

Seminário Parcial de Acompanhamento e Avaliação

Núcleo de Genômica, Proteômica, Metabolômica e Enzimologia
em Biorrefinarias Anaeróbicas Lignocelulolíticas

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal

Universidade de Brasília

Universidade Federal de Goiás

Universidade Estadual de Goiás

Embrapa - Agroenergia

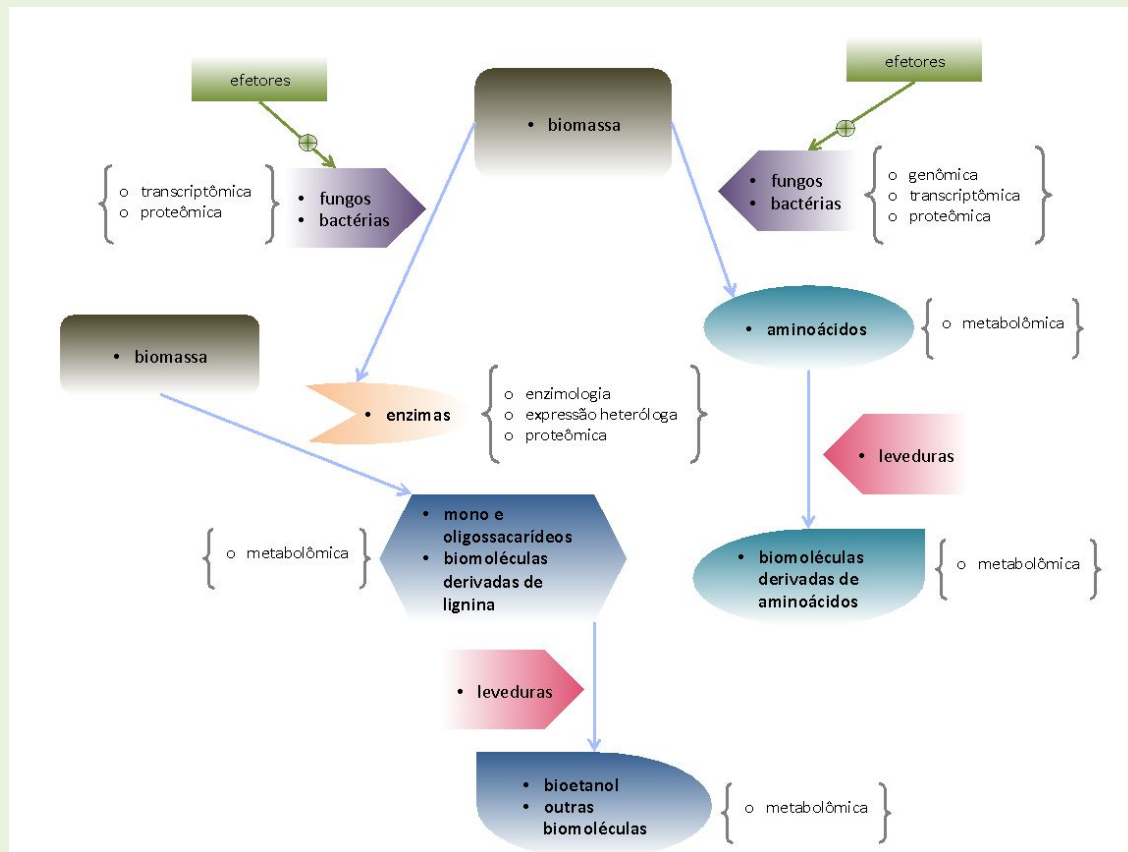
Breve contextualização do projeto e relevância do tema

