



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

PATRÍCIO DE SOUZA LIMA

**Prospecção de bactérias isoladas do solo da agroindústria
potencialmente produtoras de enzimas e polímeros**

JOÃO PESSOA – PB

2018

PATRÍCIO DE SOUZA LIMA

**Prospecção de bactérias isoladas do solo da agroindústria
potencialmente produtoras de enzimas e polímeros**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de
Biotecnologia da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito
para obtenção do grau de Bacharel
em Biotecnologia.**

Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo
Orientador

Dra Teresa Cristina Soares de Lima Grisi
Co-orientadora

JOÃO PESSOA – PB
2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732p Lima, Patrício de Souza.

Prospecção de bactérias isoladas do solo da agroindústria potencialmente produtoras de enzimas e polímeros / Patrício de Souza Lima. - João Pessoa, 2018.

54 f. : il.

Orientação: Demetrius Antônio Machado de Araújo.

Coorientação: Teresa Cristina Soares de Lima Grisi.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Solo. 2. Celulase. 3. Xilanase. I. Araújo, Demetrius Antônio Machado de. II. Grisi, Teresa Cristina Soares de Lima. III. Título.

UFPB/BC

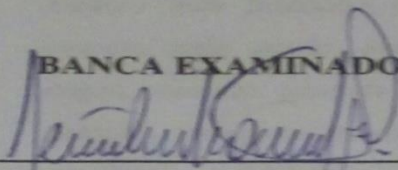
PATRÍCIO DE SOUZA LIMA

**Prospecção de bactérias isoladas do solo da agroindústria
potencialmente produtoras de enzimas e polímeros.**

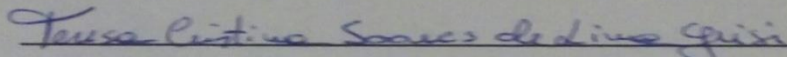
Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 07 / JUNHO / 2018

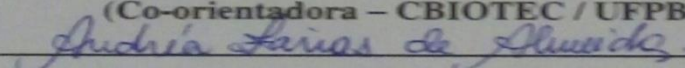
BANCA EXAMINADORA:



Prof Dr Demetrius Antonio Machado de Araújo
(Orientador – CBIOTEC / UFPB)



Dra Teresa Cristina Soares de Lima Grisi
(Co-orientadora – CBIOTEC / UFPB)



Prof Dra Andréa Farias de Almeida
(Examinador – CBIOTEC / UFPB)

Profa Dra Lais Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves
(Examinador – CTDR / UFPB)

Dedico este trabalho à minha esposa aos meus filhos e sogros, pelo apoio, paciência e por acreditarem que sou capaz, mesmo quando os problemas vieram pra me fazer desistir, todos me incentivaram a erguer a cabeça e seguir em frente, ter sempre alguém que acredita em você isso não tem preço.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, pois sem ele nada seria possível.

À minha família, por estar sempre comigo, em especial à minha esposa que sempre batalhou e se sacrificou pelo meu crescimento como cidadão, esposo e pai de família.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Centro de Biotecnologia por me possibilitarem esse processo evolutivo.

Aos meus colegas, que durante o decorrer do curso me ajudaram na minha caminhada e pela amizade, que foi construída neste período: Jefferson, Rafael Limongi, Napoleão, Lucemberg, Jorge, Palloma, Arauana, Thiago Gonçalves, Geise Maria e os demais alunos que também contribuíram efetivamente na minha formação.

Ao professor Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo, por ter aceito ser meu orientador, pelo apoio que me foi fornecido durante toda a pesquisa, pelos ensinamentos didáticos e pela confiança.

É um agradecimento muito especial à Teresa Cristina Soares de Lima Grisi por aceitar ser minha co-orientadora e por ter acreditado que eu seria capaz de dar conta de um trabalho, que requer tempo e dedicação, muito obrigado.

Ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, por disponibilizarem seus equipamentos que foram necessários no desenvolvimento da minha pesquisa e a cada um dos seus integrantes, que de forma efetiva me ajudaram nos meus experimentos com suas experiências e opiniões construtivas, onde tive uma visão mais real da biotecnologia aplicada na íntegra, não tenho como agradecer a cada um de vocês pela atenção e apoio.

A todos os professores que passaram pela minha vida acadêmica, por contribuírem no meu crescimento e formando parte do meu senso crítico, é com toda a certeza que digo, que nada seria o mesmo sem a participação de todos vocês.

À professora Sildivane Valcácia que foi uma das incentivadoras da conclusão deste curso e que se dispôs a me ajudar em minhas dificuldades e o professor Rafael Travassos pelo seu apoio e conselhos.

À Emília por fazer o possível pra resolver problemas relacionados à coordenação e as orientações sem nunca questionar.

Por fim, gostaria de agradecer aos órgãos de fomento à pesquisa, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

**“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo”.**

Martin Luther King

RESUMO

A produção de bioprodutos, como as enzimas e polímeros microbianos, têm sido alvo de intensas pesquisas no campo da biotecnologia, visando suas aplicabilidades nos processos industriais. Este trabalho teve como objetivo a bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas (celulolíticas e xilanolíticas) e do polímero exopolissacarídeo (EPS), provenientes de amostras do solo e do resíduo torta de filtro, da Usina Japungu Agroindustrial S/A, localizada no município de Santa Rita – Paraíba. Foram isoladas 65 cepas bacterianas, entre as quais, 44 cepas foram provenientes da amostra do Solo, sendo 26 cepas denominadas JS e 18 cepas denominadas S1J; e 21 cepas provenientes da amostra torta de filtro, denominadas JTF. Dentre os isolados do solo e da torta de filtro, foram selecionadas 10 cepas, com características típicas da presença de EPS (colônia viscosa), as quais foram denominadas (EPSM). Todos os isolados foram testados, quanto à produção de celulase e xilanase, em meio ágar nutriente, adicionado carboximetilcelulose ou xilano de *Beechwood*, respectivamente, incubados por 72 h, a 37° C, e corados com vermelho congo (0,1%), para observação do halo de degradação e determinação do índice enzimático (IE). Entre as cepas positivas, para celulase (8 cepas) e xilanase (27 cepas), foram selecionadas, pelo $IE \geq 2$, as quatro melhores produtoras, as quais foram incubadas, em shaker (150 rpm), 37° C, por 72 h, em caldo nutriente, adicionado de 0,5% de bagaço de cana de açúcar, pré-tratado por dupla autoclavação, a 121° C/15 min, para avaliação da atividade enzimática (U/mL), pelo método de açúcares redutores (ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS), em pH 6,5 e temperatura 55° C. O pH ótimo foi igualmente avaliado pelo método DNS, utilizando os pHs (4,0; 6,5; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0), em tampões específicos, assim como a temperatura ótima, utilizando as temperaturas (40, 50, 60, 65, 70, 75 e 80°C), para as cepas JS10 e S1J2. Entre as 10 cepas positivas para presença de EPS, foi selecionada uma (EPSM2), para produção em meio mínimo, contendo glicose ou sacarose (1 %), em incubação estática ou sob agitação (shaker a 180 rpm), ambos a 37°C/72 h. Os cultivos foram centrifugados (3880 xg/20 min), e aos sobrenadantes foram adicionados duas partes de álcool etílico, incubados a 4° C, over-night. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, os sobrenadantes foram desprezados e os EPSs obtidos foram secos em estufa a 50°C por 24 h, os quais foram pesados e quantificados em g/L de cultivo. As quantificações enzimáticas mostraram que a cepa JS10 foi a melhor produtora de celulase (1,50 U/mL) e de xilanase (0,83 U/mL), com pHs ótimos (8,0) e (8,0-9,0) e temperaturas ótimas (65-70°C) e (50-60°C), respectivamente. A produção do EPS, pela cepa EPSM2, se mostrou melhor em cultivo estático, com valores de 1,94 g/L e

de 2,25 g/L, em meios contendo glicose e sacarose, respectivamente. Estes dados preliminares mostram que a bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas e polímeros, advindas de amostras do solo e de resíduo agroindustrial (torta de filtro), apresentam-se como excelentes recursos biotecnológicos, para descoberta de novas cepas de interesse industrial.

Palavras-chave: Solo; torta de filtro; celulase; xilanase; EPS.

ABSTRACT

Prospect of bacteria isolated from soil of agro-industry which potentially produce enzymes and polymers

The production of Bioproducts, such as enzymes and microbial polymers, have been the subject of intense research in the field of biotechnology, with a view to its applications in industrial processes. In this work it was aimed the bioprospecting of bacteria producing enzymes (cellulolytic and xylanolytic) and the exopolysaccharide (EPS) polymer, from samples of soil and residue filter cake of sugarcane industry - Paraíba state, northeastern region of Brazil. 65 bacterial strains were isolated, including 44 strains of the soil sample: JS (26 strains) and S1J (18 strains); and 21 strains of the sample filter cake, known as JTF. Among the 26 strains (JS) and 21 (JTF), 10 strains were selected, five of each sample, with typical characteristics of EPS (viscose), which were called (EPSM). All the isolates were tested, with respect to production of cellulase and xylanase in nutrient Agar, carboxymethylcellulose and/or added xylan of Beechwood, respectively; subsequent staining with congo red; and observation of the halo of degradation and estimation of the enzymatic index (IE). Among the strains positive for cellulase (8) and xylanase (27), the four (4) best producers were selected, which were evaluated quantitatively, after incubation in nutrient broth, added with 0.5% of sugarcane bagasse, pre-treated by double autoclaving, 121 °C for 15 min, to obtain the enzyme production (U/mL); optimal pH (4.0; 6.5; 8.0; 9.0; 10.0 and 11.0), in specific buffers and optimum temperature (40, 50, 60, 65, 70, 75 and 80 °C), using the method of reducing sugars (3,5-dinitrosalicílico-DNS) at pH 6.5 and 55 °C temperature. The optimum temperature was also estimated by the DNS method at pHs 4.0; 6.5; 8.0; 9.0; 10.0 and 11.0 in specific buffers as well as the optimum temperature, at temperatures 40, 50, 60, 65, 70, 75, and 80 °C, for strains JS10 and S1J2. Among the 10 positive strains for EPS presence, one of them (EPSM2) was selected for production in minimum medium containing glucose or sucrose (1%) at static incubation or under agitation (shaker to 180 rpm) both at 37 °C/72h. Among the positive EPS, strains one was selected (EPSM2), for production in minimum medium containing glucose and/or sucrose (1%), static incubation and/or under agitation (shaker to 180 rpm), both at 37 °C for 72 h. The cultures were centrifugated (3880 xg/20 min.) and to supernatants two parts of ethyl alcohol were added and incubated at 4 °C overnight. After new centrifugation in the same previous conditions, the supernatants were discharged and the obtained EPSs were dried in the oven (50 °C for 24h), which were then weighed and quantified in g/L of culture. The enzymatic quantification showed that the strain JS10 was the best producer of cellulase (1.50 U/mL) and xylanase (0.83 U/mL) with best pHs (8.0) and (8.0-9.0) and best temperatures (65-70 °C), and (50-60 °C), respectively. The EPS production by the EPSM2 strains showed to be the best in static culture, yielding 1.4 g/L and 2.25 g/L in culture media containing glucose and sucrose, respectively. These preliminary data showed that bio-prospecting of producing bacteria enzymes and polymers, coming from soil samples and agro-industry waste (filter cake from sugarcane), feature excellent biotechnology resources, for discovery of new strains of industrial interest.

