



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Análise dos secretomas de *C.thermocellum* B8 quando cultivada em resíduos agroindustriais como fonte de carbono.**

**Silva J.P<sup>1</sup>., Camargo B.R<sup>1</sup>., Murad<sup>2</sup>, A.M.; Noronha, E.F<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Universidade de Brasília – Instituto de Biologia

Caixa Postal 70910-900 Brasília– DF - E-mail: wpinheiro.jessica@gmail.com

Fundação Universidade de Brasília– Departamento de Biologia Celular

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia –  
Cenagem

Caixa Postal 70770-900 Brasília– DF

#### **RESUMO**

*A utilização de materiais de origem lignocelulósica como fonte de açúcares fermentáveis e outras moléculas para obtenção de produtos químicos de alto valor agregado tem sido dificultada pela sua elevada recalcitrância. Clostridium thermocellum é capaz de eficientemente degradar materiais celulósicos através de um complexo enzimático extracelular chamado de celulosoma. No presente trabalho, utilizando a técnica de Nano UPLC-MSE foi possível mapear proteínas secretadas por C. thermocellum quando cultivada na presença de celulose microcristalina, palha e bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono e provavelmente envolvidas em sua desconstrução. Foram analisadas as frações de proteínas provenientes do sobrenadante e celulosomas parcialmente purificados. Foram identificadas no total 137 proteínas. Os secretomas de C.thermocellum cultivado nas três diferentes fontes de carbono continham proteínas pertencentes às famílias das glicosídeo hidrolases (GHs), carboidrato esterases (CEs) e polissacarídeos liases (PLs). Nos três substratos foram identificadas enzimas chaves como CelS, CelJ e CelK. Além disto, as proteínas das famílias GH9 E GH48 são as mais abundantes.*

**Palavras-chave:** *Clostridium thermocellum*, subproteoma, biomassa lignocelulósica.

#### **INTRODUÇÃO**

As biomassas lignocelulósicas são matérias-primas de grande interesse industrial uma vez que podem ser utilizadas para a produção de uma variedade de produtos. Sendo composta principalmente por: celulose, hemicelulose e lignina. Entretanto, a complexa estrutura deste tipo de material, no geral, é resistente à biodegradação (Pérez *et al.*, 2002).

A maioria das bactérias descritas como principais responsáveis pela degradação anaeróbica de lignocelulose são membros do filo *Firmicutes*, e os mais eficientes na sua degradação pertencem ao cluster III dos *Clostridiales*. Neste cluster encontra-se a bactéria anaeróbica e termófila *C. thermocellum*, que hidrolisa estes materiais através de um complexo enzimático extracelular chamado de celulosoma, que é composto por componentes catalíticos como celulasas, xilanases, pectinases, e pela proteína estrutural não catalítica chamada de escafoldina ou proteína de integração do celulosoma (CipA). Importante ressaltar também que esta bactéria apresenta maiores taxas de crescimento entre 60-65°C, o que a torna uma potencial fonte de enzimas termoestáveis (Béguin *et al.* 1994).

O celulosoma secretado por esta espécie de bactéria está localizado em protuberâncias presentes na superfície da célula, e é subsequentemente liberado no meio de



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

cultura (Béguin *et al.*, 1994). O objetivo deste trabalho foi analisar o subproteoma de *C. thermocellum*, isolado B8, quando cultivada em meio de cultura tendo como única fonte de carbono: celulose microcristalina, palha ou bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono, utilizando espectrometria de massa, Nano UPLC-MSE.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Cultivo e preparo das amostras

O isolado B8 de *C. thermocellum* foi isolada do rúmen de caprino da raça moxotó. Seu cultivo foi realizado em meio líquido redutor com atmosfera anaeróbica como previamente descrito em Hamann *et al.* (2015). Celulose microcristalina ou os resíduos agroindustriais, palha ou bagaço de cana de açúcar foram utilizados como fonte de carbono. O crescimento foi realizado durante 4 dias a 120 rpm a 60°C.