- Ampliação natural do Núcleo de Excelência anterior com perspectivas para projetos futuros:
 - (a) continuar aplicando **genômica, proteômica e enzimologia** sobre fungos e bactérias, porém utilizando técnicas mais modernas;
 - (b) passar a usar **fungos e bactérias** como **produtores** não apenas de **enzimas** lignocelulolíticas, mas também de **aminoácidos** para uso em aplicações biotecnológicas, químicas e farmacêuticas;
 - (c) passar a usar **fungos, bactérias e suas enzimas** em **biorrefinarias** não apenas para produção de bioetanol, mas também para produção de outras moléculas de interesses biotecnológico, químico e farmacêutico a a partir de substratos e resíduos agroindustriais.
- **Biorrefinaria** é definida como uma instalação que integra processos e equipamentos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir de biomassa.
- O objetivo de uma biorrefinaria é **agregar valor à biomassa**, incluindo lignocelulósica, em sua conversão a produtos úteis usando uma combinação de tecnologias e processos.
- **Bioprocessos** consistem no uso de reações enzimáticas via microrganismos, extrato celular ou enzimas puras com o objetivo de se obter um maior rendimento e produtividade do composto a ser sintetizado.

Objetivos propostos x realizados

- (1) utilizar fungos, leveduras, bactérias e suas enzimas em biorrefinarias a fim de
- (2) produzir biomoléculas como mono/oligossacarídeos, derivados de lignina, aminoácidos e, a partir destes,
- (3) direcionar fermentações por leveduras até produtos de interesses biotecnológico, químico e farmacêutico.

Materiais e Métodos



Esquema básico de ação do Núcleo de Genômica, Proteômica, Metabolômica e Enzimologia em Biorrefinarias. São mostrados os principais substratos, agentes e produtos. As principais metodologias entre chaves. O modelo principal de fungo a ser utilizado neste projeto será o *Aspergillus foetidus*. Em relação a modelos bacterianos, serão utilizados *Clostridium thermocellum* na produção de enzimas e *Corynebacterium glutamicum* na produção de aminoácidos.

Atividades planejadas x realizadas

A execução do projeto encontra-se atrasada em algumas etapas devido a alguns fatores:

- Pandemia de Covid-19. Os laboratórios envolvidos no projeto tiveram seus funcionamentos reduzidos e apenas atividades essenciais de manutenção de colônias foram mantidas. Diversos experimentos foram adiados. Alguns não puderam ser realizados até hoje.
- Alguns alunos contraíram a Covid-19. Até onde sabemos, nenhum dos pesquisadores principais (alguns pertencentes a grupos de risco) contraiu a doença até este momento felizmente, mas permanecem em trabalho remoto na maior parte do tempo devido ao risco
- Falecimento da principal pesquisadora colaboradora da Universidade Estadual de Goiás. A passagem da pesquisadora foi um grande choque do ponto de vista pessoal e científico.
- Defeitos em equipamentos. Dois dos principais equipamentos do projeto, o espectrômetro de massa Orbitrap Elite e o analisador de aminoácidos Dionex ICS-5000 apresentaram defeitos persistentes durante o projeto.

Cronograma de atividades

Etapas	Meses															
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48
Seleção e cultivo de fungos e bactérias	█						█									
Avaliação de biomassas em meios de cultura	█	█					█	█								
Avaliação da ação de efetores metabólicos	█	█					█	█								
Sequenciamento genômico			█	█	█	█										
Análise transcriptômica									█	█	█				█	█
Análise proteômica				█	█	█			█	█	█			█	█	█
Análise metabolômica				█	█	█			█	█	█			█	█	█
Purificação de enzimas e complexos					█	█					█	█				
Caracterização de enzimas e complexos							█	█	█				█	█	█	
Expressão heteróloga de enzimas								█	█	█	█	█				
Fermentação por leveduras									█	█	█	█	█			
Simulação de fluxos metabólicos									█	█	█	█	█			

Etapas restantes

Recurso aprovado x gasto

EXECUÇÃO FINANCEIRA			
	Recursos Liberados	Recursos Gastos	Saldo
Capital	400.000,00	393.850,74	6.149,26
Custeio	545.800,00	113.479,50	432.320,50
Bolsa	49.200,00	49.200,00	0
Saldo	(total) 995.000,00	(total) 556.530,24	438.469,76
Data da situação	26/05/2021	26/05/2021	26/05/2021