Keywords: soil; Filter cake; Cellulase; Xylanase; EPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituintes do material ligoceulósico.....	17
Figura 2. Estrutura molecular da celulose.....	19
Figura 3. Ação sinérgica entre as enzimas do complexo celulolítico.....	22
Figura 4. Estrutura da molécula da hemicelulose.....	23
Figura 5. Coleta das amostras de Solo.....	26
Figura 6. Coleta das amostras da Torta de Filtro.....	26
Figura 7. Processamento das amostras de solo e torta de filtro e isolamento bacteriano.....	27
Figura 8. Cepa JS10 apresentando atividade celulolítica, em meio ágar NB/CMC (A) e xilanolítica, em meio ágar NB/xilano (B).....	35
Figura 9. Cepa S1J2 apresentando atividade celulolítica, em meio ágar NB/CMC (A) e xilanolítica, em meio ágar NB/xilano (B).....	35
Figura 10. Cepa JTF16 atividade celulolítica fraca, em meio ágar NB/CMC (A) e com atividade xilanolítica, em meio ágar NB/xilano (B).....	36
Figura 11. Cepa JTF18 com atividade celulolítica fraca, em meio ágar NB/CMC (A) e com atividade xilanolítica, em meio ágar NB/xilano (B).....	36
Figura 12. Produção de EPS, de acordo com a quantidade de viscosidade.....	46

LISTA DOS GRÁFICOS

Gráfico 1 - Atividade enzimática das cepas bacterianas JTF16, JTF18, S1J2 e JS10, utilizando bagaço de cana-de-açúcar, como substrato.....	38
Gráfico 2 - pH ótimo para atividade celulolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	40
Gráfico 3 - pH ótimo para atividade xilanolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	40
Gráfico 4 - pH ótimo para atividade celulolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	41
Gráfico 5 - pH ótimo para atividade xilanolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	41
Gráfico 6 - Temperatura ótima para atividade celulolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	43
Gráfico 7 - Temperatura ótima para atividade xilanolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	43
Gráfico 8 - Temperatura ótima para atividade celulolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	44
Gráfico 9 - Temperatura ótima para atividade xilanolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais marcos históricos no avanço científico e tecnológico da Biotecnologia.....	17
Tabela 2. Composição dos meios: Caldo Nutriente (CN) e Ágar Nutriente (AN).....	27
Tabela 3. Composição do meio LB-CMC.....	29
Tabela 4. Composição do meio LB-Xilano.....	29
Tabela 5. Tampões utilizados nas quantificações enzimáticas.....	31
Tabela 6. Composição do Meio Mínimo Desbalanceado (MMD).....	32
Tabela 7. Composição da Solução de Traços do MMD.....	33
Tabela 8. Cepas produtoras de celulase e/ou xilanase, isoladas do Solo e da Torta de Filtro.....	34
Tabela 9. Índice Enzimático (IE) das cepas produtoras de celulase e xilanase.....	36
Tabela 10. Caracterização morfológica das cepas produtoras.....	37
Tabela 11. Cepas produtoras de EPS, em MMD-Glicose ¹ e MMD-Sacarose ²	46
Tabela 12. Quantificação do EPS produzido pela cepa EPSM2.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 BIOPROSPECÇÃO	17
3.2 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	18
3.3 ENZIMAS MICROBIANAS	20
3.3.1 Enzimas Celulolíticas	21
3.3.2 Enzimas xilanolíticas	23
3.4 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS (EPSS).....	23
3.6.1 Produção e extração dos biopolímeros (EPSS)	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	26
4.1.1. Características das amostras:	26
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
4.3 ISOLAMENTO BACTERIANO	28
4.4 CARACTERIZAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS DAS CEPAS BACTERIANAS	28
4.5 TRIAGEM DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS	28
4.5.1 Análise qualitativa da atividade celulolítica	28
4.5.2 Análise qualitativa da atividade xilanolítica	29
4.6 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	29
4.6.1 Cultivo das cepas para produção enzimática	29
4.6.2 Análise quantitativa das atividades enzimáticas	30
4.7 QUANTIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS	31
4.8 CURVA PADRÃO DA GLICOSE E XILOSE.....	31
4.9 TRIAGEM DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPSS).....	32
4.9.1 Produção de EPS em meio líquido	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 CEPAS PRODUTORAS DE CELULASE E XILANASE.....	34
5.1.1 Análise quantitativa da atividade celulolítica e xilanolítica.....	37
5.1.2 Avaliação do pH ótimo das cepas SIJ2 e JS10	40
5.1.3 Avaliação das temperaturas ótimas das cepas SIJ2 e JS10	43
5.2 CEPAS PRODUTORAS DE EPS.....	45

5.2.1 <i>Produção e quantificação do EPS</i>	46
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A prospecção de agentes produtores de enzimas é um dos campos mais promissores dentro da Biotecnologia, não somente pelo fato de agregar grande valor à produção em níveis industriais de materiais de consumo humano, como também por representar a possibilidade de uso mais eficiente dos infinitos recursos naturais renováveis de todo o planeta (FARIAS; VITAL, 2008).

A diversidade genética e metabólica dos microrganismos em diversos ambientes tem sido explorada desde os primórdios da humanidade, por sua potencialidade em gerar produtos e processos biotecnológicos. A produção de antibióticos (penicilina), alimentos (molho de soja), os diversos tipos de queijos, iogurtes, bebidas (vinho e cerveja) e combustível (álcool) são alguns dos exemplos do uso tradicional dos microrganismos (BORÉM, 2005).

Com o avanço das descobertas, para o conhecimento de substâncias bioativas descritas a partir da década de 50, o uso das enzimas produzidas por microrganismos deu um salto gigantesco, saindo do uso doméstico em pequena escala, para o uso em escala industrial de produção (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

As indústrias têxteis, papel e celulose, agroquímica, farmacêutica, processamento de couro, biocombustíveis, alimentícia, processamentos ambientais, entre outras, são responsáveis pelo crescimento exponencial do mercado de enzimas nas últimas décadas, por dois motivos principais, a eficiência e economia nos processos produtivos e a preocupação mundial com a sustentabilidade ambiental, que ambos exigidos pelo mercado consumidor, de que sejam utilizadas tecnologias ambientalmente mais adequadas com rigoroso acompanhamento governamental dos resíduos descartados no ambiente (ÁVIDOS; FERREIRA, 2003).

Este cenário é particularmente importante para o Brasil a busca por novos recursos, que conciliem o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental. O mercado mundial de enzimas industriais é dividido basicamente em três segmentos: i) enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), ii) enzimas para alimentos e bebidas e iii) enzimas para ração animal. As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulasas e xilanases (BORÉM, 2005).

De acordo com Adrio e Demain (2014), mais de 500 processos industriais fazem uso de enzimas, sendo cerca de 30 % utilizadas como biocatalizadores. Muitos destes fazem uso

de condições específicas de operação, como altas temperaturas e presença de solventes orgânicos, nas quais muitas enzimas são inativas. Portanto, muitos dos procedimentos utilizados se beneficiam com a descoberta de enzimas com propriedades distintas, como a capacidade de atuar em valores extremos de pH, em altas temperaturas, em soluções com elevadas pressões osmóticas ou na presença de solventes orgânicos, bem como estereosseletividade e alta especificidade (KAR; RAY, 2011; KUHAD et al., 2016).

Além da busca por enzimas mais eficientes através de processos biotecnológicos, tem crescido também a demanda por polímeros naturais para várias aplicações industriais nos últimos anos, promovendo um maior interesse aos estudos sobre a produção de exopolissacarídeo (EPS) por microrganismos, que, com avanço nas pesquisas, permitiu a descoberta de novas moléculas, de grande importância, devido ao extenso potencial de aplicação nos mais diversos campos da indústria (SANTOS et al., 2011; MACIEL et al., 2012).

Há décadas, os polissacarídeos naturais vêm sendo intensamente investigados devido às suas propriedades físico-químicas e possíveis aplicações industriais. Algumas de suas vantagens incluem a biodegradabilidade, abundância na natureza e versatilidade de uso em diversas áreas como engenharia, biotecnologia e medicina, apresentando atividades antitumoral, imuno-moduladora e antiinflamatória. Filmes finos de polissacarídeos podem se formar sobre superfícies sólidas e promover sua aplicação em sensores ou biossensores (EIRAS et al., 2007).

Comparado às gomas vegetais, os polissacarídeos microbianos apresentam vantagens como: independência das condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias primas mais baratas, de acesso fácil (adequando-se à disponibilidade regional) e produção em menor tempo, podem ser manipulados em pequenos espaços físicos e apresentam maior uniformidade em suas características físico-químicas (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2005).

Diversas abordagens são utilizáveis quando se considera o potencial para a produção de polissacarídeos microbianos (MELO et al., 2007). A maioria dos polissacarídeos microbianos pode ser produzida por meio do crescimento em fermentadores de tanque agitado, nos quais se utilizam a glicose e a sacarose como fontes de carbono. Além dessas, outras fontes alternativas estão sendo utilizadas para a produção de biopolímeros, tais como: soro de leite, resíduo de suco de maçã, melão e caldo de cana de açúcar, que contribuem para diminuição dos custos de produção (NITSCHKE et al., 2001; CAZETTA; CELLIGOI, 2005; DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007; BRANDÃO et al., 2008).