#### Preparação das frações do celulosoma parcialmente purificado

A preparação das proteínas provenientes das frações do sobrenadante e de proteínas ligadas ao substrato residual (celulosoma parcialmente purificado) foram feitas conforme descrito em Blume *et al.* (2013).

#### Análise por espectrometria de massa

O preparo das amostras provenientes do sobrenadante e celulosoma parcialmente purificado para a análise no NanoUPLC-MSE foram feitas de acordo com Murad e Rech (2012). Os dados de MS obtidos a partir LC-MSE foram processados usando ProteinLynx Global Server (PLGS) version 3.0.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

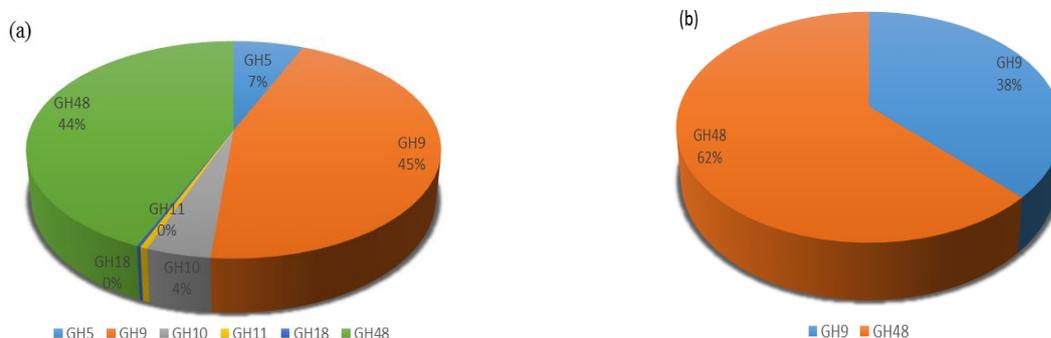
#### Mapeamento de proteínas usando nano UPLC-Mse

Ao todo foram identificadas 137 proteínas em todas as amostras, dentre estas, proteínas das diferentes famílias de glicosídeo hidrolases (GHs), carboidrato esterases (CEs) e polissacarídeo liases (PLs). Para as amostras de secretoma para o cultivo em palha de cana de açúcar como fonte de carbono também foram identificadas as enzimas celulosomais: CelJ, CelR, CelS e CelW. Quando celulose é a única fonte de carbono foi identificada uma maior diversidade de enzimas celulosomais tais como: CelG, CelT, CelF, CelN, CelB, CelU, CelA, CelQ, CelK, XynY e XynC.

A bactéria *C.thermocellum* utiliza uma série de enzimas com atividades catalíticas contra polissacarídeos que permitem a eficiente degradação da celulose e hemicelulose. Estas incluem endo- $\beta$ -glucanases, exo-  $\beta$ -glucanases e  $\beta$ -glicosidases, entre outras (Lynd *et al.*, 2002). De acordo com a figura 1 a e 1 b é possível notar que as famílias GH9 e GH48 predominam nas frações celulosoma parcialmente purificado e sobrenadante quando a bactéria foi crescida na presença de celulose microcristalina, palha e bagaço de cana. Isto mostra a sua importância na degradação dos componentes presentes na parede celular. Em um estudo realizado por Shoham *et al* (1996) é mostrado que cepas mutantes de *Ruminococcus mutantes albus*, incapazes de produzir as enzimas das famílias 9 e 48, eram ineficientes na degradação dos substratos lignocelulósicos, reforçando a importância de tais famílias para o sistema de holocelulases bacterianas.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016



**Figura 1.** Representação geral da distribuição relativa das famílias de Glicosídeo Hidrolases encontradas nas frações do celulossoma parcialmente purificado (a) e sobrenadante (b) produzidas por *C. thermocellum* utilizando como fonte de carbono: celulose microcristalina, palha e bagaço de cana de açúcar.