Resultados parciais alcançados

Fungos e enzimas

- Tratamento hidrotérmico brando do bagaço de cana-de-açúcar (170 °C, 30 min, 1 % biomassa m/m) aumentou a produção de holocelulases por *Aspergillus niger* quando cultivado na presença das frações sólida e líquida resultantes. Entretanto, esses mesmos licores inibiram o crescimento da bactéria produtora de aminoácidos *Corynebacterium glutamicum*.
- Secretomas produzidos por *A. niger* na presença de biomassas pré-tratadas (sólidos tratados e/ou licor) tiveram maior atividade de holocelulases, maior termoestabilidade, maior eficiência na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e maior abundância de holocelulases do que o secretoma produzido na presença de bagaço *in natura*.
- A composição dos secretomas é dependente não só da composição química, mas também da acessibilidade ao substrato. Este trabalho foi inédito na comparação de secretomas de *A. niger* produzidos em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e/ou licor de pré-tratamento por abordagem proteômica quantitativa.
- Observou-se ser possível modular a composição do secretoma de *A. niger* usando o tratamento hidrotérmico do substrato como ferramenta, uma vez que o fungo fez ajuste na abundância de enzimas de acordo com a fração da biomassa utilizada.
- Os parâmetros do tratamento hidrotérmico de biomassa (severidade e carga de sólidos) utilizados para gerar licores adequados para indução de holocelulases não são compatíveis com os parâmetros necessários para maximizar a sacarificação enzimática da celulose.
- Em um contexto industrial de biorrefinaria em que a produção de enzimas é feita na mesma instalação em que a hidrólise e fermentação de biomassa são realizadas (esquema de produção local e integrada de enzimas), propõe-se que sejam aplicados pré-tratamentos diferentes à biomassa, um para cada aplicação.
- O potencial de produção de enzimas holocelulolíticas por *Paecilomyces formosus* em resíduos agroindustriais de café foi avaliado. Um *screening* enzimático realizado em oito cepas de *P. variotii* revelou as três maiores produtoras de pectinases (3RET13, 3RE14 e 3RE21) para este experimento.
- Diferentes fatores relacionados ao pré-tratamento (concentração de biomassa, tempo e temperatura de exposição) e ao cultivo (pH, agitação, temperatura e suplementação de nitrogênio) foram avaliados. Os perfis de pectinases foram descritos para a cepa 3RE21. As melhores condições bioquímicas de atividade de PEC_S200 se mantiveram em faixas ácidas de pH (2 – 5), 65 °C, ativação na presença dos íons Zn, Co, K, Mg, Mn, Na, dos compostos EDTA, SDS, DTT e β -mercaptoetanol e dos compostos fenólicos ácidos ferúlico e tânico, além de estabilidade em etanol 20%.
- A partir das características apresentadas pela pectinase deste estudo, as melhores aplicabilidades seriam nas indústrias alimentares humanas, têxteis, de rações animais e de produção de etanol de 2ª geração.
- Realizou-se a produção, purificação parcial, imobilização e caracterização de uma pectinase de *Aspergillus terreus*, visando uma potencial aplicação das enzimas imobilizadas em biorrefinaria.
- Após a imobilização em suporte MANAE, a pectinase apresentou uma maior atividade em pH ácido (pH=4), quando comparado a enzima não imobilizada. Também foi constatado que após o procedimento de imobilização houve uma melhora de até 200% na termoestabilidade da enzima. Ademais, foi possível reutilizar a enzima imobilizada por até 5 ciclos de hidrólise com efetiva produção de açúcares redutores. Por fim, os testes de aplicação industrial revelaram uma redução significativa na viscosidade do suco de goiaba quando utilizada a enzima imobilizada. Embora que para uma real aplicação industrial sejam necessários estudos adicionais, como de toxicidade do suporte de imobilização, os resultados aqui obtidos revelam o potencial de aplicação das enzimas imobilizadas em biorrefinaria.

