análise por QP-MS dos peptídeos obtidos a partir da amostra do crescimento de *C. thermocellum* sobre bagaço pré-tratado (BAG), em comparação ao seu crescimento sobre celobiose (CB).

Proteína	Código	Possível função	Área	Razão BAG/CB
CbhA	A3DCH2	Exoglucanase	1,112E8	1,967
CelJ	A3DD30	Endoglucanase	2,612E8	1,084
CelS	A3DH67	Exoglucanase	1,054E9	4,387
CelW	A3DDF1	Endoglucanase	1,558E8	1,547
CelY	A3DBI3	Exoglucanase	1,270E7	1,117
ManA	A3DJ81	Mananase	4,392E7	31,141
XynD	A3DIL1	Xilanase	2,410E7	1,636
Xyn11A	A3DJP0	Xilanase	2,662E7	1,591

A partir deste tipo de análise (QP-MS) é possível extrapolar a abundância das proteínas (área). Os resultados obtidos mostraram que as enzimas mais abundantes quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço pré-tratado são: CelS, CelJ, CelW e CbhA (figura 4.2), e que a abundância não está necessariamente relacionada à regulação (razão BAG/CB). Neste caso, a ordem ficaria praticamente invertida: CelS, CbhA, CelW e CelJ.

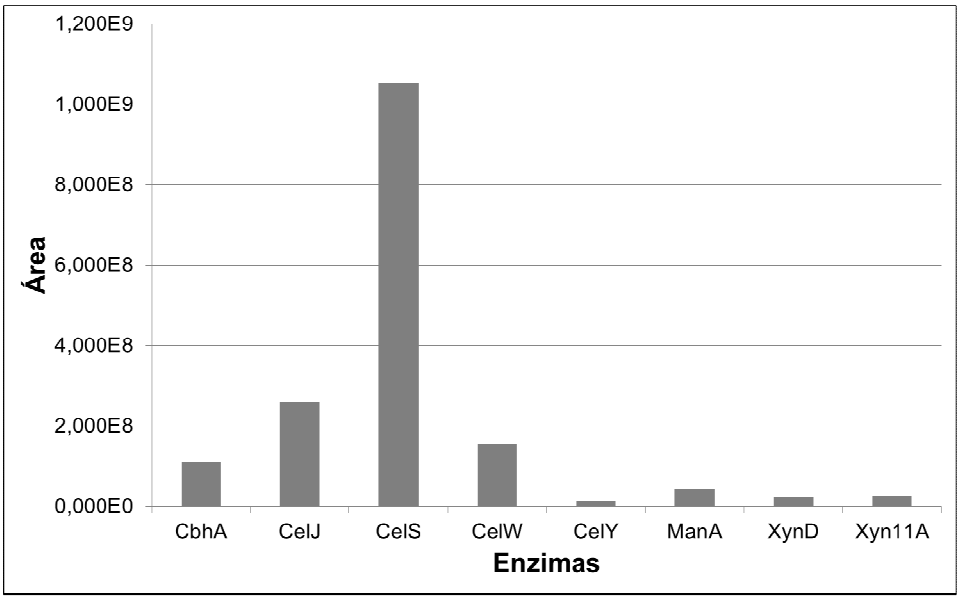


Figura 4.4 – Abundância de enzimas relacionadas com a degradação da celulose na amostra de *C. thermocellum* crescido sobre bagaço pré-tratado.

Através do uso do *software* ImagequantTL (GE Healthcare) todas as bandas obtidas no gel através da técnica de 1D SDS-PAGE (figura 4.5) analítica foram normalizadas com base na banda (banda 2) que representa a proteína responsável pela formação do *scaffoldin* (tabela 4.5).

Com base nos dados da tabela 4.5 foram selecionadas as bandas que foram enviadas para identificação por espectrometria de massas: 1, 4, 6, 7, 11, 13, 15 e 26.

De acordo com a análise, nas 8 bandas selecionadas foram identificadas apenas três enzimas com ação na degradação da celulose (tabela 4.6), sendo que duas dessas bandas (6 e 7) representam a mesma enzima.

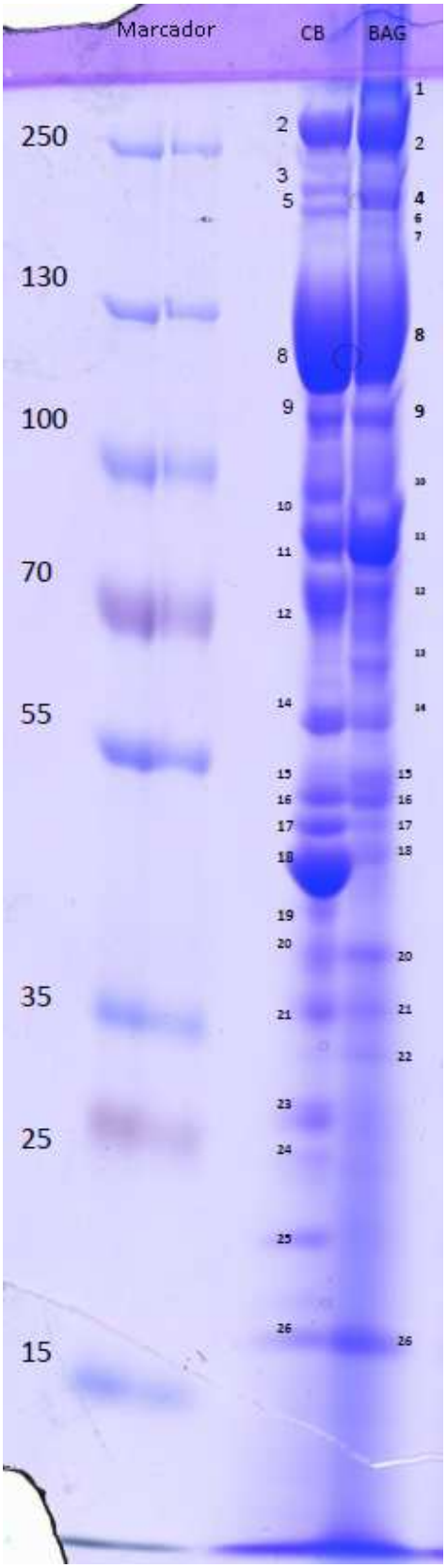


Figura 4.5 – Gel 1D SDS-PAGE analítica das amostras CB-SEC e BAG-SEC, mostrando as bandas selecionadas. CB-SEC: fração celulossomal da amostra do cultivo em celobiose; BAG-SEC: fração celulossomas da amostra do cultivo em bagaço.

Tabela 4.5 – Normalização da massa molecular das bandas selecionadas a partir da análise de 1D SDS-PAGE analítica, com base na banda 2 (*scaffoldin*).

Banda	Massa molecular	Celobiose (%)	Bagaço (%)
1	>250	-	36,45
2	~250	100	100
3	130-250	12,03	-
4	130-250	-	29,52
5	130-250	12,25	-
6	130-250	-	0,18
7	130-250	-	0,01
8	130	450,78	285,27
9	100-130	48,06	29,24
10	~100	59,01	29,44
11	70-100	118,34	167,55
12	70-80	120,75	47,86
13	55-70	-	6,62
14	55-70	47,83	8,93
15	55	-	10,79
16	35-55	48	15,72
17	35-55	60,56	1,95
18	35-55	200,84	10,67
19	35-55	13,66	-
20	35-55	27,05	8,3
21	~35	30,96	3,72
25	25-15	11,82	0,09
26	25-15	13,69	47,25

Tabela 4.6 – Identificação das bandas selecionadas a partir da técnica de 1D SDS-PAGE analítica.

Banda	Proteína	Código	Possível função	Massa Molecular (kDa)
1	Desconhecida	A3DBG8	*Ig domain*	494
4	CipA	Q06851	*Scaffoldin*	197
6	CelJ	A3DD30	Endoglucanase	178
7	CelJ	A3DD30	Endoglucanase	178
11	CelS	A3DH67	Exoglucanase	83
13	df (Cthe_0821)	A3DDM7	β-galactosidase	65
15	Desconhecida	A3DE73	*Extracellular solute-binding*	50
26	RpsE	A3DJI9	30S ribossomal	18

Comparando todos os dados obtidos na análise proteômica, através das três técnicas utilizadas (2D, QP-MS e 1D SDS-PAGE analítica), temos que 14 proteínas (tabela 4.7) com ação direta sobre a degradação da celulose foram diferencialmente expressas quando *C. thermocellum* cresceu sobre bagaço pré-tratado, em relação ao seu crescimento sobre celobiose.

Tabela 4.7 – Sumário dos resultados obtidos através de três técnicas distintas (2D, 1D SDS-PAGE analítica e QP-MS) para avaliar a regulação de proteínas quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço pré-tratado.

Proteína	Código	Possível Função
CbhA	A3DCH2	Exoglucanase
CelF	P26224	Endoglucanase
CelG	Q05332	Exoglucanase
CelJ	A3DD30	Endoglucanase
CelK	A3DCH1	Exoglucanase
CelQ	A3DD31	Endoglucanase
CelS	A3DH67	Exoglucanase
CelT	A3DJ82	Endoglucanase
CelW	A3DDF1	Endoglucanase
CelY	A3DBI3	Exoglucanase
df (Cthe_0821)	A3DDM7	β-galactosidase
ManA	A3DJ81	Mananase
XynD	A3DIL1	Xilanase
Xyn11A	A3DJP0	Xilanase

Além das enzimas ligadas diretamente à degradação da celulose, a proteína CipA (*scaffoldin*) apareceu em todas as técnicas aplicadas e as proteínas OlpB e Orf2p, ambas com função de ancoramento, apareceram como diferencialmente expressas nas análises 2D gel e QP-MS.

De todas as enzimas apresentadas na tabela 4.7, apenas CelY não contém doquerina, portanto trata-se de uma enzima não-celulossomal. Todas as demais (13) fazem parte do celulossoma de *C. thermocellum* quando este cresce sobre bagaço pré-tratado.

Ao contrário da análise genômica onde não foram detectadas enzimas exoglucanásicas, nesta análise cinco enzimas com essa função se mostraram diferencialmente expressas (CbhA, CelG, CelK, CelS e CelY).

Raman *et al.* (2009) avaliaram a expressão das proteínas do crescimento *C. thermocellum* sobre *switchgrass* pré-tratado em comparação ao seu crescimento

sobre celulose, através da técnica de QP-MS, e encontraram altos níveis de expressão das exoglucanases CelK e CbhA. De acordo com os autores, essas enzimas da família GH9, atuam nos terminais não redutores da cadeia de celulose; enquanto, outras exoglucanases, tais como, CelS (GH48) e CelO (GH5), atuam nos terminais redutores. Portanto, o aumento na expressão das duas primeiras sugeriria uma necessidade de melhorar a sinergia exo-exo entre os dois tipos de ação exoglucanásica, quando as células crescem sobre um substrato natural.

Cinco endoglucanases foram expressas diferencialmente nesta análise – CelF, CelJ, CelQ, CelT e CelW., sendo todas da família GH9. Raman *et al.* (2009) também encontraram um aumento na expressão de várias endoglucanases da família GH9 durante o crescimento de *C. thermocellum* sobre *switchgrass*[10] pré-tratado o que mostra um importante papel das endoglucanases dessa família na degradação de substratos naturais.

Duas xilanases – XynD e Xyn11A, as quais apareceram nos resultados da análise genômica, também foram detectadas pela análise proteômica.

Curiosamente, na análise realizada por Raman *et al.* (2009) as xilanases tiveram uma redução da expressão frente ao *switchgrass* pré-tratado em comparação à celulose purificada, o que poderia ser prejudicial pois a falta da ação das xilanases dificultaria o acesso das enzimas à celulose. A explicação dos autores para esse comportamento é de que, possivelmente, a hemicelulose residual (8% xilana) após o pré-tratamento ficaria 'presa' dentro do complexo lignocelulósico minimizando o potencial de indução das xilanases.

[10] Gramínea nativa da América do Norte cujo nome científico é *Panicum virgatum*.

Nenhuma das enzimas que processam a pectina ligada aos polissacarídeos apresentaram-se diferencialmente expressas neste estudo. O mesmo ocorreu no estudo realizado por Raman *et al*. (2009) com um substrato natural. Isso se deve, provavelmente, às próprias características da pectina que fazem com que esta seja facilmente removida da parede celular através dos pré-tratamentos aplicados.

Comparando os dados da análise proteômica com os dados da análise genômica, encontramos apenas 4 correspondências (tabela 4.8).

Tabela 4.8 - Correspondência entre os resultados encontrados pelas análises proteômica e genômica.

Proteína	Código	Gene	Possível Função
df (Cthe_0821)	A3DDM7	Cthe_0821	β-galactosidase
XynD	A3DIL1	Cthe_2590	Xilanase
ManA	A3DJ81	Cthe_2811	Mananase
Xyn11A	A3DJP0	Cthe_2972	Xilanase

4.4. Conclusões parciais

A análise dos dados obtidos com as ferramentas (genômica e proteômica) utilizadas nesta etapa do trabalho mostrou uma baixa correspondência entre os genes diferencialmente regulados e as proteínas diferencialmente expressas quando *C. thermocellum* cresce sobre bagaço de cana, em comparação com seu crescimento sobre celobiose. Apenas quatro correspondências foram encontradas, tratando-se de enzimas dos grupos das xilanases, mananases e β-galactosidases (tabela 4.8).

No entanto, a sobreposição das três técnicas utilizadas dentro da análise proteômica apontou 5 exoglucanases e 5 endoglucanases como enzimas que foram

diferencialmente expressas na presença do bagaço pré-tratado, enquanto a análise genômica indicou apenas 3 endoglucanases e uma grande variedade (18) de outras enzimas do grupo das GH (tabela 4.1).

Assim sendo, com base na sobreposição dos dados (tabela 4.8), nos resultados da análise proteômica (tabela 4.7) e, principalmente, na experiência das demais pessoas envolvidas nesta parte do trabalho foram selecionados ao todo 14 genes (tabela 4.9), representando enzimas dos grupos das exoglucanases (5 genes), endoglucanases (4 genes) xilanases (2 genes), mananases (1 gene), β-glicosidases (1 gene) e β-galactosidases (1 gene) para serem utilizados na próxima etapa.

Tabela 4.9 – Lista dos genes selecionados para clonagem em *E. coli* a partir dos resultados das análises genômica e proteômica.

Gene	Família GH	Atividade presumida
Cthe_0071 (F y)	48	exoglucanase
Cthe_0412 (CelK)	9	exoglucanase
Cthe_0413 (CbhA)	9	exoglucanase
Cthe_0543 (CelF)	9	endoglucanase
Cthe_0624 (CelJ)	9	endoglucanase
Cthe_0821 (dF)	2/5	β-galactosidase
Cthe_1256 (BglA)	3	β-glicosidase
Cthe_2811 (ManA)	26	mananase
Cthe_2872 (CelG)	5	exoglucanase
Cthe_2972 (Xyn11A)	11	xilanase
Cthe_2590 (XynD)	10	xilanase
Cthe_2089 (CelS)	48	exoglucanase
Cthe_0625 (CelQ)	9	endoglucanase
Cthe_0745 (CelW)	9	endoglucanase

CAPÍTULO 5

CLONAGEM, EXPRESSÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS DE *C. thermocellum* ATCC 27405

5.1. Introdução

Nesta etapa do trabalho os genes das enzimas de *C. thermocellum* selecionadas através das análises genômica e proteômica foram clonados em *Escherichia coli*, a fim de expressá-los, obtendo assim as enzimas para aplicação em testes de hidrólise enzimática.

A bactéria *E. coli* é um dos microrganismos mais utilizados para a construção e amplificação de proteínas heterólogas pelo fato dessa bactéria gram-negativa apresentar sistemas bem caracterizados em muitos aspectos e seu genoma já ter sido mapeado, além de não exigir condições de processos muito complexas e possuir baixo custo de cultivo (Shin & Chen, 2008).

À lista de enzimas selecionadas pelas análises genômica e proteômica para clonagem e expressão em *E. coli* foi acrescentada uma enzima endoprocessiva (CelR – Cthe_0578).

É sabido que para uma eficiente degradação da celulose é necessária uma cooperação sinérgica entre exoglucanases e endoglucanases. Contudo, já se reconhece há algum tempo que a diferenciação das celulases em exoglucanases e endoglucanases é uma simplificação e que os diferentes graus de processividade

dessas enzimas ainda não está totalmente claro (Kurasin & Valjamae, 2011). As enzimas com atividade endoprocessiva foram assim definidas neste trabalho quando a relação entre a atividade exoglucanásica e endoglucanásica ficou próxima de 10.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Clonagem

Para o processo de clonagem foi usado o sistema *In-Fusion PCR Cloning* (Clontech).

Primeiramente, as sequencias dos genes para as enzimas selecionadas foram coletadas do banco de dados do *NCBI – National Center for Biotechnlogy Information* e foi escolhido o vetor que seria usado no processo. A seguir foram desenhados e sintetizados os iniciadores necessários para a clonagem desses genes e posterior transformação nas células de *E. coli*.

5.2.1.1. Desenho e síntese de iniciadores

A partir das sequências selecionadas dos bancos de dados, oligonucleotídeos iniciadores senso e antissenso foram desenhados para cada um dos genes de interesse.

O desenho dos iniciadores foi feito com o auxílio do *software Vector NTI Advance 10* A (Invitrogen) e do sítio da *Clontech* (www.Clontech.com), através do qual é possível converter iniciadores para PCR em iniciadores para o sistema *In-*

Fusion pela adição específica de sequências nas extremidades 5' dos iniciadores, que permitirão a recombinação homóloga para integração no vetor. Para tanto, basta entrar com as sequências dos iniciadores senso e antissenso (desenhados no *Vector NTI*) e do vetor escolhido (neste caso o pET-28a+), selecionar os sítios de restrição e submeter a solicitação, sem preservação do *polylinker*[12]. Para este trabalho foram selecionados os sítios de restrição *NcoI* (C.CATGG) e *XhoI* (C.TCGAG).

Após transferir as sequências dos iniciadores complementadas pelo sistema *In-Fusion* para o *Vector NTI*, foi realizada uma análise na qual o *software* simula o produto de PCR que será formado. Dessa forma, pode-se verificar se a escolha dos iniciadores foi feita corretamente.

Os iniciadores desenhados e verificados foram enviados para a empresa *Sigma* (Israel), para sua síntese.

5.2.1.2. Extração do DNA de *C. thermocellum* e amplificação de genes

O DNA genômico de *C. thermocellum* ATCC 27405 foi purificado pelo método do fenol-clorofórmio (Marmur, 1961), de acordo com o protocolo 6 (Apêndice A). A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose.

De posse do DNA do microrganismo e dos iniciadores sintetizados foram realizadas as reações de amplificação dos genes selecionados (*PCR* – Reação em

[12] Segmento curto de DNA que contem muitos sítios de restrição (até 20).

cadeia de polimerase, protocolo 7, Apêndice A) para verificar a correta amplificação dos mesmos.

Para confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA pretendidos, os produtos das PCRs foram corridos em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, usando sempre um controle positivo. A visualização das bandas nos géis foi realizada com o equipamento BioDoc-It Imaging System (UVP).

Os produtos de amplificação por PCR foram purificados com o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e quantificados com o equipamento *NanoDrop* (Thermo Scientific), do Instituto Weizmann.

5.2.1.3. Reações de ligação ao vetor

As ligações dos fragmentos de DNA ao vetor (pET-28a+) foram realizadas com o kit *In-Fusion Liquid PCR Cloning* (Clontech), de acordo com o protocolo do fabricante (figura 5.1).

Primeiramente, o vetor foi linearizado (tabela 5.1) através do uso das enzimas de restrição – *NcoI* e *XhoI*. O tubo com o produto da digestão foi colocado no termociclador a 37ºC, por 1 hora. Após a incubação o vetor linearizado foi purificado usando o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) e quantificado com o equipamento *NanoDrop*. Posteriormente, o vetor linearizado foi submetido às reações de ligação (tabela 5.2) com cada um dos insertos – produtos de amplificação por PCR dos genes selecionados. Os plasmídeos recombinantes

obtidos dessa forma foram utilizados para a transformação de células competentes de *E. coli* BL-21.

Para a obtenção de células competentes por choque térmico, as bactérias foram preparadas seguindo o protocolo 8 (Apêndice A).

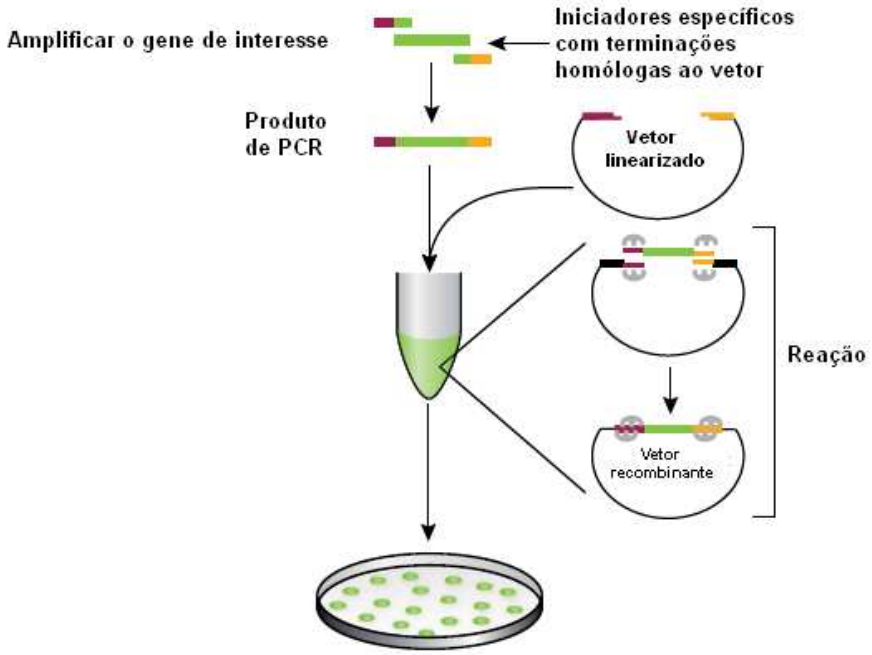


Figura 5.1 – Método de clonagem *In-Fusion*. Durante os 30 minutos de incubação, a enzima *In-Fusion* cria regiões de fita simples nas extremidades do vetor e do inserto, os quais são então fusionados devido à homologia dos 15 pb existentes. O clone resultante pode ser usado para transformar células competentes.

Tabela 5.1 – Preparo do vetor linearizado por enzimas de restrição.

Reação de digestão	**Volume (µL)**
Plasmídeo (100ng/mL)	1,0
NcoI	1,0
XhoI	1,0
NEBuffer3[13]	3,0
Água deionizada	completar
Total	30,0

[13] Buscar o tampão ideal para as enzimas de restrição a serem usadas no sítio www.neb.com. Clicar em NEB TOOLS – Double Digest Finder.

Tabela 5.2 – Reação de ligação usando o kit *In-Fusion*.

Reação de ligação	Volume (µL)
Vetor linearizado (50-200ng/mL*)	1,0-4,0
Produto PCR purificado (10-200ng**)	1,0-3,0
Premix de enzimas *In-Fusion* (5x)	2,0
Agua deionizada	completar
Total	10,0

*<10kb: 50-100ng; >10kb: 50-200ng.
**<0,5kb: 10-50ng; 0,5 a 10kb: 50-100ng; >10kb: 50-200ng.

5.2.1.4. Transformação e PCR de colônia

As células competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante, contendo o inserto do gene de interesse, de acordo com o protocolo 9 (Apêndice A).

As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (Protocolo 10, Apêndice A) seletivo – contendo o antibiótico de resistência específico (canamicina, 50mg/L) – e colocadas em estufa a 37°C para crescimento durante 18 horas.

As colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante foram submetidas ao processo de PCR de colônia (Protocolo 11, Apêndice A), a fim de verificar se o plasmídeo continha de fato a sequência de DNA correspondente ao gene de interesse.

Os produtos do PCR de colônia foram visualizados em gel de agarose 1% e a massa molecular das bandas obtidas foi comparada à massa molecular dos genes de interesse.

As colônias foram repicadas para novas placas com meio sólido de manutenção, para serem utilizadas na próxima etapa.

5.2.1.5. Minipreparação plasmidial e sequenciamento

Os clones positivos para a reação de PCR de colônia, mantidos em meio sólido, foram utilizados para a extração do DNA plasmidial contendo o gene de interesse.

Primeiramente, uma pequena quantidade do crescimento em meio sólido de cada clone positivo foi transferida para um tubo *falcon* com 5,0mL de meio LB líquido, contendo canamicina (50mg/L). Os tubos foram incubados por toda a noite (~16 horas), com agitação, a 37°C.

Após a incubação os tubos foram centrifugados a 8000rpm, por 3 minutos, à temperatura ambiente e o *pellet* foi utilizado para a extração do DNA plasmidial (minipreparação) com o kit *Spin Miniprep* (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Os kits comerciais para extração do DNA plasmidial baseiam-se no método da lise alcalina. Esse método leva em consideração a diferença de desnaturação, em condições alcalinas (pH ~12), entre o DNA plasmidial circular e o DNA cromossomial de alto peso molecular. Por isso o tamanho do plasmídeo não deve ser superior a 20kb, pois plasmídeos grandes apresentam propriedades mais próximas ao DNA cromossomial, dificultando a separação entre eles.

Após o isolamento do DNA plasmidial, as amostras foram quantificadas no equipamento *NanoDrop* e preparadas para serem enviadas para sequenciamento, da seguinte forma:

Em tubos *eppendorf* de 0,5mL foram adicionados:

- ✓ 700 a 1000ng da amostra;
- ✓ 10µM do iniciador (senso, antissenso e sequenciais, separadamente);
- ✓ Água para completar o volume de 20µL.

Os iniciadores sequenciais foram previamente preparados com o auxílio do *software Vector NTI* e sintetizados pela empresa Sigma. Esses iniciadores são desenhados com um mínimo de 19pb, um conteúdo de GC (guanina e citosina) de 40 a 60% e são estabelecidos a uma distância média de 600pb do iniciador anterior (figura 5.2). Desta forma, são evitados os erros de leitura durante o sequenciamento quando se trata de genes maiores (acima de 1500pb).

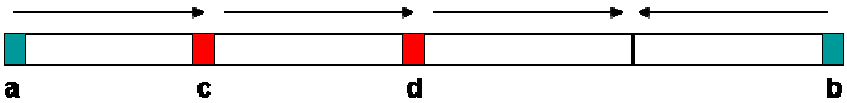


Figura 5.2 – Desenho de iniciadores sequenciais para um gene com 2400pb: (a) iniciador senso; (b) iniciador antissenso; (c) e (d) iniciadores sequenciais; as setas indicam o sentido da leitura.

Para o sequenciamento do DNA plasmidial foram utilizados os serviços do Instituto Weizmann. O equipamento utilizado foi o *3730 DNA Analyzer*, da Applied Biosystems – sequenciador automático com eletroforese capilar (48 capilares).

As sequências dos genes clonados foram comparadas com as respectivas sequências disponíveis no GenBank, com o auxílio do *software Vector NTI*, para confirmar a integridade dos mesmos.

Essa análise busca detectar mutações que tenham ocorrido durante o processo de clonagem e que possam trazer algum prejuízo para a expressão da proteína de interesse como as mutações do tipo *frameshift*[14].

5.2.2. Expressão, purificação e caracterização das enzimas

As células transformadas de *E. coli* BL-21 foram induzidas com 1mM de IPTG (isopropiltiogalactosídeo) para expressão das proteínas, seguindo o protocolo 12 (Apêndice A). As enzimas expressas seguiram para a etapa de purificação.

O primeiro passo para a purificação das enzimas foi usar a sonicação para liberar a proteína expressa da célula. A seguir foi feito um pré-tratamento térmico e, por fim, usou-se a cromatografia líquida rápida de proteínas (*FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography*) para purificar e aumentar a concentração das proteínas expressas (protocolo 13, Apêndice A).

As enzimas purificadas foram caracterizadas de acordo com a sua atividade enzimática específica utilizando as metodologias para atividade exoglucanásica, endoglucanásica e xilanásica (protocolo 14, Apêndice A). O teor de proteínas foi determinado através do método BCA (protocolo 15, Apêndice A).

---

[14] Nesse tipo de mutação ocorre a inserção ou deleção de um único par de bases, o que pode ter um efeito badverso na síntese da proteína, visto que os nucleotídeos continuam a ser lidos em trincas. Deste modo, a reorganização da sequência de nucleotídeos do DNA codificador em trincas vai dar origem a uma nova sequência de códons diferentes, sem relação com a sequência de códons original. Consequentemente, a composição em aminoácidos da proteína codificada também será diferente, a partir do local em que ocorreu a mutação. Frequentemente, o novo arranjo dos nucleotídeos em códons origina um códon *stop* que vai interromper prematuramente a formação da proteína.

5.2.3. Testes de hidrólise enzimática

Esta parte do trabalho foi realizada nas dependências do CENPES (Centro de Pesquisas da Petrobras) com o preparado de enzimas selecionadas – o qual passou a ser chamado DEH, usando como padrão de comparação o preparado comercial Cellic®Ctec2, da Novozymes.

Os testes de hidrólise enzimática com ambos os preparados foram realizados usando como substrato papel de filtro Whatman #1 e bagaço pré-tratado.

O bagaço pré-tratado utilizado apresentava: 54% de teor de glucana, 5,1% de xilana, 1,2% de acetato, 5,8% de cinzas e 32,3% de lignina total, de acordo com a metodologia proposta pelo *NREL – National Renewable Energy Laboratory* (Sluiter *et al.*, 2008).

Para os testes foram usadas as seguintes condições: Frascos de vidro de 20mL, com um volume de trabalho de 2mL; 7% de sólidos; 100µg de proteínas totais (método BCA); temperatura de 55°C para os testes com o preparado comercial e de 60°C para o preparado DEH; agitação de 150 rpm; tempo de processo de 72 horas, com amostragem a cada 24 horas por retirada do frasco; em duplicata. Portanto, foi utilizado um total de 24 frascos.

As amostras foram caracterizadas quanto ao teor de açúcares liberados (celobiose, glicose e xilose), utilizando-se cromatógrafo líquido (HPLC) com coluna HPX-87H (Bio-Rad) nas seguintes condições de análise: temperatura da coluna de

65°C; vazão de 0,700 mL.min^{-1}; solução H_2SO_4 5mM como fase móvel; volume de injeção de 20 μL; detector por índice de refração (RID) a 35°C.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Clonagem

A lista 3 do Apêndice B apresenta os iniciadores senso e antissenso para amplificação dos genes selecionados que foram inseridos no vetor escolhido (pET-28a+).

As fotografias dos géis de agarose, obtidas no equipamento *BioDoc-It Imaging System (UVP)*, com os produtos dos genes selecionados, amplificados por PCR, através do uso dos iniciadores previamente sintetizados são apresentadas no Apêndice C.

Após a purificação, os fragmentos de DNA amplificados foram clonados no vetor pET28a+, através do uso do kit *In-Fusion Liquid PCR Cloning* (Clontech).

Os plasmídeos com os insertos foram transformados nas células competentes de *E. coli* BL-21, previamente preparadas.

As colônias transformantes foram selecionadas em meio LB sólido contendo canamicina (marca de seleção do pET28a+). Aleatoriamente, foram escolhidas algumas colônias de cada placa de Petri para a realização do *PCR* de colônia, com a finalidade de selecionar os clones contendo o inserto de interesse.

As colônias contendo o inserto de interesse foram submetidas à extração plasmidial e a integridade dos genes foi verificada por sequenciamento. A listagem com os iniciadores sequenciais utilizados nesse processo é apresentada no Apêndice B (lista 4).

Seis genes apresentaram apenas mutações não silenciosas do tipo ‘sentido trocado’ ou *missense*, na qual a substituição de um nucleotídeo resulta em um códon que codifica um aminoácido diferente (tabela 5.3). As consequências de uma mutação ‘sentido trocado’ dependerão da intensidade com que a mesma afetará a atividade funcional da proteína codificada pelo gene em questão.

Tabela 5.3 – Mutações ‘sentido trocado’ ou *missense*.

Gene	**Local (pb)**	**Nucleotídeo**		**Aminoácido**	
		de	**para**	**de**	**para**
Cel G	6274	C	G	Leu	Val
CelK	5089	T	C	Ser	Pro
	6337	A	T	Lys	Met
	6358	A	G	Lys	Arg
	6370	C	G	Pro	Ala
	6454	CCA	GAG	Pro	Glu
	6559	G_C	C_A	Asp	Gln
	6822	A_G	G_T	Asp	Ser
	9361	C	A	Gln	Lys
	9376	C	A	His	Lys
CelR	6880	G	A	Val	Ile
CelS	5585	A	G	Gln	Arg
	5727	G	A	Arg	Lys
	5975	T	G	Ser	Ala
	6180	C	G	Ala	Gly
Xyn11A	5245	C	G	Thr	Arg
Cthe_0821	5815	A	G	Ile	Val
	6631	T	A	Ser	Thr
	6653	C	T	Thr	Met

Como essas mutações foram verificadas em mais de um clone concluiu-se que não haviam sido causadas durante o processo de amplificação, mas sim que poderiam se tratar de mutações ocorridas ao longo do tempo (mais de 20 anos) em

que a linhagem (ATCC 27405) vem sendo utilizada pelo grupo de pesquisadores israelenses com os quais foi realizada esta etapa do trabalho.

Um gene – CbhA, apresentou inserções de nucleotídeos. As alterações envolvendo a inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos, alterando o modo de leitura do gene, é chamada de *frameshift*. Esse tipo de mutação faz com que o ribossoma passe a identificar os códons de maneira errada a partir desse ponto, produzindo uma cadeia polipeptídica que, além de ter uma série de mutações 'sentido trocado', tem um número de aminoácidos diferente do normal, geralmente menor.

A lista 5 do Apêndice B apresenta o alinhamento da sequência de aminoácidos do gene CbhA, com a sequência encontrada nos bancos de dados para a mesma linhagem (ATCC 27405). Verifica-se que houve a inserção em *frame* de 18 nucleotídeos, correspondendo a 6 aminoácidos, sem alteração na sequência da proteína a partir desse ponto. Sendo assim, o gene CbhA continuou sendo usado nas etapas seguintes.

5.3.2. Expressão, purificação e caracterização das enzimas

Todas as enzimas selecionadas foram expressas com sucesso em *E. coli*, porém não foi possível purificar a enzima CelS, da família GH48. CelS é a subunidade enzimática mais abundante no celulossoma (Olson *et al.*, 2010), fato que foi comprovado na análise proteômica. Porém, ela só foi encontrada na forma insolúvel, o que impediu sua purificação. Para substituir essa enzima tão importante foi utilizada a enzima CelTf48A (exoglucanase) de *Thermobifida fusca*, a qual faz

parte do banco de enzimas da empresa israelense contratada para a realização desta etapa.

Todas as enzimas purificadas tiveram sua atividade avaliada, com exceção da enzima β-glicosidásica (BglA). Não foi possível verificar a atividade das enzimas CelQ, CelY, ManA e Cthe_0821. Verificou-se que CelG apresentava atividade endoglucanásica e não exoglucanásica (tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Lista das enzimas caracterizadas de acordo com sua atividade específica.

Enzima	**Atividade específica (UI/µmol)***			**Atividade identificada**
	CMC	**Avicel**	**Xilana**	
CelR	136,2	17,1	4,7	Endoprocessiva
CelK	0,9	51,8	2,5	Exoglucanásica
CelJ	1429,6	17,3	148,6	Endoglucanásica
CelW	450,3	21,2	na	Endoglucanásica
CbhA	4,9	31,8	7,7	Exoglucanásica
CelF	666,2	20,5	6,7	Endoglucanásica
CelG	499,1	45,1	8,8	Endoglucanásica
Xyn11A	70,6	0,1	1316,7	Xilanásica
XynD	110,9	0,2	429,6	Xilanásica

Obs.: na – não avaliada. *Atividade específica: µmol de glicose-equivalente formada por minuto por 1 µmol de enzima.

