UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA SÍLVIA DE ALMEIDA SCARCELLA

Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar

Ribeirão Preto
2020

ANA SÍLVIA DE ALMEIDA SCARCELLA

Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Scarcella, Ana Sílvia de Almeida

Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar. Ribeirão Preto, 2020.

267 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica. Versão Corrigida.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. *Mycothermus thermophilus*. 2. *Trichoderma reesei* RP698. 3. Consórcio enzimático. 4. Sacarificação de cana-de-açúcar. 5. Sacarificação de Cana Energia. 6. Secretoma.

SCARCELLA, ASA. Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar [doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/50884-5), e do Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 465319 / 2014-9) e Acordos de Cooperação / FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia de Portugal / FCT - Projeto de Pesquisa – Regular (FAPESP 2018/07522-6).

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com:

Diretrizes para apresentações de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [*et al.*] - - 3. ed. rev. ampl. mod. - -São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p.: il. - - (Caderno de estudos; 9).

DOI: 10.11606/9788573140569

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, com amor e gratidão
pela força, compreensão, carinho,
presença e apoio incondicional ao
longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lúcia e Luiz Carlos, à minha irmã Ana Carolina e minha tia Luiza por estarem sempre ao meu lado ao longo do desenvolvimento e elaboração deste trabalho. Ao meu sobrinho e afilhado Lorenzo por todos os momentos de bagunças que possibilitaram momentos de distração e alegria durante esta jornada.

À professora Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli pela confiança, apoio e dedicação no exercício de me orientar.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge por todo o suporte prestado ao longo destes anos. À Dra. Adriana Grandis pela ajuda nas discussões dos dados obtidos.

À Dra. Monica Stropa Ferreira Nozawa pelo apoio, paciência e todo ensinamento transmitido durante minha jornada pela pós-graduação.

À Dra. Monalisa Carneiro Sampaio (CCA – UFSCar, Araras - SP), ao Dr. Mauro Xavier (IAC, Ribeirão Preto – SP) e ao Dr. Júlio Cezar Araujo do Espírito Santo (GranBio) por disponibilizar o material vegetal utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maurício Cauti e o Dr. Cláudio Roberto Neri, do Departamento de Química da FFCLRP, pelas análises termogravimétricas.

Ao Renato Augusto Corrêa dos Santos pela colaboração com as análises de bioinformática.

Aos amigos e companheiros de laboratório pela amizade, convivência e pela gentil ajuda para a conclusão deste trabalho, Alex, Ana Vici, Emanuelle, Enrico, Guilherme, Juliana, Malena, Monica, Paula, Rosy, Tássio, Thiago, Vanessa, Yuri.

Aos técnicos Mariana e Maurício pela amizade, colaboração e disponibilidade.

Aos amigos Henrique, Fabiano, Letícia, Natália, Izabela pela caminhada e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por todo o suporte oferecido ao longo destes quatro anos de estudos e aprendizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol pelo apoio para a realização deste trabalho.

RESUMO

SCARCELLA, ASA. Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar [doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

O aumento da atividade agroindustrial levou ao acúmulo de grandes quantidades de biomassa lignocelulósica. Este tipo de material é a fonte mais abundante de carbono renovável da natureza, representando um valioso substrato industrial com potencial biotecnológico. O custo da produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais depende, em grande parte, da biomassa recalcitrante e das enzimas envolvidas na sacarificação da parede celular, sendo necessária a otimização da produção enzimática para minimizar este fator. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo a elaboração e otimização de um coquetel enzimático obtido a partir dos fungos *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 visando a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar (SCB), cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia (EC). O cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em palha de milho apresentou os melhores resultados de sacarificação, liberando $40,40 \pm 2,81 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de açúcar redutor (AR) para SCB, $30,33 \pm 1,39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de AR para EC e $33,18 \pm 1,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de AR para SP80-3280, sendo os principais açúcares liberados glucose e xilose. Além disso, foi realizada uma investigação, por análise proteômica, das enzimas secretadas por estes microrganismos quando crescidos em cana-de-açúcar SP80-3280, Cana Energia e palha de milho como única fonte de carbono. Como resultado do secretoma do cultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 crescidos em cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia foram identificadas 56 proteínas relacionadas à degradação da parede celular vegetal em todas as condições analisadas, entre elas glicosil hidrolases, carboidratos esterases e proteínas de atividades auxiliares. Já no cocultivo dos microrganismos crescidos em palha de milho durante 5 dias, foram identificadas 27 proteínas divididas entre celulases, hemicelulases, pectinases e proteínas de atividades auxiliares. Foram identificadas duas proteínas não descritas para estes fungos até o momento, sendo elas a ácido celobiônico fosforilase e a 4-O-metil glucurônico metil esterases. Ademais, estudou-se o efeito de diferentes pré-tratamentos das biomassas, sendo que o pré-tratamento