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi promover a bioprospecção de microrganismos com potencial biotecnológico, a partir do isolamento de bactérias produtoras de bioprodutos, provenientes do solo e/ou do resíduo torta de filtro da agroindústria sucroalcooleira, assim como a quantificação de celulases, xilanases e exopolissacarídeos (EPSs), utilizando sacarose, glicose e/ou bagaço de cana-de-açúcar, como fontes de carbono.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como principal objetivo a bioprospecção de bactérias produtoras enzimas (celulases e xilanases) e do polímero exopolissacáideo (EPS), isoladas do solo e do resíduo torta de filtro, provenientes da agroindústria sucroalcooleira.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e processar amostras do solo e do resíduo torta de filtro;
- Isolar bactérias das amostras do solo e da torta de filtro coletadas;
- Avaliar as bactérias isoladas quanto à produção de celulases, xilanases e exopolissacarídeo (EPS), em meio sólido, contendo substratos apropriados;
- Selecionar e caracterizar as bactérias produtoras dos bioprodutos, quanto à morfologia celular;
- Avaliar quantitativamente as enzimas (celulases e xilanases);
- Avaliar quantitativamente o biopolímero (EPS), após extração.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bioprospecção

A prospecção de agentes produtores de enzimas é um dos campos mais promissores dentro da Biotecnologia, não somente pelo fato de agregar grande valor à produção em níveis industriais de materiais de consumo humano, como também por representar a possibilidade de uso mais eficiente dos infinitos recursos naturais renováveis de todo o planeta (FARIAS; VITAL, 2008).

A diversidade genética e metabólica dos microrganismos em diversos ambientes tem sido explorada desde os primórdios da humanidade, por sua potencialidade em gerar produtos e processos biotecnológicos. A produção de antibióticos (penicilina, estreptomicina), alimentos (como os diversos tipos de queijos, iogurtes, molhos), bebidas (vinho e cerveja) e de combustível (álcool) são alguns dos exemplos do uso tradicional dos microrganismos (BORÉM, 2005).

Com o avanço das descobertas, para o conhecimento de substâncias bioativas descritas a partir da década de 50, o uso das enzimas produzidas por microrganismos deu um salto gigantesco, saindo do uso doméstico em pequena escala, para o uso em escala industrial de produção (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

A Tabela 1 abaixo mostra os principais marcos históricos no avanço científico e tecnológico da biotecnologia.

Tabela 1. Principais marcos históricos no avanço científico e tecnológico da Biotecnologia.

Período	Acontecimento
6000 a.C.	Bebidas alcoólicas (cerveja e vinho) são produzidas por sumérios e babilônios
2000 a.C.	Panificação e bebidas fermentadas são utilizadas por egípcios e gregos
1875 d.C.	Pasteur mostra que a fermentação é causada por microrganismos
1880	Surgimento da fermentação industrial (ácido láctico, etanol, vinagre)
1940	Síntese de glicerol, acetona e ácido cítrico
1950	Antibióticos são produzidos em larga escala por processos fermentativos
1953	Estabelecida a estrutura do DNA
1973	Início da engenharia genética
1982	Insulina humana é produzida
1994	O primeiro alimento geneticamente modificado, o tomate Flavr Savr, chega aos supermercados dos EUA
2000	O arroz geneticamente modificado é criado
2003	O Projeto Genoma, que identificou o mapa genético humano, é concluído

Fonte: www.bioinfo.ufpb.br/difusao

O termo bioprospecção é frequentemente utilizado para descrever a coleta e triagem de materiais biológicos para fins comerciais. Devido ao uso da biodiversidade ser de suma importância para atender demandas nas áreas de alimentação, saúde e outras necessidades da crescente população mundial, essa se tornou uma atividade bastante comum na atualidade (ARTUSO, 2002).

Segundo Azevedo (2003) a pesquisa de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos contribui para seu uso de forma sustentável, possibilitando a utilização de estratégias de conservação, contribuindo para promoção e regulamentação de novas tecnologias, uma vez que este material biológico tornou-se um recurso, no qual a informação genética tem valor de mercado.

O desenvolvimento sustentável é aquele capaz de suprir as necessidades da geração atual, sem comprometer a capacidade de atender as necessidades das futuras gerações. É o desenvolvimento que não esgota os recursos para o futuro. Assim, sendo atividades de bioprospecção podem, teoricamente, contribuir para o desenvolvimento sustentável fornecendo incentivos para a conservação da biodiversidade, enquanto melhoram o desenvolvimento das capacidades tecnológicas promovendo oportunidades de longo prazo em termos de crescimento econômico (SYNNES, 2007).

O conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos organismos tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização de microrganismos pode apresentar soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria, e vem crescendo de forma acelerada cenário mundial (OLIVEIRA et al., 2006).

3.2 Material lignocelulósico e resíduos industriais

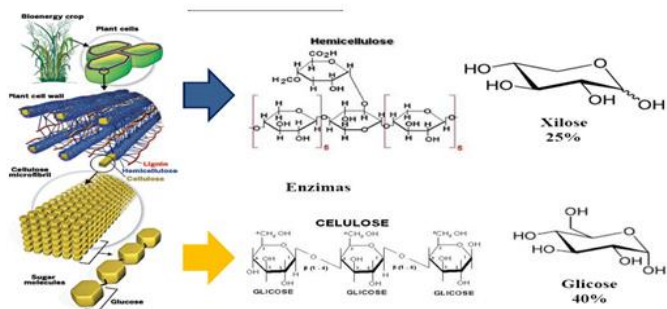
As paredes celulares dos vegetais são formadas por um material lignocelulósico (Figura 2), constituído de celulose (40 a 50%), hemicelulose (25 a 35%), lignina (15 a 25%) os quais apresentam percentuais variados de acordo com planta (PULS, 1997).

A celulose, principal constituinte do material lignocelulósico, é um polímero de cadeia longa formado por monômeros de β -glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, utilizado como matéria prima na indústria de papel e celulose (ÁVIDOS; FERREIRA, 2003).

Os resíduos agroindustriais, fontes de material lignocelulósico, são gerados no processamento de materiais como alimentos, fibras e madeira. Estes são produzidos em usinas sucroalcooleiras, indústrias de processamento de grãos, frutas e hortaliças, bem como de

celulose e papel, entre outras. Atualmente, a maior problemática relacionada à agroindústria, é a grande quantidade de resíduos gerados durante o processamento/beneficiamentos de suas matérias primas (MATOS, 2014).

Figura 1. Constituintes do material lignocelulósico.



Fonte: <http://www.alimentaria.com/2017/11/bioetanol-atraves-de-sobras-das-mesas.html>

Os resíduos agroindustriais, fontes de material lignocelulósico, são gerados no processamento de materiais como alimentos, fibras e madeira. Estes são produzidos em usinas sucroalcooleiras, indústrias de processamento de grãos, frutas e hortaliças, bem como de celulose e papel, entre outras. Atualmente, a maior problemática relacionada à agroindústria, é a grande quantidade de resíduos gerados durante o processamento/beneficiamentos de suas matérias primas (MATOS, 2014).

O bagaço da cana-de-açúcar e a torta de filtro são dois tipos de resíduos gerados pela agroindústria sucroalcooleira, que, em geral, são reutilizados pela própria indústria (MATOS, 2014).

O bagaço é um material fibroso sólido, gerado após moagem da cana-de-açúcar, constituído de água, fibra (celulose), alguns açúcares e impurezas proveniente da matéria-prima. Devido a sua característica energética, a forma mais empregada deste resíduo é na produção de energia elétrica, podendo ser utilizado na fabricação de chapas de fibra para construções, de massa de papel (celulose), fabricação de matéria plástica, como solvente na indústria e ração animal (BONASSA, 2015). Segundo a União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA, 2015), uma tonelada de cana de açúcar produz em média 280 kg de bagaço, os quais 70 a 90% são utilizados na própria indústria.

O resíduo torta de filtro é composto por uma mistura de bagaço moído e lodo da decantação provenientes do processo de clarificação do açúcar ou filtração do caldo extraído das moendas e apresenta elevado teor de umidade (75%), matéria orgânica, macro e

micronutrientes. A quantidade gerada deste produto é, em média, 40 kg/tonelada de cana de açúcar, de forma contínua, e sua disposição final é a lavoura e/ou compostagem (BONASSA, 2015).

3.3 Enzimas microbianas

Enzimas são catalisadores biológicos, em sua maioria de origem protéica, que catalisam a maioria das reações em organismos vivos (MONTEIRO; SILVA, 2009; SAYALI et al., 2013). A vantagem da utilização de enzimas como catalisadoras em processos é que estas geralmente tornam os processos mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Os microrganismos se mostram atualmente como as principais fontes de produção de enzimas usadas industrialmente, devido a algumas características interessantes para produção de enzimas como a grande quantidade de produto em tempo relativamente curto, a não dependência de condições ambientais e geográficas apropriadas e gasto reduzido no uso de matérias primas (ZIMMER et al., 2009).

Dentre as enzimas de importância industrial, podemos destacar as celulases e as xilanases, as quais possuem uma ampla faixa de aplicações (BHAT; BHAT, 1997).

As celulases possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente, e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT; BHAT, 1997).

As xilanases apresentam grande importância comercial devido a sua aplicabilidade no setor industrial. Destaca-se seu emprego nas indústrias de papel, como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft; seu uso na indústria alimentícia, na fabricação de pães de melhor qualidade; no processamento de sucos, frutas e vegetais, visando à clarificação de sucos e vinhos; assim como, na etapa da filtração da cerveja (BECKER; BARATTO; GELINSKI, 2009; BAJPAI, 1997; VIKARI et al., 1994).

O mercado global de enzimas é crescente: estimativas indicam que ele deve atingir a cifra de US\$ 5,4 bilhões em 2020. Atualmente, os fabricantes de detergentes são os maiores consumidores desses insumos (enzimas), que também são muito utilizados na produção de rações, alimentos e bebidas (EMBRAPA, 2017).

Investimentos para reduzir o uso de petróleo e aumentar o de matérias-primas de

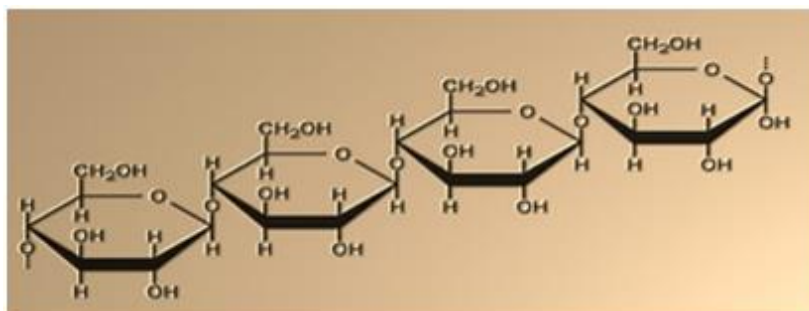
origem renovável, na indústria de transformação, estão abrindo espaço para as enzimas, que apresentam ação no processo de degradação da celulose, grupo que pertencem as β -glicosidases, que atuam na estrutura da celulose, fragmentando a molécula por etapas até reduzi-las a monômeros de açúcares, como a glicose, que, por sua vez, podem ser convertidos em diferentes produtos, de etanol a fármacos. Desta forma, aprimorar a eficiência e reduzir os custos dessas enzimas são os desafios considerados peças-chave para o crescimento da chamada bioeconomia (EMBRAPA, 2017).