A carboximetilcelulose (CMC) foi usada para identificar as enzimas com atividade endoglucanásica; a celulose microcristalina (Avicel) foi usada para identificar as enzimas com atividade exoglucanásica e a xilana obtida de bétula (Birchwood, Sigma, X0502) foi utilizada como substrato para verificar a atividade xilanásica.

A tabela 5.5 apresenta a concentração de proteínas de todas as enzimas purificadas, determinada através do método BCA.

Tabela 5.5 – Lista das enzimas selecionadas e sua respectiva concentração de proteínas (mg/mL).

Enzima	Concentração de proteínas (mg/mL)
CelY	2,73
CelK	1,06
CbhA	3,74
CelF	1,70
CelR	0,61
CelJ	0,72
Cthe_0821	0,91
ManA	0,77
CelG	1,11
Xyn11A	2,19
XynD	0,51
CelTf48A	1,62
CelQ	0,71
CelW	0,96
BglA	0,45

5.3.3. Testes de hidrólise enzimática

O preparado DEH, constando de todas as enzimas selecionadas, tendo CelS sido substituída por CelTf48A, foi submetido aos testes de hidrólise enzimática nas dependências do CENPES, em paralelo com o preparado comercial Ctec2, nas condições apresentadas na seção de materiais e métodos.

A quantidade de cada enzima adicionada ao preparado DEH foi calculada com base na concentração de proteínas (tabela 5.6) e na proporção da participação de cada uma nos resultados das análises genômica e proteômica (tabela 5.6).

As tabelas 5.7 e 5.8 apresentam as médias dos teores de açúcares quantificados por HPLC em cada tempo de amostragem para cada preparado sobre os 2 substratos testados – filtro de papel e bagaço pré-tratado.

Tabela 5.6 – Lista das enzimas selecionadas e sua participação dentro do preparado DEH.

Enzima	µg de proteína por mg de DEH
CelY	175,08
CelK	57,95
CbhA	18,47
CelF	52,04
CelR	32,07
CelJ	43,38
Cthe_0821	34,84
ManA	7,29
CelG	92,61
Xyn11A	15,03
XynD	4,00
CelTf48A	290,47
CelQ	31,17
CelW	25,88
BglA	97,8

Tabela 5.7 – Caracterização das amostras, em termos de açúcares, dos ensaios de hidrólise enzimática com os preparados DEH e Ctec2, frente a filtro de papel, usando 7% de sólidos e 100µg de proteínas totais.

Filtro de papel						
Tempo (h)	Celobiose (g/L)		Glicose (g/L)		Xilose (g/L)	
	DEH	Ctec2	DEH	Ctec2	DEH	Ctec2
24	0,00±0,0	0,00±0,0	3,92±0,1	4,57±0,1	0,00±0,0	0,37±0 ,0
48	0,00±0,0	0,00±0,0	1,18±0,1	1,34±0,1	0,00±0,0	0,00±0 ,0
72	0,00±0,0	0,00±0,0	6,25±0,0	7,34±0,1	0,00±0,0	0,12±0 ,0

Obs.: os dados referentes à amostra de 48 horas foram desconsiderados. É provável que tenha havido um erro de amostragem ou de análise. Com relação aos valores de xilose encontrados com o preparado comercial é possível que esse açúcar estivesse presente dentro do próprio preparado.

Tabela 5.8 – Caracterização das amostras, em termos de açúcares, dos ensaios de hidrólise enzimática com os preparados DEH e Ctec2, frente a bagaço pré-tratado, usando 7% de sólidos e 100µg de proteínas totais.

Bagaço pré-tratado						
Tempo (h)	Celobiose (g/L)		Glicose (g/L)		Xilose (g/L)	
	DEH	Ctec2	DEH	Ctec2	DEH	Ctec2
24	0,00±0,0	0,05±0,0	1,29±0,1	3,83±0,3	4,30±0,2	4,39±0 ,2
48	0,12±0,0	0,06±0,0	1,38±0,0	5,51±0,7	4,32±0,2	6,41±0 ,8
72	0,00±0,0	0,00±0,0	1,40±0,0	7,17±0,5	4,09±0,1	5,55±0 ,2

O gráfico da figura 5.3 apresenta os teores de glicose obtidos com os dois preparados avaliados (DEH e Ctec2), frente a cada substrato utilizado (bagaço pré-tratado e filtro de papel), ao final do processo de hidrólise (72 horas).

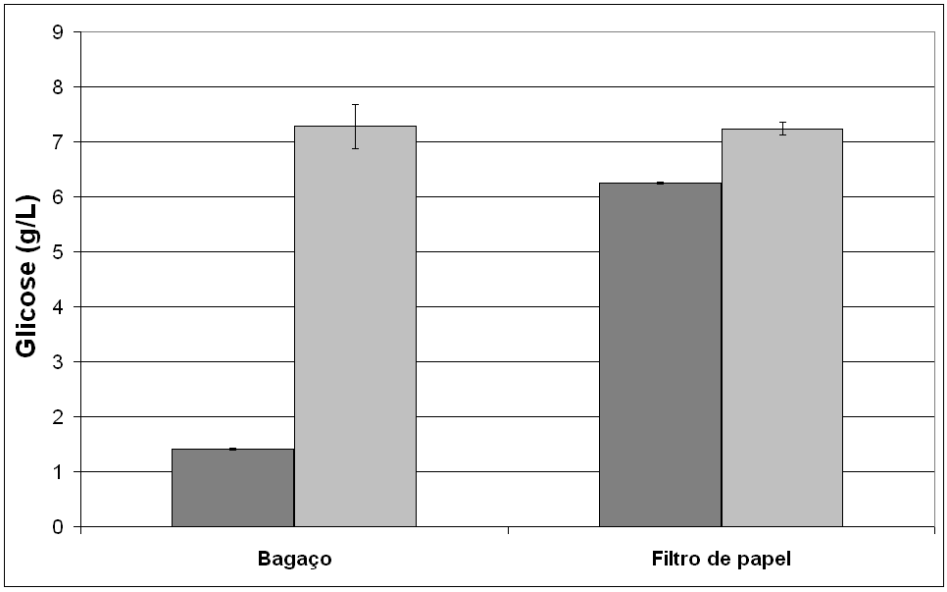


Figura 5.3 – Teores de glicose (g/L) obtidos com os dois preparados avaliados (DEH – *cinza escuro*; Ctec2 – *cinza claro*) frente a 2 diferentes substratos (bagaço pré-tratado e filtro de papel), usando 7% de sólidos e 100µg de proteínas totais.

Com o preparado DEH foi obtido 85% do teor de glicose obtido com o preparado comercial (Ctec2), quando estes foram testados frente a filtro de papel. Este tipo de substrato é fácil de ser hidrolisado, pois apresenta apenas fibras de celulose, sem hemicelulose ou lignina. Por isso, supõe-se que a xilose detectada nas análises das amostras da hidrólise com o preparado comercial não sejam provenientes do substrato, mas sim do próprio preparado enzimático.

Já o bagaço pré-tratado é mais difícil de ser hidrolisado por causa da presença de resíduos de lignina ou outros inibidores, como os ácidos fenólicos provenientes da degradação da lignina ou o furfural proveniente da degradação da xilose.

Porém, o preparado comercial apresentou frente ao bagaço pré-tratado, teores de glicose similares aos obtidos em filtro de papel. Já o preparado DEH apresentou uma conversão muito abaixo daquela obtida com filtro de papel (22,4%).

Em termos de teor de xilose (g/L), foram obtidos com o preparado DEH 73,7% dos teores obtidos com o preparado comercial (Ctec2), frente ao bagaço pré-tratado. Estes resultados mostram que as xilanases selecionadas para comporem o preparado DEH apresentam uma atividade comparável à do preparado comercial.

Cabe lembrar que das 15 enzimas que compõem o preparado DEH, 12 são enzimas celulossomais e 3 são enzimas livres (sem doquerinas) – CelY, CelTf48A (substituta de CelS) e BglA (β-glicosidase). É possível que a atividade das enzimas celulossomais tenha diminuído consideravelmente quando estas passaram a atuar isoladamente. Esse fato poderia justificar os baixos rendimentos em glicose obtidos frente ao substrato mais complexo (bagaço pré-tratado).

Além disso, de acordo com as anotações no genoma de *C. thermocellum*, apenas 6 dessas enzimas celulossomais conteriam seu próprio CBM (módulo de ligação à celulose), prejudicando a adesão das mesmas à celulose.

A eficiência na hidrólise da celulose apresentada pelos organismos que formam celulossomas está baseada na própria composição dos complexos (celulossoma), os quais apresentariam a razão correta entre os diferentes tipos de enzimas; no espaçamento entre as enzimas, evitando a adsorção improdutiva; na ligação do complexo como um todo a um único local da fibra; e ao fato de que a interrupção da hidrólise pela depleção de um tipo estrutural de celulose no local da adsorção é evitada pela presença de outras enzimas com diferentes especificidades (Schwarz, 2001).

Todas essas vantagens teriam sido perdidas no momento em que os componentes enzimáticos selecionados foram expressos em outro microrganismo e testados na forma de enzimas livres.

É importante lembrar que poucas exoglucanases salientaram-se nas análises genômica e proteômica, ao contrário do que foi visto com relação às endoglucanases. Neste caso, é possível que a quantidade de exoglucanases utilizadas no preparado DEH (quatro – CelY, CelK, CbhA e CelTf48A) não tenha sido suficiente para gerar uma grande quantidade de celobiose. É provável que boa parte dos açúcares obtidos da degradação da celulose tenha permanecido no meio na forma de dextrinas maiores que celobiose, sendo que, apenas esta última foi quantificada nas análises.

5.4. Conclusões parciais

Todas as 14 enzimas selecionadas na etapa anterior (ver capítulo 4), bem como a enzima endoprocessiva (CelR) acrescentada à lista, foram expressas com sucesso em *E. coli*.

Do total de 15 enzimas produzidas, não foi possível purificar apenas a endoglucanase CelS. Por se tratar da subunidade enzimática mais abundante do celulossoma, foi necessário substituí-la por outra da mesma família (GH48). Para isso foi escolhida a enzima CelTf48A de *T. fusca*.

A avaliação da atividade específica das enzimas produzidas confirmou a atividade presumida para as enzimas CelR (endoprocessiva), CbhA, CelK

(exoglucanásica), CelF, CelJ, CelW (endoglucanásica), Xyn11A e XynD (xilanásica). No entanto, concluiu-se que a atividade da enzima CelG é endoglucanásica e não exoglucanásica como citado anteriormente.

A β-glicosidase BglA não teve sua atividade avaliada e não foi possível verificar a atividade das enzimas CelQ, CelY e ManA.

O preparado enzimático (DEH) com as 14 enzimas de *C. thermocellum* selecionadas, adicionado da exoglucanase da família GH48 de *T. fusca*, apresentou um desempenho similar (85%) ao do preparado comercial usado como padrão de comparação (Ctec2), quando testados sobre filtro de papel.

Porém, o desempenho sobre bagaço pré-tratado foi muito inferior ao obtido com o preparado comercial, apenas 22,4%, considerando-se os rendimentos em glicose. No entanto, o rendimento obtido em xilose foi consideravelmente alto (73,7%), quando comparado ao preparado comercial, indicando que as xilanases selecionadas apresentam uma boa atividade em relação ao substrato utilizado.

Fatores como a atuação das enzimas na forma de enzimas livres e não complexadas em um celulossoma, bem como a razão entre os diferentes tipos de enzimas presentes no preparado, poderiam justificar os baixos rendimentos em glicose obtidos.

É possível que boa parte dos açúcares obtidos com a hidrólise do bagaço pré-tratado pelo mix DEH tenham permanecido no meio na forma de oligossacarídeos maiores do que celobiose. Uma proporção inadequada entre

endoglucanases e exoglucanases pode ter favorecido o acúmulo desses oligossacarídeos.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

6.1. Introdução

Como citado no capítulo 2 a estratégia de Bioprocesso Consolidado (CBP) tem grande potencial para a redução dos custos da produção de etanol de segunda geração. Mas, para isso, as limitações em termos de rendimento e concentração de produto dos microrganismos disponíveis precisam ser superadas (Shao *et al.*, 2011).

Com relação aos trabalhos com linhagens selvagens de *C. thermocellum,* as concentrações de etanol encontradas na literatura variam de, aproximadamente, 1,5g/L (32,5mM) a 25,0g/L (542mM), de acordo com a linhagem, substrato e/ou a estratégia de processo utilizada. Sato *et al.* (1993), isolaram uma linhagem denominada I-1-B e obtiveram uma concentração final de etanol de 512mM. Sudha *et al.* (1996), isolaram 12 diferentes linhagens e alcançaram uma concentração máxima de etanol de 60,8mM, com a linhagem denominada SS21. Xu *et al.* (2010) trabalhando com a linhagem JYT01, tolerante a 3% (m/v) de etanol, chegaram a uma concentração de 491mM usando a estratégia de fermentação em batelada alimentada.

Da mesma forma, para a linhagem utilizada neste trabalho, ATCC 27405, podem ser encontrados registros de concentrações de etanol bem variadas na

literatura. Por exemplo, Özpinar & Özkan (2007) citam concentrações de etanol de 20,0mM; Argyros *et al*. (2011), relatam 28,7mM; já Islam *et al*. (2013) conseguiram obter 69,5mM variando a composição do meio.

Para a primeira etapa da avaliação do desempenho fermentativo de *C. thermocellum*, realizada em frascos, a celobiose foi escolhida como fonte de carbono por ser o principal produto da solubilização da celulose pelos microrganismos anaeróbios celulolíticos (Zhang & Lynd, 2005).

Com base nos dados obtidos usando celobiose como substrato, passou-se à etapa seguinte, a qual tratou de avaliar o desempenho fermentativo de *C. thermocellum* sobre substratos mais complexos, em frascos. Ou seja, neste caso o microrganismo teria que hidrolisar o substrato para obter os açúcares necessários para seu metabolismo. Para isso, foram utilizados celulose purificada da JT Baker (#1528-01), celulose microcristalina Avicel® (Sigma-Aldrich), bagaço *in natura* e bagaço pré-tratado por hidrólise ácida.

O bagaço foi usado nos ensaios para avaliar se a capacidade hidrolítica de *C. thermocellum* é prejudicada pela presença dos demais compostos que recobrem a celulose – hemicelulose e lignina. A princípio, a hemicelulose não seria um problema, pois os celulossomas expressam mais de um tipo de xilanase, apesar de *C. thermocellum* não consumir os açúcares liberados dessa fração da fibra (Halstead *et al.*, 1999). Ao contrário, a lignina pode sim representar uma barreira para a atuação das enzimas, assim como para as celulases de origem fúngica (Barcelos *et al.*, 2013).

Apenas as concentrações de etanol e dos demais produtos e açúcares foram quantificadas nos ensaios com substratos complexos, pois não havia possibilidade de se avaliar o crescimento celular ou o consumo do substrato, ao longo dos experimentos.

O crescimento celular não poderia ser quantificado através dos mesmos métodos usados para o crescimento sobre celobiose (capítulo 3 – densidade ótica e massa seca), pois, no caso dos microrganismos formadores de celulossomas, quando estes crescem sobre um substrato insolúvel (celulose purificada ou fibras naturais), grande parte dos celulossomas encontra-se presa às fibras e/ou à superfície celular, podendo formar os complexos celulose-enzima-microrganismo citados no capítulo 2. Portanto, haveria a interferência da celulose remanescente gerando resultados inexatos. O mesmo efeito seria causado pela presença das células na quantificação do substrato não consumido através do método da massa seca.

Nesta etapa do trabalho, a quantificação dos açúcares liberados no meio foi usada para fazer algumas considerações a respeito da capacidade hidrolítica da linhagem e o consumo do substrato foi estimado através da transformação do substrato inicial e dos produtos gerados em glicose-equivalentes.

Após a etapa de avaliação em frascos foi realizado um estudo preliminar do meio de fermentação com o objetivo de reduzir ou mesmo remover alguns dos componentes usados no meio de fermentação, sem diminuição dos rendimentos em etanol.

A seleção apropriada das fontes de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas é um dos estágios mais críticos no desenvolvimento de um bioprocesso eficiente e econômico (Balusu *et al.*, 2005; Islam *et al.*, 2013) e as metodologias estatísticas disponíveis permitem entender as interações entre nutrientes em diferentes concentrações com um número muito reduzido de ensaios. Dessa forma, é possível economizar tempo, reagentes, vidrarias e mão-de-obra (Balusu *et al.*, 2004).

Por último foram realizados experimentos em biorreatores instrumentados aplicando diferentes estratégias de processo.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Ensaios em frascos

6.2.1.1. Celobiose

O ensaio com celobiose foi realizado em duplicata, em frascos de penicilina de 50mL, com 20mL de volume de meio estéril, com concentrações de substrato variando de 1 a 4% (10 a 40g/L), com o objetivo de avaliar o efeito do mesmo sobre a produção de etanol. O processo de fermentação foi mantido por 24 horas, com duas amostragens, em 12 e 24 horas. As amostras foram filtradas em membranas de nylon de 0,2μm e analisadas por HPLC para quantificação dos açúcares (celobiose e glicose) e dos produtos finais (etanol, acetato e lactato), no mesmo equipamento e nas mesmas condições citadas no capítulo 3.

A tabela 6.1 apresenta a composição do meio e as condições de processo utilizadas nos ensaios. Cada frasco foi inoculado com 2,0mL (10% v/v) de uma cultura previamente preparada em meio estéril com celobiose (6,0g/L – tabela 3.2, capítulo 3), iniciando o processo em cada frasco com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,13g/L.

Tabela 6.1 – Composição do meio e condições de processo utilizadas para os ensaios de fermentação em frascos com concentrações gradativas de celobiose.

Componentes	Quantidade
K_2HPO_4	4,3g
KH_2PO_4	1,3g
$MgCl_2$ x $6H_2O$	0,5g
$CaCl_2$ x $2H_2O$	0,1g
$(NH_4)_2SO_4$	1,3g
MOPS	10,0g
Extrato de levedura	5,0g
$FeSO_4$ x $7H_2O$*	1,0ml
Resazurina*	1,0ml
$C_2H_3NaO_2S$*	10,0ml
Celobiose	10 a 40g
Água destilada	988ml
Condições	
ph inicial	7,2
Temperatura	60°C
Agitação	80 rpm

*Ver o preparo das soluções no Apêndice A.

6.2.1.2. Celulose purificada

O primeiro ensaio com celulose purificada teve como objetivo avaliar o efeito do substrato sobre a produção de etanol. Para isso foram utilizados frascos de penicilina de 50mL, com 30mL de volume de meio estéril, com concentrações de celulose de 1, 2 e 4% (10, 20 e 40g/L). A composição do meio foi apresentada nas tabelas 3.3 e 3.4 do capítulo 3 e as condições de operação foram as mesmas utilizadas no ensaio anterior (tabela 6.1). Cada frasco recebeu 3,0mL de inóculo

(10% v/v), previamente preparado em meio estéril com celobiose (6,0 g/L – tabela 3.2, capítulo 3), iniciando o processo com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,17g/L. O processo foi mantido por 72 horas, com amostragens a cada 24 horas e as amostras foram analisadas por HPLC.

A seguir, foi avaliado o efeito do tamanho do inóculo na produção de etanol, mantendo fixa a concentração inicial de substrato selecionada a partir dos resultados obtidos no ensaio anterior. O meio e as condições utilizadas foram as mesmas citadas acima, porém utilizando 20% (v/v) de inóculo, iniciando o processo com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,33g/L.

Por último, foi avaliado o efeito da agitação sobre a produção de etanol, mantendo fixos a concentração inicial de substrato e o volume de inóculo, selecionados a partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores.

Para os cálculos de consumo de substrato a massa inicial de celulose foi convertida em glicose-equivalentes multiplicando a mesma pelo fator 1,111 (correspondendo à molécula de água incorporada a cada unidade de glicose durante a hidrólise). Todos os componentes analisados por HPLC também foram convertidos em glicose-equivalentes, usando os fatores de conversão teóricos (0,511 g/g para etanol; 1,0 g/g para lactato; 0,667 g/g para acetato; e 1,053 g/g para celobiose).

6.2.1.3. Celulose microcristalina

Buscando alcançar melhores resultados em termos de produção de etanol foi realizado um experimento com celulose microcristalina. A celulose microcristalina (MCC) é descrita como celulose purificada, parcialmente despolimerizada preparada através da hidrólise das fibras naturais, sob condições controladas, a fim de liberar os microcristais celulósicos estáveis, os quais são compostos de feixes firmes de cadeias de celulose em um arranjo linear rígido. Sendo que a composição e a cristalinidade da CMC produzida depende muito da origem das fibras utilizadas no preparo (Ohwoavworhua & Adelakun, 2005).

Para este ensaio foi utilizada a celulose microcristalina Avicel® PH101 (Sigma-Aldrich), a qual é produzida a partir de fibras de algodão, e possui um tamanho de partícula de ≅50µm. Sendo que a celulose purificada usada nos ensaios anteriores é formada por partículas que variam entre 2-20µm.

O meio e as condições foram as mesmas utilizadas nos ensaios com celulose purificada, mantendo-se fixas a concentração inicial de substrato, o volume de inóculo, e a agitação, de acordo com os melhores resultados obtidos nos ensaios com celulose purificada.

O processo foi mantido por 72 horas e as amostras coletadas a cada 24 horas foram analisadas por HPLC. Os cálculos de consumo de substrato foram realizados da mesma forma citada para a celulose purificada.

6.2.1.4. Bagaço *in natura*

As condições para os ensaios com bagaço *in natura* foram definidas com base nos melhores resultados dos ensaios com celulose purificada. Para o ensaio foram utilizados frascos de penicilina de 50mL, com 30mL de meio estéril (tabelas 3.3 e 3.4, capítulo 3) com 1% (10g/L) de concentração de substrato seco e moído (tamanho de partícula < 0,18mm). As condições de operação utilizadas foram: pH 7,2; temperatura 60°C; sem agitação. Cada frasco recebeu 6,0mL de inóculo (20% v/v), previamente preparado em meio estéril com celobiose (6,0 g/L), iniciando o processo com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,42g/L. O processo foi mantido por 72 horas, com amostragens a cada 24 horas e as amostras foram analisadas por HPLC.

Para os cálculos de consumo de substrato a massa inicial de celulose contida no bagaço *in natura* (≅40%) foi convertida em glicose-equivalentes, como citado anteriormente.

6.2.1.5. Bagaço pré-tratado

O bagaço utilizado nestes ensaios foi pré-tratado na planta piloto do CENPES a uma razão sólido:líquido de 1:3, usando uma solução de ácido sulfúrico 1% (v/v), mantendo o processo de hidrólise ácida por 30 minutos a 121°C em reator com agitação, sendo o material prensado ao final desse processo. Posteriormente, o material foi lavado exaustivamente com água destilada, secado e moído (tamanho de partícula < 0,18mm). As condições para os ensaios com bagaço pré-tratado foram as mesmas usadas com o bagaço *in natura* (1% de substrato; pH 7,2;

temperatura 60°C; sem agitação). Cada frasco recebeu 6,0mL de inóculo (20% v/v), iniciando o processo com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,38g/L. O processo foi mantido por 72 horas, com amostragens a cada 24 horas e as amostras foram analisadas por HPLC.

Para os cálculos de consumo de substrato a massa inicial de celulose contida no bagaço *in natura* (≅53%) foi convertida em glicose-equivalentes, como citado anteriormente.

6.2.2. Estudo do meio de fermentação

Visando a redução dos componentes do meio de fermentação foi realizado um estudo preliminar para selecionar os componentes necessários para a obtenção de bons resultados em termos de produção de etanol, bem como suas concentrações ideais.

Por causa do grande número de compostos do meio de fermentação a serem incluídos no estudo foi escolhido o delineamento experimental de Plackett-Burman. Esse tipo de delineamento é baseado em matrizes ortogonais do tipo Hadamard (com níveis +1 e -1), permitindo analisar os efeitos dos fatores estudados sobre a variável resposta (etanol) auxiliando no *screening* (seleção) de fatores que são significativos para o processo, dentro dos níveis pré-estabelecidos. Esta ferramenta é muito eficaz na análise de efeitos das variáveis, podendo-se avaliar o impacto delas nas respostas desejadas como uma prévia seleção de fatores, utilizando-se um número reduzido de experimentos para um número muito grande de variáveis (Rodrigues & Iemma, 2009).

Todos os componentes do meio de fermentação, incluindo os componentes da solução mineral e a fonte carbono (celulose purificada), bem como o pH foram incluídos no planejamento, totalizando 17 variáveis. A tabela 6.2 apresenta essas variáveis, bem como os níveis inferior (-1), superior (1) e central (0) para cada uma delas.

O pH foi incluído neste delineamento pois, sabe-se que o mesmo é de grande importância para a produção de celulases (Otajevwo & Aluyi, 2011), e no caso de microrganismos como *C. thermocellum* aumentar a produção e/ou melhorar a atuação das enzimas produzidas também pode ter um efeito positivo sobre a produção de etanol.

Tabela 6.2 – Variáveis selecionadas para o planejamento experimental (Plackett-Burman) visando a redução dos compostos do meio de fermentação, mostrando os níveis inferior (-1), superior (1) e central, propostos.

Variáveis	**Código**	**Unidade**	**-1**	**0**	**1**
Celulose purificada	x_1	g/L	10	25	40
Ex. de levedura	x_2	g/L	1	3	5
MOPS	x_3	g/L	4	7	10
$(NH_4)_2SO_4$	x_4	g/L	0	0,65	1,3
KH_2PO_4	x_5	g/L	0	0,65	1,3
K_2HPO_4	x_6	g/L	0	2,2	4,4
$MgCl_2.6H_2O$	x_7	g/L	0	0,25	0,5
$CaCl_2.2H_2O$	x_8	g/L	0	0,05	0,1
EDTA dissódico	x_9	mg/L	0	2	4
$MnSO_4.H_2O$	x_{10}	mg/L	0	1,25	2,5
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	x_{11}	mg/L	0	0,2	0,4
$CoCl_2.6H_2O$	x_{12}	mg/L	0	0,2	0,4
$NiCl_2.6H_2O$	x_{13}	mg/L	0	0,1	0,2
$ZnSO_4.7H_2O$	x_{14}	mg/L	0	0,1	0,2
$CuSO_4.5H_2O$	x_{15}	mg/L	0	0,015	0,03
$FeSO_4.7H_2O$	x_{16}	mg/L	0	2	4
pH	x_{17}	-	6,7	7,2	7,7

Uma das regras fundamentais na escolha da matriz de Plackett-Burman (PB) a ser usada no delineamento é a realização de, no mínimo, 4 ensaios a mais que o número de variáveis independentes (17). Por esse motivo, foi selecionada a matriz de 24 ensaios, aos quais foram somados mais 3 ensaios com as repetições do ponto central (Apêndice C, matrizes 1 e 2). Os pontos centrais são incluídos nos ensaios para verificar a variabilidade das respostas, visto a dificuldade operacional e de custos de realizar todos os ensaios em replicatas. Através dos ensaios na condição de ponto central é possível calcular o erro da repetibilidade, denominado de erro puro e avaliar o quão sob controle está o processo. E caso os ensaios indiquem uma variabilidade muito grande, é possível buscar medidas em cada etapa do processo que possam minimizar os erros e assim, melhorar a confiabilidade do processo. Além disso, eles permitem verificar se a escolha dos valores dos níveis das variáveis foi feita adequadamente, pois é muito importante explorar a condição intermediária entre o nível inferior e superior. Pode ocorrer que na definição dos níveis de cada fator, os valores estejam muito baixos ou em excesso, levando às condições de falta do componente ou de excesso inibindo a produção. Assim, o valor na condição do ponto central fornece uma informação sobre a adequação da faixa escolhida (Rodrigues & Iemma, 2009).

Os ensaios foram realizados em duplicata, em frascos de penicilina de 50mL, com 30mL de meio estéril. Cada frasco foi inoculado com 3,0mL (10% v/v) de um inóculo previamente crescido em celobiose (6,0g/L) e o processo foi mantido por 72 horas, com amostragens a cada 24 horas, a 60°C, sem agitação. As amostras foram analisadas por HPLC para quantificação dos açúcares e dos produtos (etanol, acetato e lactato), porém, apenas a concentração de etanol foi usada como variável

de resposta. A análise gráfica e o delineamento experimental foram realizados pelo *software* Statistica 7.0.

6.2.3. Ensaios em biorreatores instrumentados

O primeiro ensaio realizado em biorreatores teve como principal objetivo comparar o desempenho de *C. thermocellum* neste tipo de sistema com aquele verificado nas fermentações em frascos com celulose purificada, já que os biorreatores instrumentados permitem o controle de temperatura, agitação e pH, bem como a adição de soluções e gases.

Para isso foi usado o biorreator New Brunswick BioFlo 110 com vaso encamisado de 1,3L (volume total) com 500mL de meio de fermentação estéril (tabelas 3.3 e 3.4, capítulo 3), com 1% (10g/L) de celulose purificada. Após a esterilização do vaso com o meio, o mesmo foi conectado a todos os instrumentos e iniciou-se o controle de temperatura (60°C), pH (7,2) e agitação (50rpm), além de iniciar a injeção de N_2, a uma vazão de, aproximadamente, 100ccm. Nos ensaios anteriores verificou-se que a ausência de agitação privilegiava a produção de etanol, porém, para manter o controle de pH nos biorreatores se faz necessário manter também a agitação para que as soluções (ácida ou básica) adicionadas para controlar o pH sejam misturadas homogeneamente no meio. Por esse motivo todos os ensaios realizados em biorreatores procederam usando a agitação mínima permitida pelo equipamento (50rpm), sem que houvesse acúmulo de substrato no fundo do reator.

Após atingir a anaerobiose, o reator foi inoculado com 50mL (10% v/v) de um inóculo previamente preparado em celobiose (6,0g/L), iniciando o processo com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,2g/L.

Para o controle de pH foram usadas soluções de NaOH e H_2SO_4 1M e, para evitar a formação de espuma foram adicionados, aproximadamente, 100µL do antiespumante Despumol®6621 5M, da Struktol.

A estratégia usada para a condução do experimento foi a batelada simples, comparável ao processo realizado nos frascos, e o ensaio foi mantido por 72 horas, com amostragens em duplicata a cada 24 horas. As amostras foram analisadas por HPLC para a quantificação de açúcares (celobiose e glicose) e produtos (etanol, acetato e lactato), e por cromatografia de íons para quantificação de celodextrinas mais longas (celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose). O equipamento e as condições usadas nas análises por HPLC foram as mesmas já citadas. As análises de cromatografia de íons foram realizadas com a coluna Hamilton RCX-30 250 (7µm, 4,0 X 250mm), com fase móvel de NaOH 100mM + CH_3COONa 125mM e vazão de 1,0mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 100µL, com detector PAD-Au E1=0,05V (0,4s), E2=0,65V (0,2s), E3= -0,15V (0.4s), e tempo de corrida de 28min.

O segundo ensaio em biorreator instrumentado, com o objetivo de se avaliar a influência do H_2 sobre o metabolismo da espécie, foi realizado nas mesmas condições do anterior, porém, após a inoculação o gás de espargimento (N_2) foi trocado pelo H_2, na mesma vazão.

O processo iniciou com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,3g/L (medido através do pré-inóculo) e foi mantido por 72 horas, com amostragens a cada 24 horas, sendo as amostras analisadas apenas por HPLC.

No terceiro ensaio, a estratégia de fermentação foi alterada para batelada alimentada, usando o mesmo biorreator, o mesmo tamanho de vaso e as mesmas condições de processo (pH em 7,2±0,2; temperatura 60°C; agitação 50 rpm; adição de antiespumante; injeção de gás N_2). Porém, neste caso, o volume inicial de meio (1% celulose purificada) foi de 300mL, e após 12 horas de crescimento celular, foi iniciada a alimentação de mais 500mL de meio (1% de celulose). A vazão de alimentação foi calculada de forma a adicionar todo o meio disponível (500mL) em 36 horas, ou seja, aproximadamente, 14mL por hora.

O biorreator foi inoculado com 60mL (20% v/v) de um inóculo previamente crescido em celobiose (6,0g/L), iniciando a fermentação com, aproximadamente, uma concentração celular de 0,7g/L.

A alimentação foi concluída com 48 horas de fermentação e o processo foi mantido por 72 horas, com amostragens em 12, 18, 24, 36, 42, 48, 61, 66 e 72 horas, sendo as amostras analisadas por HPLC.

A última estratégia avaliada foi a de batelada alimentada com concentrações crescentes de substrato (celulose purificada). Para este ensaio foi escolhido um vaso encamisado com volume total de 7,5L. O volume inicial de meio estéril, com 1% (10g/L) de celulose, foi de 500mL. Todas as condições de processo

foram iguais às do anterior (pH, temperatura, agitação, gás de injeção, volume de inóculo).

A fermentação iniciou com uma concentração celular de, aproximadamente, 0,4g/L e após 12 horas de crescimento, foi iniciada a alimentação de meio.

Ao todo, foram adicionados 4,5L de meio nas seguintes concentrações de celulose purificada: 500mL com 1% (10g/L); 1L com 2% (20g/L); 1L com 3% (30g/L); 1L com 4% (40g/L) e 1L com 5% (50g/L). O volume total (4,5L) foi adicionado ao biorreator em 228,75 horas, a uma vazão média de 19,5mL/hora. Ao longo de todo o processo foram disponibilizados para o microrganismo 150g de celulose.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Ensaios em frascos

Os resultados obtidos no primeiro ensaio em frascos, usando celobiose como substrato, são apresentados na figura 6.1. Verifica-se que quanto mais alta a concentração de celobiose usada, maior o efeito negativo sobre a concentração final de etanol, bem como sobre os demais produtos analisados (lactato e acetato).

Com relação ao consumo de celobiose, observa-se na figura 6.2 que o mesmo foi de 90% na primeira condição (1% concentração inicial), diminuindo para 48%, na última condição (4% concentração inicial). Este comportamento poderia ser explicado pela inibição no transporte do açúcar para dentro da célula causado pela diminuição nos níveis de ATP intracelular diminuindo a taxa de transporte através da

membrana. Sabe-se que em *C. thermocellum* o excesso de substrato leva ao acúmulo de frutose 1,6-difosfato que, por sua vez, ativa a lactato desidrogenase. Como a via de produção de lactato (figura 2.19), ao contrário da via de produção de acetato, não produz ATP, presume-se que a produção preferencial de lactato leve à diminuição dos níveis de ATP intracelular (Strobel *et al.*, 1995).

A eficiência de fermentação (EF) considerando que todo o substrato disponibilizado inicialmente fosse convertido apenas em etanol foi de 58,6; 19,8; 9,1 e 6,1%, para as concentrações iniciais de substrato de 1; 2; 3 e 4%, respectivamente.

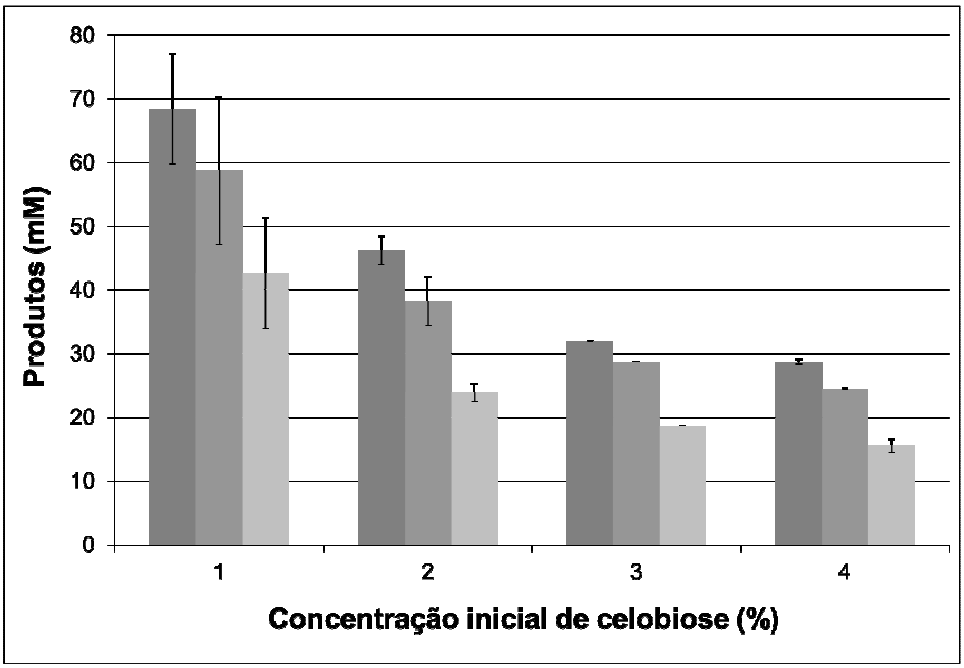


Figura 6.1 – Concentração final dos produtos (mM), após 24 horas de fermentação com *C. thermocellum* em diferentes concentrações iniciais de substrato (1% a 4% de celobiose): etanol (*cinza escuro*), acetato (*cinza médio*), e lactato (*cinza claro*). Obs.: as réplicas do ensaio com 3% de concentração inicial de substrato foram perdidas.