De forma geral, para todas as fontes de carbono utilizadas neste estudo *C. thermocellum* B8 secretou tanto na forma de celulossomas ou no sobrenadante uma maior quantidade de Glicosídeo Hidrolases das famílias 9 e 48. Dentre as enzimas pertencentes a estas famílias CelS, CelJ e CelK foram as mais abundantes, dados que estão de acordo com a literatura (Nicolas; Martin, 2007).

Juntamente com celobiohidrolases e endoglicanasas, para a amostra do celulossoma parcialmente purificado produzido na presença de celulose foram encontradas xilanases (Xyn C, Y e Z), a presença de hemicelulases juntamente com celulases é de grande importância para a completa degradação de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal visto que xilanases são capazes de facilitar o acesso das celulases ao substrato (Hu e Regauskas 2013). A secreção de hemicelulases e pectinases quando *C.thermocellum* B8 é crescida na presença de substrato celulósicos puros foi previamente descrita por nosso grupo (Hamann *et al.*, 2015), resultado que está de acordo com o perfil proteômico de diferentes isolados (Wei *et al.*, 2014 e Nicolas; Martin, 2007).

### CONCLUSÕES

A maior abundância e diversidade de proteínas foram obtidas para as amostras proteicas provenientes das culturas contendo celulose com fonte de carbono, assim como o maior número de glicosídeo hidrolases. Sendo que a maior parte dessas GHs foi encontrada na amostra do celulossoma parcialmente purificado.

As análises proteômicas feitas neste trabalho mostram que diferentes biomassas lignocelulósicas são capazes de induzir uma secreção distinta de glicosídeo hidrolases por *C.thermocellum* B8, sendo assim esses dados poderão ser utilizados como subsídio para o desenvolvimento de novas misturas enzimáticas para sacarificação de resíduos lignocelulósicos.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arai T, Kosugi A, Chan H, Koukiekolo R, Yukawa H, Inui M, Doi R. 2006. Properties of cellulosomal family 9 cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:654-660.
2. Be´guin P, Aubert JP. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25–58.
3. Blume LR, Noronha EF, Pereira JL, Queiroz RML, Ricart CAO, Souza MV, Felix CR. 2013. Characterization of *Clostridium thermocellum* isolates grown on cellulose and sugar cane bagasse. *BIOENERG RES*, v. Jan, p. 1939-1242.
4. Hamann PRV, Serpa DL, Barreto ACS, Camargo BR, Osiro KO, Valle MS, Felix CR, Miller RNG, Noronha EF. 2015. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 105, p. 97-105.
5. Hu F, Ragauskas A. 2013. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *BioEnergy Research*, v. 5, n. 4, p. 1043-1066, 2012. ISSN 1939-1234.
6. Murad AM, Rech EL. NanoUPLC-MS<sup>E</sup> proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC Biotechnology*. 2012;12:82. Doi:10.1186/1472-6750-12-82.
7. Nicolas DG; Martin VJJ. 2007. Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *J. Bacteriol.* vol. 189 no. 19 6787-6795.
8. Pérez J, Muñoz-Dourado de la Rubia T, Martínez. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5, pp. 53-63.
9. Shoham Y, Lamed R, Bayer EA. 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* 7:275-281.
10. Spinelli S, HP Fierobe, Belaich A., Belaich JP, Henrissat B, Cambillau C. 2000. Crystal structure of a cohesin module from *Clostridium cellulolyticum*: implications for dockerin recognition. *J. Mol. Biol.* 304:189-200.
11. Wei H, Fu Y, Magnusson L, et al. 2014. Comparison of transcriptional profiles of *Clostridium thermocellum* grown on cellobiose and pretreated yellow poplar using RNA-Seq. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:142. doi:10.3389/fmicb.2014.00142.