3.3.1 Enzimas Celulolíticas

As plantas têm como principal componente estrutural a celulose (Figura 3). Trata-se de um homopolímero linear composto de unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas (β -1,4), encontrado na natureza em associação com outros polissacarídeos e lignina. Pode variar em diversos graus de cristalinidade, (40-90%), dependendo da origem botânica, sendo o restante constituído da fração amorfa. A celulose é o substrato orgânico mais abundante na natureza para produção de glicose. A conversão da celulose a glicose decorre pelo processo de sacarificação gradual de polímero pela ação das celulasas (PRETORIUS, 2003).

Celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Importante função na produção de biocombustíveis de segunda geração, e aplicações na indústria têxtil, como o amaciamento e efeitos sobre o jeans. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos, que atuam em sinergia para a liberação de açúcares (CASTRO et al., 2010).

Figura 2. Estrutura molecular da celulose.



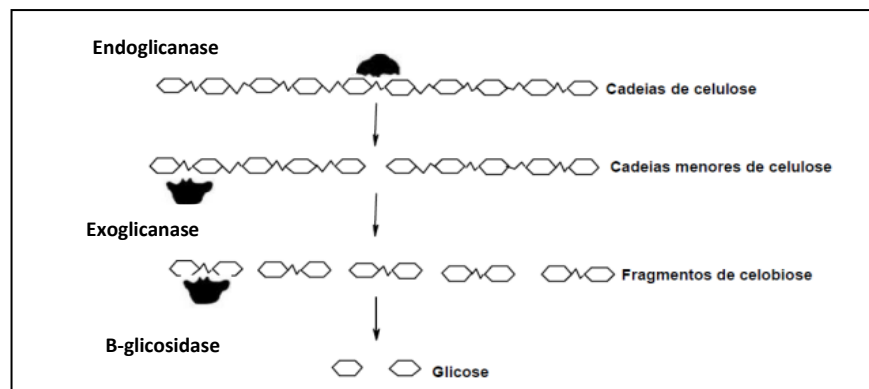
Fonte: <https://pt.esdifferent.com/difference-between-cellulose-and-hemicellulose>.

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada. As celulases são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, sendo divididas em três grandes grupos, as endoglicanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica, as exoglicanases, que atuam na região externa da celulose, e a β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO et al., 2010).

Endoglicanase (EC 3.2.1.4) é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, de forma randômica, ela hidrolisa as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. As exoglicanases são divididas em glicano-hidrolase (EC 3.2.1.74), que é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero, e celobio-hidrolase (3.2.1.91), que participa da hidrólise primária da fibra, realizando o fenômeno de ruptura física do substrato, deixando as regiões cristalinas exposta às celulases, e liberando o dissacarídeo celobiose, principal produto da degradação da celulose. Celobiose são duas unidades de glicose unidas por ligações β -1,4. A degradação da celobiose pela celobiase (β -glicosidase) resulta na formação de glicose, sendo uma das etapas da transformação da celulose em um açúcar fermentável, com inúmeras aplicações industriais (FUENTEFRIA, 2004).

As enzimas do complexo celulolítico atuam com maior aproveitamento quando em conjunto, do que em ação isolada (CASTRO et al., 2010). Ação sinérgica entre as enzimas do complexo celulolítico permite uma maior rendimento e disponibilidade da glicose (Figura 4).

Figura 3. Ação sinérgica entre as enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: modificado de WRIGHT et al., 1988.

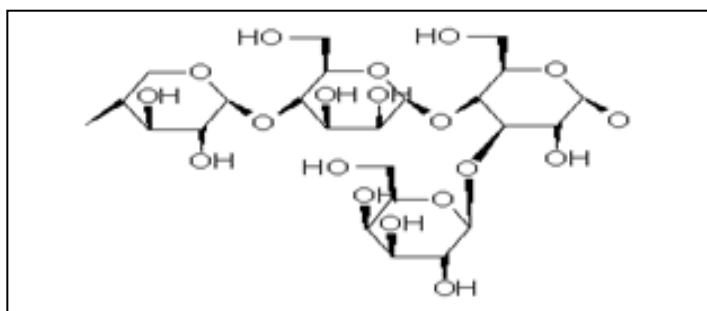
3.3.2 Enzimas xilanolíticas

As xilanases são enzimas hemicelulolíticas também chamadas de enzimas acessórias ou auxiliares. Estas enzimas são responsáveis pela desestruturação das fortes ligações cruzadas entre a celulose e a hemicelulose (Figura 5) (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2000).

Especificamente, as xilanases são hidrolases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β -1,4, presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose). A hidrólise realizada por estas enzimas dentro da cadeia da xilana produz xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidade (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2000).

Tendo em vista que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros (principalmente xilana), formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbiais específicas, tendo a endo β -1,4 xilanase, como a principal enzima na despolimerização da xilana (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993).

Figura 4. Estrutura molecular da hemicelulose.



Fonte: <https://pt.esdifferent.com/difference-between-cellulose-and-hemicellulose>.

3.4 Exopolissacarídeos microbianos (EPSs)

Diversos microrganismos produzem polissacarídeos, principalmente os procariontes (SUTHERLAND, 2001). Estes polissacarídeos podem ser capsulares ligados à superfície da célula ou secretados para fora da célula sem ter uma forma definida.

Os exopolissacarídeos (EPSs) podem ser solúveis ou insolúveis (KUMAR et al., 2007). O que torna grande parte deles solúveis em água são as cadeias laterais que geralmente apresentam grupamentos carregados como o ácido urônico e os piruvatos cetais (SUTHERLAND, 1994). A solubilidade é influenciada pelo pH, cátions e agentes complexantes presentes (STEPHEN et al., 2006).

Polímeros que são muito solúveis e flexíveis, em sua maioria, serão somente espessantes, como a xantana, que, ao ser dissolvida em água, aumenta a viscosidade, sendo que esse processo pode ser dependente da temperatura (RINAUDO, 1993).

Os EPSs podem ser muitas vezes identificados na placa pela morfologia mucóide da colônia bacteriana. No meio líquido, quando estão presentes, podem tornar o meio muito viscoso e, de forma rara, solidificá-lo (SUTHERLAND, 1990).

Existem polímeros que formam complexos estáveis com corantes solúveis em água, como o azul de anilina, e, assim, pode ser também utilizado como uma ferramenta de triagem inicial (KUMAR et al., 2007).

Os polissacarídeos desempenham várias funções: fazem parte da parede celular em plantas e em microrganismos, realizam reconhecimento celular, estimulam as defesas do hospedeiro, servem como nutrientes e fonte de oligossacarídeos funcionais e protegem os microrganismos contra a desidratação (SUTHERLAND, 1990).

Na indústria alimentícia os EPSs são utilizados como espessantes, pois tornam os líquidos mais viscosos e, com isso, permite que os alimentos fiquem com determinada textura. Além de serem utilizados como retentores de água em alimentos processados, estabilizantes e agentes gelificantes (MISAKI, 1993; TONELI et al., 2005; MORRIS et al., 2009).

Os EPSs podem estar relacionados com a patogenicidade do microrganismo. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, sintetiza o alginato que pode bloquear a via respiratória do paciente. Entretanto, não existe nenhum conhecimento de problemas de toxicidade por esses polímeros. Alguns dos microrganismos sintetizam os mesmos polissacarídeos produzidos pelas plantas, como glucanos, alginatos e celulose (MORRIS et al., 2009).

Os polissacarídeos microbianos apresentam algumas vantagens em relação às gomas produzidas por outros organismos, como os alginatos, goma arábica, goma guar e goma de algaroba, pois não dependem de fatores climáticos, podendo ser produzidos em uma quantidade determinada. Assim como, sua produtividade pode ser melhorada e, às vezes, apresentar características novas que possam ser úteis para as indústrias (MAUGERI, 2001). Apesar de serem melhores em relação aos outros polímeros naturais ou sintéticos, competem com estes últimos, por serem mais caros para produzir e comercializar (SUTHERLAND, 1998).

Diversos biopolímeros microbianos são produzidos industrialmente como a xantana (sintetizada pelo gênero *Xanthomonas*), escleroglicana (produzida por várias espécies de

Sclerotium), zanflo, gelana (a partir das *Sphingomonas* sp.), curdlana, alginato (sintetizado por bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas*), dextrana (produzida a partir da *Leuconostoc mesenteroides*), pululana (a partir de *Aureobasidium pullulans*), celulose bacteriana e glucanas (produzidas por leveduras), entretanto, as que se destacam no mercado industrial são as gomas, dextrana, xantana e gelana (MAUGERI, 2001).

3.6.1 Produção e extração dos biopolímeros (EPSs)

Os EPSs podem ser produzidos por microrganismos a partir de um meio complexo ou sintético quimicamente definido (KUMAR et al., 2007). Sendo que a produção é dependente das diferentes fontes de carbono e das suas concentrações, assim como das fontes de nitrogênio inorgânicas ou orgânicas (PRASERTSAN et al., 2008) e de diversos parâmetros como: temperatura (MATSUYAMA et al., 2003), agitação (BERWANGER et al., 2006), pH e aeração (PRASERTSAN et al., 2008).

Fontes de carbono como sacarose, glicose, lactose, maltose, sorbitol, soro de leite, amido, metanol podem ser utilizadas para a produção de polímeros microbianos, sendo que a glicose sob concentrações de 2-5% (w/v) é o substrato preferido de muitas espécies bacterianas (KUMAR et al., 2007).

A produção de exopolissacarídeos fica mais fácil de ser visualizada quando a bactéria é suplementada com açúcar em abundância e com uma quantidade mínima de nitrogênio, numa proporção de 10:1 de Carbono:Nitrogênio (C:N), sendo este processo o normalmente utilizado para induzir a limitação do crescimento e estimular a síntese de polissacarídeo (SUTHERLAND, 1996).

Para a extração do polissacarídeo ligado à célula o método geralmente utilizado é a autoclavagem, porém outros métodos como a utilização do sonificador, ebulição da suspensão celular por 15 minutos em água, aquecimento a 60° C em solução salina e aquecimento na água com fenol a 65° C também são possíveis (KUMAR et al., 2007).