Acredita-se que os processos produtores de ATP controlam a taxa de crescimento nos anaeróbios quimiotróficos. Se os sistemas para conservação de energia e produção de ATP estão associados à membrana, a diminuição no

suprimento de ATP para as reações de biossíntese poderia ser explicada pela interferência direta dos inibidores do crescimento na fisiologia da membrana (Herrero *et al.*, 1985).

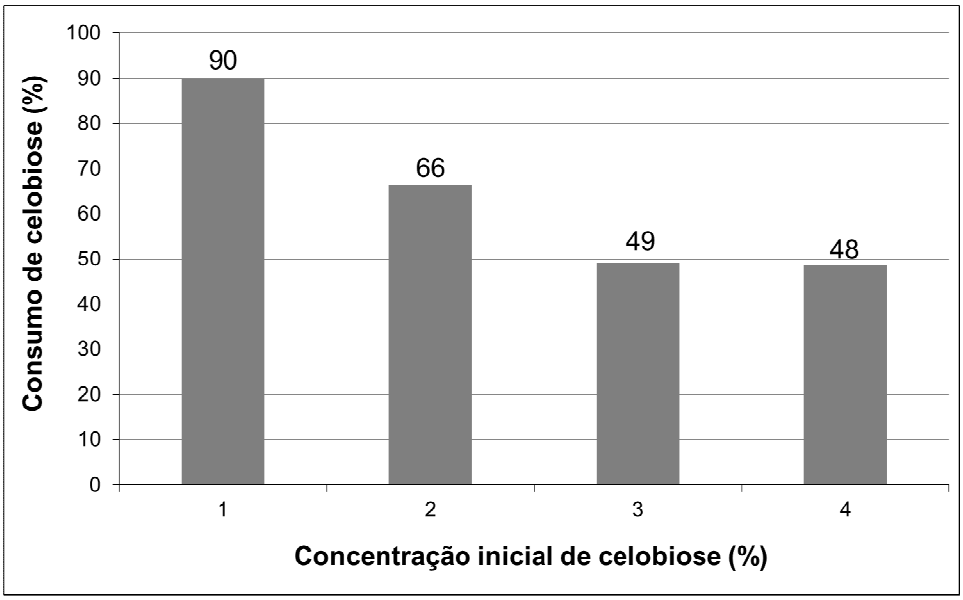


Figura 6.2 – Consumo de celobiose (%), após 24 horas de fermentação com *C. thermocellum* em diferentes concentrações iniciais de substrato (1% a 4% de celobiose).

Outro fator que pode ter interferido no consumo do açúcar e, conseqüentemente, na produção dos metabólitos quantificados é a diminuição do pH, visto que não é possível acertar o pH ao longo do processo quando os ensaios são realizados em frascos lacrados. De acordo com Islam *et al.* (2009), a redução do pH seria o principal fator na interrupção da fermentação durante a fase estacionária do crescimento celular. Nos experimentos realizados por Freier *et al.* (1988), o crescimento de *C. thermocellum* cessou totalmente quando o pH baixou para valores inferiores a 6,2. De acordo com Dumitrache *et al.* (2013) a esporulação no final da fase exponencial é uma resposta à diminuição do pH. Ao final deste experimento o pH estava abaixo de 6,0 e a concentração celular era de ≅2,3g/L em todas as

condições investigadas. Porém, não é possível afirmar se o crescimento já havia atingido a fase estacionária.

Também deve ser considerada a possível inibição causada pelo etanol. No entanto, as maiores concentrações de etanol obtidas (68,4mM) estão bem abaixo das concentrações citadas na literatura (≅ 200mM) como sendo inibitórias do crescimento de *C. thermocellum* (Lynd *et al.*, 2002; Herrero & Gomez, 1980).

Segundo Sudha & Seenayya (1999), a baixa tolerância ao etanol é um dos principais fatores limitantes para a exploração industrial de *C. thermocellum*. Apesar dos mecanismos de tolerância e inibição pelo etanol serem complexos e não totalmente compreendidos, alguns estudos apontam o comprometimento da integridade da membrana como principal fator (Brown *et al.*, 2011).

A inibição no crescimento de *C. thermocellum* pelo acetato foi investigada por Herrero *et al.* (1985). Os autores verificaram uma inibição de 50% na taxa de crescimento a uma concentração de acetato de 280mM indicando que o acetato, bem como outros ácidos, podem atuar perturbando o gradiente de pH da membrana. Porém, as concentrações de acetato alcançadas nestes ensaios foram bem inferiores (24,5 a 58,8mM).

Em um trabalho recente, o gene *pta*[18] – necessário para a produção de acetato, foi deletado resultando na eliminação desse composto como produto da fermentação. Porém, isso não levou a um aumento na produção de etanol. Sendo assim, os autores concluíram que não somente à tolerância ao etanol, mas também

[18] Gene que codifica a fosfotransacetilase, enzima que catalisa a reação química entre acetilCoA e fosfato, gerando CoA e acetilfosfato – o intermediário na formação do acetato.

a produção de etanol devem estar limitadas ao fluxo de elétrons a medida que a concentração desse produto começa a aumentar (Brown *et al.*, 2011).

As figuras 6.3a a 6.3d mostram os resultados obtidos para as duas amostragens realizadas em cada um dos ensaios com diferentes concentrações iniciais de celobiose (1% a 4%). Percebe-se que nas duas primeiras condições (figuras 6.3a e 6.3b) as curvas dos produtos são praticamente idênticas, enquanto os ensaios das figuras 6.3c e 6.3d apresentam curvas bem distintas.

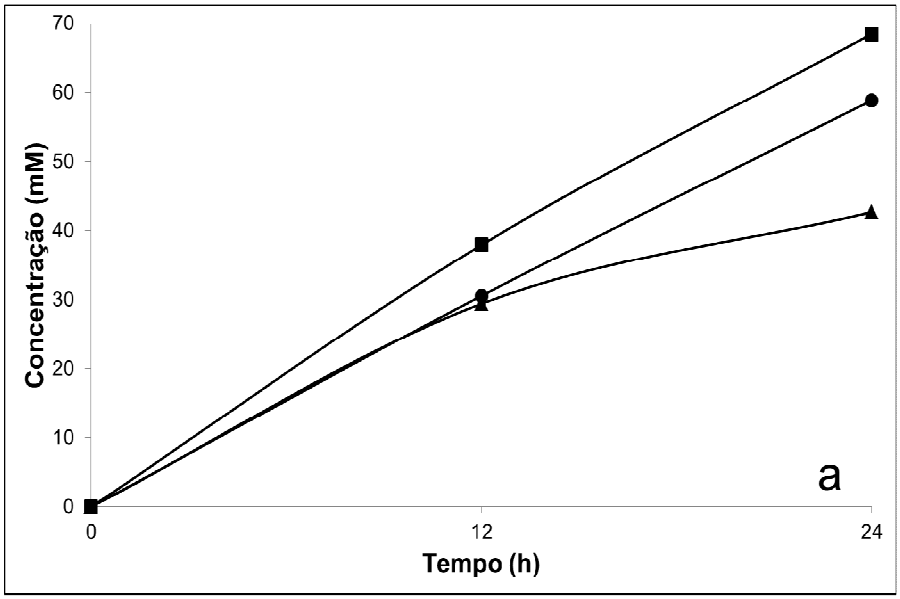


Figura 6.3a – Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio com 1% de concentração inicial de celobiose, ao longo de 24 horas de processo: etanol (*quadrados*), acetato (*círculos*), e lactato (*triângulos*).

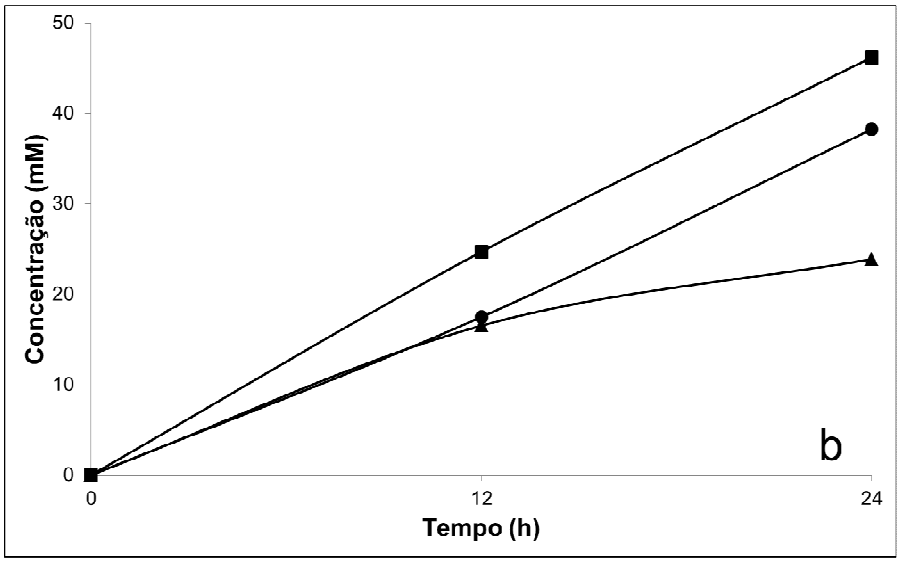


Figura 6.3b – Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio com 2% de concentração inicial de celobiose, ao longo de 24 horas de processo: etanol (*quadrados*), acetato (*círculos*), e lactato (*triângulos*).

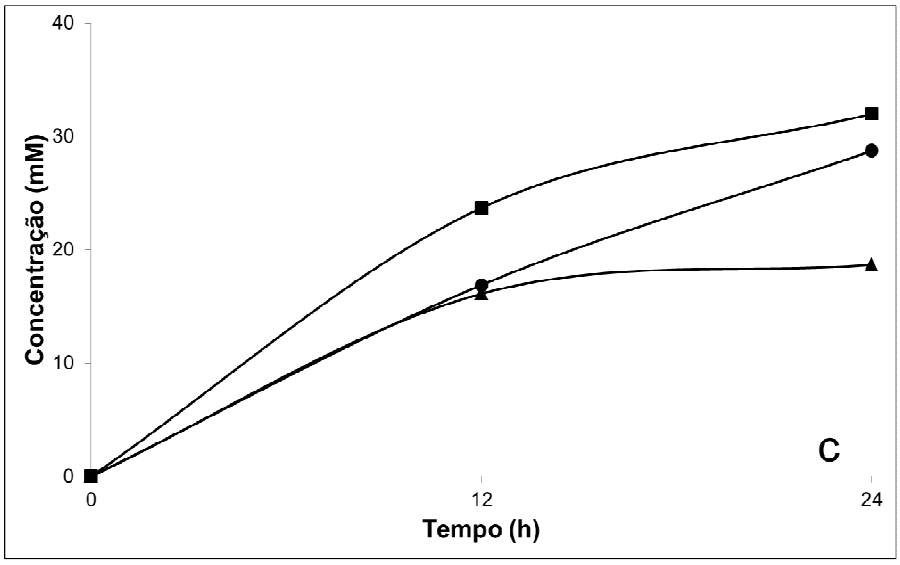


Figura 6.3c – Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio com 3% de concentração inicial de celobiose, ao longo de 24 horas de processo: etanol (*quadrados*), acetato (*círculos*), e lactato (*triângulos*).

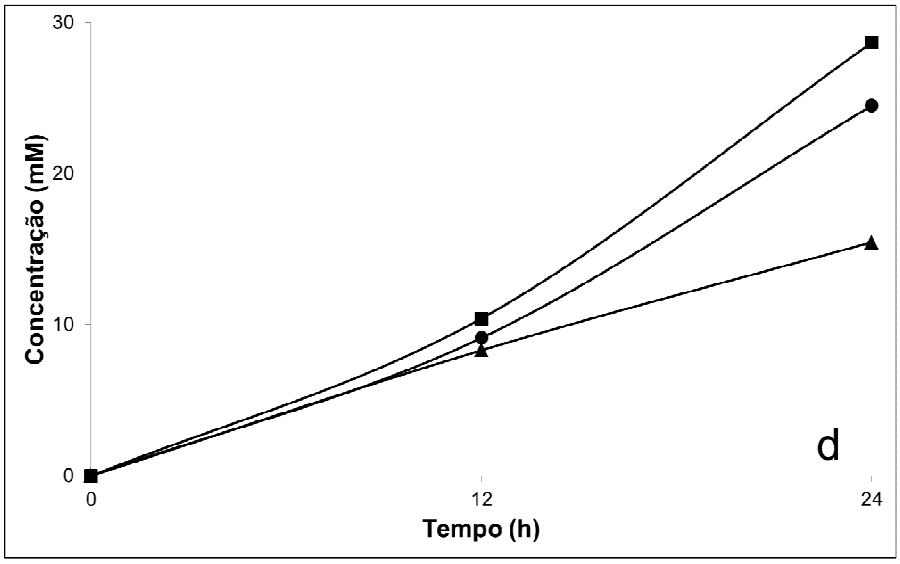


Figura 6.3d – Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio com 4% de concentração inicial de celobiose, ao longo de 24 horas de processo: etanol (*quadrados*), acetato (*círculos*), e lactato (*triângulos*).

Seria possível afirmar que já a partir da segunda condição (2%) ocorreu inibição pelo açúcar presente no meio, visto que, apesar do comportamento similar das curvas do gráfico, as concentrações dos produtos foram inferiores às da primeira condição e ainda havia 0,24g de glicose (celobiose em glicose-equivalentes + glicose) disponíveis no meio após 24 horas, enquanto na primeira condição restavam apenas 0,09g do açúcar.

Já nas terceira e quarta condições (3% e 4%, respectivamente), a provável inibição pela concentração dos açúcares pode ser facilmente visualizada nos gráficos.

Com base nesses dados, somente a concentração dos açúcares poderia ser usada para explicar o comportamento desses dois ensaios, visto que as concentrações dos produtos estavam em patamares inferiores aos alcançados nas condições anteriores e, portanto, não seriam inibitórias.

A tabela 6.3 apresenta os resultados obtidos ao final do processo (72 horas), usando diferentes concentrações de celulose purificada. Observa-se que, assim como ocorreu com a celobiose, quanto maior a concentração inicial de celulose, maior foi o acúmulo de açúcar (celobiose) no meio. Poderíamos então considerar que as enzimas de *C. thermocellum*, sejam elas livres ou celulossomais, foram capazes de degradar o substrato independente de sua concentração, porém, as células não tiveram a mesma capacidade de assimilar os açúcares liberados no meio.

Nesse sentido, Islam *et al.* (2009) e Otajevwo & Aluyi (2011) afirmam que a taxa de hidrólise da celulose pelas enzimas presentes nos celulossomas excede a taxa de utilização do carbono pelas células e que o alto acúmulo de açúcares é uma manifestação clara da alta produção e atividade das enzimas. Portanto, a solubilização da celulose não seria, em princípio, a etapa limitante para as baixas concentrações de etanol relatadas na literatura para *C. thermocellum*.

Tabela 6.3 – Efeito da concentração do substrato na concentração dos produtos finais, no acúmulo de açúcares e na eficiência de fermentação (EF %), após 72 horas de processo com *C. thermocellum* crescendo sobre celulose purificada, em frascos.

Concentração inicial de celulose (%)	**Concentração final de açúcares e produtos (mM)**					**EF (%)**
	Celobiose	**Glicose**	**Acetato**	**Lactato**	**Etanol**	
1	1,1±0,0 [a]	2,2±0,0[a]	16,8±0,7	12,1±1,7	20,3±1,5	16,5
2	6,3±0,0[a]	12,4±0,0[a]	14,5±0,0[a]	12,1±0,0[a]	22,4±0,1	9,1
4	9,0±0,0[a]	10,7±0,0[a]	12,5±0,0[a]	12,0±0,1	20,5±0,1	4,2

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção. EF: eficiência de fermentação - % de glicose inicial disponibilizada, transformada em etanol.

Xu *et al.* (2010), consideram que a acidificação do sistema por concentrações de acetato e lactato superiores a 1000mM e 500mM, respectivamente, poderiam causar a inibição dos celulossomas. Portanto, neste

caso, tal inibição não teria ocorrido visto que as concentrações de acetato e lactato obtidas foram muito baixas para causar uma acidificação acentuada do meio. O pH verificado ao final do processo foi de 5,8, 5,8 e 5,7 para a primeira, segunda e terceira condição, respectivamente.

O comportamento observado neste ensaio foi similar ao observado no ensaio com celobiose. Ou seja, a medida que as enzimas hidrolisavam o substrato disponível e os açúcares se acumulavam no meio a taxa de internalização dos açúcares diminuía, provavelmente por causa da diminuição nos níveis de ATP intracelular (Strobel *et al.*, 1995).

Cabe lembrar que durante a hidrólise da celulose podem ser obtidas celodextrinas maiores do que celobiose, as quais também podem ser internalizadas pelo microrganismo. Sabe-se que *C. thermocellum* consegue internalizar, pelo menos, até celotetraose (Zhang &Lynd, 2005).

Strobel *et al.* (1995) realizaram vários experimentos para avaliar a cinética da fermentação de *C. thermocellum*, nos quais verificaram que a internalização da celobiose era inibida, por competição, pela presença de celodextrinas mais longas. Segundo os autores, durante os experimentos a internalização da celobiose foi virtualmente eliminada na presença de excessos (20 vezes) de celotriose, celotetraose ou celopentaose. Já o excesso de glicose não teria o mesmo efeito sobre a celobiose e vice-versa por causa da presença de mecanismos de internalização separados para esses dois açúcares. Portanto, a presença de celodextrinas maiores, não quantificadas neste ensaio, poderia explicar o acúmulo de celobiose verificado.

Embora a concentração de etanol na segunda condição avaliada (22,4mM), tenha sido maior do que na primeira condição (20,3mM), a eficiência de fermentação apresentou resultados opostos (16,5% na primeira condição e 9,1% na segunda condição). Com relação à utilização do substrato verifica-se um comportamento similar, com 47% de consumo na primeira condição, e 39% na segunda condição (figura 6.4). Portanto, a despeito das concentrações de etanol obtidas, podemos concluir que a primeira condição apresentou um resultado global melhor do que as demais condições. Sendo assim, a concentração de substrato de 1% foi selecionada para os próximos ensaios.

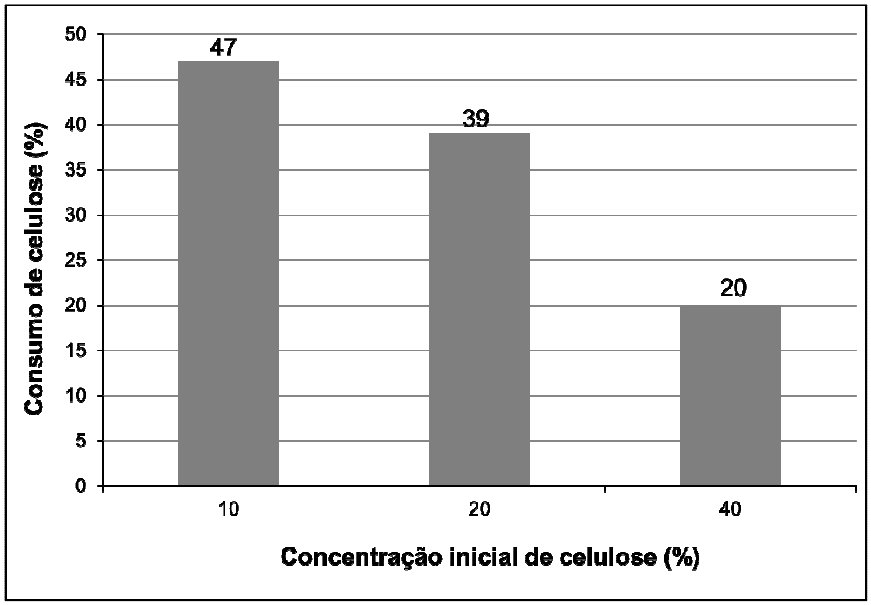


Figura 6.4 – Consumo de celulose (%), após 72 horas de fermentação em frascos *C. thermocellum* em diferentes concentrações iniciais de celulose purificada (1%, 2% e 4%).

Comparando os resultados do segundo experimento com celulose purificada (tabela 6.4), cujo objetivo foi o de avaliar o efeito do tamanho do inóculo sobre a produção de etanol, com os resultados do experimento anterior (tabela 6.3) vemos que mantendo a concentração de substrato (1%) e dobrando o tamanho do inóculo (20% v/v) foi possível aumentar em 1,4 vezes as concentrações de todos os

produtos. Contudo, houve aqui um acúmulo considerável de açúcares ao final do período avaliado (72 horas).

Tabela 6.4 – Efeito do tamanho do inóculo (%) sobre a concentração dos produtos, acúmulo de açúcares (mM) e eficiência de fermentação (EF %), após 72 horas de fermentação em frascos com *C. thermocellum* crescendo sobre celulose purificada (1%).

Tamanho do inóculo (%)	**Concentração final de açúcares e produtos (mM)**					**EF (%)**
	Celobiose	**Glicose**	**Acetato**	**Lactato**	**Etanol**	
10	1,0±0,1	2,2±0,0[a]	16,8±0,7	12,1±1,7	20,3±1,5	16,5
20	2,8±0,1	7,9±0,7	25,2±2,2	16,9±2,5	29,2±1,9	23,7

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção. EF: eficiência de fermentação - % de glicose inicial disponibilizada (celulose transformada em glicose-equivalentes), transformada em etanol.

Seria razoável afirmar que, em havendo maior número de células haverá também um maior número de enzimas sendo produzidas e, portanto, uma hidrólise mais eficiente do substrato disponível. Assim, de acordo com as afirmações de Strobel *et al.* (1995) seria esperado um acúmulo de açúcares no meio, seja pela diminuição na taxa de internalização devido à queda nos níveis de ATP intracelular, ou pela presença de celodextrinas maiores.

No entanto, Özpinar & Özkan (2007) verificaram o efeito oposto. Segundo os autores o aumento no volume de inóculo resultou em níveis mais baixos de acúmulo de glicose.

Poderíamos considerar também que se o processo fosse mantido por um período de tempo maior do que 72 horas, as possíveis inibições teriam sido suplantadas e, portanto, teria sido possível consumir todo o açúcar disponível e, consequentemente, obter maiores concentrações dos produtos.

A necessidade de realizar um terceiro ensaio para avaliar o efeito da agitação sobre o processo fermentativo partiu de informações obtidas a partir de vários artigos. Bothun *et al.* (2004), consideram que a agitação pode ser utilizada para controlar a concentração dos gases dissolvidos e, consequentemente, alterar a proporção entre os produtos finais. Cabe lembrar que um processo estático estaria mais próximo das condições encontradas por *C. thermocellum* em ambientes naturais do que um processo com agitação (Freier *et al.*, 1988).

Os resultados do ensaio realizado mostraram (tabela 6.5) que a ausência de agitação levou a um aumento de 1,2 vezes na concentração final (72 horas) de etanol e uma diminuição nas concentrações de lactato e acetato, quando comparados aos resultados do ensaio anterior, o qual foi realizado com agitação de 80rpm. Aparentemente, a falta de agitação causou uma mudança no metabolismo, direcionando o carbono para a produção de etanol em detrimento da produção de lactato e acetato.

Tabela 6.5 – Efeito da agitação sobre as concentrações dos produtos finais, acúmulo de açúcares (mM) e eficiência de fermentação (EF %), após 72 horas de fermentação em frascos com *C. thermocellum* crescendo sobre celulose purificada (1%), com 20% (v/v) de inóculo.

Agitação	**Concentração final de açúcares e produtos (mM)**					**EF (%)**	**Razão Etanol/ Acetato**
	Celobiose	**Glicose**	**Acetato**	**Lactato**	**Etanol**		
80rpm	2,8±0,1	7,9±0,7	25,2±2,2	16,9±2,5	29,2±1,9	23,7	1,2
0	0,8±0,0[a]	1,6±0,0[a]	17,2±0,3	7,3±0,0[a]	34,7±0,0[a]	33,8	2,0

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção. EF: eficiência de fermentação - % de glicose inicial disponibilizada (celulose transformada em glicose-equivalentes), transformada em etanol.

De acordo com Lamed *et al.* (1988), nos processos sem agitação o meio fica supersaturado de H_2 e essa supersaturação leva a um aumento na razão etanol/acetato, o que também foi verificado neste experimento (tabela 6.5). Freier *et al.* (1988) demonstraram que em culturas não agitadas, a celulose e as células

aderidas a esta se depositam no fundo do frasco e o H_2 produzido é aprisionado no sedimento influenciando o resultado da fermentação, enquanto em culturas agitadas o H_2 formado escapa para a fase gasosa.

Os mesmos autores (Freier *et al.,* 1988) verificaram também que culturas agitadas a 200rpm não conseguiam iniciar o crescimento, e conjecturaram que isso se daria devido a uma influência negativa da alta agitação sobre o sistema celulásico, quando o microrganismo cresce sobre celulose. Ou seja, a agitação não permitiria a formação do complexo celulose-enzima-microrganismo impedindo, em grande parte, a hidrólise da celulose e a consequente liberação dos açúcares para crescimento e manutenção do microrganismo.

Segundo Islam *et al.* (2006) e Roberts *et al.* (2010) o fluxo metabólico é influenciado não só pela taxa de assimilação de carbono, pelas mudanças no pH e no potencial redox, e pelo acúmulo dos produtos finais, mas também pela pressão parcial de hidrogênio [pH_2].

A formação do H_2 em organismos como *C. thermocellum* é usada para canalizar o excesso de equivalentes redutores gerados durante o catabolismo dos carboidratos (Raman *et al.*, 2011). A manutenção do balanço redox tem se demonstrado muito importante quando se busca aumentar a produção de solventes por microrganismos anaeróbios termofílicos. Roberts *et al.* (2010) previram um aumento de 15 vezes na produção de etanol através da deleção do gene para hidrogenase denominado Cthe_3003.

É possível que a mudança verificada no fluxo metabólico pelos resultados das análises deste ensaio, no qual foi possível aumentar a concentração de etanol e diminuir as concentrações de lactato e acetato, tenha ocorrido pela manutenção da [pH_2] junto aos complexos celulose-enzima-microrganismo, depositados no fundo dos frascos.

Li *et al.* (2012) provaram a importância da [pH_2] realizando um experimento, com uma mesma cultura de *C. thermocellum*, no qual o gás de espargimento foi trocado de N_2 para H_2. Os resultados mostraram uma diminuição na produção de acetato de 35%, a manutenção dos níveis de produção de lactato, e um aumento de 350% na produção de etanol.

Portanto, seria possível explorar o efeito dos gases dissolvidos sobre a seletividade por um produto de interesse e sobre seu rendimento, bem como sobre o crescimento celular, para melhorar os processos de produção de solventes através da manipulação da concentração destes, sejam provenientes da fermentação ou exógenos, por meio do ajuste da pressão total do sistema (Bothun *et al.*, 2004).

Na figura 6.5 são apresentados os ganhos obtidos ao longo dos ensaios em frascos com celulose purificada nos quais foram avaliados os efeitos da concentração inicial de substrato, volume de inóculo e agitação.

Com base nesses resultados foram estabelecidas as condições para os próximos experimentos em frascos – concentração de substrato de 1%, tamanho de inóculo de 20% (v/v) e remoção da agitação.

O próximo ensaio comparou o desempenho de *C. thermocellum* em celulose microcristalina (Avicel®) e celulose purificada (JT Baker). A tabela 6.6 apresenta os resultados alcançados no ensaio.

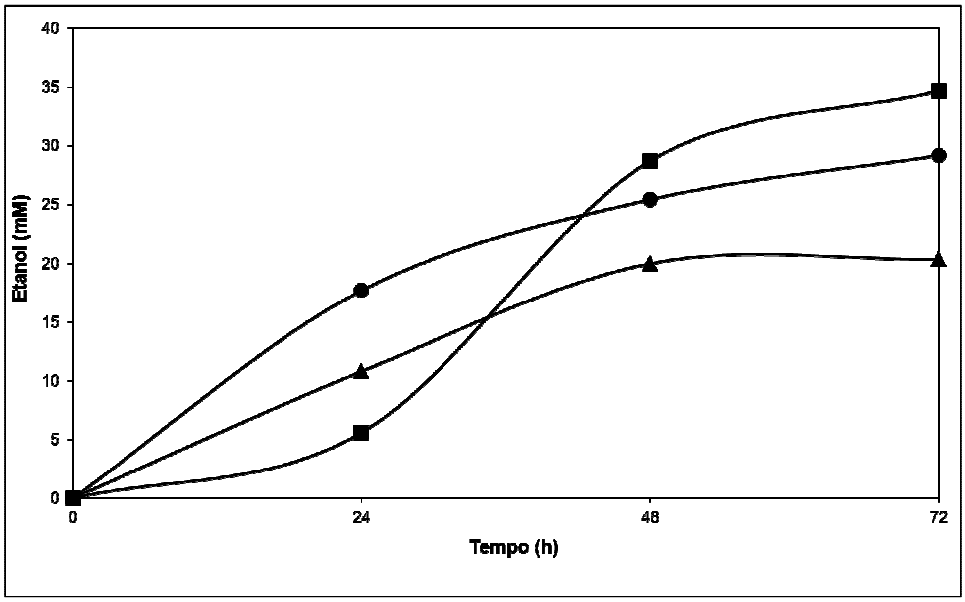


Figura 6.5 – Ganhos em termos de produção de etanol (mM), em função do tempo, nas fermentações em frascos com *C. thermocellum* em diferentes condições: concentração inicial de celulose de 1%, 10% (v/v) de inóculo e 80rpm (*triângulos*); concentração inicial de celulose de 1%, 20% (v/v) de inóculo e 80rpm (*círculos*); e concentração inicial de celulose de 1%, 10% (v/v) de inóculo, e sem agitação (*quadrados*).

De acordo com os dados, parece que este substrato estimulou a produção de lactato em detrimento, principalmente, da produção de etanol. Sabe-se que a acessibilidade das enzimas (exo- e endocelulases) às microfibrilas de celulose da parede vegetal pode ser afetada pela cristalinidade da celulose, mas também pela quantidade ou distribuição da lignina e/ou hemicelulose presentes, bem como pelo tamanho da partícula e a porosidade do material (Park *et al.*, 2010). As características dos materiais utilizados como, por exemplo, tamanho de partículas, poderiam explicar diferenças nas taxas de hidrólise, caso estas tivessem sido quantificadas, mas não explicariam as diferenças encontradas na formação dos produtos e, especialmente, no acúmulo de açúcares.

Portanto, levando em consideração os resultados obtidos nesta etapa, bem como as informações coletadas a partir da literatura, a celulose purificada foi selecionada para os experimentos em biorreatores instrumentados.

Tabela 6.6 – Resultados comparativos – concentrações dos produtos finais, acúmulo de açúcares (mM) e eficiência de fermentação (EF %) – dos ensaios com celulose purificada (JT Baker) e celulose microcristalina (Avicel®), após 72 horas de fermentação em frascos com *C. thermocellum*, nas mesmas condições de processo: concentração inicial de substrato, 1%; volume de inóculo, 20% (v/v); sem agitação.

Tipo de celulose	**Concentração final de açúcares e produtos (mM)**					**EF (%)**	**Razão Etanol/ Lactato**
	Celobiose	**Glicose**	**Acetato**	**Lactato**	**Etanol**		
JT Baker	0,8±0,0[a]	1,6±0,0[a]	17,2±0,3	7,3±0,0[a]	34,7±0,0[a]	33,8	4,7
Avicel	4,2±1,1	4,2±0,9	10,1±1,3	25,7±2,5	18,8±1,4	16,8	0,7

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção. EF: eficiência de fermentação - % de glicose inicial disponibilizada (celulose transformada em glicose-equivalentes), transformada em etanol.

Ainda na etapa de ensaios em frascos foram avaliados mais dois substratos: o bagaço *in natura* e o bagaço pré-tratado por hidrólise ácida.

A tabela 6.7 apresenta os resultados obtidos ao final do processo (72 horas), usando as condições estabelecidas anteriormente, comparando-os com o melhor resultado obtido com celulose purificada.

Apesar das concentrações de etanol obtidas terem sido menores do que no ensaio com celulose purificada os resultados podem ser considerados melhores, especialmente com o bagaço *in natura*, em termos de conversão do substrato disponível a etanol (EF %). A explicação para essa consideração é que, em média, apenas 40% do bagaço *in natura* e 53% do bagaço pré-tratado, nas condições citadas, é composto por celulose. Portanto, se considerarmos esses percentuais teríamos no ensaio com bagaço *in natura* e no ensaio com bagaço pré-tratado uma concentração de celulose de ≅ 0,4% (4,0g/L) e ≅ 0,5% (5,3g/L), respectivamente,

menor do que a concentração usada nos ensaios com celulose purificada (1% ou 10g/L).

Se considerarmos a massa inicial de celulose disponível, nesses três ensaios, a conversão de glicose a etanol foi de 33,8% no ensaio com celulose purificada, 48,0% no ensaio com bagaço *in natura* e de 35,9% no ensaio com bagaço pré-tratado.

Porém, relativamente, a produção de acetato foi maior com bagaço do que com celulose. É possível que o acetato, proveniente dos grupos acetil liberados da hemicelulose pelo processo de pré-tratamento ou pela ação das xilanases, tenha colaborado com os valores de concentrações encontrados.

Tabela 6.7 – Resultados comparativos – concentrações dos produtos finais, acúmulo de açúcares (mM) e eficiência de fermentação (EF %) – dos ensaios com celulose purificada, bagaço *in natura* e bagaço pré-tratado, após 72 horas de fermentação em frascos com *C. thermocellum*, nas mesmas condições de processo: concentração inicial de substrato, 1%; volume de inóculo, 20% (v/v); sem agitação.

Tipo de substrato	**Concentração final de açúcares e produtos (mM)**						**EF (%)**	**Razão Etanol/ Acetato**
	Celobiose	**Glicose**	**Xilose**	**Acetato**	**Lactato**	**Etanol**		
Celulose purificada	0,8±0,0[a]	1,6±0,0[a]	n.q.	17,2±0,3	7,3±0,0[a]	34,7±0,0[a]	33,8	2,0
Bagaço *in natura*	n.d.	n.d.	0,7±0,0[a]	12,1±0,5	3,1±0,0[a]	21,9±0,6	48,0	1,8
Bagaço pré-tratado	1,2±0,0[a]	1,1±0,0[a]	0,5±0,0[a]	10,8±0,0[a]	1,7±0,2	19,6±1,6	35,9	1,8

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção; n.d. – não detectado; n.q. – não quantificado. EF: eficiência de fermentação - % de glicose inicial disponibilizada (celulose transformada em glicose-equivalentes), transformada em etanol.

Poder-se-ia afirmar então que, apesar da presença da lignina no bagaço *in natura*, não houve, aparentemente, redução da capacidade hidrolítica do microrganismo. Já a obtenção de concentrações menores de etanol no ensaio com bagaço pré-tratado pode ter sido causada pela presença de algum tipo de inibidor

proveniente do pré-tratamento, tais como, furfural e/ou 5-hidroximetilfurfural, que possam ter permanecido na fibra mesmo após as lavagens.

Segundo Lynd *et al.* (2002) *C. thermocellum* é capaz de crescer em substratos lignocelulósicos pré-tratados que contenham toda ou a maior parte da lignina presente antes do pré-tratamento, tendo obtido resultados similares para a fermentação de celulose microcristalina Avicel® e madeira pré-tratada. Portanto, a presença de lignina insolúvel *per se* parece não reduzir as taxas de hidrólise.