Resultados parciais alcançados

Fungos e enzimas

- A avaliação do secretoma produzido pelo fungo *Clonostachys byssicola* em cultivo submerso com diversas fontes de carbono lignocelulósicas através de eletroforese em BN-PAGE revelou a presença de bandas de alta massa molecular, correspondentes à complexos proteicos putativos.
- A identificação desses complexos por LC-MS/MS demonstrou que abrigam diversas enzimas envolvidas na degradação de holocelulose, como celulases, mananases, xilanases e pectinases.
- Os complexos também são cataliticamente ativos, uma vez que foi possível identificar atividade enzimática in gel.
- Em outra etapa do trabalho, o secretoma do fungo obtido em fontes de carbono comerciais (Avicel, carboximetilcelulose-CMC e xilana de aveia) e agroindustriais (sabugo de milho, casca do grão de soja, engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar) foi caracterizado por LC-MS/MS.
- A maior diversidade de proteínas foi identificada no secretoma obtido em Avicel, seguido pelo secretoma obtido em sabugo de milho. Foram identificadas várias enzimas relacionadas à degradação da lignocelulose, o que evidencia que o fungo é capaz de produzir sistemas enzimáticos completos específicos para cada uma das principais frações da holocelulose: celulose, hemiceluloses e pectina.
- Os secretomas obtidos em resíduos agroindustriais foram empregados para sacarificar sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificados. Os extratos brutos produziram mais açúcares a partir da hidrólise do sabugo, revelando uma maior digestibilidade deste substrato quando comparado ao bagaço, o que pode decorrer do menor teor de lignina observado após o tratamento do sabugo de milho.
- Os secretomas permitiram a solubilização de grande parte da xilana presente no sabugo de milho, com a liberação de xilobiose como principal produto de hidrólise.
- O isolado de *C. byssicola* foi ainda avaliado quanto à capacidade de produção de enzimas pectinolíticas quando cultivado em meio contendo casca de laranja como única fonte de carbono. O fungo foi capaz de secretar pectinases e pectato liases. A caracterização do secretoma feita por LC-MS/MS revelou uma grande diversidade de enzimas atuantes na cadeia principal e sobre substituintes laterais.
- Uma fração parcialmente purificada foi caracterizada quanto ao efeito da temperatura e pH, e a atividade de pectinase foi máxima a 50°C, e na faixa de pH entre 4,5 e 6,0.
- Estas características sugerem a aplicação da enzima para o tratamento de sucos de frutas com baixa acidez.
- Uma das enzimas parcialmente purificada foi identificada por LC-MS/MS, e a partir desta identificação, o transcrito correspondente foi clonado com sucesso em *Escherichia coli*, e a etapa de expressão em *Pichia pastoris* se encontra em andamento. Todos os resultados deste trabalho revelam *C. byssicola* como uma nova fonte de enzimas holocelulolíticas, que ainda precisa ser explorada.