A segunda etapa é a separação do polímero que geralmente ocorre por utilização de solventes orgânicos polares, como o álcool isopropílico, etanol e acetona, que fazem com que o polímero seja precipitado a partir do sobrenadante, possibilitam a separação do EPS. O volume do solvente utilizado pode ser uma, duas ou três vezes o volume do sobrenadante, porém a proporção mais utilizada é 2:1 (BRANDÃO et al., 2013). Após a separação do polímero, este é centrifugado, seco em estufa, purificado e liofilizado, o qual pode se purificado por meio da diálise (ASSIS et al., 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta das amostras

As amostras de solo (Figura 6) e a do resíduo torta de filtro (Figura 7) foram coletadas na usina Japungu Agroindustrial S/A (07°01'37.3''S, 34°58'34.8''W), localizada no município de Santa Rita – Paraíba.

As coletas foram realizadas em 31 de outubro 2017, no período da manhã (10:30 às 12:00), utilizando, para as amostras de solo, o método de amostragem aleatória simples (EMBRAPA, 1999), onde em cada ponto de amostragem foram retiradas de 3 a 5 sub-amostras simples ao acaso, em zigue-zague, com aproximadamente 300 g cada, numa profundidade de 0-20 cm, as quais foram reunidas e homogeneizadas formando uma amostra composta.

Todas as amostras foram levadas ao laboratório em caixa isotérmica (~8° C) e refrigeradas até o processamento.

Figura 5. Coleta das amostras de solo.



Figura 6. Coleta das amostras da torta de filtro



Fonte: Autor (2017).

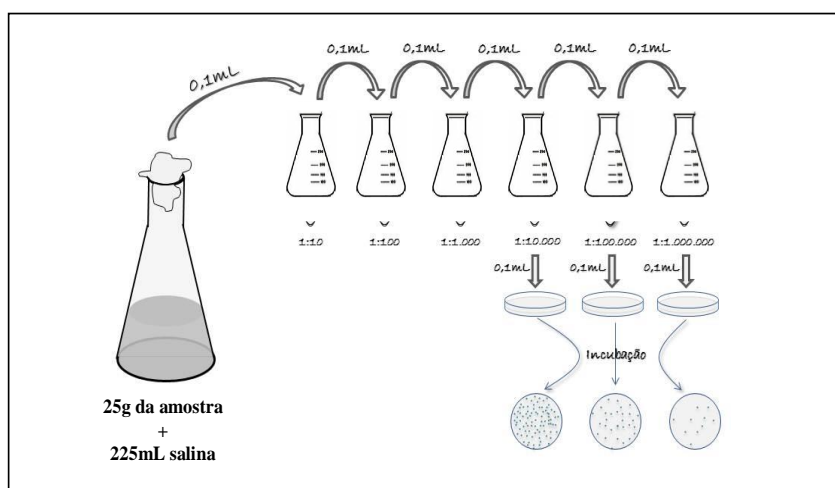
4.1.1. Características das amostras:

- **Solo** – procedente do talhão 61 (Anexo 1), com vinhaça aplicada em agosto de 2017, cana cortada e replantada em julho de 2017.
- **Torta de filtro** - resíduo obtido do processo de clareamento do caldo de cana-de-açúcar, empilhamento a céu aberto, fora da área de plantio.

4.2 Processamento das Amostras

As amostras da torta de filtro foram tamisadas (mersh 2,5 mm) para a separação dos sólidos maiores do restante da amostra. Cerca de 25 g do resíduo foram dissolvidos em frasco de vidro tipo *Erlenmeyer*, contendo 225 mL de solução salina (0,9% NaCl), colocado sob agitação durante 20 min, a 37° C (Figura 8). Em seguida, diluições em série foram realizadas até 10^{-5} . Um inoculo de 100 μ L, de cada diluição, em duplicata, foi espalhado com auxílio de alça de *Drigalski* esterilizada, na superfície de placas de Petri, contendo Ágar Nutriente (AN) (Tabela 2). As placas foram incubadas a 37° C, em estufa bacteriológica, por 24 - 48 h, para crescimento e, posteriormente, isolamento bacteriano. Todo material utilizado, frascos, meios de cultura, soluções foram previamente esterilizados em autoclave a 121° C, por 15 min, a 1 atm.

Figura 7 - Processamento das amostras de solo e torta de filtro e isolamento bacteriano.



Fonte: <https://bacilosnasopa.wordpress.com/tag/tecnica-de-diluiçao-seriada/> (modificado)

Tabela 2 – Composição dos meios: Caldo Nutriente (CN) e Ágar Nutriente (AN).

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de Carne	3,0
Peptona	5,0
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

*Para o preparo do meio Ágar Nutriente, acrescentou-se Ágar bacteriológico (15 g/L).

4.3 Isolamento bacteriano

As colônias bacterianas, que cresceram após 24 - 48 h de cultivo, foram selecionadas e repassadas, individualmente, para placas de Petri, contendo meio AN, para purificação das cepas e novamente incubadas em estufa bacteriológica a 37° C, por 24 - 48 h. Todas as cepas isoladas foram utilizadas nos testes de triagem, quanto à produção de enzimas e de exopolissacarídeos.

As cepas foram denominadas de S1J ou JS (solo 1-Japungu), quando isoladas do solo e JTF (Japungu-Torta de Filtro), quando isoladas da torta de filtro. As cepas que posteriormente se apresentaram como produtoras de EPSs foram denominadas de EPSM (Exopolissacarídeos Mesofílicas).

4.4 Caracterizações morfo-fisiológicas das cepas bacterianas

A caracterização das cepas bacterianas isoladas do solo e da torta de filtro ocorreu, primeiramente, pela observação dos seus aspectos coloniais distintos, tais como: cor, tamanho, textura, formato de borda, presença de material viscoso, e, posteriormente, pela caracterização celular, por meio da coloração de Gram, de acordo com Smibert e Krieg (1994).

A presença ou a ausência de endósporos foi realizada por meio da observação das células bacterianas, advindas de culturas velhas, em meio sólido, após coloração de Gram.

4.5 Triagem das bactérias produtoras de enzimas

4.5.1 Análise qualitativa da atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi avaliada repassando a cepa bacteriana, com auxílio de palitos estéreis, para placas de Petri descartáveis, contendo o meio Ágar Luria Bertani (LB) (Tabela 3), acrescido de 0,5% de Carboximetilcelulose – CMC (Difco Laboratories Inc., USA) (LB/CMC). Após três dias de incubação a 37° C, foi adicionada ao meio a solução aquosa de vermelho congo (Difco Laboratories Inc., USA) a 0,1%, por 15 min. Após esse período, o corante foi descartado e foi adicionado solução de NaCl 1 M, por mais 15 min. Os halos amarelos formados ao redor das colônias indicaram atividade celulolítica positiva (TEATHER; WOOD, 1982).

Tabela 3 - Composição do meio LB-CMC.

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	10,0g
Extrato de levedura	5,0g
NaCl	10,0g
Agar	15,0g
CMC	5,0g
Água destilada	q.s.p 1000mL

4.5.2 Análise qualitativa da atividade xilanolítica

A atividade xilanolítica foi avaliada repassando a cepa bacteriana, com auxílio de palitos estéreis, para placas de Petri descartáveis, contendo o meio LB, acrescido de 0,4% de xilano de *Beechwood* (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) (LB-xilano) (Tabela 4). Após 3 dias de incubação, a 37° C, foi adicionada ao meio a solução aquosa de vermelho congo 0,1%, por 15 min. Após esse período, o corante foi descartado e foi adicionado a solução de NaCl 1 M, por mais 15 min. Os halos claros formados ao redor das colônias indicaram atividade xilanolítica positiva (TEATHER; WOOD, 1982).

Tabela 4 - Composição do meio LB-Xilano.

Componente	Concentração (g/L)
Triptona	10,0g
Extrato de levedura	5,0g
NaCl	10,0g
Agar	15,0g
Xilano	4,0g
Água destilada	q.s.p 1000mL

4.6 Produção e quantificação enzimática

4.6.1 Cultivo das cepas para produção enzimática

Para produção enzimática foi utilizado o resíduo industrial bagaço de cana-de-açúcar (BC), como fonte alternativa de carbono, o qual foi previamente seco em estufa a 50° C (24h), triturado em liquidificador, peneirado (peneira plástica simples) e autoclavado duas vezes a 121° C, 15 min, quando acrescido ao meio de cultura.

As cepas isoladas foram cultivadas em *Erlenmeyers* (125 mL), contendo 50 mL do meio (NB), acrescido de 0,5 % p/v de bagaço de cana-de-açúcar (BC), e incubadas a 37° C, em *shaker* a 200 rpm, por 72 h, para produção de celulases e xilanases.

4.6.2 Análise quantitativa das atividades enzimáticas

A determinação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), com modificações (SANTOS et al., 2017), foi utilizada para quantificações das atividades celulolíticas e xilanolíticas. A preparação do reagente DNS, de acordo com Miller (1959), está descrita no ANEXO 3.

Após cultivo das cepas no meio LB/BG, as amostras foram centrifugadas a 3880 xg. (HERMLE Mod. Z326K), por 20 min, a temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 100 µL, de cada amostra (sobrenadante), para tubos de ensaio, e adicionados 100 µL de solução tampão fosfato de sódio, pH 6,5 (pH padrão de triagem) (Tabela 5), contendo os substratos CMC e/ou xilano (2%). As amostras foram incubadas a 55° C (temperatura padrão de triagem), por um tempo de 10 min. Após este período, adicionou-se 200 µL do reagente DNS a cada tubo (solução de parada da reação), misturando-se vigorosamente. Os tubos foram incubados em banho-maria (100° C), pelo tempo de 5 min. A reação foi resfriada imergindo os tubos em banho de gelo. Foram utilizadas placas de 96 poços, onde se adicionou, para cada amostra (em duplicata), 260 µL de água destilada esterilizada e 40 µL de amostra, sendo homogeneizadas por pipetagem. Branco da amostra foi preparada com solução tampão, sem sobrenadante. A leitura foi realizada por espectrofotometria, em leitor de placa (BIOTEK, Mod. EL800), a 540 nm.

- **Avaliação do pH ótimo** - O efeito do pH sobre a atividade da celulase e da xilanase foi determinado por incubação dos sobrenadantes das culturas bacterianas, com os respectivos substratos, em tampões com diferentes valores de pHs (4,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0) (Tabela 5), e as quantificações enzimáticas foram obtidas, como descrito no item 4.6.2.