Nos ensaios anteriores foi obtida uma concentração de etanol de 19,6mM usando bagaço pré-tratado como substrato e 18,8mM usando celulose microcristalina Avicel®. Esses dados corroboram com a afirmação de Lynd *et al.* (2002).

6.3.2. Estudo do meio de fermentação

A tabela 6.8 apresenta a média dos resultados finais (72 horas), para cada um dos 27 ensaios, em termos de concentração de produtos e açúcares (mM) e alteração do pH.

Com base nesses resultados foram calculados os efeitos de cada variável sobre a variável resposta (produção de etanol). A tabela 6.9 apresenta o cálculo dos efeitos para a amostragem final (72 horas). No Apêndice C podem ser encontradas as tabelas com o cálculo dos efeitos para todos os produtos e açúcares analisados, nos 3 tempos amostrados (tabelas 1 a 5).

De acordo com o cálculo dos efeitos apenas o sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) e o pH foram estatisticamente significativos a 90% e 95%, respectivamente. Portanto, a princípio, todos os demais compostos poderiam ser removidos do meio ou deveriam ser selecionados outros níveis (+1 e -1) para serem avaliados.

Tabela 6.8 – Resultado final (72 horas) das análises (produtos, açúcares e pH) do planejamento experimental (PB24) para estudo do meio de fermentação.

Ensaio	Concentração final de açúcares e produtos (mM)					pH	
	Celobiose	Glicose	Acetato	Lactato	Etanol	Inicial	Final
1	1,3±0,3	2,0±0,1	3,9±1,2	3,4±0,2	1,8±0,4	6,7	6,5
2	4,8±0,3	9,1±3,0	2,7±0,0[a]	8,3±0,9	9,7±0,9	7,7	6,0
3	3,6±0,8	5,9±0,1	3,3±0,2	8,5±1,1	15,6±5,2	7,7	6,5
4	2,6±0,2	2,2±1,9	3,4±0,8	4,2±1,1	4,4±0,0[a]	6,7	6,5
5	1,7±0,1	1,9±0,2	3,9±0,2	4,9±1,0	5,3±3,6	6,7	6,3
6	1,5±0,2	0,5±0,1	3,4±1,1	3,5±0,2	2,1±0,1	7,7	7,4
7	1,1±0,6	2,2±0,5	16,8±3,6	7,8±0,3	10,9±0,6	7,7	6,5
8	4,7±1,0	6,1±0,3	8,2±0,0[a]	7,6±0,1	7,9±0,7	6,7	5,7
9	2,2±0,2	4,8±2,5	4,7±2,8	6,4±0,7	6,6±2,3	6,7	6,1
10	7,2±0,2	9,5±3,5	11,5±1,7	9,9±0,5	16,1±0,2	7,7	5,8
11	3,5±0,2	3,3±0,8	6,4±0,2	6,1±0,6	7,4±1,5	6,7	6,0
12	1,5±0,0[a]	0,5±0,1	2,0±0,0[a]	3,0±0,2	1,7±0,1	7,7	7,5
13	5,3±0,7	5,3±0,5	2,8±0,7	5,5±0,3	5,7±1,1	6,7	5,8
14	1,8±0,0[a]	1,9±0,1	5,4±1,4	3,5±0,1	2,1±0,5	6,7	6,5
15	3,0±0,5	3,9±1,3	6,1±1,3	5,8±0,6	6,4±0,6	6,7	6,3
16	3,0±0,5	3,1±2,2	3,4±1,6	5,5±0,8	5,5±0,8	6,7	5,8
17	5,1±0,7	6,4±1,1	2,9±1,3	7,1±0,2	13,5±2,8	7,7	6,2
18	0,6±0,2	1,1±0,3	3,3±0,1	8,6±0,6	19,4±4,7	7,7	6,5
19	1,5±0,0[a]	5,1±2,5	2,7±1,4	7,5±0,1	15,9±3,5	7,7	6,7
20	4,9±0,5	5,4±3,9	6,6±2,6	6,8±1,6	8,9±1,1	7,7	5,8
21	2,8±0,3	4,2±0,8	1,8±0,0[a]	5,5±0,1	10,1±0,0[a]	7,7	6,9
22	1,4±0,1	1,8±0,1	1,8±0,0[a]	3,6±0,1	2,2±0,1	6,7	6,6
23	3,0±0,7	5,5±0,5	3,2±0,3	6,0±0,0[a]	9,0±1,6	7,7	6,4
24	2,0±0,1	2,7±0,3	1,3±0,0[a]	3,8±0,6	2,6±1,8	6,7	6,5
25	5,5±0,4	11,0±0,1	6,1±0,1	10,1±0,5	16,6±0,2	7,2	5,8
26	3,6±1,3	7,1±4,7	7,4±2,1	8,4±1,6	14,2±2,9	7,2	5,8
27	4,7±1,1	7,7±5,7	7,6±2,4	8,6±1,3	13,9±1,4	7,2	5,8

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção.

É possível que as baixas concentrações obtidas (tabela 6.8), tenham mascarado os efeitos (tabela 6.9), subestimando-os ou superestimando-os.

As baixas concentrações obtidas poderiam ser justificadas pelo uso de um volume de inóculo menor (10% v/v). Porém, se compararmos estes resultados com os resultados apresentados na tabela 6.3 (20,3mM), na qual os ensaios também foram realizados com o mesmo tamanho de inóculo, veremos que apenas no ensaio 18 foi alcançada uma concentração similar (19,4mM).

Tabela 6.9 – Efeito de cada uma das variáveis analisadas sobre a variável resposta (etanol), ao final do processo (72 horas).

Variáveis	Código	Efeitos	p-valor
Celulose purificada	x_1	2,04	0,2142
Ex. de levedura	x_2	1,66	0,3049
MOPS	x_3	-0,57	0,7141
$(NH_4)_2SO_4$	x_4	-1,86	0,2547
KH_2PO_4	x_5	0,77	0,6243
K_2HPO_4	x_6	-0,39	0,8053
$MgCl_2.6H_2O$	x_7	2,45	0,1440
$CaCl_2.2H_2O$	x_8	0,28	0,8561
EDTA dissódico	x_9	1,31	0,4114
$MnSO_4.H_2O$	x_{10}	1,74	0,2826
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	x_{11}	-2,74	0,1076
$CoCl_2.6H_2O$	x_{12}	-1,31	0,4135
$NiCl_2.6H_2O$	x_{13}	0,21	0,8934
$ZnSO_4.7H_2O$	x_{14}	1,50	0,3518
$CuSO_4.5H_2O$	x_{15}	3,31	0,0604
$FeSO_4.7H_2O$	x_{16}	0,50	0,7494
pH	x_{17}	6,24	0,0034
Média		7,95	0,0000
Curvatura		13,84	0,0159

Obs.: p-valor < 0,05 - estatisticamente significativo a 95% de confiança; p-valor < 0,10 - estatisticamente significativo a 90% de confiança; p-valor > 0,10 - não são estatisticamente significativos dentro da faixa estudada.

Além das concentrações menores, verifica-se na tabela 6.8 que os desvios padrão também foram bem superiores aos normalmente observados nos ensaios anteriores. Ou seja, as réplicas, em alguns casos, apresentaram resultados bastante diversos, inclusive nas repetições do ponto central. Uma possível explicação para esse fato é a dificuldade de se padronizar o volume de inóculo a ser

adicionado aos frascos. Cabe lembrar que o inóculo é introduzido nos frascos com o auxílio de agulha e seringa, o que não possibilita uma quantificação exata do volume que está sendo adicionado.

Para ter inóculo suficiente para todos os 54 frascos usados no planejamento (108mL) foi necessário crescer o pré-inóculo em 2 frascos de penicilina de 100mL, com 60mL de meio de crescimento estéril em cada. Apesar da concentração celular em cada frasco de pré-inóculo ter sido quantificada e elas terem sido praticamente idênticas, o fato do septo dos frascos ter sido perfurado diversas vezes (27 vezes em cada frasco) para a retirada do inóculo acabou propiciando a entrada de oxigênio, o que foi verificado pela mudança de coloração do meio. Como nenhuma etapa deste trabalho foi realizada em câmara de anaerobiose, é possível que as últimas inoculações tenham sido prejudicadas e, que alguns frascos tenham iniciado com um inóculo viável menor do que os primeiros frascos inoculados.

A possibilidade de abrir os frascos para a retirada do inóculo de forma mais precisa com o uso de pipetas permitiria uma quantificação exata do inóculo diminuindo o impacto do mesmo sobre os resultados.

Analisando o ensaio 18, no qual se obteve o melhor resultado em termos de concentração de etanol, verifica-se que a fonte de carbono (celulose) foi usada no mesmo patamar (1% ou 10g/L) indicado pelos ensaios citados no início deste capítulo, como o mais adequado. O extrato de levedura foi usado na mesma concentração estabelecida para o meio de fermentação padrão (5g/L), confirmando que esse composto tem uma forte influência sobre a fermentação, representando

não só uma fonte de nitrogênio, mas também de aminoácidos, vitaminas e elementos traço essenciais para o crescimento do microrganismos (Islam *et al.*, 2013). Já o sulfato de amônia $(NH_4)_2SO_4$ parece ser desnecessário.

Pelos resultados desse ensaio o MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico), usado em experimentos sem controle de pH, como no caso dos frascos, para aumentar a capacidade tamponante do meio, poderia ter sua concentração reduzida, e as concentrações das fontes de fosfato (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) poderiam continuar sendo usadas nas concentrações já padronizadas (1,3g/L e 4,3g/L, respectivamente). De acordo com as informações passadas pelo pesquisador Steven Brown durante o Congresso *Clostridium XII* (2012, dados não publicados), os níveis de fosfato usados no meio podem alterar drasticamente a fermentação.

Ainda de acordo com os resultados do ensaio 18, as fontes de magnésio ($MgCl_2x6H_2O$) e de cálcio ($CaCl_2x2H_2O$) poderiam ser removidas do meio. No entanto, no estudo do meio realizado por Islam *et al.* (2013) uma alta concentração de cálcio (0,3g/L) favoreceu a produção de etanol, já uma alta concentração de magnésio (2,0g/L) teve um impacto negativo, privilegiando a produção de H_2, o que pode estar relacionado, segundo os autores, ao aumento na atividade da acetato quinase. Por outro lado, Balusu *et al.* (2004) consideram que a fonte de magnésio é um fator importante para aumentar a produção de etanol.

Com relação aos compostos presentes na solução mineral, com exceção do molibdato de amônia ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}x4H_2O$) e do cloreto de níquel ($NiCl_2x6H_2O$), todos os demais estavam presentes no ensaio 18 nas mesmas concentrações

utilizadas na solução mineral apresentada na tabela 3.4, do capítulo 3. Portanto, os dois compostos citados, a princípio, poderiam ser removidos da solução.

Visto que os resultados obtidos com este planejamento experimental apresentaram valores de etanol aquém do esperado devido à possível perda de anaerobiose, como explicado acima, e já que não havia uma câmara de anaerobiose disponível para repetir os ensaios com maior precisão, optou-se então por não dar continuidade ao estudo do meio de fermentação, pois a formulação do meio para o ensaio que apresentou os melhores resultados (ensaio 18) era muito similar ao meio que vinha sendo utilizado desde o início dos experimentos.

6.3.3. Ensaios em biorreatores instrumentados

Como citado na seção de materiais e métodos, o objetivo principal do primeiro ensaio em biorreatores intrumentados foi o de comparar o desempenho de *C. thermocellum* neste tipo de sistema com aquele verificado nas fermentações em frascos, usando como substrato a celulose purificada. A tabela 6.10 apresenta os resultados encontrados nas análises das amostras por HPLC (produtos e açúcares).

Tabela 6.10 – Resultados das análises por HPLC (produtos e açúcares em mM) das amostras do processo de fermentação em batelada simples em biorreator instrumentado com *C. thermocellum,* usando celulose purificada (JT Baker – 1%), 10% (v/v) de inóculo e agitação de 50rpm.

Tempo (h)	Concentração final de açúcares e produtos (mM)					EF (%)	Razão Etanol/ Acetato
	Celobiose	Glicose	Acetato	Lactato	Etanol		
24	0,0	0,0	26,8±0,0[a]	12,4±0,0[a]	38,2±0,2	34,1	1,4
48	0,0	0,0	33,0±0,1	14,3±0,2	28,3±0,5	25,3	0,9
72	2,6±0,0[a]	8,42±0,1	28,2±0,0[a]	15,4±0,5	15,7±0,2	14,0	0,6

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção. EF: eficiência de fermentação - % de glicose inicial disponibilizada (celulose transformada em glicose-equivalentes), transformada em etanol.

Comparando os resultados deste ensaio com os resultados da melhor condição encontrada nos ensaios em frascos (1% de substrato, 20% de inóculo, sem agitação – tabela 6.5) percebe-se que as concentrações obtidas com 24 horas de processo foram superiores às alcançadas em frascos após 72 horas. Porém, após a primeira amostragem o etanol parece ter sido consumido, enquanto o lactato e o acetato permaneceram praticamente estáveis nas duas últimas amostragens.

Comparando com os resultados em frascos poderíamos deduzir que as diferenças verificadas podem ter sido causadas porque nos reatores não é possível manter a pressão de hidrogênio [pH_2], por não se tratar de um sistema totalmente vedado como nos frascos, o que poderia ter desviado o metabolismo. Com relação ao etanol é possível que este tenha sido arrastado para o *head space* (espaço livre ente o meio e o topo do vaso), visto que não foram encontradas referências na literatura que citem o consumo do etanol por *C. thermocellum*. Esse arraste pode ter sido propiciado pela temperatura de processo (60°C), próxima da temperatura de ebulição do etanol (78°C), com a colaboração do gás de espargimento e da agitação.

A injeção de gás N_2 e a agitação também podem ter propiciado a perda do H_2 produzido para o *head space*. Quando se possibilita o acúmulo do H_2 no meio, sua produção é inibida, com isso mais etanol ou lactato tem que ser produzidos para recuperar NAD^+ às expensas de acetato e ATP (Lamed *et al.*, 1988; Bothun *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012).

A explicação para isso é que a formação de acetato a partir de acetilCoA é energeticamente favorável em relação à produção de etanol. Contudo para *C.*

thermocellum produzir uma única molécula de acetato, duas moléculas de H_2 tem que ser formadas, de forma a manter o balanço redox. O aumento na [pH_2] altera o fluxo de elétrons da ferredoxina reduzida (FdH_2) para o NAD^+, fazendo com que a reação de formação de mais H_2 ($NADH+H^+ \leftrightarrow NAD^++H_2$) se torne termodinamicamente desfavorável. É por isso que a formação e manutenção da [pH_2] inibe a produção de acetato e aumenta a concentração de NADH, disponibilizando mais redutores equivalentes para a produção de etanol (ver figura 2.19, capítulo 2).

A fim de verificar um possível efeito das celodextrinas mais longas presentes no meio sobre a internalização da celobiose e, consequentemente, sobre a produção de etanol obtida, como citado por Strobel *et al.* (1995), as amostras deste ensaio foram enviadas para a análise de celooligosacarídeos por cromatografia de íons, no departamento de Química, do CENPES.

Por se tratar de uma metodologia em implantação algumas modificações tiveram que ser feitas com relação ao preparo das soluções-padrão (celobiose a celohexaose). Apesar da obtenção de curvas analíticas com excelente linearidade (r^2 > 0,999), utilizando as soluções preparadas em água, os interferentes presentes nas amostras, causavam distorções na separação (variação nos tempos de retenção) e na quantificação (integração de picos). Sendo assim, optou-se por preparar as soluções-padrão no próprio meio de fermentação. Dessa forma, os interferentes das amostras também estariam presentes nas soluções-padrão na mesma diluição.

Entretanto, mesmo com essas modificações, houve dificuldades no estabelecimento de parâmetros de integração nos cromatogramas gerados com as

soluções preparadas com o meio de fermentação, além do que foi impossível obter dados para a celotriose (C3), devido a que o pico da mesma co-eluiu com um pico não identificado.

A tabela 6.11 apresenta os resultados encontrados nas análises por cromatografia de íons para quantificação de celodextrinas, após correção dos valores pela subtração dos valores dos interferentes no branco.

Tabela 6.11 – Resultados das análises por cromatografia de íons (celodextrinas em mg/L) das amostras dos processos de fermentação em batelada simples em biorreator instrumentado com *C. thermocellum,* usando celulose purificada (JT Baker –1%), 10% (v/v) de inóculo e agitação de 50rpm.

Amostra e tempo (h)	**Concentração final celodextrinas (mM)**			
	Celobiose	**Celotetraose**	**Celopentaose**	**Celohexaose**
BS/24h	0,006	<0,001	0,001	0,032
BS/48h	0,006	<0,001	<0,001	0,020
BS/72h	0,008	<0,001	0,0	0,009
Branco	0,029	0,013	0,007	0,002

Obs.: BS – batelada simples.

Percebe-se pelos dados da tabela 6.11 que após a correção alguns valores ficaram muito baixos. Isso pode ter ocorrido porque os valores subtraídos se referem aos interferentes presentes no meio de fermentação no tempo 0 (zero). É esperado que ao longo do processo de fermentação os compostos presentes no meio sejam consumidos pelo microrganismo. Portanto, neste caso, os valores dos interferentes a serem subtraídos estariam sendo superestimados nas amostras. Isso poderia explicar porque o valor encontrado para a celobiose na amostra de 72 horas foi inferior ao valor encontrado para a mesma amostra (tabelas 6.10), quando esta foi analisada por HPLC.

De acordo com o técnico responsável pela análise, o efeito da matriz (meio de fermentação), especialmente do tioglicolato de sódio, resazurina e os subprodutos e/ou contaminantes presentes no extrato de levedura, na separação e detecção das celodextrinas, poderia ser reduzido através da utilização de algum recurso de preparo da amostra como, por exemplo, (1) percolação da amostra em cartucho contendo resina de troca iônica em pH apropriado (menor que o pKa das celodextrinas), ou (2) utilização da técnica de cromatografia 2D, com uma coluna de troca iônica na primeira dimensão para retenção de ânions indesejáveis, e uma coluna para separação de carboidratos.

Sendo assim, não foi possível tirar conclusões a partir dos dados obtidos com a análise por cromatografia de íons, com relação a uma possível inibição causada pela presença das celodextrinas. Porém, é interessante ressaltar a diminuição das concentrações de celohexaose ao longo do tempo, o que poderia ser explicado pela ação das exoglucanases (ou celobiohidrolases). Não foram encontrados registros na literatura que comprovem a internalização de celodextrinas tão longas, no entanto, foi encontrado um trabalho que comprovou o modo de ação da enzima CelO (exoglucanase) de *C. thermocellum* na hidrólise das celodextrinas (Zverlov *et al.*, 2002). Nesse trabalho, os autores comprovaram que a celobiose pode ser gerada a partir da hidrólise das celotetra-, celopenta- e celohexaoses, enquanto a celotriose foi produzida somente a partir da celopentaose. Esses dados poderiam então explicar a redução verificada na concentração de celohexaose.

O segundo ensaio em biorreator instrumentado foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da produção de H_2 sobre o metabolismo de *C. thermocellum*, como citado anteriormente, trocando a injeção de N_2 pela injeção de H_2. Li *et al*.

(2012) realizaram um experimento similar com a mesma linhagem, no qual eles verificaram a redução da produção de acetato em 35% e o aumento da produção de etanol em 350%. Porém, o sistema montado pelos autores permitia a manutenção da [pH_2], o que não seria possível no modelo de reator disponível para a realização dos ensaios deste trabalho.

A tabela 6.12 apresenta os resultados das análises das amostras por HPLC. Observa-se que a produção de etanol foi um pouco inferior à obtida no ensaio anterior. Porém, a produção de acetato foi reduzida em 31% e a de lactato em 86%. A figura 6.6 mostra a comparação das concentrações de produtos obtidas ao final do processo (72 horas) nos dois ensaios realizados em biorreator instrumentado até este momento.

Tabela 6.12 – Resultados das análises por HPLC (produtos e açúcares em mM) das amostras do processo de fermentação em batelada simples em biorreator instrumentado com *C. thermocellum,* usando celulose purificada (JT Baker – 1%), 10% (v/v) de inóculo, agitação de 50rpm e injeção de H_2 (100ccm).

Tempo (h)	**Concentração final de açúcares e produtos (mM)**					**EF (%)**	**Razão Etanol/ Acetato**
	Celobiose	**Glicose**	**Acetato**	**Lactato**	**Etanol**		
24	0,0	0,5±0,0[a]	14,1±0,2	1,7±0,1	30,0±0,3	26,8	2,1
48	0,0	0,3±0,0[a]	18,4±0,5	2,1±0,2	28,2±0,2	25,1	1,5
72	0,0	0,2±0,0[a]	19,4±0,8	2,2±0,1	12,2±0,2	10,9	0,6

[a] Desvio padrão abaixo do limite de detecção. EF: eficiência de fermentação - % de glicose inicial disponibilizada (celulose transformada em glicose-equivalentes), transformada em etanol.

É provável que a diminuição nos níveis de ATP gerados, devido ao desvio do metabolismo do acetato para o etanol, tenha ocasionado uma diminuição nas taxas de transporte de açúcares para o interior da célula. Com isso, não haveria substrato suficiente para a manutenção dos mesmos níveis de produção verificados nos ensaios anteriores. Com pouco açúcar sendo internalizado não haveria também

acúmulo de frutose 1,6-difosfato e assim a lactato desidrogenase não seria ativada, reduzindo a produção de lactato.

Aparentemente, a injeção de H_2 causou de fato alterações no metabolismo de *C. thermocellum*. Porém, como não havia condições para gerar ou manter pressão dentro do vaso do biorreator, o gás H_2 passou a não ter mais efeito a partir do momento que foi alcançado o ponto de saturação do meio.

Portanto, como colocado por Lamed *et al.* (1988), o reconhecimento do efeito da supersaturação de H_2 sobre a distribuição dos produtos pode ter um impacto importante na tecnologia de fermentações anaeróbias. Justificando o estudo, no futuro, de configurações de reatores que permitam a aplicação de pressão fazendo com que seja possível ultrapassar o ponto de saturação de H_2 no meio.

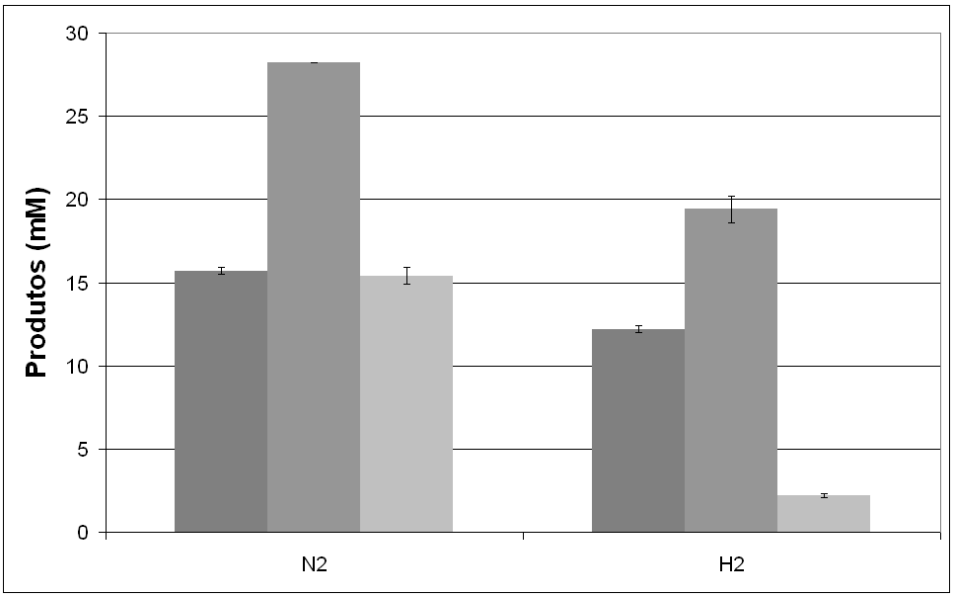


Figura 6.6 – Comparação das concentrações dos produtos (mM) ao final do processo de fermentação (72 horas) em biorreator instrumentado em batelada simples com *C. thermocellum*, com injeção de N_2 e H_2 a uma vazão de 100ccm: etanol (*cinza escuro*), acetato (*cinza médio*), e lactato (*cinza claro*).

Ainda na busca de melhores resultados com relação à produção de etanol optou-se por trocar o modo de operação do processo de batelada simples para batelada alimentada.

A batelada alimentada pode ser um caminho para aumentar o rendimento dos processos, visto que esse modo de operação é bem conhecido por evitar problemas relacionados à inibição pelo substrato. Contudo, cabe lembrar, que a inibição pelos produtos, especialmente pelo etanol, é outro ponto a ser considerado.

Usando este modo de operação e celulose microcristalina como substrato, Xu *et al.* (2010) conseguiram uma concentração final de etanol de 491mM com a linhagem JYT01 de *C. thermocellum*, a qual é tolerante a 3% (m/v) de etanol. O experimento foi mantido por 18 dias, com a degradação total do substrato e sem acúmulo de açúcares, indicando que todos os açúcares liberados da hidrólise da celulose foram completamente utilizados.

Transformando o substrato disponível em glicose-equivalentes, no estudo de Xu *et al.* (2010), apenas 29% dos açúcares contidos na celulose foram convertidos a etanol. Enquanto, que nos ensaios em frascos realizados neste trabalho, foi obtida uma conversão de 34% em apenas três dias (72 horas). Já nos ensaios realizados até o momento em biorreatores as conversões foram inferiores: 14% no ensaio com injeção de N_2 e 11% no ensaio com injeção de H_2.

Utilizando esta estratégia de processo (batelada alimentada), foi possível alcançar uma concentração de etanol superior (38,9mM) à obtida nos ensaios em frascos (34,7mM), no mesmo período de tempo (72 horas). A razão entre produção

de etanol e de acetato foi inferior neste ensaio (1,3), quando comparada à obtida no último ensaio em frascos (2,0), e a eficiência de fermentação (EF %) foi praticamente a mesma (31,5% neste ensaio e 33,8% no último ensaio em frascos).

A figura 6.7 mostra o perfil cinético encontrado neste ensaio e a figura 6.8 apresenta um gráfico comparativo dos resultados alcançados nos três ensaios realizados até este ponto do trabalho, em biorreatores instrumentados – batelada simples com injeção de N_2, batelada simples com injeção de H_2 e batelada alimentada com injeção de N_2.

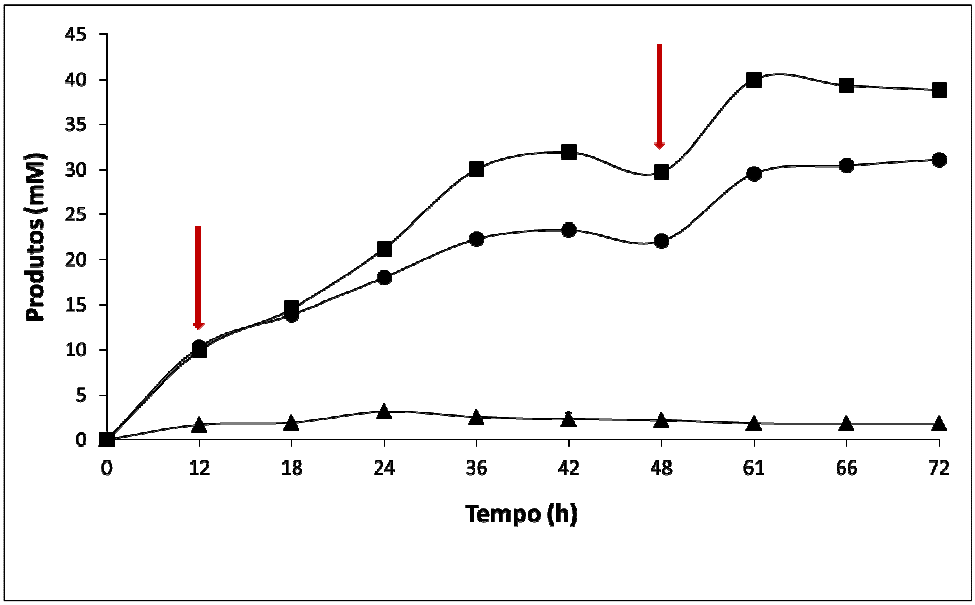


Figura 6.7 – Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio de fermentação em batelada alimentada com *C. thermocellum*, ao longo de 72 horas de processo: etanol (*quadrados*), acetato (*círculos*), e lactato (*triângulos*). As setas indicam o início e o final da alimentação, a qual foi mantida constante a uma vazão de ≅14mL/h.

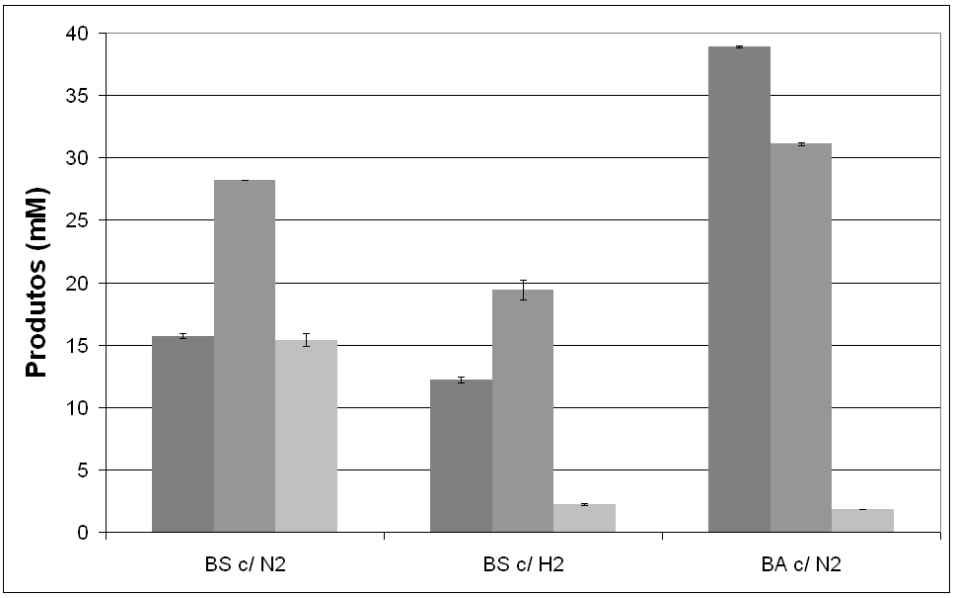


Figura 6.8 – Comparação das concentrações dos produtos (mM) ao final do processo de fermentação (72 horas) com *C. thermocellum*, em biorreator instrumentado em batelada simples com injeção de N_2 (BS c/ N_2), batelada simples com injeção de H_2 (BS c/ H_2) e batelada alimentada com injeção de N_2 (BA c/ N_2): etanol (*cinza escuro*), acetato (*cinza médio*), e lactato (*cinza claro*).

Com base no trabalho de Xu *et al.* (2010) e nos resultados obtidos nos ensaios em biorreatores até o momento, nos quais a estratégia de batelada alimentada se mostrou mais adequada, foi realizado um novo processo de fermentação em batelada alimentada com concentrações crescentes de substrato a fim de alcançar maiores concentrações de etanol, porém sem reduzir os melhores índices de conversão verificados até o momento.

A figura 6.9 mostra o perfil cinético verificado neste ensaio. Observa-se que a maior concentração de etanol (98,5mM) foi obtida após 9,8 dias de fermentação (234 horas), e que após esse período a concentração começou a diminuir. O mesmo ocorrendo com o acetato.

No entanto, apesar de ter sido alcançada uma concentração de etanol superior àquela obtida no ensaio de batelada alimentada com concentração fixa de

substrato (1%), a conversão dos açúcares presentes no substrato disponibilizado em etanol (EF %) diminuiu de 31,5% (ensaio anterior) para 26,7%, considerando o ponto do final da alimentação. No entanto, se considerarmos o final do processo (330 horas), a eficiência de fermentação caiu para 18,8%.

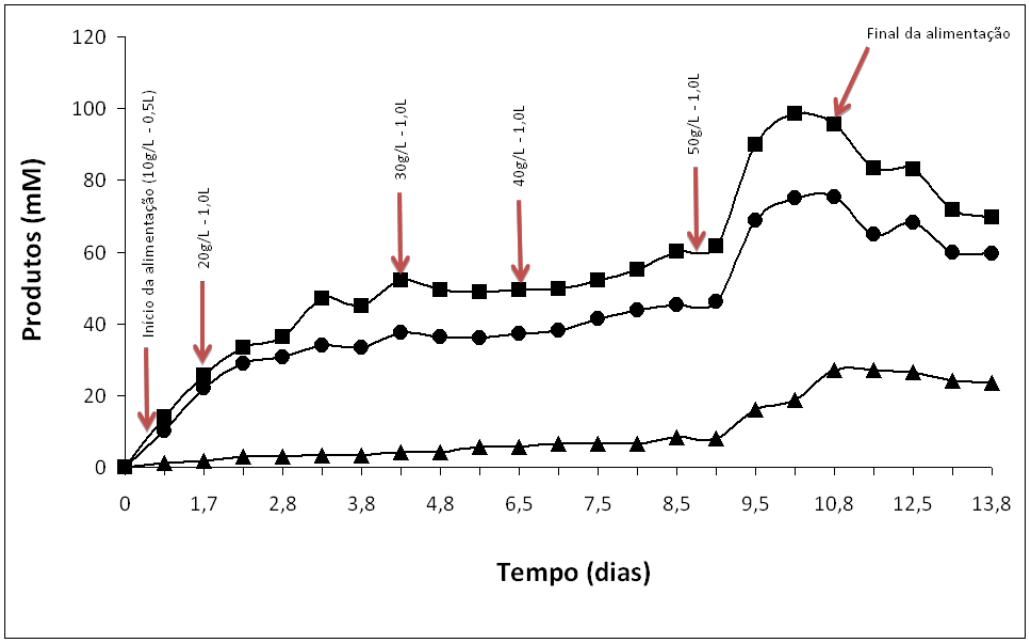


Figura 6.9 – Curvas de produção de etanol, acetato e lactato (mM) obtidas no ensaio de fermentação em batelada alimentada com concentrações crescentes de substrato, com *C. thermocellum*, ao longo de 330 horas (13,8 dias) de processo: etanol (*quadrados*), acetato (*círculos*), e lactato (*triângulos*). As setas em vermelho mostram o momento em que foi iniciada a alimentação com os diferentes meios, indicando a concentração e o volume adicionado.

A diminuição na conversão do substrato a medida que se aumenta a alimentação do mesmo já havia sido registrada para processos em modo de alimentação contínua. As possíveis explicações dadas para esse comportamento incluem (1) a inibição das células, da produção de celulases ou da ação das celulases por causa dos sais formados a partir da reação entre os ácidos orgânicos produzidos e a base adicionada para controlar o pH, (2) acúmulo de metabólitos intracelulares em níveis inibitórios, e (3) requerimento de algum nutriente específico

para o crescimento sobre celulose (Lynd *et al.*, 2002), o qual pode ter sido consumido ao longo do processo.

Observa-se que o maior pico de produção de etanol ocorreu no período entre 8,8 e 9,8 dias (210 e 228 horas), durante a alimentação do meio com maior concentração (5% ou 50g/L de celulose). Após 9,8 dias (234 horas) de fermentação a concentração de etanol começou a diminuir. A diminuição do etanol poderia ser explicada pelos motivos sugeridos anteriormente – arraste para o *head space* favorecido pela temperatura do processo, agitação e injeção de N_2. Já a diminuição do acetato poderia ser explicada pelo consumo desse metabólito para a recuperação de NAD^+, caso tenha ocorrido acúmulo de H_2 no meio (Lamed *et al.*, 1988; Bothun *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012).

Com relação ao lactato é provável que a partir da 15ª ponto amostral o substrato tenha começado a se acumular ativando a via do lactato como explicado anteriormente, justificando o aumento na concentração desse produto. No entanto, após o final da alimentação, à medida que o substrato continuou sendo consumido, a concentração de lactato ficou estabilizada.

6.4. Conclusões parciais

Esta etapa do trabalho investigou os efeitos da (1) concentração e do tipo de substrato, (2) do tamanho do inóculo, (3) da agitação, (4) da presença de gases, (5) da estratégia de processo, e (6) da composição do meio sobre a produção de etanol por *C. thermocellum*.

