



Palestra 13

DESVENDANDO O CÓDIGO GLICÔMICO DA PAREDE CELULAR PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Marcos Buckeridge, Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO), Biomass Synthetic and Systems Biology Center, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, msbuck@usp.br

Resumo

Uma das barreiras mais importantes para o desenvolvimento de tecnologias para a segunda geração do bioetanol (2G) - ou etanol celulósico - é o uso eficiente das enzimas durante o processo. A busca tem obtido relativo sucesso, mas ainda assim o custo da operação na indústria é muito alto. Pesquisadores em todo o mundo vêm buscando enzimas capazes de hidrolisar a parede celular vegetal, explorando principalmente o potencial existente nos genomas de microorganismos. Porém, parte da dificuldade reside no que é conhecido com recalitrância à hidrólise, fenômeno este relacionado à complexidade existente nas paredes celulares, que se encontra encriptada em um Código Glicômico (Buckeridge & De Souza, 2014; Tavares & Buckeridge, 2015). Nossas descobertas sobre como os polímeros da parede de cana e miscanto, duas espécies importantes para a produção de etanol 2G, se associam (De Souza et al., 2013, 2015) levaram à proposição da hipótese de que a hidrólise da parede poderia ser mais eficiente se, ao invés de coquetéis enzimáticos, usássemos uma sequência de consórcios enzimáticos que atacassem os diferentes domínios da parede, seguindo uma ordem “de fora para dentro” das unidades arquitetônicas da parede (Buckeridge et al., 2015). Esta hipótese foi corroborada pela descoberta de que os complexos enzimáticos produzidos pelos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* pareceram seguir a ordem esperada de produção de hidrolases quando estes fungos foram cultivados sobre a biomassa de cana e de bagaço (Borin et al., 2015). O mesmo foi observado quando estudamos um mecanismo endógeno em que a planta de cana altera a sua própria parede celular (ver Tavares et al., 2015 para uma revisão sobre processos deste tipo em plantas). Encontramos tal mecanismo nas raízes de cana. Durante o desenvolvimento, todas as raízes de cana formam aerênquima, que é um conjunto de espaços de gás cujas paredes celulares são alteradas durante a sua formação. Neste processo, foram detectadas as expressões de mais de 500 genes associados à parede celular. Destes, 49 genes são de hidrolases. Os estudos agora caminham no sentido de caracterizar estas hidrolases, assim como fatores de transcrição relacionados à parede. Priorizamos enzimas chave na desmontagem da parede pertencentes às classes das pectinases, hemicelulases e celulases, visando obter plantas transformadas capazes de se auto-pretratarem para posterior ação dos coquetéis enzimáticos. Também estamos focalizando o trabalho na produção heteróloga das enzimas da cana para possível adição a

coquetéis/consórcios existentes visando melhorar a eficiência da hidrólise enzimática para o etanol de segunda geração.

Financiamento: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CNPq/FAPESP), CNPq Engenharia Biológica

Unveiling the Glycomic Code of plant cell walls to increase enzymatic hydrolysis efficiency for the production of 2G ethanol

Marcos Buckeridge, Laboratory of Plant Physiological Ecology (LAFIECO), Biomass Synthetic and Systems Biology Center, Institute of Biosciences, University of São Paulo, msbuck@usp.br

One of the most important barriers for development of 2G bioethanol technologies (the cellulosic ethanol) is the efficient use of enzymes during the process. The search for enzymes has been relatively successful, but the production costs are still too high. Researchers from everywhere have been looking for enzymes capable to hydrolyze plant cell walls, exploiting mainly the potential extant in microorganism's genomes. However, one of the difficulties reside on what is known as recalcitrance to hydrolysis, which is a phenomenon related to the complexity of the cell walls that are encrypted into a Glycomic Code (Buckeridge & De Souza, 2014; Tavares & Buckeridge, 2015), Our discoveries about how the polymers interact in the cell walls of sugarcane and miscanthus, two important bioenergy crops for 2G, led to the proposition of the hypothesis that the wall might be hydrolyzed more efficiently if enzyme consortia were used, instead of enzyme cocktails, following from the outside towards the inside of the wall architectural unit. This hypothesis was corroborated by the discovery that the enzyme complexes produced by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* seem to follow the expected sequence of hydrolases production when these fungi were grown on sugarcane biomass and bagasse (Borin et al., 2015). The same has been observed when we studied an endogenous mechanism extant in sugarcane that alters its own walls (see Tavares et al., 2015 for a review about such process in plants). We found such a mechanism in sugarcane roots. During development, all sugarcane roots form aerenchyma, a complex of gas spaces whose walls are altered during their formation. In this process, we detected more than 500 cell wall related genes. Among them, 49 were hydrolases. Our studies now are being directed towards the characterization of these hydrolases along with cell wall related transcription factors. We prioritize key enzymes in the disassembly of cell walls belonging to the classes of pectinases, hemicellulases and cellulases, envisaging the transformation of plants that would be capable of pre-treating themselves for further action of enzyme cocktails. We also focus on the heterologous production of sugarcane hydrolases that could be added to existing enzyme cocktails as well as to help composing enzyme consortia aiming to improve the efficiency of enzymatic hydrolysis for 2G bioethanol production.

This work was financed by the National Institute of Science and Technology of Bioethanol (INCT-Bioetanol)(CNPq-FAPEP) and by the Biological Engineering Program (CNPq).

Bibliografia/References

Borin, G.P., Sanchez, C.C., De Souza, A.P., Santana, E.S., Souza, A.T., Leme, A.F.P.,m Squina, F.M., Buckeridge, M.S. Goldman, G.H., Oliveira, J.V.C. (2015) Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *Plos One*. 10(6): e0129275

Buckeridge, M.S., Santos, W.D., Tiné, M.S., De Souza, A.P. (2015) The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance. In *Compendium of Bioenergy Plants: Sugarcane* (E.Lam, H.Carrer, J.A. Silva Eds). CRC Press 125p.

Buckeridge, M.S., De Souza, A.P. (2014) Breaking the “Glycomic Code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. *Bioenergy Research* 7:1065-1073.

De Souza, A. P., Leite, D. C. C., Pattathil, S. ; Hahn, M. G. ; Buckeridge, M. S. (2013) Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Research*, 6: 564-579.

De Souza, A.P., Kamei, C.L.A., Torres, A.F., Pattathil. S., Hahn, M.G., Trindade, L.M., Buckeridge, M.S. (2015) How cell wall complexity influences saccharification efficiency in *Miscanthus sinensis*. *Journal of Experimental Botany*. 66: 4351-4365.

Tavares, E.Q.P., De Souza, A. P., Buckeridge, M.S. (2015) How endogenous plant cell wall degradation mechanisms can help achieve higher efficiency in saccharification of biomass. *Journal of Experimental Botany*. 66:4133-4143.

Tavares, E.Q.P., Buckeridge, M.S. (2015) Do cell walls have a code? *Plant Science*. 241:286-294.