- **Avaliação da temperatura ótima** - O efeito da temperatura sobre a atividade da celulase e da xilanase foi determinado por incubação dos sobrenadantes das culturas bacterianas, com os respectivos substratos, em diferentes nas temperaturas (40, 50, 60, 65, 70, 75 e 80°C), e as quantificações enzimáticas foram obtidas, como descrito no item 4.6.2.

Tabela 5. Tampões utilizados nas quantificações enzimáticas.

Tampão	pH	mM
Citrato de sódio	4,0 – 5,5	100
Fosfato de sódio	6,0 - 6,5	100
Tris-HCl	7,0 - 8,0	100
Glicina	9,0 – 11,0	100

4.7 Quantificações enzimáticas

As determinações das quantificações das enzimas, celulase e xilanase, foram baseadas nas concentrações de glicose e xilose, respectivamente, utilizando curvas padrões desses açúcares, obtenção da equação da reta e R^2 . Para os cálculos das quantificações de celulase e xilanase, utilizou-se a fórmula abaixo descrita:

$$[\text{Enz}] = \frac{\text{OD} \times \text{F} \times \text{D}^* \times \text{VR}}{\text{PM} \times \text{T} \times \text{VA}} \text{ U/mL}$$

Onde:

[Enz] – concentração da enzima (U/mL)

OD – Densidade óptica

$$\text{F} = \frac{1}{\text{Coeficiente angular}}$$

D* – diluição da amostra (se houver)

VR – volume total da reação

PM – peso molecular do açúcar

T – tempo de ativação enzimática

VA – volume da amostra (sobrenadante)

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores equivalentes a xilose (atividade xilanolítica) ou glicose (atividade celulolítica), por mililitro, por minuto, ($\text{U}/\text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$) ou (U/mL), nas condições de ensaio, utilizando curvas padrões de xilose e glicose. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

4.8 Curva padrão da glicose e xilose

Inicialmente, foram preparadas soluções-padrão de glicose e de xilose, para as quais foram pesados 1,0 g de glicose e xilose, ambos anidro, transferidos para balões volumétricos de 1,0 L. Após dissolução, o volume foi completado com água destilada.

A partir da solução-padrão de cada açúcar (1,0 g/L) foram preparadas soluções com

diferentes concentrações de glicose (0,5; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 mg/mL) e de xilose (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 mg/mL). A partir das soluções de diferentes concentrações foram realizados os ensaios de acordo com o método de DNS, acima mencionado no item 4.6.2. As curvas padrão para glicose e xilose estão apresentadas no Anexo 2.

4.9 Triagem das bactérias produtoras de exopolissacarídeos (EPSs)

A triagem das cepas produtoras de exopolissacarídeos (EPSs) ocorreu por identificação preliminar das colônias, as quais apresentaram uma substância de aspecto viscoso, típico da presença do polímero extracelular, após cultivo em meio Agar Nutriente (AN).

As cepas que apresentaram característica típica, após isolamento, da presença de EPS foram repassadas para placas de Petri, contendo Ágar Meio Mínimo Desbalanceado, contendo glicose (MMD-Gli) ou sacarose (MMD-SAC) (Tabela 6 e 7), como fontes de carbono, numa concentração de 1% e incubação a 37° C, por 72 h, em estufa bacteriológica, para confirmação da presença do polímero. As cepas que apresentaram maior viscosidade em placa foram selecionadas para cultivo em MMD líquido, para posterior extração e quantificação do mesmo.

Tabela 6 – Composição do Meio Mínimo Desbalanceado (MMD).

Componente	Concentração (g/L)
Na ₂ HPO ₄	3,54
K ₂ HPO ₄	1,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂ .2H ₂ O,	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
Citrato Férrico Amoniacal	0,06
Fonte de Carbono	10,00
Solução de Elementos Traços	1,0 MI

*Para o preparo do meio MMD em estado sólido acrescentou-se ágar bacteriológico (15 g/L).

Tabela 7 - Composição da Solução de Traços do MMD.

Componente	Concentração (g/L)
H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

4.9.1 Produção de EPS em meio líquido

As cepas produtoras de EPS foram repassadas para placas de Petri, contendo meio NA, incubadas a 37°C, por 24 h, das quais uma colônia foi inoculada em meio 25 mL de NB (pré-inóculo), 37°C, over-night, em shaker, a 200 rpm. De cada pré-inóculo foram retiradas alíquotas de 1 mL e adicionadas a Erlenmeyers (500 mL), contendo 200 mL de MMD-Gli e/ou MMD-Sac, sendo incubadas a 37° C, por 72 h, tanto sob agitação em shaker, a 180 rpm, como de forma estática, em estufa bacteriológica. Após este período, 100 mL do cultivo foi centrifugado, centrífuga HERMLE Mod. Z326K, a 3880 xg, por 20 min, e o sobrenadante, sem células bacterianas foi recuperado. Aos sobrenadantes foram adicionados dois volumes de álcool etílico 96° e incubadas a 4° C, por 24 h, para precipitação do EPS. Após incubação, os sobrenadantes foram novamente centrifugados para recuperação do polímero, os quais foram secos em estufa a 50° C, por 24h e pesados. A quantidade de EPS foi estimada em g/L de cultivo (CERNING, 1995, com modificações).

5. Resultados e Discussão

Com a utilização de técnicas tradicionais de cultivo e isolamento de cepas bacterianas, provenientes de amostras ambientais ou de resíduos agroindustriais, foi possível isolar microrganismos com capacidade de produzir enzimas celulolíticas e xilanolíticas, bem como o biopolímero exopolissacarídeo (EPS).

Neste trabalho foram isoladas 65 cepas bacterianas, entre as quais, 44 cepas foram isoladas da amostra do solo, denominadas: JS (21 cepas), S1J (18 cepas) e EPSM (5 cepas); e 21 cepas isoladas da amostra da torta de filtro, denominadas: JTF (16 cepas) e EPSM (5 cepas).

5.1 Cepas produtoras de celulase e xilanase

Todas as cepas isoladas foram testadas quanto à capacidade de degradação do CMC ou xilano, em meio sólido, dentre as quais, oito cepas foram positivas para atividade celulolítica e 27 para atividade xilanolítica (Tabela 8).

Tabela 8 – Cepas produtoras de celulase ou xilanase, isoladas do solo e da torta de filtro.

Cepa	Atividade Celulolítica	Atividade Xilanolítica	Cepa	Atividade Celulolítica	Atividade Xilanolítica
Isoladas do Solo			Isoladas da Torta de Filtro		
JS2	-	+	JTF1	-	+
JS6	-	+	JTF2	-	+
JS10	+++	+	JTF3	F	+
JS15	-	+	JTF4	-	+
JS18	-	+	JTF6	-	+
JS21	+	-	JTF13	-	+
JS23	-	+	JTF14	-	+
JS24	+	-	JTF16	F	++
JS25	-	+	JTF17	-	+
JS26	+	+	JTF18	F	++
S1J2	+++	++	Atividade enzimática pelo halo de degradação - ¹ F (Fraca); + (baixa); ++ (média); +++ (alta).		
S1J3	-	+			
S1J5	-	+			
S1J7	-	+			
S1J11	-	+			
S1J12	-	+			
S1J17	-	+			

Entre as bactérias positivas para as atividades celulolíticas e xilanolíticas, foram selecionadas quatro cepas (S1J2, JS10, JTF16 e JTF18), devido as mesmas apresentarem uma maior produção enzimática, evidenciada pelo halo de degradação, para celulase (Figuras 9A e 10A) e xilanase (Figuras 9B, 10B, 11B e 12B), no cultivo em placa.

Figura 8 - Atividade celulolítica da cepa JS10, em meio ágar LB/CMC (A) e xilanolítica, em meio ágar LB/xilano (B).

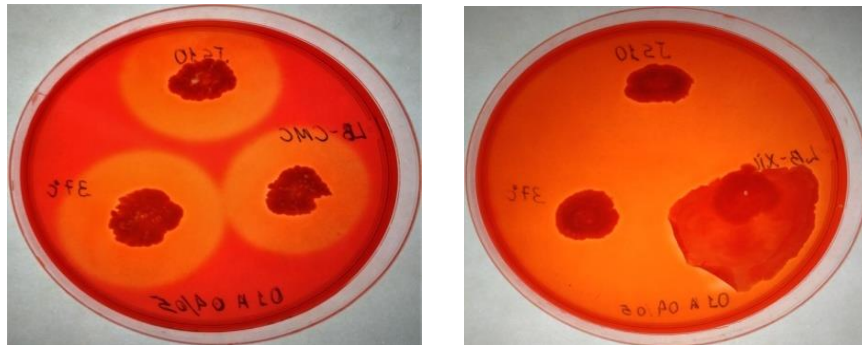


Figura 9 - Atividade celulolítica da cepa S1J2, em meio ágar LB/CMC (A) e xilanolítica, em meio ágar LB/xilano (B).

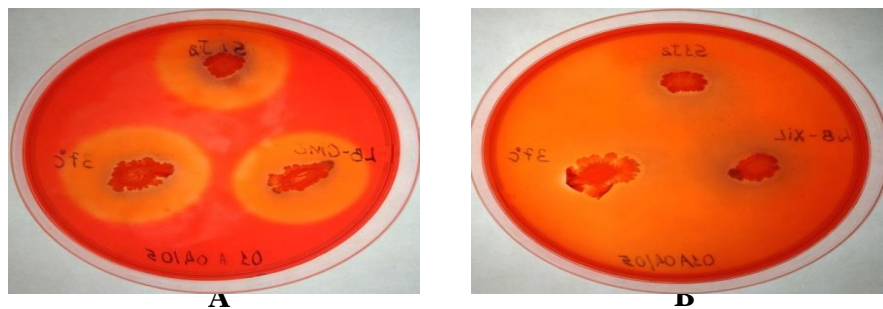


Figura 10 - Atividade celulolítica JTF16, em meio ágar LB/CMC (A) e com atividade xilanolítica, em meio ágar LB/xilano (B).