Com relação ao primeiro item verificou-se que, quanto mais alta a concentração de substrato, maior o efeito negativo sobre o consumo do açúcar e sobre a concentração final de etanol. Esse comportamento foi verificado tanto diante de substrato simples (celobiose), quanto de substrato complexo (celulose purificada).

Já o tipo do substrato parece ter tido uma influência menor do que esperado. Em termos de conversão do substrato, transformado em glicose-equivalentes, para etanol, foi possível obter uma eficiência de fermentação superior com o bagaço *in natura* (48%), do que com o bagaço pré-tratado (35,9%) e mesmo com a celulose purificada (33,8%), o que não seria esperado devido à presença da lignina – uma barreira natural para o ataque das enzimas.

O aumento do tamanho do inóculo de 10 para 20% mostrou-se bastante importante. Porém, o uso de volumes muito grandes de inóculo mostrou-se inviável na etapa de experimentos em biorreatores.

A ausência de agitação também melhorou o desempenho do microrganismo com relação à produção de etanol, o que pode ter sido ocasionado pela supersaturação do meio com o H_2 produzido, indicando que a manipulação das condições da fermentação pode melhorar o rendimento, ou mesmo redirecionar o metabolismo, para o produto desejado. No entanto, essa estratégia só pode ser aplicada nos ensaios em frascos, visto que em biorreatores é necessário manter uma agitação mínima que permita o controle automático do pH.

Esses achados levaram a realização de ensaios em biorreatores com injeção de H_2 para avaliar a influência da produção desse gás sobre o metabolismo de *C.thermocellum*. Porém, apesar de terem sido verificados efeitos sobre a produção de lactato e acetato, os quais tiveram suas concentrações reduzidas em 86% e 31%, respectivamente, não foi possível verificar nenhum efeito positivo sobre a produção de etanol. Esse resultado se deve, principalmente, à configuração dos biorreatores usados, nos quais não é possível gerar ou manter a pressão de hidrogênio. Portanto, investir no estudo de diferentes configurações de reatores, como aquela citada por Li *et al*. (2012), se faz necessário para poder investigar o efeito da pressão de hidrogênio sobre o fluxo de elétrons em *C. thermocellum*.

Outra ferramenta da engenharia de bioprocessos aplicada neste estudo foi a alteração da estratégia de condução do processo visando a obtenção de maiores concentrações de etanol. Nesse sentido, foram usadas três estratégias distintas: a batelada simples, a batelada alimentada e a batelada alimentada com concentrações crescentes de substrato.

Com a primeira estratégia foram obtidos 38,2mM de etanol, após 24 horas de processo, com uma conversão de açúcares em etanol de 34,1%. Já com a segunda estratégia foram obtidos 38,9mM de etanol, após 72 horas de processo e uma conversão de 31,5%. Na última estratégia utilizada, foram obtidos 98,5mM de etanol após 234 horas de processo, com uma conversão de substrato a produto de 26,7%.

Os resultados indicaram a necessidade de estudos mais aprofundados com relação à estratégia de processo para buscar o ponto ideal em que se possa obter a

maior concentração possível de etanol, com a maior conversão de substrato a produto e no menor espaço de tempo.

Não foi possível tirar nenhuma conclusão com relação ao estudo da composição do meio, principalmente, em função de dificuldades operacionais. Porém, é extremamente importante continuar investindo na redução dos custos do meio de cultivo, especialmente, quando se pretende viabilizar um processo em grande escala.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O principal objetivo deste trabalho foi o de selecionar e estudar um microrganismo capaz de converter substratos lignocelulósicos em etanol em uma única etapa, visando a futura aplicação do mesmo em um Bioprocesso Consolidado.

Para tanto foi escolhido o gênero *Clostridium* e dentro desse gênero foi selecionada, com base em ensaios preliminares de produção de etanol, a linhagem de *C. thermocellum* ATCC 27405.

Uma das etapas deste estudo envolveu a investigação dos genes e proteínas que apresentavam mudanças na expressão quando a linhagem selecionada crescia sobre bagaço pré-tratado em comparação com o seu crescimento sobre celobiose.

A análise genômica revelou 757 genes com mudanças na expressão, representando ≅24% do genoma total da espécie. Desse total, 21 genes representam enzimas da família das glicosil hidrolases e 10 correspondem a potenciais enzimas acessórias do celulossoma. Desses 31 genes, 24 possuem doquerina, ou seja, são genes que codificam enzimas celulossomais e os outros 7 genes representam enzimas livres.

Na análise proteômica 14 enzimas com ação direta na degradação da celulose apresentaram mudanças na expressão, sendo que 13 delas fazem parte do celulossoma (possuem doquerinas). Dado que as amostras para as análises foram

coletadas durante a fase exponencial do crescimento de *C. thermocellum* seria esperado que a maioria das enzimas detectadas fossem mesmo celulossomais. De acordo com Raman *et al.* (2011), *C. thercemollum* libera os celulossomas na fase estacionária e, a partir desse momento aumenta a expressão de enzimas acessórias livres para ajudar na exposição das fibras de celulose.

Nos resultados da análise genômica chamou a atenção a ausência de exoglucanases e a presença de várias xilanases, apesar da espécie não possuir a via para fermentação da xilose. Diferentemente, na análise proteômica, foram detectadas cinco enzimas exoglucanásicas.

Como citado anteriormente é possível que a capacidade de *C. thermocellum* de internalizar celodextrinas maiores do que celobiose torne menos necessária a expressão de exoglucanases se compararmos este microrganismo com outros que só conseguem internalizar açúcares simples. A suprarregulação de 8 dos 14 genes envolvidos com o transporte de celodextrinas comprova a capacidade da linhagem de internalizar as celodextrinas oriundas da degradação do bagaço pré-tratado.

Ao contrário do esperado, foram encontradas apenas 4 correspondências entre os resultados das análises genômica e proteômica, com relação aos genes/proteínas envolvidos na degradação da celulose. Raman *et al.* (2009 e 2011) encontraram 12 correspondências entre as enzimas celulossomais nos resultados das análises a nível de transcrição e de proteínas.

Por esse motivo, todos os resultados obtidos nas análises, e não apenas essas 4 correspondências, foram usados para definir quais enzimas seriam clonadas em *E. coli.*

A aplicação das 15 enzimas expressas em *E. coli*, reunidas em um mix denominado DEH, mostrou que estas tiveram uma excelente atividade sobre papel de filtro, chegando a 85% do total de glicose obtido com o preparado comercial. Porém, não se mostraram muito eficientes na hidrólise do bagaço pré-tratado, com apenas 22,4% dos açúcares obtidos com o preparado Cellic®Ctec2.

Esse fato não era esperado visto que as enzimas foram selecionadas a partir das análises genômica e proteômica nas quais foram usadas células crescidas em bagaço pré-tratado, após seis ciclos de adaptação. É possível que isso se deva ao fato de que a maioria das enzimas selecionadas para fazerem parte do mix DEH são enzimas celulossomais. No entanto, nesse mix elas atuaram como enzimas livres. Cabe lembrar que a eficiência na hidrólise da celulose apresentada pelos organismos que formam celulossomas está baseada, entre outros, na organização das enzimas e na ligação do complexo como um todo a um único local da fibra (Mazzoli *et al.*, 2012; Schwarz, 2001).

É importante lembrar que boa parte dos açúcares gerados durante a hidrólise do bagaço pré-tratado pelo mix DEH podem ter permanecido no meio na forma de oligossacarídeos maiores do que celobiose. Portanto, é necessário que se estabeleça a metodologia para quantificar esses açúcares antes de retomar os ensaios com esse mix.

A ordem de grandeza das concentrações de etanol obtidas com a linhagem selecionada (98,5mM ou 4,5g/L) ainda é muito pequena para justificar o uso da mesma em escala industrial. No entanto, um dos resultados mais interessantes verificados neste estudo foi a possibilidade de usar um resíduo lignocelulósico abundante como o bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *C. thermocellum*. Ainda mais interessante foi o fato de que, assim como já havia sido reportado por Lynd *et al*. (2002), *C. thermocellum* foi capaz de crescer sobre bagaço *in natura*, com resultados melhores do que aqueles obtidos com bagaço pré-tratado, a despeito da presença da lignina.

Os resultados gerados ao longo deste trabalho mostraram também que seria possível melhorar ainda mais a conversão do substrato em etanol investindo-se na configuração de processo.

Ficou demonstrado que a concentração do substrato, assim como afirmam outros autores (Islam *et al.,* 2009; Otajevwo & Aluyi, 2011), é uma variável importante a ser considerada, pois a taxa de hidrólise da celulose pelas enzimas presentes nos celulossomas excede a taxa de utilização do carbono pelas células. O acúmulo de açúcares verificado a medida que a concentração inicial de substrato aumenta é uma manifestação clara da alta produção e atividade das enzimas.

Da mesma forma o tamanho de inóculo influenciou os resultados obtidos. Ao dobrar o volume de inóculo adicionado ao processo a concentração dos produtos aumentou em 1,4 vezes.

O controle de pH e a agitação são também variáveis importantes a serem consideradas. Um pH ácido pode influenciar na produção das enzimas, bem como cessar o crescimento do microrganismo e levar à esporulação. Já a agitação pode ser utilizada para controlar a concentração dos gases dissolvidos e, conseqüentemente, alterar a proporção entre os produtos finais. Nos ensaios realizados, a produção de etanol aumentou quando a agitação foi retirada, porém não é possível realizar o controle de pH sem manter uma agitação mínima.

Foi demonstrado também o efeito do hidrogênio no fluxo metabólico da linhagem, reduzindo-se em 31% a produção de acetato e em 86% a de lactato com a injeção de H_2 exógeno.

Em trabalhos futuros é preciso avaliar a possibilidade de trabalhar com a estratégia de fermentação contínua, removendo os produtos formados para reduzir a possibilidade de inibição pelos produtos, assim como investir no desenho de biorreatores que permitam aumentar a pressão de hidrogênio, acima do ponto de saturação, de forma a desviar o fluxo metabólico para a produção de etanol, como aqueles usados pelas empresas produtoras de etanol a partir da fermentação de gás de síntese (por exemplo, Coskata e LanzaTech).

Nesse sentido, é imprescindível que se conheçam melhor os fluxos metabólicos a fim de utilizar as ferramentas da engenharia metabólica de modo a aumentar a produção de etanol, minimizando o gasto energético e a produção de substâncias secundárias não desejadas.

Também se faz necessário investir na redução dos custos relacionados aos requerimentos nutricionais da linhagem, minimizando a quantidade de oligoelementos e fontes de nitrogênio adicionadas ao meio, sem reduzir a eficiência da fermentação.

Com os avanços na área de biologia molecular, investigações direcionadas para o melhoramento genético da linhagem de estudo visando aperfeiçoar o perfil dos produtos finais, particularmente o etanol, serão altamente pertinentes para viabilizar um processo em maior escala.

Outra estratégia alternativa para explorar os resultados obtidos neste estudo seria a expressão de celulossomas em microrganismos não celulolíticos que produzem altos níveis de etanol como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

A expressão heteróloga de um 'celulossoma desenhado' (*designer cellulosome*) em um hospedeiro industrial seria uma abordagem atrativa para a produção de grandes quantidades de celulossomas, empregando a estratégia de processo de SSF (Bayer *et al.*, 2007).

Um celulossoma desenhado compreenderia um *scaffoldin* quimérico recombinante e doquerinas selecionadas para as enzimas desejadas. Esse *scaffoldin* atuaria como uma plataforma conceitual para promover a ação sinérgica entre essas enzimas (Bayer *et al.*, 2006).

Outra possibilidade para futuras investigações é a fermentação com co-culturas, incluindo outra espécie anaeróbia termofílica com capacidade para

fermentar a xilose (p. ex. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) liberada pela ação das xilanases presentes nos celulossomas de *C. thermocellum*. Visto que o processo realizado apenas com o uso de *C. thermocellum* não pode ser considerado um CBP de fato por causa da incapacidade da espécie de fermentar esse açúcar. Além disso, com essa estratégia seria possível aumentar as concentrações de etanol obtidas.

Apesar dos estudos com microrganismos anaeróbios para a produção de etanol terem sido deixados de lado durante muito tempo, em parte, pela grande atenção que foi dedicada ao conceito *Trichoderma-Saccharomyces*, a literatura recente, bem como planos de desenvolvimento energético de alguns países, sugerem que as linhas de pesquisas envolvendo microrganismos anaeróbios para a produção de etanol 2G seriam as mais promissoras a médio e longo prazo.

Sendo assim, espera-se que os dados gerados ao longo do desenvolvimento deste trabalho tenham ajudado a compreender melhor o complexo sistema enzimático desses microrganismos, bem como, as rotas metabólicas de formação dos produtos, de forma que, no futuro, os processos de conversão de materiais lignocelulósicos a etanol possam ser feitos de forma mais integrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. P. *et al.* (2010) Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. Revista Brasileira de Reprodução Animal.

ALZARI, P. M.; BÉGUIN, P. (2006) Catalytic components of the cellulosome. *In: Cellulosome*. Molecular anatomy and physiology of proteins. Capítulo IV, p. 69-94. Nova Science Publishers.

ARGYROS, D. A. *et al.* (2011) High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes. Applied Environmental Microbiology 77, 8288–8294.

BALUSU, R. R. *et al.* (2004) Production of ethanol from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19 in submerged fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology 117: 133-140.

BALUSU, R. R. *et al.* (2005) Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19. Process Biochemistry 40: 3025-3030.

BARCELOS, C. A. (2013) The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. Waste and Biomass Valorization 4(2): 341-346.

BAYER, E. A.; MORAG, E.; LAMED, R. (1994) The cellulosome – a treasure-trove for biotechnology. Trends Biotechnology 12: 378-386.

BAYER, E. A. *et al.* (1998) Cellulosomes – Structure and Ultrastructure. Journal of Structural Biology 124: 221-234.

BAYER, E. A.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. (2000) The cellulosome: an exocellular organelle for degrading plant cell wall polysaccharides. *In*: Glycomicrobiology. Ed.: DOYLE, R. J. pp. 387-430.

BAYER, E. A. *et al.* (2004) The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annual Review Microbiology 58: 521-554.

BAYER, E. A.; LAMED, R. (2006) The cellulosome saga: early history. *In:* Cellulosome. Eds.: UVERSKY, V.; KATAEVA, I.A. pp. 1-46.

BAYER, E. A. *et al.* (2006) Designer cellulosomes for future production of biofuels and biomaterials. Life Sciences Open Day, Weizmann Institute.

BAYER, E. A.; LAMED, R.; HIMMEL, M. E. (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. Current Opinion in Biotechnology 18: 237-245.

BÉGUIN, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. Annual Reviews Microbiology 44: 219-248.

BÉGUIN, P.; LEMAIRE, M. (1996) The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 31(3): 201-236.

BERLIN, A. *et al.* (2007) Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering 97(2): 287-296.

BHALLA, A. *et al.* (2013) Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. Bioresource Thecnology 128: 751-759.

BOISSET, C. *et al.* (1999) Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. Biochemical Journal 340: 829-835.

BOTHUN, G. D. *et al.* (2004) Metabolic selectivity and growth of *Clostridium thermocellum* in continuous culture under elevated hydrostatic pressure. Applied Microbiology and Biotechnology 65: 149-157.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. (2010) Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. Bioresource Technology 101: 4862-4874.

BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. (1999) exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nature Genetics 21: 33-37.

BROWN, S. D. *et al.* (2007) Construction and evaluation of a *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 whole-genome oligonucleotide microarray. Applied Biochemistry and Biotechnology 136-140: 663-674.

BROWN, S. T. *et al.* (2011) Mutant alcohol dehydrogenase leads to improved tolerance in *Clostridium thermocellum*. PNAS 108(33): 13752-13757.

BUABAN, B. *et al.* (2010) Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. Journal of Bioscience and Bioengineering *IN PRESS*.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. (2010) Prodcution of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. Bioresource Technology 10: 4754-4766.

CERQUEIRA, L. B. (2004) Avaliação genômica functional do impacto das diferenças genéticas entre hospedeiros na infecção por *Leishmania amazonensis*. Dissertação de mestrado, UFPR, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. (1998) Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. Cristical Reviews in Biotechnology 18(4): 295-331.

CHERUBINI, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. Energy Conversion and Management 51: 1412-1421.

CHEUNG, V. G. *et al.* (1999) Making and reading microarrays. Nature Genetics Supplement 21: 15-19.

CLAASSEN, P. A. M. *et al.* (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Applied Microbiology and Biotechnology 52: 741-755.

COLLINS, M. D. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. International Journal of Systematic Bacteriology 44(4): 812-826.

CORRALES, R. C. N. R. *et al.* (2012) Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO_2 and SO_2. Biotechnology for Biofuels 5:36.

DEMAIN, A. L. (2006) The crucial importance of bioethanol and the contribution of anaerobic bacteria and their cellulosomes. *In:* Cellulosome. Eds.: UVERSKY, V.; KATAEVA, I.A. pp. 1-9.

DEMAIN, A. L. (2009) Biosolutions to the energy problem. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36: 319-332.

DEN HAAN, R. *et al.* (2007) Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant Saccharomyces cerevisiae. Metab. Eng. 9(1): 87-94.

DENG, Y. *et al.* (2013) Redirecting carbon flux through exogenous pyruvate kinase to achieve high ethanol yields in *Clostridium thermocellum*. Metabolic Engineering 15: 151-158.

DESVAUX, M.; GUEDON, E.; PETITDEMANGE, E. (2000) Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. Applied and Environmental Microbiology 66(6): 2461-2470.

DESVAUX, M. (2005) *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. FEMS microbiology reviews 29: 741-764.

DESVAUX, M. (2006) Unravelling carbon metabolism in anaerobic cellulolytic bacteria. Biotechnology Progress 22: 1229-1238.

DOI, R. H.; KOSUGI, A. (2004) Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. Nature Reviews 2: 541-551.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review. Bioresource Technology 55: 1-33.

DUMITRACHE, A. *et al.* (2013) Form and function of *Clostridium thermocellum* biofilms. Applied and Environmental Microbiology 79(1): 231-239.

ERDEI, B. *et al.* (2012) Separate hydrolysis and co-fermentation for improved xylose utilization in integrated ethanol production from wheat meal and wheat straw. Biotechnology for Biofuels 5: 12.

FELIX, C. R.; LJUNGDAHL, L. G. (1993) The cellulosome: the exocellular organelle of Clostridium. Annual Reviews Microbiology 47: 791-819.

FONTES, C. M. G. A.; GILBERT, H. J. (2010) Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. Annual Review Biochemistry 79: 655-681.

FREIER, D.; MOTHERSHED, C. P.; WIEGEL, J. (1988) Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. Applied and Environmental Microbiology 54(1): 204-211.

FUJITA, Y. *et al.* (2004). Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of na engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 70(2): 1207-1212.

GARRITY, G. M.*et al.* (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer-Verlag. Ed. Eletrônica, disponível em: http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1703&VerticalID=0.

GE HEALTHCARE (2004) 2D Eletrophoresis – principles and methods. Uppsala, Suécia, 162p.

GEFEN, G. *et al.* (2012) Enhanced cellulose degradation by targeted integration of a cohesion-fused β-glucosidase into the *Clostridium thermocellum* cellulosome. Proceedings of the National Academy of Sciences 109(26): 10298-303.

GERNGROSS, U. T. *et al.* (1993) Sequencing of a *Clostridium thermocellum* gene (cipA) encoding the cellulosomal SL-protein reveals an unusual degree of internal homology. Molecular Microbiology 8:325-334.

GHESHLAGHI, R. *et al.* (2009) Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. Biotechnology Advances 27(6): 764-781.

GHOSE, T. K. (1987) Measurement of cellulase activities. Pure & Appl. Chem. 59(2): 257-268.

GUEDON, E. *et al.* (1999) Growth inhibition of *Clostridium cellulolyticum* by an inefficiently regulated carbon flow. Microbiology 145:1831-1838.

GUEDON, E.; DESVAUX, M.; PETITDEMANGE, H. (2002) Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. Applied Environmental Microbiology 68(1): 53-58.

GUIMARÃES, B. G. *et al.* (2002) The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase cels, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. Journal of Molecular Biology 320: 587-596.

HALSTEAD, J. R. *et al.* (1999) A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* as a componenet of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. Microbiology 145: 3101-3108.

HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. Biomass and Bioenergy, v.28, p.384 – 410.

HARMSEN, P. *et al.* (2010) Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Biosynergy report no. 1184, 54 pp.

HASUNUMA, T. *et al.* (2013) A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. Bioresource Technology 135: 513–522.

HE, Q. *et al.* (2009) Characterization of the impact of acetate and lactate on ethanolic fermentation by *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Bioresource Technology 100: 5955-5965.

HERRERO, A. A.; GOMEZ, R. F. (1980) Development of ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*: effect of growth temperature. Applied Environmental Microbiology 40(3): 571-577.

HERRERO, A. A. *et al.* (1985) Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids. Applied Microbiology and Biotechnology 22: 53-62.

HOLZMAN, D. C. (2008) The carbon footprint of biofuels: can we shrink it down to size in time? Environmental Health Perspectives 116(6): A246-A252.

HYEON, J. E.; JEON, S. D.; HAN, S. O. (2013) Cellulosome-based, *Clostridium*-derived multi-functional enzyme complexes for advanced biotechnology tool development: Advances and applications. Biotechnolgy Advances (*in press*).

ILMÉN, M. *et al.* (2011) High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels 4: 30.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Contribution of working group III to the fourth assessment report of the IPCC, 2007. Disponível em: http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg3/en/contents.html.

ISLAM, R.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D. (2006) Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by *Clostridium thermocellum* 27405. Applied Microbiology and Biotechnology 72: 576-583.

ISLAM, R. *et al.* (2009) Influence of initial cellulose concentration on the carbon flow distribution during batch fermentation by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. Applied Microbiology and Biotechnology 82: 141-148.

ISLAM, R. *et al.* (2013) Enhanced cellulose fermentation and end-product synthesis by *Clostridium thermocellum* with varied nutrient compositions under carbon-excess conditions. Biomass and Bioenergy 48: 213-223.

JIN, M. *et al.* (2011) Consolidated bioprocessing (CBP) performance of *Clostridium phytofermentans* on AFEX-treated corn stover for ethanol production. Biotechnology and Bioengineering 108(6): 1290-1297.

JOHNSON, E. A. *et al.* (1982) Saccharification of complex cellulosic substrates by the callulase system from *Clostridium thermocellum*. Applied and Environmental Microbiology 43(5): 1125-1132.

KARAKASHEV, D.; THOMSEN, A. B.; ANGELIDAKI, I. (2007) Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. Biotechnology Letters 29: 1005-1012.

KURASIN, M.; VALJAMAE, P. (2011) Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. The Journal of Biological Chemistry 286(1): 169-177.

LAMED, R., SETTER, E., BAYER, E. A. (1983) Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. Journal of Bacteriology 156: 828-836.

LAMED, R.; BAYER, E. A. (1986) Contact and cellulolysis in *Clostridium thermocellum* via extensile surface organelles. Cellular and Molecular Life Sciences 42(1): 72-73.

LAMED, R. *et al.* (1987a) Scanning electron microscopic delineation of bacterial surface topology using cationized ferritin. Journal of Microbiological Methods 7: 233-240.

LAMED, R. *et al.* (1987b) Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. Journal of Bacteriology 169(8): 3792-3800.

LAMED, R.; BAYER, E. A. (1988) The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. Advances in Applied Microbiology 33: 1-46.

LAMED, R. J.; LOBOS, J. H.; SU, T. M. (1988) Effects of stirring and hydrogen on fermentation products of *Clostridium thermocellum*. Applied and Environmental Microbiology 54(5): 1216-1221.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. (1998). Improving fermentation performance of recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. Appl. Biochem. Biotech. 70-72: 161-172.

LEE, H. J.; BROWN JR., M. (1997) A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*: a high resolution electron microscopy study. Journal of Biotechnology 57: 127-136.

LEE, S. J. *et al.* (2012) Biological conversión assay using *Clostridium phytofermentans* to estimate plant feedstock quality. Biotechnology for Biofuels 5:5.

LEMOS, J. L. S. (2001) Estudo da produção de xilanases por Aspergillus awamori em bagaço de cana. Dissertação de Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

LI, H. F. *et al.* (2012) Metabolic control of *Clostridium thermocellum* via inhibition of hydrogenase activity and the glucose transport rate. Applied Microbiology and Biotechnology 93: 1777-1784.

LIN, L.; XU, J. (2013) Dissecting and engineering metabolic and regulatory networks of thermophilic bacteria for biofuel production. Biotechnology Advances (*in press*).

LYND, L. R. *et al.* (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbial and Molecular Biology Reviews 66(3): 506-577.

LYND, L. R. *et al.* (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. An update. Current Opinion Biotechnol. 16(5): 577-583.

LYND, L. R. *et al.* (2006) Cellulose hydrolysis by Clostridium thermocellum: a microbial perspective. In: Cellulosome. Eds. UVERSKY, V.; KATAEVA, I.A. New York, Nova Science Publishers, pp 95-117.

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. (2012) Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. Biotechnology for Biofuels 2012, 5:22.

MARMUR, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3: 208-218.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. (2007) Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse.

MATTINEN, M-L. *et al.* (1997) Three-dimensional structures of three engineered cellulose-binding domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Protein Science 6: 294-303.

MAZZOLI, R.; LAMBERTI, C.; PESSIONE, E. (2012) Engineering new metabolic capabilities in bacteria: lessons from recombinant cellulolytic strategies. Trends in Biotechnology 30(2): 111-119.

McMILLAN, J. D. (1997) Bioethanol production. Status and prospects. Renewable Energy 10: 295-302.

McMILLAN, J. D. *et al.* (1999) Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. Appl. Biochem. Biotech. 77-79: 649-665.

MISHRA, S.; BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. (1991) Transcription of *Clostridium thermocellum* endoglucanase genes CelF and CelD. Journal of Bacteriology 173: 80-85.

MORGENSTERN, I.; KLOPMAN, S.; HIBBETT, D. (2008) Molecular evolution and diversity of lignina degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. Journal of Molecular Evolution 66: 243-257.

MORISAKA, H. *et al.* (2012) Profile of native cellulosomal proteins of *Clostridium cellulovorans* adapted to various carbon sources. AMB Express 2:37.

MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I. C. (2002) Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. v. 28, p. 24-39.

NAKAR, D. *et al.* (2006) The cohesin-dockerin interaction. *In:* Cellulosome. Eds.: UVERSKY, V.; KATAEVA, I.A. pp. 47-67.

NASS, L. L; PEREIRA, P. A. A.; ELLIS, D. (2007) Biofuels in Brazil: na overview. Crop Science 47: 2228-2237.

NG, T. K.; ZEIKUS, J. G. (1982) Differential metabolism of celobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Journal of bacteriology 150(3): 1391-1399.

OHWOAVWORHUA, F. O.; ADELAKUN, T. A. (2005) Some physical characteristics of microcrystalline cellulose obtained from raw cotton of *Cochlospermum planchonii.* Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Vol. 4, No. 2, December 2005, pp. 501-507.

OLSON, D. G. *et al.* (2010) Deletion of the Cel48S cellulose from *Clostridium thermocellum*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(41): 17727-17732.

OLSON, D. G. *et al.* (2011) Recent progress in consolidated bioproccessing. Current Opinion in Biotechnology 23: 1-10.

OLSSON, L. *et al.* (2006) Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing Saccharomyces cerevisiae. Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132: 117-129.

OTAJEVWO, F. D.; ALUYI, H. S. A. (2011) Cultural conditions necessary for optimal cellulose yield by cellulolytic bacterial organisms as they relate to residual sugars released in broth medium. Modern Applied Science 5(3): 141-151.

ÖZPINAR, Ö; ÖZKAN, M. (2007) Cellulose degradation and glucose accumulation by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 under different cultural conditions. Annals of Microbiology 57(3): 395-400.

PAGÈS, S. *et al.* (1997) Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: prediction of specificity determinants of the dockerin domain. Proteins 29: 517-527.

PANDEY, A.; MANN, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. Nature 405: 837-846.

PAPOUTSAKIS, E. T. (2008) Engineering solvetogenic clostridia. Current Opinion in Biotechnology 19: 420-429.

PARK, S. *et al.* (2010) Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulose performance. Biotechnology for Biofuels 3:10.

PEREIRA JR., N. (1991) Investigation of D-xylose fermenting yeast. Ph.D. Thesis. Deparment of Chemistry. The University of Manchester, U.K.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. (2008) Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefunery. Rio de Janeiro: Series on Biotechnology, v.2, 47 p.

PETITDEMANGE, E. *et al.* (1984) *Clostridium cellulolyticum* sp.nov., a cellulolytic, mesophilic species from decayed grass. International Journal of Systematic Bacteriology 34(2): 155-159.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K.; WYMAN, C. E. (1993) Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. Biotechnol. Bioeng. 41(9): 846-853.

PINHEIRO, B. A. (2009) Novel insight into the mechanism of cellulosome assembly and plant cell wall hydrolysis in anaerobic bacteria. Universidade Técnica de Lisboa, tese de doutorado, 140 pp.

RAJOKA, M. I. (2005) Regulation of synthesis of endo-xylanase and β-xylosidase in *Cellulomonas flavigena*: a kinetic study. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21: 463-469.

RAMAN, B. *et al.* (2009) Impact of pretreated switchgrass and biomass carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulosome composition: a quantitative proteomic analysis. PLoS ONE 4(4): e5271.

RAMAN, B. *et al.* (2011) Transcriptomic analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulose fermentation. BMC Microbiology 11: 134.

RAMOS, L. P. (2003) The chemistry involved in the steam treatmentof lignocellulosic materials. Química Nova 26(6): 863-871.

RANI, K. S.; SWAMY, M. V.; SEENAYYA, G. (1997) Increasaed ethanol production by metabolic modulation of cellulose fermentation in *Clostridium thermocellum*. Biotechnology Letters 19(8): 819-823.

REVERBEL-LEROY, C. *et al.* (1997) The processive endocellulase celf, a major component of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome: purification and characterization of the recombinant form. Journal of Bacteriology 179(1): 46-52.

RIBEIRO, C. M. (2011) Estudo proteômico de vermes adultos machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*. Dissertação de mestrado, USP, Instituto de Física, 92p.

ROBERTS, S. B. *et al.* (2010). Genome-scale metabolic analysis of *Clostridium thermocellum* for bioethanolproduction. BMC Systems Biology 4: 31-48.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. (1989) Cellulases of bacterial origin. Enzyme Microbiology Rechnology 11: 626-644.

ROCHA, T. L. *et al.* (2005) Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Comunicado Técnico 136, Embrapa.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F. (2009) Planejamento experimental e otimização de processos. 2ª ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 358 pp.

RYDZAK, T. *et al.* (2012) Proteomic analysis of *Clostridium thermocellum* core metabolism: relative protein expression profiles and growth phase-dependent changes in protein expression. BMC Microbiology, vol. 12, p. 214-232.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2012) Molecular cloning: a laboratory manual, 4a. ed. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Laboratory Press.

SATO, K. *et al.* (1993) Characterization of and ethanol hyper-production by *Clostridium thermocellum* I-1-B. Biosci. Biotech. Biochem. 57(12):2116-2121.

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

SHAO, X. *et al.* (2011) Conversion for Avicel and AFEX pretreated corn stover by *Clostridium thermocellum* and simultaneous saccharification and fermentation: insights into

microbial conversion of pretreated cellulosic biomass. Bioresource Technology 102(17): 8040-8045.

SHAW, A. J. *et al.* (2008) Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 105, 13769–13774.

SHIMON, L. J. W. *et al.* (1997) A cohesin domain from *Clostridium thermocellum*: the crystal structure provides new insights into cellulosoma assembly. Structure 5(3): 381-390.

SHIN, H., CHEN, R. R. (2008) Extracellular Recombinant Protein Production from a Escherichia coli Ipp Deletion Mutant, Biotechnology and Bioengineering, 101(6): 1288-1296.

SHIRATORI, H. *et al.* (2006) Isolation and xharacterization of a new *Clostridium* sp. That performs effective cellulosic waste digestion in a thermophilic methanogenic bioreactor. Applied and Environmental Microbiology 72(5): 3702-3709.

SHOHAM, Y., LAMED, R., BAYER, E. A. (1999) The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. Trends in Microbiology 275(7): 275-281.

SILVA E SILVA, A. M.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. (2007) Proteômica – uma abordagem funcional do estudo do genoma. Saúde & Ambiente em Revista 2(2): 1-10.

SLUITER, A. *et al.* (2008) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-510-42618.

SMITH, P. K. *et al.* (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 150: 76-85.

SMOLKA, M. B. *et al.* 2003. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. Proteomics 3(2): 224-237.

SOCCOL, C. R. *et al.* (2010) Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. Bioresource Technology 101: 4820-4825.

SOUTH, C. R.; HOGSETT, D. A.; LYND, L. R. (1993) Continuous fermentation of cellulosic biomass to ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology 39-40: 587-600.

STROBEL, H. J.; CALDWELL, F. C.; DAWSON, K. A. (1995) Carbohydrate transport by the anaerobic thermophile *Clostridium thermocellum* LQRI. Applied and environmental microbiology 61(11): 4012-4015.

SUDHA, R. K.; SWAMY, M. V.; SEENAYYA, G. (1996) High ethanol production by new isolates of *Clostridium thermocellum*. Biotechnology Letters 18(8): 957-962.

SUDHA, R. K.; SEENAYYA, G. (1999) High ethanol tolerance of new isolates of *Clostridium thermocellum* strains SS21 and SS22. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 173-178.

SUN, Y.; CHENG, I. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83: 1-11.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. BioResources 2(4): 707-738.

TARDIF, C. *et al.* (2006) Clostridium cellulolyticum: cellulosomes and cellulolysis. In: Cellulosome. Eds. UVERSKY, V.; KATAEVA, I.A. New York, Nova Science Publishers, pp 231-259.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. (2000) Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86: 111-127.

THE ROYAL SOCIETY (2008) Sustainable biofuels: prospects and challenges. Londres, UK, 82 p.

TOLONEN, A. C. *et al.* (2011) Proteome-wide systems analysis of a cellulosic biofuel-producing microbe. Molecular System Biology 7: 461.

TRACY, B. P. *et al.* (2011) Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. Current Opinion in Biotechnology 23: 1-18.

URQUIAGA, S., ALVES, B. J. R.; BOODEY, R. M. (2005) Produção de biocombustíveis: a questão do balanço energético. Revista de Política Agrícola, ano XIV, no. 1, 42-46.

WARNICK, T. A., METHÉ, B. A., LESCHINE, S. B. (2002) *Clostridium phytofermentans* sp. Nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1155-1160.

WEISE, U. (1998) Hornification-mechanisms and terminology. Paperi Ja Puu 80(2): 110-115.

WU, A.; LEE, Y. Y. (1997) Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. Biotechnology Letters 19: 977-979.

XIMENES, E. de .A.; FELIX, C. R. (2003) O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios : uma mini-revisão sobre o celulossoma. Universitas Ciencias da Saude 01(02) : 335-341.

XU, C. *et al.* (2010). Factors influencing cellulosome activity in Consolidated Bioprocessing of cellulosic ethanol. Bioresource Technology 101: 9560-9569.

YANG, Y. H.; SPEED, T. (2002) Design issues for cDNA microarray experiments. Nature Reviews Genetics 3: 579-588.

ZHANG, Y-H. P.; LYND, L. R. (2005) Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation. Proceedings of the National Academy of Sciences 102(20): 7321-7325.

ZHOU, J. *et al.* (2013) Atypical glycolysis in *Clostridium thermocellum*. Applied and Environmental Microbiology 79(9): 3000-3008.

ZVERLOV, V. V.; VELIKODVORSKAYA, G. A.; SCHWARZ, W. H. (2002) A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose. Microbiology 148: 247-255.

APÊNDICE A

PROTOCOLO 1
Extração de RNA

1ª. Etapa – Lise celular

1) Crescer a bactéria no meio desejado e parar o processo aproximadamente na metade da fase exponencial de crescimento celular.
2) Coletar 25mL do meio, centrifugar a 4000g por 10 min.
3) Remover o sobrenadante.
4) Ressuspender o *pellet* com 200µL de tampão TE (10mM Tris, 5mM EDTA) suplementado com 20mg de lisozima por ml.
5) Incubar as amostras por 5min, a 37°C.
6) Adicionar 1ml de Trizol gelado, agitar em vortex por 30 seg.
7) Armazenar a -80°C.