alcalino possibilitou melhor sacarificação das biomassas, mostrando um aumento na quantidade dos açúcares liberados e alcançando $215,01 \pm 11,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de AR para a hidrólise de SCB, $177,16 \pm 16,00 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de AR para EC e $220,64 \pm 29,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de AR para SP80-3280. Foram aplicados diferentes coquetéis na hidrólise de cana-de-açúcar comercial, Cana Energia tipo I e tipo II proveniente da GranBio, comprovando que os melhores resultados de liberação de AR foram gerados após o uso do coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em palha de milho. Todos os resultados demonstraram que existe uma forte correlação entre a enzimas a serem utilizadas e a composição da biomassa. Foi observado ainda, os benefícios do cocultivo de microrganismos para a obtenção de um coquetel diversificado com elevado potencial de aplicação e de baixo custo.

Palavras-chaves: *Mycothermus thermophilus*. *Trichoderma reesei* RP698. Consórcio enzimático. Sacarificação de cana-de-açúcar. Sacarificação de Cana Energia. Secretoma.

ABSTRACT

SCARCELLA, ASA. Cultivation of *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 in agro-industrial residues: microbial consortium in the development of an enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

The increase in agro-industrial activity led to the accumulation of large amounts of lignocellulosic biomass. This kind of material is the most abundant source of renewable carbon in nature, representing a valuable industrial substrate with biotechnological potential. The cost of bioethanol producing from agro-industrial residues depends, in large extend, on the recalcitrant biomass and the enzymes involved in the saccharification of the cell wall, what makes the optimization of the enzymatic production necessary in order to minimize this factor. Therefore, this work focused on the elaboration and optimization of an enzymatic cocktail obtained from the fungi *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 aiming at the saccharification of sugarcane bagasse (SCB), sugarcane SP80-3280 and energy cane (EC). The co-cultivation of *M. thermophilus* and *T. reesei* RP698 in corn straw showed the best saccharification results , releasing $40.40 \pm 2.81 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ of reducing sugar (RS) for SCB, $30.33 \pm 1.39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ of RS for EC and $33.18 \pm 1.04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ of RS for SP80-3280, the main sugars released were glucose and xylose. Also, an investigation by proteomic analysis of the enzymes secreted by these microorganisms, grown in sugarcane SP80-3280, energy cane and corn straw as the only carbon source, was carried out. As a result of the secretome of the cultivation of *M. thermophilus* and *T. reesei* RP698 grown in sugarcane SP80-3280 and energy cane, 56 proteins related to the degradation of the plant cell wall, were identified in all conditions analyzed, including glycosyl hydrolases, carbohydrates esterases and auxiliary activity proteins. Twenty-seven proteins were identified in the cultivation of microorganisms grown in corn straw for 5 days. These proteins are divided into cellulases, hemicellulases, pectinases and proteins of auxiliary activities. Two proteins, which were not described for these fungi so far, have also been identified. They were named as cellobionic acid phosphorylase and 4-O-methyl glucuronic methyl esterases. In addition, the effect of different biomass pretreatments was studied, and the alkaline pretreatment enabled a better saccharification of the biomass, showing an increase in

the amount of sugars released, reaching $215.01 \pm 11.02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ of RS for SCB hydrolysis, $177.16 \pm 16.00 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ of RS for EC and $220.64 \pm 29.02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ of RS for SP80-3280. Different cocktails were applied in the hydrolysis of commercial sugar cane, energy cane type I and type II from GranBio, proving that the best results of AR release were generated after the use of the cocktail obtained by the co-cultivation of *M. thermophilus* and *T reesei* RP698 grown in corn straw. All the results showed that there is a strong correlation between the enzymes to be used in the saccharification process and the composition of the biomass. The benefits of microorganism co-cultivation was also verified in obtaining a diversified cocktail with high application potential at low cost.

Keywords: *Mycothermus thermophilus*. *Trichoderma reesei* RP698. Enzymatic consortium. Sugarcane saccharification. Energy Cane saccharification. Secretome.