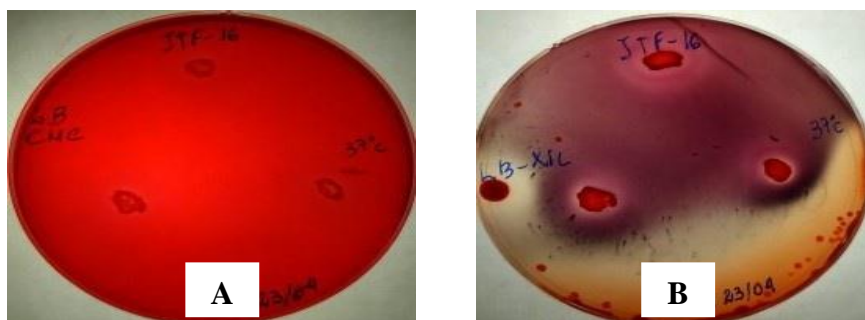
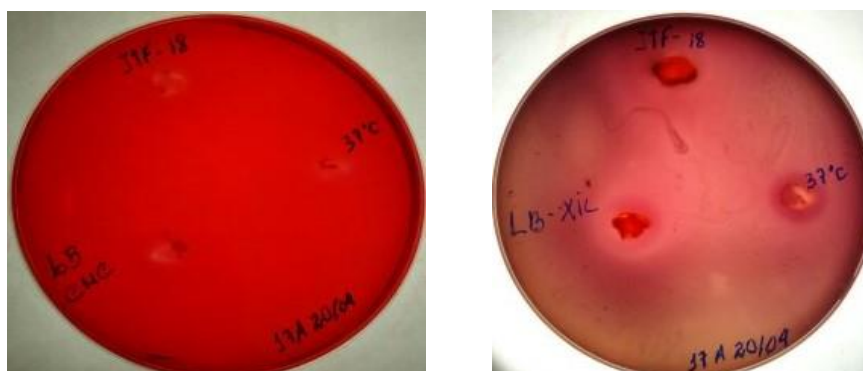


Figura 11 - Atividade celulolítica da cepa JTF18, em meio ágar LB/CMC (A) e com atividade xilanolítica, em meio ágar LB/xilano (B).



O isolamento de bactérias celulolíticas em amostras de solo também foi evidenciado por Oliveira et al. (2006), Gorch-Lira e Coutinho (2007) e Wang et al. (2009), pela triagem em meio AN-CMC, assim como, cepas xilanolíticas, em meio contendo xilano (HECK; HERTZ; AYUB, 2002; KINEGAM; TANASUPAWAT; AKARACHARANYA, 2007; AZERI; TAMER; OSKAY, 2010), evidenciados pelos halos de degradação.

Na Tabela 9 estão apresentados os Índices Enzimáticos (IE) das cepas JS10; S1J2; JTF16 e JTF18, que representam produções enzimáticas indiretas, baseadas na relação entre o diâmetro médio do halo de degradação, dividido pelo diâmetro médio da colônia. Quando o IE é maior ou igual a dois (≥ 2), indica uma maior produção da enzima (OLIVEIRA et al., 2006).

Tabela 9 - Índice Enzimático (IE) das cepas produtoras de celulase e xilanase.

Cepa	Celulase (cm)			Xilase (cm)		
	MDC ¹	MHD ²	IE ³	MDC	MHD	IE
JTF16	0,8	F ⁴	-	0,7	1,6	2,3
JTF18	0,8	F	-	0,7	1,6	2,3
S1J2	0,7	3,7	5,3	1,0	4,2	4,2
JS10	1,5	3,9	2,6	1,2	1,9	1,6

1 – Média do diâmetro da colônia; 2 – Média do diâmetro do halo de degradação; 3 – Índice enzimático; F – Fraca atividade.

As cepas JTF16 e JTF18 apresentaram uma baixa produção de celulase, em meio sólido (Figuras 11A e 12A), não sendo possível obter um IE significativo, devido o halo de

degradação estar muito próximo ao diâmetro da colônia. Entretanto, essas cepas apresentaram uma boa produção de xilanase em placa, com valor de IE (2,3) igual, para ambas as cepas (Tabela 9).

As cepas JS10 e S1J2 foram as que se apresentaram como produtoras, tanto de celulase, como de xilanase, com halos de degradação bem evidenciados (Figuras 9 e 10), com destaque para a cepa S1J2, que apresentou IE de 5,2 para celulase e 4,2 para xilanase (Tabela 9).

Sacco (2013), entre os 16 isolados de amostras de biomassa celulósica em decomposição, não evidenciou nenhuma cepa celulolítica, com $IE \geq 2$, entretanto, Baratto et al. (2011), evidenciaram cepas produtoras de xilanase, com $IE \geq 2$.

As cepas JS10, S1J2, JTF16 e JTF18 foram parcialmente caracterizadas quanto à morfologia celular, por coloração de Gram e presença ou ausência de endósporos, as quais todas se apresentaram como bacilos Gram positivos, com presença de endósporos, central e/ou sub-terminal (Tabela 10). Grande número de bactérias provenientes do solo são bacilos Gram positivos, pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, entre os quais, várias espécies são produtoras de bioprodutos, como enzimas e polímeros, de interesse biotecnológico (LAMA et al., 2004).

Tabela 10 - Caracterização morfológica das cepas produtoras.

Cepa	Gram	Morfologia celular
JTF16	+	Bacilos com endósporo (C ¹ / ST ²)
JTF18	+	Bacilos com endósporo (C)
S1J2	+	Bacilos com endósporo (C)
JS10	+	Bacilos com endósporo (C)

1 - Central; 2 – Sub-terminal

5.1.1 Análise quantitativa da atividade celulolítica e xilanolítica

As cepas JS10, S1J2, JTF16 e JTF18 foram avaliadas quantitativamente em relação às atividades celulolíticas e xilanolíticas (Gráfico 1).

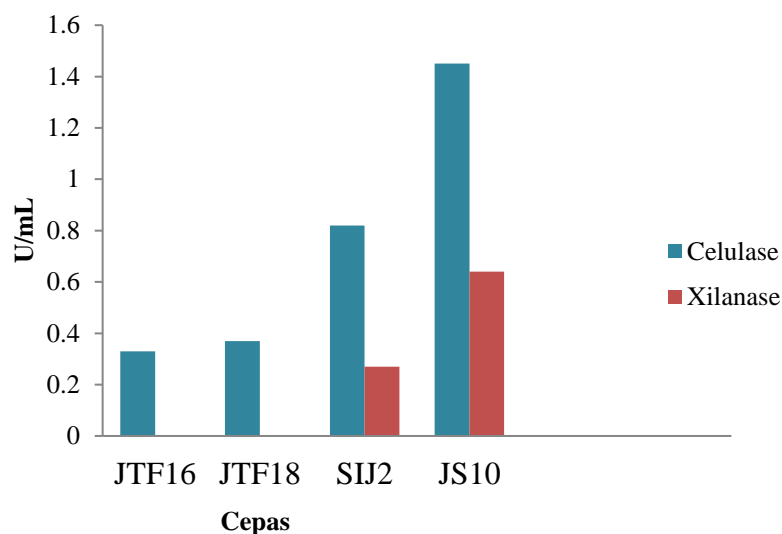


Gráfico 1 Atividade enzimática das cepas bacterianas JTF16, JTF18, SIJ2 e JS10, utilizando bagaço de cana-de-açúcar, como substrato.

Diferentemente do que foi evidenciado na produção enzimática em placa, as cepas JTF16 e JTF18, quando cultivadas em meio líquido, contendo bagaço de cana, como fonte de carbono, se apresentaram como produtoras de celulase, com valores em torno de 0,33 e 0,37 U/mL, respectivamente, mas não apresentaram atividade xilanolítica (Gráfico 1), pelo menos quando foi utilizado pH 6,5 e ativação enzimática a 55° C, necessitando, provavelmente, da avaliação em outros pHs, diferentes temperaturas e/ou outros tipos de fontes de carbono alternativas, que possam evidenciar melhor as produções enzimáticas.

As cepas SIJ2 e JS10 comprovaram as atividades celulolíticas e xilanolíticas, anteriormente evidenciadas pela presença dos halos de degradação, apresentando quantificações para celulase e xilanase, em torno de (0,82 e 1,45 U/mL) e (0,27 e 0,64 U/mL), respectivamente (Gráfico 1).

Nos testes de atividade enzimática, para triagem de cepas produtoras de celulase e xilanase (avaliação qualitativa), foram utilizados carboximetilcelulose (CMC) e xilano de *Beechwood*, como fontes de carbono, respectivamente. Mas, para a quantificação enzimática (avaliação quantitativa), em meio líquido, foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado termicamente (duas vezes autoclavado), como fonte de carbono, tanto para produção de celulase, como para xilanase.

De acordo com Castro e Pereira Jr. (2010), os tipos de enzimas produzidos pelos microrganismos irão atuar de maneira diferenciada, a partir das diferentes fontes de carbono disponíveis nos meios de cultivo.

Zhang et al. (2006), relatam que a ação das endoglicanases (CMCases) é mais eficiente em meio contendo CMC, devido a esse substrato ser solúvel e ter 100% de acessibilidade a fração das cadeias β -glicosídicas, em relação a substratos como, avicel, papel de filtro, algodão, *p*-NPG, nos quais apenas cerca de 0,2 a 1,8% das ligações β -glicosídicas estão acessíveis, assim como ocorre em resíduos industriais (CASTRO; PEREIRA JR, 2010), como bagaço de cana, palha de arroz, entre outros, que podem favorecer a atuação de exoglicanases e β -glicosidase, em detrimento as endoglicanases.

A semelhança das celulasas, que diferentes tipos irão ser ativadas, dependendo do tipo de substrato lignocelulósico, os xilanos comerciais, como de *Beechwood*, provenientes de árvores, do gênero *Fagus* (faia) e os presentes nos resíduos industriais, como bagaço de cana, apresentam características distintas, quanto a sua natureza, que podem influenciar no processo de degradação, pelas enzimas bacterianas (VIIKARI et al, 1994).

Provavelmente, as cepas JTF16 e JTF18 estão produzindo enzimas celulolíticas e xilanolíticas mais específicas, atuando de forma diferenciada nos substratos comerciais, como CMC e xilano de *Beechwood*, e no resíduo bagaço de cana, necessitando de uma maior investigação.

Yang et al (2010) verificaram um maior rendimento de celulase (2,82 U/mL) de uma cepa do gênero *Bacillus*, quando cultivada em meio contendo CMC, assim como Azeri; Tamer e Oskay (2010) verificaram uma maior atividade xilanolítica em meio contendo xilano (3,7 U/mL), enquanto que em farelo de trigo os valores foram mais baixos (1,1 a 2,1 U/mL).

Yin et al. (2010) isolaram uma cepa de *B. subtilis* que apresentou atividade celulolítica, tendo CMC como substrato e após cultivo em farelo de arroz, porém, quando utilizaram xilano, avicel, fibra de algodão, papel de filtro e *p*-NPG, como substratos, essa cepa não apresentou atividade para celulase.