2ª. Etapa – Separação

1) Degelar o *pellet*.
2) Diluir a amostra 5x com Trizol gelado (volume final de 1mL = 200µL da amostra + 800µL de Trizol).
3) Adicionar 200µL de clorofórmio.
4) Agitar em vórtex, incubar à temperatura ambiente por 2 min.
5) Centrifugar por 15min a 12000g a 4°C.
6) Recuperar a fase aquosa para um novo tubo.

3ª. Etapa – Purificação do RNA

1) Adicionar 500µL de isopropanol aos tubos e invertê-los várias vezes.
2) Incubar os tubos por 10min à temperatura ambiente.
3) Centrifugar a 12000g por 10 min e descartar o sobrenadante.
4) Lavar o *pellet* com 1 mL de etanol (75%), preparado com água livre de RNAse).
5) Centrifugar a 8000g por 4 min a 4°C.
6) Descartar o sobrenadante e secar o pellet com a tampa aberta por 10 minutos ou mais (não deixar o *pellet* ressecar, apenas retirar o excesso de liquido).

7) Ressuspender em 50µL de água livre de RNAse com DEPC.
8) Quantificar o RNA por espectrofotometria (260nm e 280nm), gel de agarose ou *Bioanalyzer*.
9) Estocar as amostras a -80°C.

4ª. Etapa – Tratamento com DNAse

1) Usar DNAse I livre de RNAse (Qiagen) para remover traços de DNA cromossomal.
2) Para purificar o RNA, usar o RNeasy Mini Kit da Qiagen seguindo as instruções do fornecedor.

Obs.: todos os materiais a serem usados devem ser estéreis e certificados para a ausência de RNAse.

Fonte: Sambrook *et al.*¸1989.

PROTOCOLO 2

RT-PCR

1ª. Etapa – Preparo das amostras

Amostra A – com adição de DNase:

1) Colocar em um tubo para PCR 9,0µL da amostra de mRNA;
2) Adicionar 2,0 µL do mix 1.

Amostra B – sem adição de DNase:

1) Colocar em um tubo para PCR 9,0µL da amostra de mRNA;
2) Adicionar 2,0 µL de tampão (500mM Tris pH 7,5, 100mM $MgCl_2$, água DEPC1).

Mix 1 – 10 µL de tampão (500mM Tris pH 7,5, 100mM $MgCl_2$, água DEPC), 1 µL de DNase.

Colocar os tubos no termociclador nas seguintes condições:

- 37°C por 10 min (reação);
- 65°C por 5 min (parar a reação).

2ª. Etapa A – Reação de transcriptase reversa

Amostras A+ e B+ – com adição de RT:

1) Colocar em tubos para PCR 2 µL da amostra preparada na 1ª. Etapa;
2) Adicionar 1 µL de iniciadores aleatórios (*random hexamers*);
3) Adicionar 8 µL de água DEPC.

Amostras A- e B- – sem adição de RT:

1) Colocar em tubos para PCR 2 µL da amostra preparada na 1ª. Etapa;
2) Adicionar 1 µL de iniciadores aleatórios (*random hexamers*);
3) Adicionar 9 µL de água DEPC.

Controle positivo do processo:

1) Colocar em tubo para PCR 1 µL de RNA GAPDH;
2) Adicionar 1 µL de iniciadores aleatórios (*random hexamers*);
3) Adicionar 9 µL de água DEPC.

Incubar os tubos a 70°C por 5 min.

2ª. Etapa B – Reação de transcriptase reversa

1) Adicionar aos tubos com as amostras A+, B+ e ao controle positivo, 4 µL de tampão 5x concentrado, 4 µL de mix dNTP 10mM, 1 µL de enzima RT (transcriptase reversa);
2) Adicionar aos tubos com as amostras A- e B-, 4 µL de tampão 5x concentrado e 4 µL de mix dNTP 10mM.

Colocar os tubos no termociclador nas seguintes condições:

- 25°C por 5 min;
- 60°C por 1 hora;
- 70°C por 5 min.

3ª. Etapa – PCR para os produtos da RT

Em tubos para PCR adicionar:

1) 2,0 µL de amostra (para todas as amostras obtidas, incluindo o controle positivo);
2) 12,5 µL de Readymix 2x concentrado;
3) 1,0 µL de iniciador senso e 1,0 µL de iniciador antissenso para um gene conhecido;
4) 8,5 µL de água bidestilada.

Preparar um tubo a mais usando como amostra DNA genômico de *C. thermocellum*. Colocar os tubos no termociclador nas seguintes condições:

Fase	Ciclos	Temperatura	Duração
1	1	95°C	2 min
2	29	95°C	20 seg
		58°C	20 seg
		72°C	1 min
3	1	72°C	3 min

PROTOCOLO 3

GEL DE AGAROSE 1%

1) Pesar 0,600 g de agarose;
2) Medir 60 ml de tampão TBE 1x;
3) Misturar a agarose (0,600g) e o TBE 1x (60 ml);
4) Ferver a mistura no microondas até homogeneizar bem;
5) Esperar o gel esfriar um pouco;
6) Adicionar 0,5 µl de brometo de etídio (1%) no gel;
7) Derramar o gel na cubeta;
8) Colocar o pente e esperar solidificar (+- 30 min);
9) Remover o pente;
10) Derramar TBE 1x até cobrir o gel;
11) Colocar em um pedaço de parafilme gotas (1,0 µL) do tampão de carregamento com corante (ex. azul de bromofenol);
12) Colocar 10 µL da amostra na gota de corante e homegeneizar bem com a ponteira da pipeta;
13) Carregar cada amostra em um poço do gel;
14) Adicionar o marcador de peso molecular no primeiro e/ou último poços;
15) Conectar os cabos e estabelecer a voltagem ideal.

PROTOCOLO 4
CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO – SEC

Coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200, com tampão TBS 15mM $CaCl_2$, com fluxo de eluição de 1,2 mL/min:

1) Prepare a coluna com pelo menos 1,2 vezes o volume da mesma com tampão – etapa de pré-equilíbrio;
2) Carrega a coluna com a amostra;
3) Inicie a lavagem da coluna com o tampão no fluxo escolhido;
4) Colete as frações (1-5% do volume total da coluna);
5) Analise as frações no comprimento de onda de 280nm;
6) Avalie as frações de interesse por SDS-PAGE;
7) Reúna as frações que correspondam à fração celulossomal;
8) Reúna as demais frações, correspondendo à fração não-celulossomal.

PROTOCOLO 5

DIGESTÃO TRÍPTICA

1) Colocar 5µg de cada amostra (CB e BAG) em uma solução de 8M de uréia e 65mM de bicarbonato de amônio (ABC). Esta etapa é importante para ajustar o pH.
2) Reduzir as amostras com 3mM de DTT (ditiotreitol) em 100mM de bicarbonato de amônio, a 60°C, por 30 minutos.
3) Proceder a alquilação das amostras com 10mM de iodoacetamida em 100mM de bicarbonato de amônio, à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 minutos.
4) Realizar a etapa de tripsinização colocando as amostras em uma solução de 2M de uréia e 16mM de bicarbonato de amônio contendo tripsina modificada (Promega) à razão de 1:50 (enzima:substrato), à temperatura de 37°C, *overnight*.
5) Realizar uma segunda etapa de tripsinização pela adição de outra parte igual de tripsina e incubação a 37°C, por 4 horas.

PROTOCOLO 6

ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO

1) Centrifugar 500 mL da cultura bacteriana em crescimento rapidamente;
2) Suspender o pellet em tampão de extração (o volume do tampão deve ser de 4x o volume do pellet). É necessário uma concentração de 50µg de Proteinase K/ml de tampão de lise (estoque PK a 2,5µg/µl, logo usar 20µl do referido estoque para cada 1ml de tampão de lise), incubar 42°C por pelo menos 1h. Adicionar a Proteinase K somente na hora do uso;
3) Adicionar igual volume de Fenol equilibrado, misturar com cuidado (batidas no tubo e inversão) por 10 minutos e centrifugar por 10 minutos a 14.000g em TA;
4) Se a fase aquosa aparecer "nebulosa", adicionar igual volume de clorofórmio, misturar com cuidado e centrifugar (spin) a 14.000g por 10 minutos (siga para o passo 8);
5) Se a fase aquosa aparecer clara, transferir a mesma para um novo tubo (cuidando para não levar a fase oleosa);
6) Adicionar o mesmo volume de uma mistura Fenol-Clorofórmio (1:1), misturar por inversão do tubo com cuidado por 10 minutos;
7) Centrifugar por 10 minutos a 14.000g, preferencialmente a 4°C ou alternativamente em TA;
8) Transferir a fase líquida para um tubo limpo e adicione um volume igual de clorofórmio e misture cuidadosamente por 10 minutos, centrifugar a 14.000g por 10 minutos a 4°C ou em TA;
9) Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar o volume de 1/10, de uma solução 3M de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5x o volume total de etanol 100% gelado;
10) Incubar em geladeira 4oC por 15 minutos;
11) Centrifugar por 30 minutos a 14.000g em 4oC ou TA;
12) Descartar o sobrenadante e lavar o pellet duas vezes com 500µl de etanol 70% gelado, centrifugando por 10 minutos a 14.000g a 4oC ou TA;
13) Secar, invertendo o tubo em TA por 10 minutos (cuidando para não perder completamente o pellet);

14) Suspender o pellet em 50µl de TE (pode-se incubar o pellet por alguns minutos a 60°C para auxiliar na solubilização);
15) Tratar com 1 µl de RNAse (estoque a 10 µg/ml) por 1 hora a 37oC;
16) Checar a concentração de DNA em espectofotômetro ou em gel de agarose e estocar a –20°C.

Tampão de lise:

10mM Tris pH 7,4 (para fazer 20ml utilize: 200µl de Tris 1M)

10mM NaCl (200µl de NaCl 1M)

25mM EDTA (1ml de EDTA 0,5M)

1% SDS (2ml de SDS 10%)

16,6ml de H2O milliq

Fonte: Marmur, J. 1961.

PROTOCOLO 7
REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO – PCR

Após ressuspender os iniciadores preparar a quantidade de tubos para PCR necessária, de acordo com a quantidade de genes selecionados a serem amplificados, com a seguinte solução:

- Tampão Pfu Ultra 5,0µL
- dNTP mix 0,5µL
- DNA genômico de *C. thermocellum* 1,0µL
- Iniciador senso do gene selecionado 1,0µL
- Iniciador antissenso do gene selecionado 1,0µL
- Pfu Ultra Polimerase 1,0µL
- Água bidestilada 40,5µL

Além dos tubos para os genes selecionados, preparar mais 2 tubos para os controles positivo e negativo. Nesses tubos usar iniciadores para um gene já testado, sendo que no controle negativo ao invés do DNA genômico será adicionado água.

Levar os tubos para o termociclador, nas seguintes condições:

Fase	Ciclos	Temperatura	Duração
1	1	95°C	2 min
2	29	95°C	20 seg
		58°C	20 seg
		72°C	1 min
3	1	72°C	3 min

Fonte: Sambrook & Russel, 2012.

PROTOCOLO 8

PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

1) Placas com células incubadas a 37°C.
2) Escolha uma colônia e coloque-a para crescer a 37°C, 250rpm, *overnight* em 10ml de meio LB (ver protocolo 3) sem antibiótico.
3) Adicione 0,3ml da cultura crescida em 300ml de meio LB.
4) Incube as células a 37°C, 250rpm, até que a O.D.$_{600}$ atinja 0,2 (deve levar umas 2-3hs).
5) Distribua a cultura em 6 tubos de 50ml tubos, deixando-os em gelo por 15min.
6) Centrifugue a 1500rpm por 15min a 4°C, remova o sobrenadante.
7) Ressuspenda o *pellet* em 11,0ml de tampão RF1 gelado, por tubo.
8) Incube em gelo por 0,5-2 horas.
9) Centrifugue a 1500rpm por 15min a 4°C e remova o sobrenadante (neste ponto pode combinar todos os tubos em 2 tubos).
10) Ressuspenda o *pellet* em 16ml de tampão RF2 gelado (o *pellet* total dos 300ml).
11) Incube em gelo por 15min.
12) Distribua a suspensão em frascos de polipropileno estéreis, em alíquotas de 100 ou 200µl e imediatamente congele em nitrogênio líquido a -80°C.

Tampões:

	RF1 500ml		**RF2 200ml**
KCl (74,55g/mol)	3,7 g	KCl (74,55g/mol)	0,148 g
$MnCl_2$-4H_2O (197,9g/mol)	4,95 g		
		MOPS 0,5M pH6,8	4 ml
KOAc 1M pH7,5	15 ml		
$CaCl_2$-2H_2O (147 g/mol)	0,75 g	$CaCl_2$-2H_2O (147 g/mol)	2,2 g
Glicerol (92 g/mol)	**30g** / 75ml ?	Glicerol (92 g/mol)	30ml
Ajustar para pH 5,8 com HOAc 1M (~0,5ml) não autoclavar – filtrar!!		*Ajustar para pH 6.8 com NaOH 0,5M (~0,5ml)*	

Glicerol ~ 15% (w/v)

	KOAc 1M 50ml		**MOPS 0,5M 10ml**
KOAc *(98 g/mol)*	4,9 g	MOPS *(209,3 g/mol)*	1,05g
	Ajustar pH 7,5 com HCl (~ ul)		

Fonte: Sambrook & Russel, 2012.

PROTOCOLO 9

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

1) Adicione (~1µl) de DNA às células competentes (100µl, ou 50µl para plasmídeos não ligados), deixe em gelo por ~10 a 20 min.
2) Coloque em banho a 42°C por 2 min (choque térmico).
3) Coloque novamente no gelo por 1 min.
4) Adicione 1ml de meio LB e transfira para tubos de 5ml.
5) Coloque por ~1 hora a 37°C em *shaker*.
6) Centrifugue por ~2 min, a 14000rpm, ressuspenda em ~100µl (deixando um pouco no tubo). Opcional para plasmídeos ligados – pegue 100µl e plaqueie sem centrifugar.
7) Plaqueie em meio LB sólido + antibiótico.
8) Incube a 37°C *overnight*.

PROTOCOLO 10
MEIO LURIA-BERTANI (LB)

Sólido

1) Dissolva os reagentes abaixo em 1L de água:

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g
Agar	15g

2) Ajuste o pH para 7,5;
3) Autoclave;
4) Distribua nas placas de Petri e mantenha a 4°C.

Líquido

1) Dissolva os reagentes abaixo em 1L de água:

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g

2) Ajuste o pH para 7,5;
3) Autoclave;
4) Mantenha a 4°C.

PROTOCOLO 11
PCR DE COLÔNIA

1) Selecionar uma colônia da placa de petri e com auxílio de palito estéril replicar a colônia para outra placa com o antibiótico de seleção.
2) Incubar a placa para o processo de mini-preparação.
3) Com o auxílio do mesmo palito transferir parte da colônia para um microtubo, esfregando o palito nas paredes do mesmo.
4) Adicionar ao tubo:

a. 10,5 µL de água estéril;
b. 12,5µL de Readymix 2x concentrado;
c. 1,0 µL do iniciador senso;
d. 1,0 µL do iniciador antissenso.

5) Colocar os tubos no termociclador para 30 ciclos de:

a. Anelamento: 58°C, 20 segundos;
b. Extensão: 72°C, 2 minutos;
c. Desnaturação: 95°C, 20 segundos.

6) Visualizar os produtos em gel de agarose 1%.

Preparo de gel de agarose 1%

1) Pesar 0,600 g de agarose;
2) Medir 60 ml de tampão TBE 1x concentrado (obtido por diluição com água deionizada da solução comercial 10x concentrada);
3) Misturar a agarose (0,600g) e o TBE 1x (60 ml);
4) Ferver a mistura no microondas até homogeneizar bem;
5) Esperar o gel esfriar um pouco;
6) Adicionar 0,5 µl de brometo de etídio (1% m/v) no gel;
7) Derramar o gel na cubeta;
8) Colocar o pente e esperar solidificar (± 30 min);
9) Remover o pente;
10) Derramar o TBE 1x até cobrir o gel;
11) Colocar em um pedaço de parafilme gotas (1,0 µL) do tampão de corrida com corante (ex. azul de bromofenol);

12) Colocar 10 µL da amostra na gota de corante e homegeneizar bem com a ponteira da pipeta;
13) Carregar cada amostra em um poço do gel;
14) Adicionar o marcador de peso molecular no primeiro e/ou último poços;
15) Conectar os cabos e estabelecer a voltagem ideal de acordo com o tempo de corrida desejado.

Fonte: Sambrook *et al.*, 1989.

PROTOCOLO 12
INDUÇÃO DE EXPRESSÃO COM IPTG

1) Inocular uma colônia de bactérias isoladas em 12 mL de meio Luria-Bertani (LB; ver protocolo 3 RT BIO 013/2011), com o antibiótico canamicina (50ng/ml) e incubar por 12-16 horas (*overnight*), a 37°C, sob agitação (250 rpm).
2) Adicionar o inóculo gerado (12 mL) em um Erlenmeyer de 2 L, com 500 mL de meio LB com antibiótico e incubar nas mesmas condições, até atingir a leitura ótica de A_{600nm}= ~1,0.
3) Adicionar IPTG para uma concentração final de 1mM (usar solução estoque de IPTG de 1M). Aconselha-se reservar uma pequena amostra da cultura antes de adicionar o IPTG para avaliar a expressão sem o IPTG.
4) Incubar a 37°C, sob agitação (250 rpm) por 3,5 horas.
5) Centrifugar a cultura a 4000g por 30minutos (ou 6000g por 15 minutos).
6) Descartar o sobrenadante.
7) Conservar o *pellet* a -20°C até o momento da purificação.

PROTOCOLO 13
PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR FPLC

Sonicação

1) Descongele o *pellet* à temperatura ambiente.
2) Use TBS + 5 mM de Imidazol para ressuspender o *pellet* com 1/10 do volume do sobrenadante (p. ex., se o crescimento foi em 500 mL de meio LB então ressuspenda o *pellet* com 50 mL de TBS).
3) Coloque o frasco em gelo e proceda à sonicação da seguinte forma: 3 pulsos, cada pulso deverá ficar 30 segundos ligado e 30 segundos desligado.
4) Centrifugue as amostras a 10.000g por 20 minutos.
5) A proteína deverá ser liberada para a fração solúvel (sobrenadante)

Pré-tratamento térmico

1) Aqueça um banho a 60°C.
2) Coloque as amostras no banho por 20minutos. Agita os frascos a cada 2 ou 3 minutos.
3) Centrifugue as amostras a 10.000 ou 20.000g por 20 minutos.
4) Reserve o sobrenadante para a purificação.

Purificação

1) Para quantidade de proteínas de ~40mg, usar coluna de vidro de 2,5 x 20 cm (Bio-Rad #737-4252), com válvula de 2 vias (Bio-Rad #732-8102).
2) Adicionar 10-20mL de resina carregada com níquel (Qiagen Ni-NTA 30210).
3) Lavar a coluna com água destilada (usar 5 vezes o volume da coluna).
4) Equilibrar a coluna com o tampão de corrida: TBS com 5mM de Imidazol (3 vezes o volume da coluna).
5) Fechar o fundo da coluna e adicionar a solução de proteína a ser purificada. Preencher o restante da coluna com o tampão de corrida e adicionar Imidazol para uma concentração final de 5mM.
6) Fechar a coluna.

7) Misturar gentilmente por 1 hora em incubadora rotatória à temperatura ambiente.
8) Remover o tampão de corrida através da válvula para ser reutilizado nas próximas corridas.
9) Adicionar o tampão de eluição (TBS com 10mM de Imidazol) até preencher a coluna.
10) Misturar gentilmente por 30min em incubadora rotatória à temperatura ambiente.
11) Remover o tampão de eluição através da válvula para ser reutilizado nas próximas corridas.
12) Adicionar mais 50mL de tampão de eluição e deixar fluir através da válvula.

PROTOCOLO 14
QUANTIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Construção da Curva Padrão

1) Prepare soluções com o açúcar padrão a ser medido, diluindo a solução estoque com o tampão citrato 3, 5, 7, 10 e 20 vezes, atingindo um volume total de 1,5mL em cada solução;
2) Em tubos de vidro de 25mL, adicionar 500µL das soluções diluídas, 1mL de tampão citrato e 3mL do reagente DNS;
3) Tampe os frascos e misture em vórtex;
4) Prepare o branco para zerar no espectro antes da leitura das amostras. Para isso, em apenas um tubo, adicionar 1,5mL de água destilada e 3mL do reagente DNS;
5) Incube as amostras padrão e o branco em um banho a 100ºC por 5 min;
6) Adicione mais 20mL de água destilada as amostras e ao branco, homogeinize por inversão 3 vezes;
7) Então, insira o volume total a uma cubeta, calibrando o espectrofotômetro com o branco em 540nm. Registre os valores de absorvância de cada réplica dos pontos da curva. Construa uma curva de calibração plotando os valores de absorvância média medidos para cada solução (eixo y) *versus* a quantidade total de glicose nas amostras (em µmols) (eixo x). Verifique o coeficiente de determinação. Ele deve ser maior que 0,9900 para uma determinação acurada do conteúdo de glicose contido nas amostras com atividade desconhecida.

Preparo do reagente DNS

O reagente original de DNS deve ser preparado seguindo-se as concentrações apresentadas na tabela abaixo. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e o NaOH devem ser previamente dissolvidos e à solução originada são adicionados os demais componentes.

Componente	***Quantidade***
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
Sal de Rochele (tartarato duplo de sódio e potássio)	306,0 g
Fenol	7,6 mL
Metabissulfito de sódio	8,3 g
Água destilada	1416 mL

Preparo do tampão citrato de sódio 50mM

Este tampão é composto por duas soluções primárias, misturadas em diferentes proporções para cada pH desejado: 100 mM de ácido cítrico e 100 mM de citrato de sódio. Para chegar ao pH 4.8 deve-se misturar 75,5 mL de ácido cítrico com 24,6 mL de citrato de sódio, obtendo um volume final de 100 mL.

Preparo de solução padrão de glicose

1) Dissolva 200mg de D-glicose pura em 100mL de água destilada;
2) Distribua a solução em tubos plásticos (eppendorf com capacidade de 2mL) propriamente identificados e guarde-os congelados.

Atividade Exoglucanásica

1) Separar os tubos de rosca de acordo com o número de amostras e identificá-los;
2) Adicionar 500µL de extrato enzimático a tubos contendo 1mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 e 50mg de Avicel;
3) Incubar os tubos por 1 hora a 60ºC;
4) Em seguida, devem ser adicionados 3mL de reagente de DNS original, de forma a parar a reação enzimática;
5) Preparar um branco de substrato. Para isso adicione 3mL do reagente DNS antes de adicionar 50mg de Avicel, de forma a evitar que a reação enzimática ocorra;
6) Os tubos devem ser incubados por 5 min. a 100ºC;

7) Depois, adiciona-se 20mL de água destilada e as soluções são homogeneizadas por inversão;
8) Transferir cerca de 2mL para tubos tipo *eppendorf* que deverão ser centrifugados por 5 min a 20.000 g, para a sedimentação das partículas não hidrolisadas;
9) Por fim, o sobrenadante de cada amostra é transferido para uma cubeta, e são lidas as absorvâncias das soluções a 540nm. Cada análise deve ser realizada em triplicata;
10) Para o cálculo da atividade exoglucanásica usar a equação a seguir:

$$\text{Atividade (UI/L)} = \frac{\text{abs} \times f_d \times 1000}{\alpha \times 60 \times 0{,}5}$$

Onde: α é o coeficiente angular da curva de calibração; abs é o valor de leitura de absorvância da amostra; f_d é o fator de diluição (no tampão citrato) para as amostras; 60 é o tempo de reação (min); 1000 é um fator de ajuste de unidades (mL/L); e 0,5 representa o volume do extrato enzimático (mL) utilizado para o ensaio.

A atividade exoglucanásica deve ser expressa em unidades internacionais por litro de extrato enzimático (UI/L). Uma unidade de atividade de exoglucanase é definida como representando a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1,0 µmol de ART (glicose equivalente) por minuto, sob as condições do ensaio.

Atividade Endoglucanásica

O padrão de CMC utilizado nas quantificações enzimáticas padrão contem 20g/L desse polímero na forma de seu sal de sódio de média viscosidade dissolvido em tampão citrato de sódio pH 4,8.

Para a construção da curva padrão, neste caso, usar tubos *eppendorf* com 100µL das soluções de glicose diluídas e 300µL do reagente DNS e zerar o espectro com uma solução de 100µL de água destilada e 300µL do reagente DNS. Após o período de incubação adicionar mais 1,5mL de água destilada às amostras e ao branco. Os demais passos são iguais aos citados acima.

1) Separar os tubos tipo *eppendorf* de acordo com o número de amostras e identificá-los;
2) Pipetar 50µL de extrato enzimático para cada um dos tubos;
3) Incubar com 50µL de solução de CMC por 30 min a 60ºC;
4) Em seguida, devem ser adicionados 300µL de reagente de DNS original, de forma a parar a reação enzimática;
5) Os tubos devem ser incubados por 5 min. a 100ºC;
6) Por fim, adiciona-se 1,5 mL de água destilada e são lidas as absorvâncias das soluções a 540nm. Cada análise deve ser realizada em triplicata.

Para o cálculo da atividade endoglucanásica usar a mesma equação citada na atividade exoglucanásica, alterando o tempo de reação (30) e o volume de extrato enzimático (0,05).

Uma unidade de atividade de endoglucanase é definida como representando a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1,0µmol de ART (glicose equivalente) por minuto, sob as condições do ensaio.

Atividade Xilanásica

Para o cálculo da atividade xilanásica usar como substrato a xilana obtida de bétula (birchwood, Sigma, X0502). Preparar uma solução de xilana (1% m/v) em tampão citrato 50mM, pH 4,8.

Para a construção da curva padrão, neste caso, realizar o mesmo procedimento citado para a atividade endoglucanásica trocando a glicose pela xilose.

1) Separar os tubos tipo *eppendorf* de acordo com o número de amostras e identificá-los;
2) Pré-incubar 100 µL solução de xilana por 2 min a 60ºC;
3) Adicionar 50µL da enzima em cada um dos tubos e incubar por mais 15 min;
4) Em seguida, adicionar 1,5mL de NaOH 2,5M, misturar em vórtex, e ler as absorvâncias das soluções a 540nm. Cada análise deve ser realizada em triplicata.

Para o cálculo da atividade xilanásica usar a mesma equação citada na atividade exoglucanásica, alterando o tempo de reação (15).

Uma unidade de atividade de xilanase é definida como representando a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1,0µmol de ART (glicose equivalente) por minuto, sob as condições do ensaio.

Fonte: Ghose, 1987.

PROTOCOLO 15
QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO BCA

Para a realização dessa metodologia foi usado o kit conhecido como *Pierce BCA Protein Assay Kit – Reducting Agent Compatible,* compatível com amostras de proteínas contendo concentrações superiores a 5 mM de DTT, 35 mM de 2-mercaptoetanol ou 10 mM de TCEP.

Preparao de brancos e padrões

Branco padrão: este branco não contém proteína. Preparar 200 µL da solução tampão, sem agente redutor.

Branco da amostra: este branco não contém proteína. Preparar 200 µL da solução tampão contendo agente redutor na mesma concentração da amostra.

Padrões de proteína: diluir o conteúdo de uma das ampolas de padrão de albumina (BSA) em vários microtubos, utilizando preferencialmente a mesma solução tampão que é usada para as amostras. Usar o seguinte protocolo (tabela) como guia para o preparo dos padrões com volume suficiente para 3 réplicas (faixa de ensaio = 125 -2000 mg/mL):

Microtubo	Volume do diluente (solução tampão) - □L	Volume da solução padrão de BSA - □L	Concentração de proteína –□□g/mL
A	0	500 do estoque	2000
B	125	375 do estoque	1500
C	200	200 do estoque	1000
D	200	200 do microtubo B	750
E	200	200 do microtubo C	500
F	200	200 do microtubo E	250
G	200	200 do microtubo F	125

Preparo do reagente

Tampão de trabalho: diluir a solução tampão em 1:1 com água tipo 1 (ultrapura). Para amostras com pH < 5 não diluir a solução tampão.

Solução estoque de reagente de compatibilidade: adicionar 1 mL do tampão de trabalho ou da solução tampão para um tubo de reagente de compatibilidade. Agitar em alta rotação por 30 segundos para dissolver. Estocar a solução (se não utilizar em 8h) a 4°C, protegida da luz.

Reagente de trabalho BCA (Rt): Usar a seguinte fórmula para determinar o volume total de Rt necessário: ($X_{brancos}$ + $Y_{padrões}$ + $Z_{amostras}$) x (réplicas) x (volume de Rt por amostra) = Rt total necessário

Para preparar o Rt, misturar 50 partes do Reagente A com 1 parte do Reagente B (50:1, Reagente A:B). Quando o Reagente B é adicionado ao Reagente A, a solução apresenta turbidez, mas torna-se límpida e esverdeada após a mistura.

Quantificação de proteína

Pipetar 25 µL de cada réplica de padrão, amostras desconhecidas e dos brancos em microtubos de 1,5 mL.

Adicionar 25 µL da Solução estoque de reagente de compatibilidade em cada tubo e agitar a baixa rotação. A mistura adequada da amostra com a solução estoque de reagente de compatibilidade é essencial para a precisão do ensaio.

Incubar os tubos a 37°C por 15 minutos em um banho de água. O uso de estufas incubadoras pode introduzir erros significativos, devido à transferência de calor não uniforme.

Adicionar 1 mL do Rt em cada tubo e misturar bem. Incubar os tubos a 37°C por 30 minutos no banho de água.

Resfriar os tubos até à temperatura ambiente por 5-10 minutos.

Com o espectrofotômetro configurado a 562 nm, zerar o instrumento com uma cubeta de 1 mL cheia de água. Medir, em seguida, as absorbâncias de todas as amostras dentro de 10 minutos.

Subtrair a média dos valores de absorbância das réplicas do Branco padrão dos valores das absorbâncias de todos os padrões.

Subtrair a média dos valores de absorbância das réplicas do Branco padrão da média dos valores das absorbâncias das réplicas das amostras desconhecidas.

Preparar a curva padrão, plotando os valores das médias das absorbâncias de cada padrão (corrigidas pelo Branco padrão) *vs* concentração (mg/mL). Usar a curva padrão para determinar a concentração de proteína total de cada amostra desconhecida.

Fonte: Smith *et al.*, 1985.

APÊNDICE B

LISTA 1 – Genes infrarregulados.

	Identificação do gene	Valor de regulação		Identificação do gene	Valor de regulação
1	Cthe_2535080700002493	0,0969	53	Cthe_0695080700000688	0,2875
2	Cthe_2533080700002491	0,1265	54	Cthe_2405080700002365	0,2905
3	Cthe_2802080700002757	0,1398	55	Cthe_1069080700001059	0,2912
4	Cthe_2266080700002226	0,1497	56	Cthe_1252080700001242	0,2917
5	Cthe_2537080700002495	0,1586	57	Cthe_2918080700002872	0,2919
6	Cthe_2265080700002225	0,1716	58	Cthe_2406080700002366	0,2925
7	Cthe_2539080700002497	0,1873	59	Cthe_2582080700002538	0,2933
8	Cthe_2048080700002013	0,1924	60	Cthe_1767080700001746	0,2956
9	Cthe_2532080700002490	0,1951	61	Cthe_2536080700002494	0,2958
10	Cthe_0751080700000744	0,1956	62	Cthe_0180080700000179	0,2968
11	Cthe_0719080700000712	0,2013	63	Cthe_1361080700001351	0,3002
12	Cthe_2267080700002227	0,2020	64	Cthe_0622080700000615	0,3035
13	Cthe_2534080700002492	0,2023	65	Cthe_3000080700002952	0,3045
14	Cthe_2512080700002470	0,2055	66	Cthe_2343080700002303	0,3079
15	Cthe_2531080700002489	0,2098	67	Cthe_0988080700000978	0,3079
16	Cthe_2061080700002026	0,2208	68	Cthe_3196080700003147	0,3095
17	Cthe_1854080700001833	0,2253	69	Cthe_0767080700000760	0,3116
18	Cthe_2538080700002496	0,2263	70	Cthe_0250080700000247	0,3133
19	Cthe_2541080700002499	0,2265	71	Cthe_2403080700002363	0,3134
20	Cthe_1867080700001846	0,2302	72	Cthe_3003080700002955	0,3134
21	Cthe_2187080700002147	0,2307	73	Cthe_0748080700000741	0,3137
22	Cthe_0694080700000687	0,2329	74	Cthe_2269080700002229	0,3142
23	Cthe_2049080700002014	0,2363	75	Cthe_2801080700002756	0,3144
24	Cthe_3159080700003110	0,2374	76	Cthe_2373080700002333	0,3151
25	Cthe_3158080700003109	0,2391	77	Cthe_3160080700003111	0,3154
26	Cthe_0815080700000808	0,2402	78	Cthe_2433080700002393	0,3155
27	Cthe_0742080700000735	0,2405	79	Cthe_2521080700002479	0,3161
28	Cthe_2931080700002885	0,2449	80	Cthe_3004080700002956	0,3163
29	Cthe_2922080700002876	0,2481	81	Cthe_0607080700000600	0,3165
30	Cthe_2921080700002875	0,2512	82	Cthe_2107080700002072	0,3182
31	Cthe_0252080700000249	0,2517	83	Cthe_1007080700000997	0,3188
32	Cthe_2798080700002753	0,2525	84	Cthe_1337080700001327	0,3209
33	Cthe_3095080700003046	0,2551	85	Cthe_3119080700003070	0,3226
34	Cthe_2375080700002335	0,2555	86	Cthe_0870080700000862	0,3229
35	Cthe_2268080700002228	0,2576	87	Cthe_0156080700000155	0,3234
36	Cthe_1768080700001747	0,2585	88	Cthe_1866080700001845	0,3239
37	Cthe_1094080700001084	0,2591	89	Cthe_3157080700003108	0,3263
38	Cthe_3094080700003045	0,2607	90	Cthe_1855080700001834	0,3276
39	Cthe_0113080700000112	0,2635	91	Cthe_1028080700001018	0,3277
40	Cthe_2695080700002650	0,2668	92	Cthe_0539080700000533	0,3280
41	Cthe_3019080700002971	0,2670	93	Cthe_1793080700001772	0,3292
42	Cthe_0630080700000623	0,2672	94	Cthe_3162080700003113	0,3323
43	Cthe_1841080700001820	0,2677	95	Cthe_2364080700002324	0,3324
44	Cthe_0907080700000899	0,2747	96	Cthe_0638080700000631	0,3328
45	Cthe_2002080700001977	0,2748	97	Cthe_1319080700001309	0,3362
46	Cthe_0251080700000248	0,2768	98	Cthe_3024080700002976	0,3366
47	Cthe_2803080700002758	0,2775	99	Cthe_0713080700000706	0,3375
48	Cthe_0776080700000769	0,2799	100	Cthe_0953080700000945	0,3386
49	Cthe_2892080700002846	0,2812	101	Cthe_1240080700001230	0,3386
50	Cthe_0747080700000740	0,2832	102	Cthe_0459080700000455	0,3396
51	Cthe_2594080700002550	0,2839	103	Cthe_2800080700002755	0,3400
52	Cthe_0157080700000156	0,2853	104	Cthe_2333080700002293	0,3415

