



Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação



### **Projeto de Iniciação Científica:**

## **Realização de Experimentos Sistemáticos empregando Enzimas Hemicelulolíticas para Desconstrução da Parede Celular do Bagaço da Cana de Açúcar**

**Pesquisador Responsável:** Dr. Fabio M. Squina - Pesquisador do Programa de Pesquisa Básica / CTBE

**Co-orientadora:** Dra. Rosana Goldbeck - Pós-Doutoranda do Programa de Pesquisa Básica / CTBE

### **RESUMO**

A conversão de biomassa lignocelulósica em combustíveis renováveis, como o bioetanol, tem sido considerada uma tecnologia promissora para a substituição dos combustíveis fósseis e para ampliação da produção mundial de etanol. Um passo essencial na conversão da biomassa lignocelulósica em etanol ou em outros produtos de biorefinaria é a despolimerização de polissacarídeos por via enzimática. No entanto, o alto custo das enzimas necessárias para degradação da parede celular vegetal dificulta o desenvolvimento de um etanol lignocelulósico economicamente viável. Em face disto, a necessidade reduzir os níveis de enzimas não-essenciais e aumentar a proporções relativas das enzimas prioritárias são, portanto, uma potencial estratégia para aumentar as atividades específicas e, assim, diminuir o custo da bioconversão da biomassa vegetal. Neste sentido, fazendo o uso de uma coleção de enzimas hemicelulolíticas expressas em sistema heterólogo de expressão pertencentes ao CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol), pretendemos realizar experimentos sistemáticos empregando enzimas hemicelulolíticas para desconstrução da parede celular de bagaço de cana de açúcar. Este estudo tem como objetivo não somente o melhor entendimento da atuação das enzimas na degradação da biomassa, mas também visa mapear acessibilidade enzimática e definir quais as enzimas são essenciais e secundárias na bioconversão.

*Palavras-Chave:* enzimas hemicelulolíticas, parede celular, desconstrução, bagaço de cana de açúcar.

### **PLANO DE TRABALHO**

#### **Caracterização da Biomassa Lignocelulósica**

Para o desenvolvimento do projeto, contaremos com o estudo de duas diferentes biomassas de cana de açúcar: bagaço de cana de açúcar pré-tratado/designificado e a própria cana de açúcar (*colmos*). A cana de açúcar e o bagaço de cana de açúcar pré-tratado/designificado serão disponibilizados pela Dr. George Jacson, pesquisador do grupo de físico-química do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol). O bagaço pré-tratado/designificado e o colmo da cana de açúcar (cana "*in natura*") serão moídos separadamente em moinho de bola (Tecnal, Brasil), e as amostras moídas serão submetidas a lavagem com etanol a 80% (v/v) a 80 °C durante 20 minutos. Os sobrenadantes serão descartados para remover os açúcares e outros compostos solúveis. O resíduo insolúvel será lavado com água destilada e seco a 60 °C durante 24 horas. Serão realizadas análises de composição química tanto do bagaço como do colmo de cana de açúcar através HPAE-PAD "*high performace anion exchange – pulsed amperometric detection*".

## Clonagem e Expressão das Enzimas de Interesse em Sistema Heterólogo

Faremos uso de uma coleção de enzimas envolvidas na conversão da biomassa lignocelulósica (super expressas em sistema heterólogo de expressão) pertencentes ao CTBE, que serão estudadas nos experimentos sistemáticos de misturas enzimáticas para degradação da parede celular de cana de açúcar. No entanto, muitas dessas enzimas já se encontram expressas em *Aspergillus nidulans* A773 e em *Escherichia coli* BL21D3pLys, empregando os vetores de expressão pExPYR e pET28a respectivamente. Porém as enzimas que ainda não foram super-expressas, serão clonadas e expressas, conforme protocolos propostos por Damásio et al. (2011) e Santos et al. (2012).

## Produção e Purificação das Enzimas de Interesse

Após realizada a super-expressão das enzimas que ainda não se encontravam expressas em *Aspergillus nidulans* ou *Escherichia coli*, as enzimas de interesse serão produzidas segundo protocolos descrito por Damásio et al. (2011) e Santos et al. (2012). Os transformantes de *A. nidulans* serão inoculados em meio mínimo líquido contendo 2% de maltose, e mantidos a 37 °C por 36 horas. O micélio será separado por filtração à vácuo em funil de Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células. O mesmo será dialisado e utilizado para purificação e determinação das atividades enzimáticas extracelulares. Os transformantes de *E. coli* serão cultivados em meio LB (Luria-Bertani) até atingir uma densidade óptica de 0,6 e então serão induzidos com 0,5 mM de IPTG “*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*” durante 4 horas à 37°C e 250 rpm. Posteriormente a biomassa será ressuspendida em tampão contendo 20 mM de fosfato de sódio, pH 7,4, 100mM NaCL e 5mM de Imidazol e incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos após adição de Lysozyme (80 µg/mL) e PMSF “*phenylmethylsulfonyl fluoride*” (0,001 mM). Em seguida esta biomassa será sonicada com 7 pulsos de 10 segundos usando Vibracell VCX 500, para liberação das enzimas intracelulares. A mesma será centrifugada por 30 minutos à 10000 x g, sendo a biomassa descartada e o sobrenadante empregado para purificação da enzima de interesse. Para confirmação da expressão da proteína alvo, serão realizadas separações em géis de eletroforese (SPS-PAGE).