Resultados parciais alcançados

Bactérias e aminoácidos

- Foram selecionados micro-organismos dos gêneros *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, além de isolados ainda não caracterizados obtidos de milho, arroz, sorgo, solo e de Kombucha. Os isolados foram obtidos da coleção de bactérias da Universidade Estadual de Goiás.
- Foram padronizados métodos para realização de triagem em larga escala e assim aumentar a capacidade de seleção. Foram testados métodos para crescimento em microescala, além da adaptação da metodologia para realização de teste rápido de detecção de aminoácidos nessas culturas. Após diversos testes de crescimento em microescala, foram estabelecidos parâmetros para o microcultivo que permitem o *screening* de diferentes isolados em um único experimento. Os testes foram realizados com 12 isolados diferentes dos gêneros *Bacillus*, *Rhizobium* e isolados obtidos a partir de sorgo, ainda não caracterizados. Após os ajustes de temperatura, meio de cultura e agitação, foi estabelecida uma condição de crescimento na qual a maioria dos isolados atingiu a fase estacionária após 40 h de incubação. Tal condição implica na microcultura utilizando placas de 12 poços em temperatura ajustada à 28 °C, com agitação de 300 rpm em meio mínimo NFB-lactato.
- Dentre os 12 isolados testados, um não apresentou crescimento, 6 entraram em fase estacionária após aproximadamente 12 h de cultivo, 3 após aproximadamente após 30 h de cultivo e 2 após 60 h de cultivo. Com esses resultados pudemos estabelecer o tempo de cultivo dos isolados que foi de 48 h.
- A partir da técnica utilizando OPAME foi possível identificar todos os aminoácidos livres nas amostras resultantes dos cultivos em aproximadamente 1 h. O reagente OPAME é preparado utilizando OPA (*o-phthaldialdehyde*) 10% em metanol e β -mercaptoethanol 2%. Tal preparado é diluído em tampão tetraborato de potássio na concentração final de 2,5%. Um volume de 100 μ L do reagente OPAME é incubado juntamente com sobrenadante do cultivo em microplaca de 96 poços por 60 min. A leitura da fluorescência foi obtida em equipamento CLARIOstar (BMG) utilizando os parâmetros de excitação em 360 nm e emissão em 460 nm, sensibilidade de 50.
- Até o momento, foi possível identificar 6 isolados bacterianos com produção de aminoácidos em concentração acima de 350 μ M. Todos os isolados analisados foram obtidos de milho e ainda não foram caracterizados. O isolado que apresentou maior produção de aminoácidos foi denominado MJV19, apresentando concentração de aminoácidos acima de 700 μ M em sobrenadante de cultura. No momento estamos determinando a concentração, assim como a caracterização do tipo de aminoácido produzido, por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detectores amperométrico pulsátil (HPAEPAD) ICS-5000 (Dionex) com coluna cromatográfica AminoPAC PA10 de 2 mm.
- Foram também realizados ativação, cultivo e análise de aminoácidos das bactérias *Corynebacterium glutamicum* (cepa ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* (cepa NRRL B-2784), *Azospirillum brasiliensis* e *Azospirillum amazonense* (cepa BR 11141). Todos os micro-organismo foram adquiridos a partir da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (http://fat.org.br/colec_culturas/, Campinas, SP). As cepas de *C. glutamicum* mostraram-se como as melhores produtoras e secretoras de aminoácidos.
- Análises proteômicas que comportam as metodologias: extração de proteínas em metodologia nativa e desnaturante (padronização das técnicas), BN-PAGEs, SDS-PAGEs, GELFrEE), eletroeluição, MALDI-TOF/TOF, Nano LC-MS/MS (Obitrap elite) "top-down" e "bottom-up shotgun label free" de proteínas e complexos proteicos obtidos das extrações de proteínas das bactérias *C. glutamicum* (cepa ATCC 13032) e *C. glutamicum* (cepa NRRL B-2784) e análises de bioinformática dos dados proteômicos obtidos dos cultivos de *C. glutamicum* (ATCC 13032).
- Também foram realizadas análises metabolômicas do secretado dos cultivos de *C. glutamicum* (ATCC 13032) via CG-MS e HPLC.