105	Cthe_2210080700002170	0,3420	163	Cthe_2911080700002865	0,3798
106	Cthe_2927080700002881	0,3427	164	Cthe_1326080700001316	0,3804
107	Cthe_2926080700002880	0,3455	165	Cthe_0205080700000204	0,3812
108	Cthe_2344080700002304	0,3458	166	Cthe_2601080700002557	0,3814
109	Cthe_1014080700001004	0,3475	167	Cthe_0674080700000667	0,3828
110	Cthe_2517080700002475	0,3486	168	Cthe_0950080700000942	0,3838
111	Cthe_1010080700001000	0,3492	169	Cthe_2693080700002648	0,3859
112	Cthe_2151080700002112	0,3518	170	Cthe_0708080700000701	0,3864
113	Cthe_2916080700002870	0,3520	171	Cthe_3021080700002973	0,3866
114	Cthe_2342080700002302	0,3520	172	Cthe_0567080700000561	0,3887
115	Cthe_2380080700002340	0,3528	173	Cthe_0568080700000562	0,3888
116	Cthe_1216080700001206	0,3535	174	Cthe_1052080700001042	0,3896
117	Cthe_1095080700001085	0,3545	175	Cthe_2363080700002323	0,3900
118	Cthe_1009080700000999	0,3548	176	Cthe_0827080700000820	0,3917
119	Cthe_0965080700000957	0,3549	177	Cthe_2797080700002752	0,3919
120	Cthe_2714080700002669	0,3564	178	Cthe_0705080700000698	0,3921
121	Cthe_2917080700002871	0,3566	179	Cthe_2252080700002212	0,3922
122	Cthe_2874080700002828	0,3566	180	Cthe_0688080700000681	0,3926
123	Cthe_2891080700002845	0,3569	181	Cthe_0787080700000780	0,3933
124	Cthe_1354080700001344	0,3571	182	Cthe_1802080700001781	0,3938
125	Cthe_1218080700001208	0,3575	183	Cthe_2915080700002869	0,3938
126	Cthe_0631080700000624	0,3603	184	Cthe_2709080700002664	0,3951
127	Cthe_2409080700002369	0,3605	185	Cthe_2938080700002892	0,3955
128	Cthe_0249080700000246	0,3608	186	Cthe_3200080700003151	0,3956
129	Cthe_1358080700001348	0,3611	187	Cthe_1857080700001836	0,3957
130	Cthe_0053080700000052	0,3613	188	Cthe_1936080700001912	0,3957
131	Cthe_2096080700002061	0,3617	189	Cthe_0621080700000614	0,3968
132	Cthe_3107080700003058	0,3619	190	Cthe_2361080700002321	0,3992
133	Cthe_2923080700002877	0,3620	191	Cthe_0647080700000640	0,3994
134	Cthe_2606080700002562	0,3620	192	Cthe_2540080700002498	0,4000
135	Cthe_2264080700002224	0,3625	193	Cthe_2900080700002854	0,4004
136	Cthe_2707080700002662	0,3632	194	Cthe_0927080700000919	0,4006
137	Cthe_0572080700000566	0,3638	195	Cthe_0332080700000328	0,4010
138	Cthe_0375080700000371	0,3644	196	Cthe_1343080700001333	0,4016
139	Cthe_1232080700001222	0,3647	197	Cthe_3183080700003134	0,4021
140	Cthe_1217080700001207	0,3647	198	Cthe_3108080700003059	0,4031
141	Cthe_0439080700000435	0,3676	199	Cthe_0527080700000522	0,4035
142	Cthe_2209080700002169	0,3681	200	Cthe_2968080700002921	0,4038
143	Cthe_0832080700000825	0,3685	201	Cthe_2600080700002556	0,4039
144	Cthe_1840080700001819	0,3685	202	Cthe_0909080700000901	0,4054
145	Cthe_2399080700002359	0,3689	203	Cthe_2346080700002306	0,4058
146	Cthe_2673080700002628	0,3689	204	Cthe_2933080700002887	0,4058
147	Cthe_2804080700002759	0,3696	205	Cthe_1008080700000998	0,4065
148	Cthe_1269080700001259	0,3712	206	Cthe_1247080700001237	0,4065
149	Cthe_0373080700000369	0,3720	207	Cthe_0826080700000819	0,4069
150	Cthe_0174080700000173	0,3720	208	Cthe_0764080700000757	0,4075
151	Cthe_0609080700000602	0,3721	209	Cthe_1320080700001310	0,4085
152	Cthe_0608080700000601	0,3723	210	Cthe_2391080700002351	0,4093
153	Cthe_0906080700000898	0,3728	211	Cthe_0206080700000205	0,4099
154	Cthe_1544080700001529	0,3736	212	Cthe_0581080700000575	0,4100
155	Cthe_2376080700002336	0,3743	213	Cthe_1317080700001307	0,4104
156	Cthe_1292080700001282	0,3743	214	Cthe_2596080700002552	0,4110
157	Cthe_1314080700001304	0,3744	215	Cthe_1246080700001236	0,4150
158	Cthe_0867080700000859	0,3770	216	Cthe_1054080700001044	0,4153
159	Cthe_1545080700001530	0,3772	217	Cthe_1093080700001083	0,4160
160	Cthe_2930080700002884	0,3791	218	Cthe_1985080700001961	0,4162
161	Cthe_2208080700002168	0,3793	219	Cthe_1051080700001041	0,4166
162	Cthe_2251080700002211	0,3794	220	Cthe_2631080700002586	0,4168

221	Cthe_3064080700003016	0,4176	279	Cthe_2799080700002754	0,4437
222	Cthe_2519080700002477	0,4187	280	Cthe_3118080700003069	0,4442
223	Cthe_2374080700002334	0,4188	281	Cthe_2713080700002668	0,4445
224	Cthe_0183080700000182	0,4188	282	Cthe_0186080700000185	0,4448
225	Cthe_1239080700001229	0,4197	283	Cthe_0181080700000180	0,4448
226	Cthe_2690080700002645	0,4203	284	Cthe_0460080700000456	0,4458
227	Cthe_2942080700002896	0,4226	285	Cthe_3016080700002968	0,4470
228	Cthe_0035080700000034	0,4231	286	Cthe_0731080700000724	0,4471
229	Cthe_2334080700002294	0,4234	287	Cthe_0253080700000250	0,4476
230	Cthe_0054080700000053	0,4237	288	Cthe_1486080700001473	0,4484
231	Cthe_2914080700002868	0,4238	289	Cthe_2215080700002175	0,4486
232	Cthe_0367080700000363	0,4244	290	Cthe_1163080700001153	0,4490
233	Cthe_3020080700002972	0,4244	291	Cthe_2434080700002394	0,4498
234	Cthe_0615080700000608	0,4245	292	Cthe_1188080700001178	0,4502
235	Cthe_2211080700002171	0,4252	293	Cthe_0672080700000665	0,4509
236	Cthe_0908080700000900	0,4252	294	Cthe_2404080700002364	0,4511
237	Cthe_2924080700002878	0,4258	295	Cthe_0179080700000178	0,4512
238	Cthe_0724080700000717	0,4263	296	Cthe_3148080700003099	0,4516
239	Cthe_1946080700001922	0,4263	297	Cthe_0081080700000080	0,4523
240	Cthe_2306080700002266	0,4264	298	Cthe_1238080700001228	0,4526
241	Cthe_1829080700001808	0,4268	299	Cthe_0871080700000863	0,4529
242	Cthe_2432080700002392	0,4272	300	Cthe_2666080700002621	0,4529
243	Cthe_2912080700002866	0,4273	301	Cthe_0575080700000569	0,4537
244	Cthe_2910080700002864	0,4274	302	Cthe_1796080700001775	0,4544
245	Cthe_1364080700001354	0,4279	303	Cthe_0207080700000206	0,4550
246	Cthe_1070080700001060	0,4287	304	Cthe_3090080700003041	0,4555
247	Cthe_1363080700001353	0,4296	305	Cthe_2595080700002551	0,4556
248	Cthe_0461080700000457	0,4300	306	Cthe_2920080700002874	0,4559
249	Cthe_1502080700001488	0,4302	307	Cthe_2896080700002850	0,4564
250	Cthe_0786080700000779	0,4303	308	Cthe_0723080700000716	0,4589
251	Cthe_0998080700000988	0,4305	309	Cthe_0978080700000968	0,4598
252	Cthe_3073080700003025	0,4310	310	Cthe_0628080700000621	0,4601
253	Cthe_3120080700003071	0,4311	311	Cthe_2725080700002680	0,4604
254	Cthe_0736080700000729	0,4314	312	Cthe_1842080700001821	0,4610
255	Cthe_1049080700001039	0,4316	313	Cthe_2193080700002153	0,4615
256	Cthe_1287080700001277	0,4322	314	Cthe_0138080700000137	0,4627
257	Cthe_0990080700000980	0,4322	315	Cthe_2904080700002858	0,4637
258	Cthe_0261080700000258	0,4327	316	Cthe_1265080700001255	0,4640
259	Cthe_2365080700002325	0,4329	317	Cthe_0116080700000115	0,4642
260	Cthe_2701080700002656	0,4329	318	Cthe_2586080700002542	0,4643
261	Cthe_2746080700002701	0,4334	319	Cthe_0655080700000648	0,4644
262	Cthe_0741080700000734	0,4340	320	Cthe_2431080700002391	0,4666
263	Cthe_1164080700001154	0,4341	321	Cthe_1227080700001217	0,4671
264	Cthe_1954080700001930	0,4347	322	Cthe_1162080700001152	0,4671
265	Cthe_2263080700002223	0,4349	323	Cthe_0629080700000622	0,4676
266	Cthe_0945080700000937	0,4352	324	Cthe_0238080700000235	0,4684
267	Cthe_2668080700002623	0,4353	325	Cthe_1543080700001528	0,4689
268	Cthe_2599080700002555	0,4356	326	Cthe_2150080700002111	0,4693
269	Cthe_2913080700002867	0,4367	327	Cthe_2337080700002297	0,4693
270	Cthe_2070080700002035	0,4370	328	Cthe_2542080700002500	0,4707
271	Cthe_2219080700002179	0,4379	329	Cthe_0995080700000985	0,4707
272	Cthe_1311080700001301	0,4388	330	Cthe_2608080700002564	0,4721
273	Cthe_1764080700001743	0,4395	331	Cthe_1945080700001921	0,4732
274	Cthe_3161080700003112	0,4396	332	Cthe_0134080700000133	0,4736
275	Cthe_0700080700000693	0,4404	333	Cthe_2670080700002625	0,4745
276	Cthe_1002080700000992	0,4410	334	Cthe_2928080700002882	0,4753
277	Cthe_1760080700001739	0,4418	335	Cthe_2390080700002350	0,4758
278	Cthe_1055080700001045	0,4434	336	Cthe_1843080700001822	0,4760

337	Cthe_0687080700000680	0,4765	344	Cthe_0213080700000212	0,4835
338	Cthe_0317080700000313	0,4774	345	Cthe_1542080700001527	0,4835
339	Cthe_0696080700000689	0,4779	346	Cthe_1186080700001176	0,4837
340	Cthe_1801080700001780	0,4785	347	Cthe_1470080700001457	0,4857
341	Cthe_0542080700000536	0,4801	348	Cthe_0794080700000787	0,4893
342	Cthe_3066080700003018	0,4808	349	Cthe_1167080700001157	0,4957
343	Cthe_0930080700000922	0,4828			

LISTA 2 – Genes suprarregulados.

	Identificação do gene	Valor de regulação		Identificação do gene	Valor de regulação
1	Cthe_0473080700000469	2,0274	53	Cthe_0199080700000198	2,2436
2	Cthe_0050080700000049	2,0333	54	Cthe_0842080700000835	2,2444
3	Cthe_1379080700001369	2,0456	55	Cthe_1300080700001290	2,2490
4	Cthe_2568080700002525	2,0714	56	Cthe_2647080700002602	2,2531
5	Cthe_1815080700001794	2,0790	57	Cthe_2880080700002834	2,2559
6	Cthe_1819080700001798	2,0904	58	Cthe_0263080700000260	2,2598
7	Cthe_2993080700002945	2,0927	59	Cthe_1818080700001797	2,2601
8	Cthe_1582080700001566	2,0934	60	Cthe_0474080700000470	2,2652
9	Cthe_0739080700000732	2,0944	61	Cthe_0499080700000494	2,2743
10	Cthe_0585080700000579	2,1050	62	Cthe_2636080700002591	2,2765
11	Cthe_1170080700001160	2,1152	63	Cthe_1907080700001884	2,2793
12	Cthe_0016080700000016	2,1201	64	Cthe_2545080700002503	2,2793
13	Cthe_1444080700001432	2,1286	65	Cthe_2194080700002154	2,2810
14	Cthe_0074080700000073	2,1310	66	Cthe_2731080700002686	2,2838
15	Cthe_2154080700002115	2,1340	67	Cthe_2090080700002055	2,2876
16	Cthe_2979080700002932	2,1360	68	Cthe_2645080700002600	2,2886
17	Cthe_2161080700002121	2,1370	69	Cthe_1479080700001466	2,2901
18	Cthe_2196080700002156	2,1370	70	Cthe_0041080700000040	2,2910
19	Cthe_0303080700000299	2,1377	71	Cthe_2785080700002740	2,2914
20	Cthe_0177080700000176	2,1401	72	Cthe_0268080700000265	2,2961
21	Cthe_1440080700001428	2,1426	73	Cthe_2961080700002914	2,2975
22	Cthe_2820080700002775	2,1461	74	Cthe_0592080700000585	2,2994
23	Cthe_2853080700002808	2,1497	75	Cthe_2233080700002193	2,3028
24	Cthe_3044080700002996	2,1538	76	Cthe_0667080700000660	2,3050
25	Cthe_2641080700002596	2,1549	77	Cthe_2978080700002931	2,3130
26	Cthe_2698080700002653	2,1576	78	Cthe_0807080700000800	2,3159
27	Cthe_2787080700002742	2,1588	79	Cthe_0725080700000718	2,3170
28	Cthe_0669080700000662	2,1611	80	Cthe_2710080700002665	2,3197
29	Cthe_1474080700001461	2,1629	81	Cthe_1915080700001892	2,3215
30	Cthe_1987080700001963	2,1641	82	Cthe_1016080700001006	2,3230
31	Cthe_2543080700002501	2,1717	83	Cthe_2967080700002920	2,3251
32	Cthe_1350080700001340	2,1785	84	Cthe_1430080700001419	2,3291
33	Cthe_2648080700002603	2,1885	85	Cthe_2133080700002096	2,3336
34	Cthe_1267080700001257	2,1932	86	Cthe_1579080700001563	2,3339
35	Cthe_0037080700000036	2,1940	87	Cthe_1196080700001186	2,3407
36	Cthe_2842080700002797	2,1952	88	Cthe_1429080700001418	2,3462
37	Cthe_2821080700002776	2,1960	89	Cthe_1637080700001618	2,3560
38	Cthe_2272080700002232	2,1962	90	Cthe_0327080700000323	2,3561
39	Cthe_3126080700003077	2,1966	91	Cthe_1508080700001494	2,3590
40	Cthe_1194080700001184	2,1973	92	Cthe_1862080700001841	2,3654
41	Cthe_1378080700001368	2,1980	93	Cthe_1080080700001070	2,3746
42	Cthe_0498080700000493	2,2024	94	Cthe_0164080700000163	2,3807
43	Cthe_2189080700002149	2,2039	95	Cthe_1301080700001291	2,3833
44	Cthe_2195080700002155	2,2065	96	Cthe_2351080700002311	2,3846
45	Cthe_0108080700000107	2,2096	97	Cthe_1588080700001572	2,3883
46	Cthe_3133080700003084	2,2170	98	Cthe_2570080700002527	2,3885
47	Cthe_2809080700002764	2,2192	99	Cthe_1583080700001567	2,3912
48	Cthe_0838080700000831	2,2244	100	Cthe_0805080700000798	2,3956
49	Cthe_1017080700001007	2,2248	101	Cthe_2232080700002192	2,3965
50	Cthe_0240080700000237	2,2291	102	Cthe_0658080700000651	2,3978
51	Cthe_0318080700000314	2,2346	103	Cthe_1817080700001796	2,4004
52	Cthe_0676080700000669	2,2372	104	Cthe_2784080700002739	2,4123

105	Cthe_1473080700001460	2,4256	163	Cthe_3050080700003002	2,6948
106	Cthe_2021080700001991	2,4325	164	Cthe_2881080700002835	2,6956
107	Cthe_2307080700002267	2,4326	165	Cthe_3099080700003050	2,7019
108	Cthe_1524080700001510	2,4419	166	Cthe_2573080700002529	2,7122
109	Cthe_0032080700000031	2,4439	167	Cthe_2639080700002594	2,7139
110	Cthe_3121080700003072	2,4510	168	Cthe_0266080700000263	2,7158
111	Cthe_2823080700002778	2,4540	169	Cthe_1480080700001467	2,7167
112	Cthe_0476080700000472	2,4569	170	Cthe_1822080700001801	2,7186
113	Cthe_0184080700000183	2,4580	171	Cthe_3032080700002984	2,7255
114	Cthe_2650080700002605	2,4601	172	Cthe_0535080700000529	2,7271
115	Cthe_1428080700001417	2,4619	173	Cthe_2948080700002902	2,7333
116	Cthe_0084080700000083	2,4626	174	Cthe_1403080700001392	2,7350
117	Cthe_1825080700001804	2,4629	175	Cthe_0171080700000170	2,7370
118	Cthe_1366080700001356	2,4637	176	Cthe_2197080700002157	2,7388
119	Cthe_3221080700003172	2,4689	177	Cthe_2387080700002347	2,7411
120	Cthe_1580080700001564	2,4757	178	Cthe_2700080700002655	2,7470
121	Cthe_1981080700001957	2,4773	179	Cthe_2782080700002737	2,7492
122	Cthe_1086080700001076	2,4806	180	Cthe_2178080700002138	2,7533
123	Cthe_2837080700002792	2,4970	181	Cthe_3026080700002978	2,7586
124	Cthe_1788080700001767	2,5132	182	Cthe_1254080700001244	2,7650
125	Cthe_2659080700002614	2,5175	183	Cthe_2644080700002599	2,7707
126	Cthe_0469080700000465	2,5180	184	Cthe_1804080700001783	2,7824
127	Cthe_2732080700002687	2,5263	185	Cthe_1472080700001459	2,7878
128	Cthe_2949080700002903	2,5268	186	Cthe_2358080700002318	2,7925
129	Cthe_0843080700000836	2,5287	187	Cthe_0811080700000804	2,7983
130	Cthe_2699080700002654	2,5295	188	Cthe_0557080700000551	2,8013
131	Cthe_0637080700000630	2,5344	189	Cthe_2818080700002773	2,8026
132	Cthe_1514080700001500	2,5352	190	Cthe_1404080700001393	2,8152
133	Cthe_0300080700000296	2,5352	191	Cthe_3197080700003148	2,8210
134	Cthe_0077080700000076	2,5449	192	Cthe_3194080700003145	2,8287
135	Cthe_0467080700000463	2,5492	193	Cthe_1445080700001433	2,8412
136	Cthe_2146080700002107	2,5563	194	Cthe_2236080700002196	2,8460
137	Cthe_2454080700002414	2,5743	195	Cthe_2415080700002375	2,8500
138	Cthe_3029080700002981	2,5798	196	Cthe_0470080700000466	2,8507
139	Cthe_1613080700001595	2,5806	197	Cthe_1645080700001626	2,8541
140	Cthe_1271080700001261	2,5866	198	Cthe_2362080700002322	2,8591
141	Cthe_0039080700000038	2,5903	199	Cthe_0559080700000553	2,8653
142	Cthe_1816080700001795	2,5959	200	Cthe_2964080700002917	2,8662
143	Cthe_3055080700003007	2,6000	201	Cthe_0845080700000838	2,8665
144	Cthe_0434080700000430	2,6055	202	Cthe_2245080700002205	2,8671
145	Cthe_2852080700002807	2,6069	203	Cthe_3008080700002960	2,8771
146	Cthe_1784080700001763	2,6088	204	Cthe_0301080700000297	2,8800
147	Cthe_0956080700000948	2,6153	205	Cthe_2445080700002405	2,8865
148	Cthe_1608080700001590	2,6288	206	Cthe_0044080700000043	2,8999
149	Cthe_1820080700001799	2,6347	207	Cthe_1507080700001493	2,9050
150	Cthe_0810080700000803	2,6382	208	Cthe_1499080700001485	2,9154
151	Cthe_1581080700001565	2,6405	209	Cthe_2425080700002385	2,9193
152	Cthe_2137080700002099	2,6460	210	Cthe_2590080700002546	2,9252
153	Cthe_1427080700001416	2,6476	211	Cthe_2654080700002609	2,9302
154	Cthe_0772080700000765	2,6580	212	Cthe_1461080700001448	2,9382
155	Cthe_2962080700002915	2,6582	213	Cthe_0072080700000071	2,9481
156	Cthe_3098080700003049	2,6671	214	Cthe_2940080700002894	2,9493
157	Cthe_2426080700002386	2,6710	215	Cthe_3141080700003092	2,9518
158	Cthe_1614080700001596	2,6808	216	Cthe_0302080700000298	2,9624
159	Cthe_1624080700001606	2,6842	217	Cthe_2963080700002916	2,9635
160	Cthe_2637080700002592	2,6871	218	Cthe_2686080700002641	2,9755
161	Cthe_0691080700000684	2,6889	219	Cthe_2506080700002466	2,9860
162	Cthe_2992080700002944	2,6935	220	Cthe_2094080700002059	2,9863

221	Cthe_0257080700000254	2,9905	279	Cthe_0390080700000386	3,3110
222	Cthe_1085080700001075	2,9908	280	Cthe_0462080700000458	3,3155
223	Cthe_3005080700002957	3,0012	281	Cthe_1640080700001621	3,3226
224	Cthe_0620080700000613	3,0068	282	Cthe_2284080700002244	3,3322
225	Cthe_0812080700000805	3,0139	283	Cthe_1630080700001612	3,3533
226	Cthe_1012080700001002	3,0238	284	Cthe_2020080700001990	3,3575
227	Cthe_0671080700000664	3,0245	285	Cthe_1406080700001395	3,3711
228	Cthe_1980080700001956	3,0250	286	Cthe_0121080700000120	3,3716
229	Cthe_1065080700001055	3,0333	287	Cthe_1807080700001786	3,3771
230	Cthe_0468080700000464	3,0368	288	Cthe_0774080700000767	3,3771
231	Cthe_0804080700000797	3,0522	289	Cthe_3006080700002958	3,4238
232	Cthe_3195080700003146	3,0574	290	Cthe_0675080700000668	3,4377
233	Cthe_0281080700000278	3,0586	291	Cthe_2986080700002938	3,4463
234	Cthe_2829080700002784	3,0601	292	Cthe_1616080700001598	3,4476
235	Cthe_3089080700003040	3,0731	293	Cthe_2642080700002597	3,4541
236	Cthe_1932080700001908	3,0746	294	Cthe_2349080700002309	3,4579
237	Cthe_1610080700001592	3,0762	295	Cthe_0465080700000461	3,4581
238	Cthe_0389080700000385	3,0798	296	Cthe_1621080700001603	3,4600
239	Cthe_1629080700001611	3,0823	297	Cthe_1517080700001503	3,5045
240	Cthe_3082080700003034	3,0839	298	Cthe_1481080700001468	3,5069
241	Cthe_2643080700002598	3,0912	299	Cthe_2965080700002918	3,5239
242	Cthe_2653080700002608	3,0920	300	Cthe_1021080700001011	3,5308
243	Cthe_0466080700000462	3,1187	301	Cthe_1628080700001610	3,5337
244	Cthe_2808080700002763	3,1211	302	Cthe_2168080700002128	3,5364
245	Cthe_0246080700000243	3,1262	303	Cthe_3083080700003035	3,5365
246	Cthe_1244080700001234	3,1376	304	Cthe_2877080700002831	3,5622
247	Cthe_0878080700000870	3,1666	305	Cthe_1821080700001800	3,5691
248	Cthe_0170080700000169	3,1669	306	Cthe_1641080700001622	3,5696
249	Cthe_1642080700001623	3,1671	307	Cthe_0447080700000443	3,6025
250	Cthe_0641080700000634	3,1879	308	Cthe_0038080700000037	3,6100
251	Cthe_2138080700002100	3,1887	309	Cthe_0076080700000075	3,6186
252	Cthe_1087080700001077	3,1939	310	Cthe_2385080700002345	3,6197
253	Cthe_1083080700001073	3,1991	311	Cthe_2544080700002502	3,6202
254	Cthe_2400080700002360	3,2028	312	Cthe_2507080700002467	3,6221
255	Cthe_2858080700002813	3,2068	313	Cthe_1531080700001516	3,6289
256	Cthe_0073080700000072	3,2090	314	Cthe_0565080700000559	3,6649
257	Cthe_1635080700001616	3,2127	315	Cthe_0642080700000635	3,6804
258	Cthe_1084080700001074	3,2148	316	Cthe_2402080700002362	3,6902
259	Cthe_0463080700000459	3,2167	317	Cthe_3071080700003023	3,7150
260	Cthe_2663080700002618	3,2331	318	Cthe_1623080700001605	3,7151
261	Cthe_0085080700000084	3,2333	319	Cthe_1794080700001773	3,7345
262	Cthe_1636080700001617	3,2374	320	Cthe_1634080700001615	3,7503
263	Cthe_3198080700003149	3,2436	321	Cthe_0057080700000056	3,7733
264	Cthe_2071080700002036	3,2492	322	Cthe_2649080700002604	3,7803
265	Cthe_2824080700002779	3,2521	323	Cthe_0415080700000411	3,8188
266	Cthe_2099080700002064	3,2560	324	Cthe_1328080700001318	3,8961
267	Cthe_2139080700002101	3,2585	325	Cthe_2950080700002904	3,9034
268	Cthe_0148080700000147	3,2613	326	Cthe_1609080700001591	3,9180
269	Cthe_2175080700002135	3,2628	327	Cthe_2819080700002774	3,9403
270	Cthe_2832080700002787	3,2666	328	Cthe_1638080700001619	3,9678
271	Cthe_3030080700002982	3,2668	329	Cthe_1611080700001593	3,9766
272	Cthe_3193080700003144	3,2739	330	Cthe_0265080700000262	3,9813
273	Cthe_0801080700000794	3,2756	331	Cthe_0472080700000468	4,0217
274	Cthe_1515080700001501	3,2795	332	Cthe_1212080700001202	4,0426
275	Cthe_1633080700001614	3,2859	333	Cthe_0326080700000322	4,0503
276	Cthe_3075080700003027	3,2974	334	Cthe_1890080700001869	4,0608
277	Cthe_1991080700001966	3,2985	335	Cthe_2283080700002243	4,0757
278	Cthe_2396080700002356	3,3005	336	Cthe_0659080700000652	4,0964

337	Cthe_1443080700001431	4,1338	373	Cthe_1949080700001925	5,0267
338	Cthe_1627080700001609	4,1396	374	Cthe_2651080700002606	5,1199
339	Cthe_1176080700001166	4,1507	375	Cthe_1612080700001594	5,1682
340	Cthe_2652080700002607	4,1576	376	Cthe_0454080700000450	5,1826
341	Cthe_0733080700000726	4,1712	377	Cthe_0392080700000388	5,1894
342	Cthe_3176080700003127	4,2008	378	Cthe_1273080700001263	5,2174
343	Cthe_0464080700000460	4,2106	379	Cthe_1310080700001300	5,2869
344	Cthe_1256080700001246	4,2229	380	Cthe_0391080700000387	5,3175
345	Cthe_1547080700001532	4,2520	381	Cthe_1082080700001072	5,5108
346	Cthe_1088080700001078	4,2527	382	Cthe_1258080700001248	5,5171
347	Cthe_0471080700000467	4,3038	383	Cthe_1951080700001927	5,5223
348	Cthe_1625080700001607	4,3142	384	Cthe_0453080700000449	5,6764
349	Cthe_1398080700001387	4,3461	385	Cthe_2177080700002137	5,7477
350	Cthe_1809080700001788	4,4003	386	Cthe_1081080700001071	5,7549
351	Cthe_0923080700000915	4,4326	387	Cthe_1548080700001533	5,8322
352	Cthe_1210080700001200	4,4354	388	Cthe_0664080700000657	5,9470
353	Cthe_3007080700002959	4,4574	389	Cthe_1950080700001926	6,0874
354	Cthe_1626080700001608	4,4661	390	Cthe_2618080700002574	6,3420
355	Cthe_2246080700002206	4,4748	391	Cthe_3125080700003076	6,4384
356	Cthe_1617080700001599	4,5479	392	Cthe_0798080700000791	6,5074
357	Cthe_1622080700001604	4,5862	393	Cthe_0446080700000442	6,5127
358	Cthe_0421080700000417	4,5892	394	Cthe_1836080700001815	6,6609
359	Cthe_2684080700002639	4,5899	395	Cthe_1257080700001247	6,7417
360	Cthe_0797080700000790	4,6175	396	Cthe_0401080700000397	6,9281
361	Cthe_1920080700001897	4,6180	397	Cthe_0394080700000390	6,9969
362	Cthe_1639080700001620	4,6181	398	Cthe_0393080700000389	7,1439
363	Cthe_2972080700002925	4,6461	399	Cthe_0395080700000391	7,2105
364	Cthe_0414080700000410	4,6842	400	Cthe_2617080700002573	7,3643
365	Cthe_0264080700000261	4,7244	401	Cthe_2811080700002766	8,1687
366	Cthe_2237080700002197	4,7507	402	Cthe_0821080700000814	8,9492
367	Cthe_0388080700000384	4,8704	403	Cthe_1192080700001182	9,0982
368	Cthe_1952080700001928	4,8735	404	Cthe_0785080700000778	10,6383
369	Cthe_2655080700002610	4,8859	405	Cthe_1309080700001299	11,5548
370	Cthe_2807080700002762	4,9100	406	Cthe_3081080700003033	12,6011
371	Cthe_0448080700000444	4,9668	407	Cthe_1437080700001425	18,5151
372	Cthe_2503080700002463	4,9736	408	Cthe_1438080700001426	20,7491

LISTA 3 – Iniciadores senso e antissenso para amplificação dos genes selecionados para inserção no pET28a+.

Nome	Sequência do iniciador	bp
ManA Infusion S	AGGAGATATACCATGCTTTCTGACGGGGATAAGTATG	37
ManA Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGCTGTTGTTCAACGGGAAAACTCG	39
XynD Infusion S	AGGAGATATACCATGGAAGGCAATTTACTTTTCAACC	37
XynD Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGACGTTTTAAAGGCAATTCATC	37
CelS Infusion S	AGGAGATATACCATGCCTACAAAGGCACCTACAAAAGATGG	41
CelS Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGGTTCTTGTACGGCAATGTATC	37
CelR Infusion S	AGGAGATATACCATGGACTATAACTATGGAGAAGC	35
CelR Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGTGAATTTCCGGGTATGGTTGG	37
CelK Infusion S	AGGAGATATACCATGTTGGAAGACAAGTCTTCAAAG	36
CelK Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGTTTATGTGGCAATACATCTATC	38
CelQ Infusion S	AGGAGATATACCATGGTGAAAAAGACATTATGCTTTG	37
CelQ Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGTTCTACCGGAAATTTATCTATTATAC	42
CelJ infusion S	AGGAGATATACCATGACAGTTGCTCCTGAAGGCTACAGG	39
CelJ infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGCCAGTCAATAGCATCTACATAG	38
CelW Infusion S	AGGAGATATACCATGACTACATTCAACTACGGAGAAG	37
CelW Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGAGGTGCGTAAGGCAGTTTGC	36
CelY Infusion S	AGGAGATATACCATGCTGATAATCACAATCAAAAAC	36
CelY Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGCGGTTCGTTTCCCGATACAAG	37
CbhA infusion S	AGGAGATATACCATGGAAGATAATTCTTCGACTTTG	36
CbhA infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGTCGATATGGCAATTCTTCTATG	38
CelF infusion S	AGGAGATATACCATGGATTTCAACTATGGTGAGGC	35
CelF infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGCTGTTCAGCCGGGAATTTTTC	37
CelG infusion S	AGGAGATATACCATGAATACCGGTTCAACAGCTAC	35
CelG infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGGGTGGTGTGCGGCAGTTTG	35
Cthe_0821 Infusion S	AGGAGATATACCATGGATGACATTTATCCGGGAC	34
Cthe_0821 Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGTGGTGTCACTATTCTCGTATC	37
Cthe_1256 Infusion S	AGGAGATATACCATGGCGGTAGATATCAAGAAAATAATAAAG	42
Cthe_1256 Infusion AS	GGTGGTGGTGCTCGAGTTCCACGTTGTTTATTTTGTC	37
Xyn11A Infusion S	AATTGTCGACTTGTAGTAATTACGTCAAACCAG	33
Xyn11A Infusion AS	AATTCTCGAGCGGTACAGAGTTATACATTCTTTTG	35

LISTA 4 – Iniciadores sequenciais para os genes previamente selecionados.

No.	Nome	Sequência do iniciador	bp
1	CelS Seq1	CGTTGACAACTGGTACGGTTTTGG	24
	CelS Seq2	AGAGAGACTGGACAACAAGC	20
	CelS Seq3	TTGACCTTGCAGTTGCAATGGG	22
2	CelR Seq1	TGCTGCAACTGCCTTGGTATTC	22
	CelR Seq2	AGAAACAGGCTGACTATGCC	20
	CelR Seq3	TGAAGTTGTAAAAGAAATGCC	21
3	CelK Seq1	CAGCCGGATGTACGTGTTAACC	22
	CelK Seq2	GGCATAGCTAATCAAGGTGC	20
	CelK Seq3	GTGGGGATGCTTCACCTGGGG	21
4	CelQ Seq1	GAAATGACAAGACCTTACTTTG	22
	CelQ Seq2	GCAAAAATATTATAATTTTGC	21
5	celJ seq1	AATGAAAAGTCCGCTCCTGC	20
	celJ seq2	AAAGCGGAAACGGTGTACCG	20
	celJ seq3	AACAATCCATGGAAGAATGC	20
	celJ seq4	GGCGGAAACAGAACTACAGG	20
	celJ seq5	CCTGACTGGGGAACTGAAGG	20
	celJ seq6	CAGCAAACTCCATATCATTC	20
6	CelW Seq1	GGAACTTTTCAACTTTGCCG	20
	CelW Seq2	GACAGCATGAATGTGCCTG	19
7	CelY Seq1	ATCACGGGGACGGTACAAG	19
	CelY Seq2	TTGTACCTTCAAAGTGCCG	19
	CelY Seq3	CCCTCATGATTTTTCCGGC	19
8	CbhA Seq1	TGATGTACGTGTGAACCAG	19
	CbhA Seq2	TGACAACTGGGGACCATAC	19
	CbhA Seq3	GCTTCACCTGGGGAACTAC	19
	CbhA Seq4	GAGCAGTACACAGACAGTG	19
9	CelF seq1	GGATATAGAGCGGCAGAGGG	20
	CelF seq2	GCAGACATATTCTGGTGGG	19
10	CelG seq1	ACACCATAATAGCTTTTGAC	20
11	Cthe_0821 Seq1	CTTGTTCTCGGTACATATG	19
12	Cthe_1256 Seq1	GCTGTAAAAAAAGCACGGC	19
	Cthe_1256 Seq2	GAAAATGACGGTATTGATGAG	21
13	Xyn11A seq1	AAGCCGACGTAACCAGCATG	20
	Xyn11A seq2	AATATAACCAGACTTTCAGG	20
14	XynD Seq1	CCTGTTTCGGGAGTAAGCA	19
15	ManA Seq1	TCCGGGATCTGAGGCGGAG	19

LISTA 5 – Alinhamento da sequência (aminoácidos) do gene CbhA que apresentou inserções de nucleotídeos. A comparação é feita entre a sequência dos genes clonado neste projeto (DE01) com a sequência encontradas nos bancos de dados para a linhagem ATCC 27405 (ATCC). Obs.: as partes das sequências com 100% de similaridade foram marcadas em amarelo.