Para os processos de purificação iniciaremos utilizando colunas de troca iônica (DEAE-celulose, Mono-Q), uma vez que a maioria das proteínas que pretendemos estudar apresentam pI entre 4-6. Em seguida, e quando necessário, a purificação continuará por cromatografia de filtração em gel em coluna Sephadex (200 prep grade - GE). Já para as enzimas provenientes de bactéria (*E.coli*) será empregada a cromatografia de afinidade, utilizando coluna de níquel (HiTrap SP HP), visto que o vetor empregado para expressão (pET28a) apresenta cauda de histidina. As enzimas purificadas serão armazenadas a -80°C, em alíquotas de 250 µL adicionando glicerol até a concentração final de 20%.

## Realização dos Experimentos Sistemáticos com Misturas Enzimáticas

Nesta etapa serão realizados planejamentos experimentais para cada biomassa analisada (bagaço pré-tratado/deslignificado e colmo de cana de açúcar) em experimentos distintos, com o intuito de analisar os efeitos individuais e sinérgicos das enzimas que atuam na degradação da biomassa de cana de açúcar. Os produtos gerados na degradação da biomassa serão analisados para compreender a atuação destas enzimas, e a partir daí definir quais são as enzimas essenciais na degradação da biomassa de cana de açúcar. É importante salientar, que também será realizado um planejamento experimental empregando um substrato comercial (arabinoxilano) para colaborar com a interpretação dos resultados obtidos. As condições experimentais de hidrólise serão mantidas constantes, somente as enzimas que atuam na hidrólise que serão variáveis. Conforme foi proposto por Benarjee et al. (2010), será fixada a temperatura (50°C), tempo de hidrólise (24 horas) e a concentração das enzimas (15mg/g de glucano). Também fixaremos a concentração de biomassa utilizada nos experimentos (2% p/V). Como

variável resposta, serão analisadas as porcentagens de xilose e oligossacarídeos liberadas após 24 de hidrólise enzimática à 50°C e pH 5,0.

Os experimentos serão realizados em micro-escala, com um volume reacional de 1 mL. A estratégia a ser aplicada nestes experimentos, contará com a realização de planejamentos experimentais fundamentados estatisticamente. Dentre os possíveis planejamentos, destacamos o planejamento Plackett & Burman, como uma potencial ferramenta estatística na etapa de “*screening*” de variáveis, pois além de diminuir o número de experimentos necessários, fornece os efeitos principais que afetam o processo. No planejamento a ser realizado, pretendemos verificar a atuação das enzimas hemicelulolíticas na degradação da hemicelulose e demais componentes da parede celular vegetal, com exceção da celulose. Para isso, contaremos um conjunto de 6 enzimas acessórias (endo-xilanases: GH10 e GH11; xiloglucanase: GH12; arabinofuranosidases: GH51 e GH54; e beta-xilosidase: GH43) todas pertencentes a coleção de enzimas do CTBE. Os efeitos individuais e sinérgicos das enzimas na desconstrução da parede celular da biomassa serão determinados através de um planejamento Plackett Burman (PB16 + 3 pontos centrais) totalizando 19 ensaios. As variáveis independentes do planejamento serão as 6 enzimas hemicelulolíticas a serem estudadas na desconstrução da parede celular da biomassa de cana de açúcar e as variáveis respostas serão a porcentagem (%) de xilose e (%) de oligossacarídeos liberados em 24 horas de hidrólise. Os resultados dos efeitos de todos os planejamentos serão analisados através do software STATISTICA® 8.0.

As concentrações de xilose e oligossacarídeos gerados serão quantificadas por HPED-PAD e avaliados através de eletroforese capilar. Estas análises serão realizadas com o objetivo de melhor entender o modo de atuação e a especificidade enzimática, e por serem ensaios rápidos e precisos vão auxiliar na determinação dos produtos gerados pela desconstrução da parede celular de cana de açúcar através da ação de misturas enzimática (planejamentos), e assim compreender melhor a atuação dessas enzimas e os efeitos sinérgicos resultantes da ação conjunta destas enzimas.

## CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	3ºTRIM 2013	4ºTRIM 2013	1ºTRIM 2014	2ºTRIM 2014
<b>Caracterização da Biomassa Lignocelulósica</b>	X			
<b>Clonagem e Expressão das enzimas de interesse</b>	X			
<b>Produção e Purificação das enzimas de interesse</b>	X	X	X	
<b>Realização dos Experimentos com misturas enzimáticas</b>		X	X	
<b>Análises de HPEA-PAD e Eletroforese capilar</b>			X	X

## REFERÊNCIAS

- Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Borrusch MS, Bongers M, Walton JD. Synthetic multicomponent enzymemixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 101: 9097-9105, 2010.
- Damásio ARL, Silva TM, Almeida FBR, Squina FM, Ribeiro DA, Leme AFP, Segato F, Prade RA, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. *Process Biochem* 46: 1236-1242, 2011.
- Santos et al. Dissecting structure–function–stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis*. *Biochemical Journal*, 441(1): 95-104, 2012.