Resultados parciais alcançados

Bactérias e aminoácidos

- Os dados de MS referentes à cepa *C. glutamicum* NRRL B-2784 foram coletados, mas ainda estão sob análises de bioinformática. Também foram realizadas proteômica "bottom-up shotgun label free". Como essa cepa não tem genoma anotado, este trabalho proteômico torna-se um pouco restritivo e demorado.
- Em relação a cepa *C. glutamicum* ATCC 13032 avançamos muito na coleta de dados de MS e suas subsequentes análises de bioinformática. Neste ponto foram investigadas proteínas e complexos proteicos via proteômica "top-down" e "bottom-up", assim como estudos complementares de metabolômica do secretado.
- Foram realizadas análises proteômicas top-down e "bottom-up" em amostras de *C. glutamicum* cultivadas em meio BT e CGXII. Em meio BT foram detectados 1873 PrSMs e identificadas 492 proteínas não redundantes com 681 proteoformas diferentes. As modificações identificadas foram clivagens e adições de grupamentos formil, acetil ou fosfato.
- Além disso, pôde-se estabelecer condição de degradação proteolítica nessa amostra a partir da contagem de espectros. A análise de cultivo CGXII foi feita com Tween 40, para estimular a produção de glutamato, e sem Tween 40.
- A produção de glutamato e aspartato pode ser evidenciada na condição estimulante após 30 hs de estímulo. Apesar da produção de aminoácidos, não foi possível detectar diferenças estatísticas na quantidade de modificações entre as duas condições. Ademais, foi possível verificar efeito de degradação proteolítica muito menor nessas amostras quando comparadas à cultivadas em meio BT.
- No metabolismo de aminoácidos, foram detectadas proteoformas das enzimas lactato desidrogenase e treonina desidratase fosforiladas que sugerem mecanismo de regulação dessas enzimas por PTMs na biossíntese de L-glutamato, L-lisina e L-leucina.
- A identificação de vários níveis de PTM não caracterizada no banco de dados foi executada em proteína anotada por similaridade à subunidade da acetolactato sintase e em subunidade pequena da 3-isopropilmalato desidratase, ambas enzimas presentes na biossíntese de L-valina e L-leucina. As massas dessas PTMs sugerem a presença de estearoilacção, possível mecanismo de regulação enzimática. Além da adição de grupamentos, foram detectadas proteoformas com pequenas clivagens em suas sequências, como a corismato mutase, que apresentou processamento não descrito no banco de dados. Essa clivagem em corismato mutase pode abalar a formação de supercomplexo entre unidades de corismato mutase e DAHP sintase e conseqüentemente afetar a produção de L-fenilalanina e L-tirosina.
- Em relação ao estudo de proteínas nativas e complexos proteicos nativos, padronizamos melhor forma de extração. A utilização de "beads" disruptivas como método de lise não desnaturante demonstrou alta eficiência em manter os complexos proteicos nativos.
- O método de eletroforese por BN-PAGE permitiu a análise de complexos multiproteicos intracelulares, que, posteriormente, foram separados por SDS-PAGE. A caracterização das subunidades realizada por espectrômetro de massas MALDI-TOF a partir de PMF permitiu a identificação da proteína enolase, um complexo enzimático multimérico. Posteriormente, estas amostras foram injetadas em espectrômetro de massas de alta resolução e acurácia Orbitrap Elite, o que nos forneceu grande gama de informações sobre esses complexos proteicos.
- Os dados de metabolômica do secretado nos revelaram, preliminarmente, uma gama de produtos secretados, de açúcares a ácidos orgânicos, além de um perfil marcadamente diferenciado na produção de aminoácidos das cepas, com Tween 40 (detecção de 9 tipos de aminoácidos) e sem Tween 40 (detecção de 4 tipos de aminoácidos).

Resultados parciais alcançados

Importante destaque

Um dos pesquisadores principais do Núcleo, o **Prof. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho**, foi **incluído na lista dos 600 cientistas de instituições brasileiras que estão elencados entre os 100 mil melhores do mundo de acordo com sua carreira, ou seja, os top 2%** da Tabela-S6-career-2019, publicada recentemente pelo Journal PLOS Biology (<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000918>). A pesquisa foi conduzida por uma equipe da Universidade de Stanford (EUA), liderada por John Ioannidis e intitulada: "Updated science-wide author databases of standardized citation indicators".