Lista 5 –

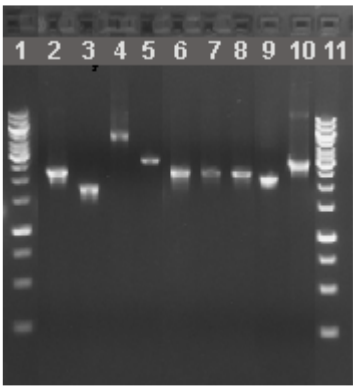
CbhA

```
                    1                                                  50
CbhA ATCC     (1)   MEDNSSTLPPYKNDLLYERTFDEGLCYPWHTCEDSGGKCSFDVVDVPGQP
CbhA DE01     (1)   MEDNSSTLPPYKNDLLYERTFDEGLCYPWHTCEDSGGKCSFDVVDVPGQP
Consensus     (1)   MEDNSSTLPPYKNDLLYERTFDEGLCYPWHTCEDSGGKCSFDVVDVPGQP
                    51                                                100
CbhA ATCC    (51)   GNKAFAVTVLDKGQNRWSVQMRHRGLTLEQGHTYRVRLKIWADASCKVYI
CbhA DE01    (51)   GNKAFAVTVLDKGQNRWSVQMRHRGLTLEQGHTYRVRLKIWADASCKVYI
Consensus    (51)   GNKAFAVTVLDKGQNRWSVQMRHRGLTLEQGHTYRVRLKIWADASCKVYI
                    101                                               150
CbhA ATCC   (101)   KIGQMGEPYAEYWNNKWSPYTLTAGKVLEIDETFVMDKPTDDTCEFTFHL
CbhA DE01   (101)   KIGQMGEPYAEYWNNKWSPYTLTAGKVLEIDETFVMDKPTDDTCEFTFHL
Consensus   (101)   KIGQMGEPYAEYWNNKWSPYTLTAGKVLEIDETFVMDKPTDDTCEFTFHL
                    151                                               200
CbhA ATCC   (151)   GGELAATPPYTVYLDDVSLYDPEYTKPVEYILPQPDVRVNQVGYLPEGKK
CbhA DE01   (151)   GGELAATPPYTVYLDDVSLYDPEYTKPVEYILPQPDVRVNQVGYLPEGKK
Consensus   (151)   GGELAATPPYTVYLDDVSLYDPEYTKPVEYILPQPDVRVNQVGYLPEGKK
                    201                                               250
CbhA ATCC   (201)   VATVVCNSTQPVKWQLKNAAGVVVLEGYTEPKGLDKDSQDYVHWLDFSDF
CbhA DE01   (201)   VATVVCNSTQPVKWQLKNAAGVVVLEGYTEPKGLDKDSQDYVHWLDFSDF
Consensus   (201)   VATVVCNSTQPVKWQLKNAAGVVVLEGYTEPKGLDKDSQDYVHWLDFSDF
                    251                                               300
CbhA ATCC   (251)   ATEGIGYYFELPTVNSPTNYSHPFDIRKDIYTQMKYDALAFFYHKRSGIP
CbhA DE01   (251)   ATEGIGYYFELPTVNSPTNYSHPFDIRKDIYTQMKYDALAFFYHKRSGIP
Consensus   (251)   ATEGIGYYFELPTVNSPTNYSHPFDIRKDIYTQMKYDALAFFYHKRSGIP
                    301                                               350
CbhA ATCC   (301)   IEMPYAGGEQWTRPAGHIGIEPNKGDTNVPTWPQDDEYAGIPQKNYTKDV
CbhA DE01   (301)   IEMPYAGGEQWTRPAGHIGIEPNKGDTNVPTWPQDDEYAGIPQKNYTKDV
Consensus   (301)   IEMPYAGGEQWTRPAGHIGIEPNKGDTNVPTWPQDDEYAGIPQKNYTKDV
                    351                                               400
CbhA ATCC   (351)   TGGWYDAGDHGKYVVNGGIAVWTLMNMYERAKIRGLDNWGPYRDGGMNIP
CbhA DE01   (351)   TGGWYDAGDHGKYVVNGGIAVWTLMNMYERAKIRGLDNWGPYRDGGMNIP
Consensus   (351)   TGGWYDAGDHGKYVVNGGIAVWTLMNMYERAKIRGLDNWGPYRDGGMNIP
                    401                                               450
CbhA ATCC   (401)   EQNNGYPDILDEARWEIEFFKKMQVTEKEDPSIAGMVHHKIHDFRWTALG
CbhA DE01   (401)   EQNNGYPDILDEARWEIEFFKKMQVTEKEDPSIAGMVHHKIHDFRWTALG
Consensus   (401)   EQNNGYPDILDEARWEIEFFKKMQVTEKEDPSIAGMVHHKIHDFRWTALG
                    451                                               500
CbhA ATCC   (451)   MLPHEDPQPRYLRPVSTAATLNFAATLAQSARLWKDYDPTFAADCLEKAE
CbhA DE01   (451)   MLPHEDPQPRYLRPVSTAATLNFAATLAQSARLWKDYDPTFAADCLEKAE
Consensus   (451)   MLPHEDPQPRYLRPVSTAATLNFAATLAQSARLWKDYDPTFAADCLEKAE
                    501                                               550
CbhA ATCC   (501)   IAWQAALKHPDIYAEYTPGSGGPGGGPYNDDYVGDEFYWAACELYVTTGK
CbhA DE01   (501)   IAWQAALKHPDIYAEYTPGSGGPGGGPYNDDYVGDEFYWAACELYVTTGK
Consensus   (501)   IAWQAALKHPDIYAEYTPGSGGPGGGPYNDDYVGDEFYWAACELYVTTGK
                    551                                               600
CbhA ATCC   (551)   DEYKNYLMNSPHYLEMPAKMGENGGANGEDNGLWGCFTWGTTQGLGTITL
CbhA DE01   (551)   DEYKNYLMNSPHYLEMPAKMGENGGANGEDNGLWGCFTWGTTQGLGTITL
Consensus   (551)   DEYKNYLMNSPHYLEMPAKMGENGGANGEDNGLWGCFTWGTTQGLGTITL
                    601                                               650
CbhA ATCC   (601)   ALVENGLPATDIQKARNNIAKAADRWLENIEEQGYRLPIKQAEDERGGYP
CbhA DE01   (601)   ALVENGLPATDIQKARNNIAKAADRWLENIEEQGYRLPIKQAEDERGGYP
Consensus   (601)   ALVENGLPATDIQKARNNIAKAADRWLENIEEQGYRLPIKQAEDERGGYP
                    651                                               700
CbhA ATCC   (651)   WGSNSFILNQMIVMGYAYDFTGDSKYLDGMFDGISYLLGRNAMDQSYVTG
CbhA DE01   (651)   WGSNSFILNQMIVMGYAYDFTGDSKYLDGMFDGISYLLGRNAMDQSYVTG
Consensus   (651)   WGSNSFILNQMIVMGYAYDFTGDSKYLDGMFDGISYLLGRNAMDQSYVTG
                    701                                               750
CbhA ATCC   (701)   YGERPLQNPHDRFWTPQTSKRFPAPPPGIISGGPNSRFEDPTINAAVKKD
CbhA DE01   (701)   YGERPLQNPHDRFWTPQTSKRFPAPPPGIISGGPNSRFEDPTINAAVKKD
Consensus   (701)   YGERPLQNPHDRFWTPQTSKRFPAPPPGIISGGPNSRFEDPTINAAVKKD
                    751                                               800
```

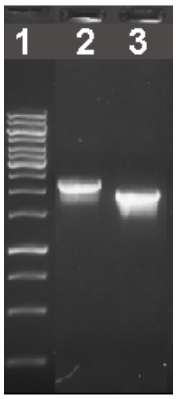
```
CbhA ATCC    (751) TPPQKCFIDHTDSWSTNEITVNWNAPFAWVTAYLDEQYTDSETDKVTIDS
CbhA DE01    (751) TPPQKCFIDHTDSWSTNEITVNWNAPFAWVTAYLDEQYTDSETDKVTIDS
Consensus    (751) TPPQKCFIDHTDSWSTNEITVNWNAPFAWVTAYLDEQYTDSETDKVTIDS
                   801                                            850
CbhA ATCC    (801) PVAGERFEAGKDINISATVKSKTPVSKVEFYNGDTLISSDTTAPYTAKIT
CbhA DE01    (801) PVAGERFEAGKDINISATVKSKTPVSKVEFYNGDTLISSDTTAPYTAKIT
Consensus    (801) PVAGERFEAGKDINISATVKSKTPVSKVEFYNGDTLISSDTTAPYTAKIT
                   851                                            900
CbhA ATCC    (851) GAAVGAYNLKAVAVLSDGRRIESPVTPVLVKVIVKPTVKLTAPKSNVVAY
CbhA DE01    (851) GAAVGAYNLKAVAVLSDGRRIESPVTPVLVKVIVKPTVKLTAPKSNVVAY
Consensus    (851) GAAVGAYNLKAVAVLSDGRRIESPVTPVLVKVIVKPTVKLTAPKSNVVAY
                   901                                            950
CbhA ATCC    (901) GNEFLKITATASDSDGKISRVDFLVDGEVIGSDREAPYEYEWKAVEGNHE
CbhA DE01    (901) GNEFLKITATASDSDGKISRVDFLVDGEVIGSDREAPYEYEWKAVEGNHE
Consensus    (901) GNEFLKITATASDSDGKISRVDFLVDGEVIGSDREAPYEYEWKAVEGNHE
                   951                                           1000
CbhA ATCC    (951) ISVIAYDDDDAASTPDSVKIFVKQARDVKVQYLCENTQTSTQEIKGKFNI
CbhA DE01    (951) ISVIAYDDDDAASTPDSVKIFVKQARDVKVQYLCENTQTSTQEIKGKFNI
Consensus    (951) ISVIAYDDDDAASTPDSVKIFVKQARDVKVQYLCENTQTSTQEIKGKFNI
                   1001                                          1050
CbhA ATCC   (1001) VNTGNRDYSLKDIVLRYYFTKEHNSQLQFICYYTPIGSGNLIPSFGGSGD
CbhA DE01   (1001) VNTGNRDYSLKDIVLRYYFTKEHNSQLQFICYYTPIGSGNLIPSFGGSGD
Consensus   (1001) VNTGNRDYSLKDIVLRYYFTKEHNSQLQFICYYTPIGSGNLIPSFGGSGD
                   1051                                          1100
CbhA ATCC   (1051) EHYLQLEFKDVKLPAGGQTGEIQFVIRYADNSFHDQSNDYSFDPTIKAFQ
CbhA DE01   (1051) EHYLQLEFKDVKLPAGGQTGEIQFVIRYADNSFHDQSNDYSFDPTIKAFQ
Consensus   (1051) EHYLQLEFKDVKLPAGGQTGEIQFVIRYADNSFHDQSNDYSFDPTIKAFQ
                   1101                                          1150
CbhA ATCC   (1101) DYGKVTLYKNGELVWGTPPGGTEPEEPEEP------AIVYGDCNDDGKVN
CbhA DE01   (1101) DYGKVTLYKNGELVWGTPPGGTEPEEPEEPEEPEEPAIVYGDCNDDGKVN
Consensus   (1101) DYGKVTLYKNGELVWGTPPGGTEPEEPEEP      AIVYGDCNDDGKVN
                   1151                                          1200
CbhA ATCC   (1145) STDVAVMKRYLKKENVNINLDNADVNADGKVNSTDFSILKRYVMKNIEEL
CbhA DE01   (1151) STDVAVMKRYLKKENVNINLDNADVNADGKVNSTDFSILKRYVMKNIEEL
Consensus   (1151) STDVAVMKRYLKKENVNINLDNADVNADGKVNSTDFSILKRYVMKNIEEL
                   1201   1211
CbhA ATCC   (1195) PYRLEHHHHHH
CbhA DE01   (1201) PYRLEHHHHHH
Consensus   (1201) PYRLEHHHHHH
```

APÊNDICE C

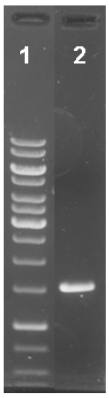
- Fotografias dos géis de agarose com os produtos dos genes selecionados amplificados por PCR.



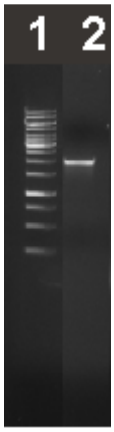
1-marcador, 2-CelF, 3-CelG, 4-CelJ, 5-CelK, 6-CelQ, 7-CelR, 8-CelS, 9-CelW, 10-CelY, e 11-marcador



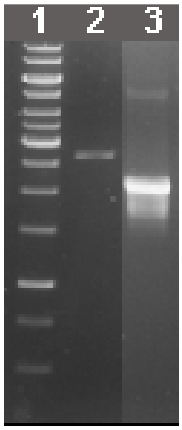
1-marcador, 2-XynD, 3-ManA



1-marcador, 2-CbhA



1-marcador, 2-Xyn11A



1-marcador, 2-df (Cthe_0821), 3-dh (Cthe_1256).

MATRIZ 1 – Matriz de Plackett-Burman (PB) de 24 ensaios, acrescida de 3 ensaios com as repetições do ponto central.

Ensaios	Variáveis																
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}	x_{11}	x_{12}	x_{13}	x_{14}	x_{15}	x_{16}	x_{17}
1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
6	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1
7	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
8	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1
9	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
10	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
11	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
12	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
13	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1
14	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1
15	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1
16	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1
17	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1
18	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
19	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1

20	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
21	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
22	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
23	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
24	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

MATRIZ 2 – Matriz de Plackett-Burman (PB) de 24 ensaios, acrescida de 3 ensaios com as repetições do ponto central, mostrando os valores reais usados na composição do meio.

Ensaios	Variáveis																
	Celulose (g/l)	Ex. de levedura (g/l)	MOPS (g/l)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	KH_2PO_4 (g/l)	K_2HPO_4 (g/l)	$MgCl_2.6H_2O$ (g/l)	$CaCl_2.2H_2O$ (g/l)	EDTA (mg/l)	$MnSO_4.H_2O$ (mg/l)	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (mg/l)	$CoCl_2.6H_2O$ (mg/l)	$NiCl_2.6H_2O$ (mg/l)	$ZnSO_4.7H_2O$ (mg/l)	$CuSO_4.5H_2O$ (mg/l)	$FeSO_4.7H_2O$ (mg/l)	pH
1	40	1	4	0	0	4,4	0	0,1	0	0	4	0,4	0	0	0,03	4	6,7
2	40	5	4	0	0	0	0,5	0	4	0	0	0,4	0,2	0	0	4	7,7
3	40	5	10	0	0	0	0	0,1	0	2,5	0	0	0,2	0,2	0	0	7,7
4	40	5	10	1,3	0	0	0	0	4	0	4	0	0	0,2	0,03	0	6,7
5	40	5	10	1,3	1,3	0	0	0	0	2,5	0	0,4	0	0	0,03	4	6,7
6	10	5	10	1,3	1,3	4,4	0	0	0	0	4	0	0,2	0	0	4	7,7
7	40	1	10	1,3	1,3	4,4	0,5	0	0	0	0	0,4	0	0,2	0	0	7,7
8	10	5	4	1,3	1,3	4,4	0,5	0,1	0	0	0	0	0,2	0	0,03	0	6,7
9	40	1	10	0	1,3	4,4	0,5	0,1	4	0	0	0	0	0,2	0	4	6,7
10	40	5	4	1,3	0	4,4	0,5	0,1	4	2,5	0	0	0	0	0,03	0	7,7
11	10	5	10	0	1,3	0	0,5	0,1	4	2,5	4	0	0	0	0	4	6,7
12	10	1	10	1,3	0	4,4	0	0,1	4	2,5	4	0,4	0	0	0	0	7,7

13	40	1	4	1,3	1,3	0	0,5	0	4	2,5	4	0,4	0,2	0	0	0	6,7
14	40	5	4	0	1,3	4,4	0	0,1	0	2,5	4	0,4	0,2	0,2	0	0	6,7
15	10	5	10	0	0	4,4	0,5	0	4	0	4	0,4	0,2	0,2	0,03	0	6,7
16	10	1	10	1,3	0	0	0,5	0,1	0	2,5	0	0,4	0,2	0,2	0,03	4	6,7
17	40	1	4	1,3	1,3	0	0	0,1	4	0	4	0	0,2	0,2	0,03	4	7,7
18	10	5	4	0	1,3	4,4	0	0	4	2,5	0	0,4	0	0,2	0,03	4	7,7
19	40	1	10	0	0	4,4	0,5	0	0	2,5	4	0	0,2	0	0,03	4	7,7
20	10	5	4	1,3	0	0	0,5	0,1	0	0	4	0,4	0	0,2	0	4	7,7
21	10	1	10	0	1,3	0	0	0,1	4	0	0	0,4	0,2	0	0,03	0	7,7
22	10	1	4	1,3	0	4,4	0	0	4	2,5	0	0	0,2	0,2	0	4	6,7
23	10	1	4	0	1,3	0	0,5	0	0	2,5	4	0	0	0,2	0,03	0	7,7
24	10	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,7
25	25	3	7	0,65	0,65	2,2	0,25	0,05	2	1,25	2	0,2	0,1	0,1	0,015	2	7,2
26	25	3	7	0,65	0,65	2,2	0,25	0,05	2	1,25	2	0,2	0,1	0,1	0,015	2	7,2
27	25	3	7	0,65	0,65	2,2	0,25	0,05	2	1,25	2	0,2	0,1	0,1	0,015	2	7,2

Tabela 1 – Efeito de cada uma das variáveis analisadas sobre a produção de etanol ao longo do processo.

Código da variável		Níveis estudados			Etanol 24 hs		Etanol 48 hs		Etanol 72 hs	
	Fatores	-1	0	1	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor
	Média				5,00	0,0000	7,08	0,0000	7,95	0,0000
	Curvatura				8,99	0,0043	14,54	0,0023	13,84	0,0159
x1	Celulose (g/l)	10	25	40	1,65	0,0618	2,07	0,0959	2,04	0,2142
x2	Ex. de levedura (g/l)	1	3	5	1,02	0,2171	1,31	0,2666	1,66	0,3049
x3	MOPS (g/l)	4	7	10	-0,20	0,8003	-0,57	0,6187	-0,57	0,7141
x4	$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	0	0,65	1,3	-0,49	0,5404	-1,35	0,2531	-1,86	0,2547
x5	KH_2PO_4 (g/l)	0	0,65	1,3	-0,67	0,4050	0,14	0,9038	0,77	0,6243
x6	K_2HPO_4 (g/l)	0	2,2	4,4	-0,69	0,3935	-0,98	0,3995	-0,39	0,8053
x7	$MgCl_2.6H_2O$ (g/l)	0	0,25	0,5	2,29	0,0167	2,79	0,0348	2,45	0,1440
x8	$CaCl_2.2H_2O$ (g/l)	0	0,05	0,1	1,25	0,1386	1,07	0,3608	0,28	0,8561
x9	EDTA (mg/l)	0	2	4	0,53	0,5032	1,08	0,3546	1,31	0,4114
x10	$MnSO_4.H_2O$ (mg/l)	0	1,25	2,5	0,57	0,4718	1,50	0,2091	1,74	0,2826
x11	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,82	0,3118	-2,04	0,1005	-2,74	0,1076
x12	$CoCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-1,36	0,1108	-1,59	0,1863	-1,31	0,4135
x13	$NiCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	0,88	0,2829	0,78	0,4987	0,21	0,8934
x14	$ZnSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	0,06	0,9363	0,70	0,5438	1,50	0,3518
x15	$CuSO_4.5H_2O$ (mg/l)	0	0,015	0,03	1,07	0,1974	2,68	0,0406	3,31	0,0604
x16	$FeSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	2	4	-0,49	0,5345	0,36	0,7484	0,50	0,7494
x17	pH	6,7	7,2	7,7	2,31	0,0162	5,44	0,0011	6,24	0,0034

Obs.: p-valor < 0,05 - estatisticamente significativo a 95% de confiança (verde); p-valor < 0,10 - estatisticamente significativo a 90% de confiança (amarelo); p-valor > 0,10 - não são estatisticamente significativos dentro da faixa estudada (branco).

Tabela 2 – Efeito de cada uma das variáveis analisadas sobre a produção de lactato ao longo do processo.

Código da variável		Níveis estudados			Lactato 24 hs		Lactato 48 hs		Lactato 72 hs	
	Fatores	-1	0	1	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor
	Média				5,45	0,0000	5,70	0,0000	5,95	0,0000
	Curvatura				4,29	0,0037	6,83	0,0006	6,11	0,0022
x1	Celulose (g/l)	10	25	40	0,56	0,1531	0,60	0,1864	0,93	0,0782
x2	Ex. de levedura (g/l)	1	3	5	0,68	0,0884	1,08	0,0329	1,06	0,0502
x3	MOPS (g/l)	4	7	10	-0,20	0,5927	-0,20	0,6371	-0,44	0,3640
x4	$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	0	0,65	1,3	-0,28	0,4525	-0,32	0,4592	-0,33	0,4945
x5	KH_2PO_4 (g/l)	0	0,65	1,3	-0,14	0,7020	-0,41	0,3595	0,19	0,6948
x6	K_2HPO_4 (g/l)	0	2,2	4,4	-0,36	0,3345	-0,28	0,5216	-0,14	0,7658
x7	$MgCl_2.6H_2O$ (g/l)	0	0,25	0,5	1,43	0,0037	1,88	0,0020	1,96	0,0028
x8	$CaCl_2.2H_2O$ (g/l)	0	0,05	0,1	0,82	0,0486	0,43	0,3339	0,32	0,5045
x9	EDTA (mg/l)	0	2	4	0,32	0,3946	0,37	0,4013	0,43	0,3833
x10	$MnSO_4.H_2O$ (mg/l)	0	1,25	2,5	-0,04	0,9205	-0,08	0,8600	0,21	0,6609
x11	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,86	0,0416	-1,57	0,0055	-1,51	0,0113
x12	$CoCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,52	0,1821	-0,81	0,0890	-0,43	0,3787
x13	$NiCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	0,59	0,1341	-0,08	0,8530	0,10	0,8349
x14	$ZnSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	-0,08	0,8271	0,27	0,5402	0,41	0,3955
x15	$CuSO_4.5H_2O$ (mg/l)	0	0,015	0,03	0,42	0,2633	1,04	0,0374	0,76	0,1386
x16	$FeSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	2	4	-0,35	0,3531	0,30	0,4890	0,04	0,9251
x17	pH	6,7	7,2	7,7	0,93	0,0301	2,04	0,0012	1,84	0,0040

Obs.: p-valor < 0,05 - estatisticamente significativo a 95% de confiança (verde); p-valor < 0,10 - estatisticamente significativo a 90% de confiança (amarelo); p-valor > 0,10 - não são estatisticamente significativos dentro da faixa estudada (branco).

Tabela 3 – Efeito de cada uma das variáveis analisadas sobre a produção de acetato ao longo do processo.

Código da variável		Níveis estudados			Acetato 24 hs		Acetato 48 hs		Acetato 72 hs	
	Fatores	-1	0	1	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor
	Média				2,73	0,0000	4,04	0,0000	4,65	0,0000
	Curvatura				0,27	0,7460	4,08	0,0678	4,78	0,1884
x1	Celulose (g/l)	10	25	40	0,39	0,1912	0,72	0,2966	1,37	0,2503
x2	Ex. de levedura (g/l)	1	3	5	1,44	0,0007	1,91	0,0179	1,41	0,2395
x3	MOPS (g/l)	4	7	10	-0,39	0,1846	-0,36	0,5868	0,37	0,7500
x4	$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	0	0,65	1,3	0,47	0,1209	1,26	0,0874	1,83	0,1373
x5	KH_2PO_4 (g/l)	0	0,65	1,3	-0,06	0,8207	0,39	0,5644	1,16	0,3245
x6	K_2HPO_4 (g/l)	0	2,2	4,4	0,80	0,0191	1,58	0,0402	2,36	0,0660
x7	$MgCl_2.6H_2O$ (g/l)	0	0,25	0,5	0,79	0,0194	2,53	0,0044	3,22	0,0196
x8	$CaCl_2.2H_2O$ (g/l)	0	0,05	0,1	0,54	0,0825	1,27	0,0850	0,75	0,5186
x9	EDTA (mg/l)	0	2	4	-0,11	0,6970	-0,53	0,4359	-1,06	0,3667
x10	$MnSO_4.H_2O$ (mg/l)	0	1,25	2,5	-0,10	0,7254	-0,45	0,5089	-1,02	0,3818
x11	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,30	0,2999	-0,59	0,3876	-1,15	0,3300
x12	$CoCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,17	0,5590	0,01	0,9872	0,50	0,6644
x13	$NiCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	-0,44	0,1459	-1,21	0,0981	-1,89	0,1271
x14	$ZnSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	-0,13	0,6550	0,27	0,6861	0,87	0,4540
x15	$CuSO_4.5H_2O$ (mg/l)	0	0,015	0,03	0,45	0,1331	0,26	0,6923	-0,25	0,8259
x16	$FeSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	2	4	-0,64	0,0475	-1,15	0,1122	-1,67	0,1696
x17	pH	6,7	7,2	7,7	-0,10	0,7244	0,22	0,7473	0,74	0,5236

Obs.: p-valor < 0,05 - estatisticamente significativo a 95% de confiança (verde); p-valor < 0,10 - estatisticamente significativo a 90% de confiança (amarelo); p-valor > 0,10 - não são estatisticamente significativos dentro da faixa estudada (branco).

Tabela 4 – Efeito de cada uma das variáveis analisadas sobre as concentrações de celobiose ao longo do processo.

Código da variável		Níveis estudados			Celobiose 24 hs		Celobiose 48 hs		Celobiose 72 hs	
	Fatores	-1	0	1	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor
	Média				0,63	0,0000	1,54	0,0000	2,92	0,0000
	Curvatura				0,18	0,5567	1,78	0,0351	3,37	0,0076
x1	Celulose (g/l)	10	25	40	0,11	0,2975	0,40	0,1283	0,52	0,1371
x2	Ex. de levedura (g/l)	1	3	5	0,42	0,0029	0,59	0,0364	0,83	0,0313
x3	MOPS (g/l)	4	7	10	-0,08	0,4202	-0,48	0,0725	-1,15	0,0066
x4	$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	0	0,65	1,3	0,12	0,2755	0,30	0,2328	0,81	0,0337
x5	KH_2PO_4 (g/l)	0	0,65	1,3	-0,16	0,1350	-0,37	0,1522	-0,28	0,4053
x6	K_2HPO_4 (g/l)	0	2,2	4,4	-0,08	0,4205	-0,54	0,0488	-1,22	0,0050
x7	$MgCl_2.6H_2O$ (g/l)	0	0,25	0,5	-0,14	0,1870	0,48	0,0726	1,54	0,0013
x8	$CaCl_2.2H_2O$ (g/l)	0	0,05	0,1	0,02	0,8676	0,23	0,3486	1,09	0,0089
x9	EDTA (mg/l)	0	2	4	0,09	0,4069	0,39	0,1339	0,83	0,0316
x10	$MnSO_4.H_2O$ (mg/l)	0	1,25	2,5	-0,04	0,6796	0,00	0,9918	-0,17	0,6159
x11	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	0,02	0,8351	0,00	0,9928	-0,04	0,9142
x12	$CoCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,16	0,1429	-0,23	0,3548	-0,55	0,1187
x13	$NiCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	-0,07	0,4854	0,21	0,3952	0,57	0,1110
x14	$ZnSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	-0,13	0,2207	-0,20	0,4236	-0,46	0,1849
x15	$CuSO_4.5H_2O$ (mg/l)	0	0,015	0,03	-0,01	0,9174	0,03	0,8980	0,23	0,4804
x16	$FeSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	2	4	-0,12	0,2620	-0,44	0,0958	-0,61	0,0916
x17	pH	6,7	7,2	7,7	-0,10	0,3393	0,11	0,6575	0,41	0,2375

Obs.: p-valor < 0,05 - estatisticamente significativo a 95% de confiança (verde); p-valor < 0,10 - estatisticamente significativo a 90% de confiança (amarelo); p-valor > 0,10 - não são estatisticamente significativos dentro da faixa estudada (branco).

Tabela 5 – Efeito de cada uma das variáveis analisadas sobre as concentrações de glicose ao longo do processo.

Código da variável		Níveis estudados			Glicose 24 hs		Glicose 48 hs		Glicose 72 hs	
	Fatores	-1	0	1	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor	Efeitos	p - valor
	Média				0,61	0,0000	1,89	0,0000	3,93	0,000000
	Curvatura				0,23	0,4140	3,37	0,0009	9,33	0,000364
x1	Celulose (g/l)	10	25	40	0,08	0,3953	0,64	0,0187	1,51	0,020987
x2	Ex. de levedura (g/l)	1	3	5	0,04	0,6430	0,16	0,4839	0,59	0,293575
x3	MOPS (g/l)	4	7	10	-0,22	0,0397	-0,74	0,0097	-1,61	0,015773
x4	$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	0	0,65	1,3	-0,16	0,1155	-0,36	0,1378	-0,36	0,509701
x5	KH_2PO_4 (g/l)	0	0,65	1,3	-0,27	0,0170	-0,52	0,0435	-0,64	0,259582
x6	K_2HPO_4 (g/l)	0	2,2	4,4	-0,25	0,0233	-0,79	0,0067	-1,30	0,039160
x7	$MgCl_2.6H_2O$ (g/l)	0	0,25	0,5	-0,01	0,9032	0,97	0,0022	2,70	0,000920
x8	$CaCl_2.2H_2O$ (g/l)	0	0,05	0,1	0,00	0,9976	0,19	0,4148	0,99	0,097817
x9	EDTA (mg/l)	0	2	4	-0,05	0,5691	0,24	0,2979	0,84	0,152304
x10	$MnSO_4.H_2O$ (mg/l)	0	1,25	2,5	-0,08	0,4000	-0,18	0,4267	-0,38	0,491879
x11	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,21	0,0427	-0,37	0,1262	-0,85	0,145869
x12	$CoCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,2	0,4	-0,18	0,0794	-0,43	0,0825	-1,12	0,067301
x13	$NiCl_2.6H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	-0,04	0,6799	0,34	0,1536	0,99	0,096820
x14	$ZnSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	0,1	0,2	-0,19	0,0596	-0,29	0,2259	-0,51	0,364276
x15	$CuSO_4.5H_2O$ (mg/l)	0	0,015	0,03	-0,09	0,3242	0,03	0,8975	0,63	0,264454
x16	$FeSO_4.7H_2O$ (mg/l)	0	2	4	-0,17	0,0920	-0,28	0,2408	-0,45	0,416519
x17	pH	6,7	7,2	7,7	-0,01	0,9091	0,49	0,0547	1,38	0,031100

Obs.: p-valor < 0,05 - estatisticamente significativo a 95% de confiança (verde); p-valor < 0,10 - estatisticamente significativo a 90% de confiança (amarelo); p-valor > 0,10 - não são estatisticamente significativos dentro da faixa estudada (branco).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA E TÉCNICA, PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS – 2008/2013

Artigos completos publicados em periódicos

GROPOSO, C.; CASTRO, A.M.de; PEREIRA JR, N. (2013) Effects of agitation and exogenous H_2 on bioconversion of sugarcane bagasse into ethanol by *Clostridium thernocellum* ATCC 27405. Electronic Journal of Biotechnology 16(6): xx-xx.

DRECHSLER-SANTOS, E.R.; GROPOSO, C.; LOGUERCIO-LEITE, C. (2008) New records of lignocellulolytic fungi (Basidiomycetes) from the Atlantic Rain Forest in State of Santa Catarina, Brazil. Hoehnea 35(1): 57-61.

MONTAGNER, C. *et al.* (2008) Antifungal activity of coumarins. Z. Naturforsch 63c: 21-28.

DRECHSLER-SANTOS, E.R.; GROPOSO, C.; LOGUERCIO-LEITE, C. (2008) Additions to the knowledge of lignocellulolytic basidiomycetes in forests from Santa Catarina, Southern Brazil. Mycotaxon 103: 197-200.

Trabalhos completos em anais de eventos

GROPOSO, C. *et al.* (2013) Influência do hidrogênio no metabolismo de *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, Foz Fo Iguaçu/PR. (em anexo)

Resumos em anais de eventos

CONCEIÇÃO, A.G. da *et al.* (2010) Compositional analysis of sugar cane bagasse for bioprocessing control. Annals 32 Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Clearwater, Florida.

Participação em eventos

2013 – ISMOS4 – International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems

2013 – XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos – X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas

2013 – Encontro Avançado em Biorrefinarias, Rio de Janeiro/RJ.

2012 – Workshop on Second Generation Bioethanol 2012: Enzymatic Hydrolysis, Campinas/SP

2012 – XXI ALAM, Santos/SP

2012 – X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Blumenau/SC.

2012 – Clostridium XII, Nottingham, Inglaterra.

2011 – Seminário Internacional sobre Nanobiotecnologia: Aspectos Regulatórios e Patentes, São Paulo/SP.

2010 – IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro/RJ.

2010 – 3o. Congresso Brasileiro de Biotecnologia, Fortaleza/CE.

2010 – Informex Latin America 2010, São Paulo/SP.

2009 – VI Congresso Brasileiro de Biossegurança e VI Simpósio Latino-americano de Produtos Biotecnológicos, Rio de Janeiro/RJ.

2009 – 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas/PE.

2009 – Cellulosomes, Cellulases & Other Carbohydrate Modifying Enzymes. Andover, NH, USA.

2008 – VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC 2008, Rio de Janeiro/RJ.

2008 – III Encontro de Biossegurança. Petrobras, Rio de Janeiro/RJ.

Palestras ministradas

GROPOSO, C. (2012) Patentes, bioprospecção e biotecnologia enzimática dos fungos degradadores e Madeira. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – UFSC, Florianópolis/SC.

GROPOSO, C. (2009) Riscos à saúde relacionados ao de uso de novas tecnologias. Congresso SMS, Petrobras, Rio de Janeiro/RJ.

GROPOSO, C. (2008) Desafios na produção de etanol de segunda geração. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

Participação em cursos

2012 – Formação de Auditores e Fiscais em Biosseguridade. Associação Nacional de Biossegurança, Porto Alegre/RS, 40h.

2011 - Aproveitamento energético de biogas. Petrobras, Rio de Janeiro/RJ, 8h.

2010 - Advanced school on biochemistry of biofuels. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Ubatuba/SP, 60h

Cursos ministrados

GROPOSO, C. (2008) Biotecnologia e Biossegurança na Indústria do Petróleo. Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, 4h.

Participação em Patentes

Processo para produção de gases energéticos a partir de correntes obtidas de materiais lignocelulósicos (2011)

Vetor modular para expressão de enzimas em fungos filamentosos, fungo filamentoso transformado com dito vetor modular e método para produzir uma proteína de interesse no interior do dito fungo filamentoso (2008)

Processo de produção de um preparado enzimático para hidrólise de celulose de resíduos lignocelulósicos e sua aplicação na produção de etanol (2008)

Trabalhos técnicos

GOMES, A. da C; GROPOSO, C. (2013) Avaliação da fermentabilidade de hidrolisados enzimáticos concentrados por *Saccharomyces cerevisiae*. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C.(2013) Identificação dos genes de *Clostridium thermocellum* envolvidos na hidrólise do bagaço de cana – relatório final. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C.(2013) Identificação dos genes de *Clostridium thermocellum* envolvidos na hidrólise do bagaço de cana – Análise Proteômica II. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C.(2012) Identificação dos genes de *Clostridium thermocellum* envolvidos na hidrólise do bagaço de cana – Análise Proteômica I. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C.(2012) Identificação dos genes de *Clostridium thermocellum* envolvidos na hidrólise do bagaço de cana – Análise Genômica. Relatório técnico Petrobras.

CASTRO, A.M. *et al.* (2012) Desenvolvimento conjunto entre Petrobras e KL Energy da tecnologia de produção de etanol a partir de bagaço de cana de açúcar. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C. (2011) Construção de biblioteca plasmidial para os genes envolvidos na sacarificação do bagaço de cana em *Clostridium thermocellum*. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C.; MOYSES, D.N. (2011) Seleção e Identificação de Novas Linhagens de *Pichia stipitis* adaptadas ao processo de etanol de segunda geração. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C.; SANTA ANNA, L.M.M.; MENEZES, E.P. (2009) Estudo dos parâmetros para fermentação alcoólica de D-xilose por *Pichia stipitis*. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C.; MOYSES, D.N. (2009) Estudo do efeito de inibidores no crescimento de *Pichia stipitis* em batelada simples e batelada alimentada. Relatório técnico Petrobras.

GROPOSO, C. (2009) Estudo da eficiência do sistema celulolítico de *Clostridium thermocellum* na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Relatório técnico Petrobras.

RIBEIRO, C.M.S.; GROPOSO, C.; SANSEVERINO, A.M. (2008) Utilização de glicerina visando a produção de biogás. Relatório técnico Petrobras.