Grisi (2011), entre cinco isolados bacterianos do solo, observou que apenas duas cepas produziram celulase, quando utilizou o resíduo palha de arroz (0,03 a 0,04 U/mL), cujo a produção foi mais baixa do que a encontrada pelas cepas neste estudo, não havendo produção de celulase, quando utilizou bagaço de cana de açúcar, como fonte de carbono. Esses dados mostram a especificidade das enzimas celulolíticas e xilanolíticas bacterianas, frente aos substratos utilizados para avaliação das atividades enzimáticas.

5.1.2 Avaliação do pH ótimo das cepas S1J2 e JS10

As determinações dos pHs ótimos, para as atividades celulolíticas e xilanoalíticas, após cultivo em meio utilizando bagaço de cana-de-açúcar, estão apresentados nos Gráficos 2 e 3, para cepa S1J28 e Gráficos 4 e 5, para cepa JS10, respectivamente.

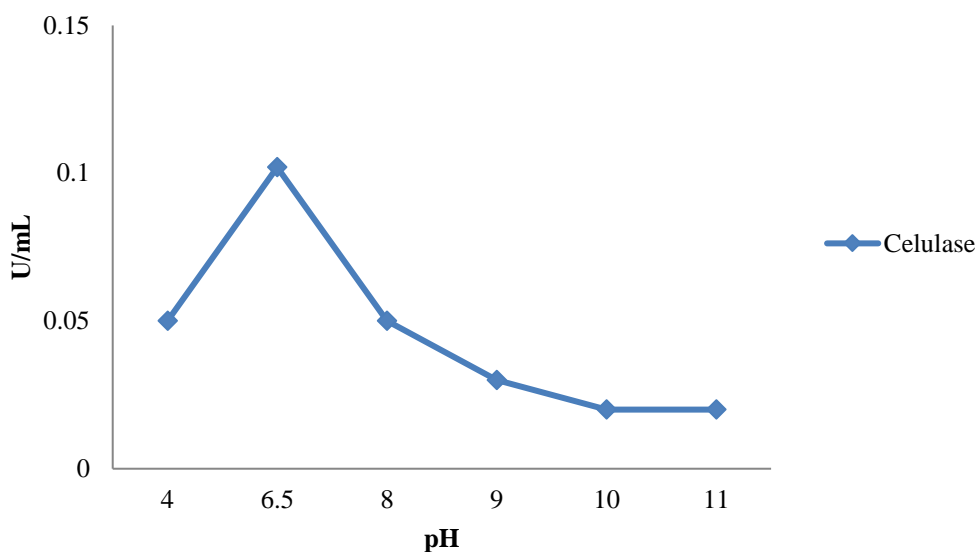


Gráfico 2 - pH ótimo para atividade celulolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

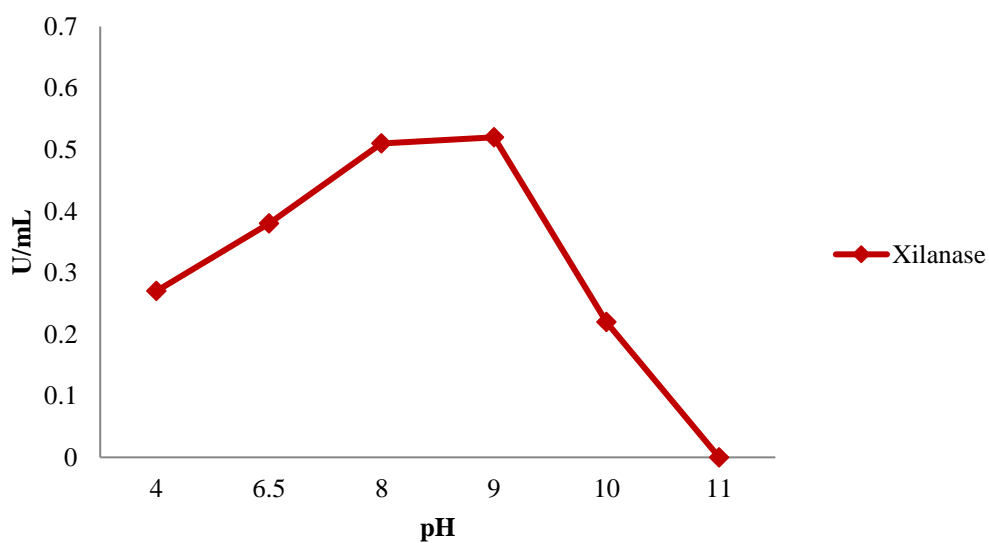


Gráfico 3 - pH ótimo para atividade xilanolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

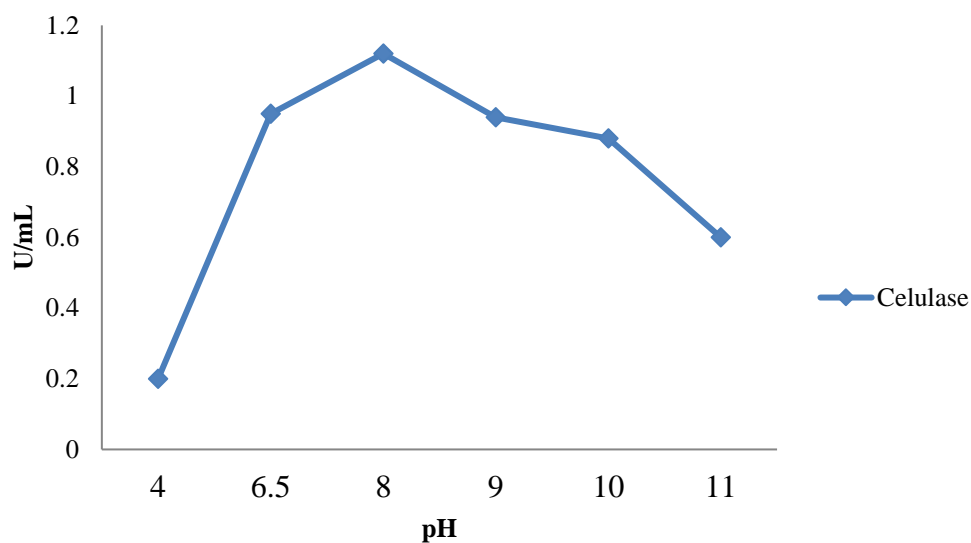


Gráfico 4 - pH ótimo para atividade celulolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

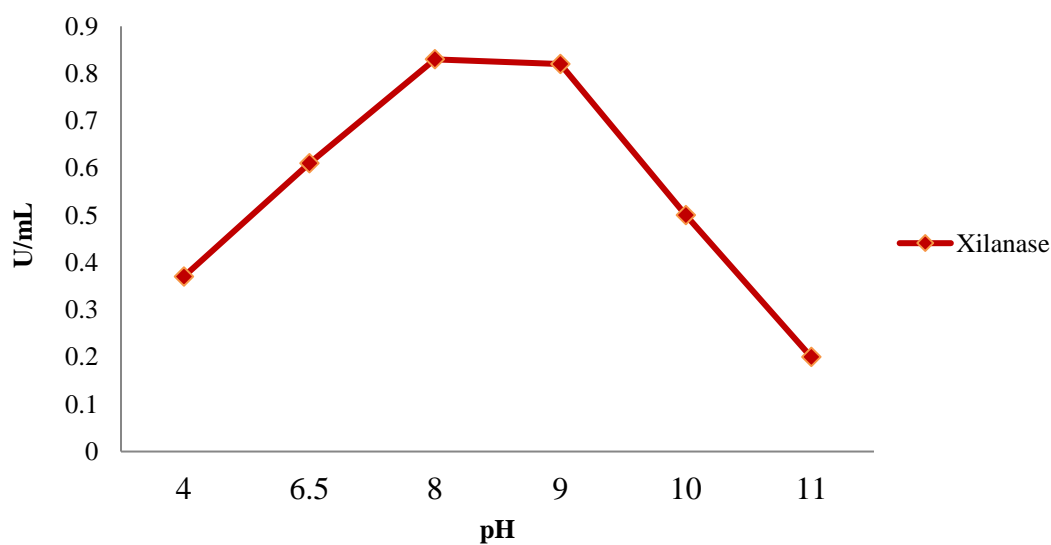


Gráfico 5 - pH ótimo para atividade xilanolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

O pH ótimo para produção de celulases e xilanases é amplamente discutido na literatura, que somado a outros fatores como, temperatura, tempo de ativação e tipo de microrganismo, podem influenciar diretamente na produção enzimática (ZIMMER et al., 2009; CASTRO et al., 2010).

As bactérias, em geral, apresentam valores menores para produção enzimática, do que os exibidos pelos fungos, porém o pH das atividades enzimáticas das bactérias, se apresentam do mais básico ao alcalino, do que para os fungos, que apresentam produção de enzimas, em pH mais ácido (KAUR, 2007).

Neste trabalho, diferentemente do que foi evidenciado pelo IE (Tabela 9), no qual a cepa S1J2 foi a que obteve o melhor valor para este parâmetro, a cepa JS10, quando cultivada em meio líquido contendo bagaço de cana, apresentou uma melhor atividade celulolítica (1,12 U/mL), com pH ótimo em torno de 8,0 e xilanolítica (0,83 U/mL), com pH ótimo entre 8,0-9,0 (Gráficos 4 e 5). Já a cepa S1J2, apresentou um pH ótimo ligeiramente ácido (6,5) e uma produção celulolítica (0,10 U/mL), dez vezes menor em relação a cepa JS10, sendo mais propícia à produção de xilanase (0,52 U/mL), que ocorreu em pH alcalino (8,0) (Gráficos 2 e 3).

Resultados obtidos por De Marco (2012) mostraram produção de celulase semelhante (0,1 U/mL), aos encontrados nesta pesquisa, para a cepa S1J2, porém inferior aos encontrados para a cepa JS10. Este autor também evidenciou, a máxima produção de celulase em pH em torno de 9,0, sendo um pouco mais elevado do que o encontrado nesta pesquisa (pH 8,0), para celulase da cepa JS10, mas compatível com o pH entre 8,0 – 9,0, para xilanase (Gráfico 4 e 5).

Ladeira (2013) obteve uma melhor produção enzimática, por *Bacillus* sp., em pH 9,0 para celulase, valor de pH superior ao encontrado para cepa S1J2, porém, este autor encontrou valor de pH 7,5, para xilanase, o qual foi inferior aos pHs encontrados neste trabalho (8,0 a 9,0), para ambas as cepas (S1J2 e JS10) (Gráficos 2, 3, 4 e 5). Este autor encontrou valor máximo para celulase em torno de 0,85 U/mL, o qual foi maior do que o encontrado para a cepa S1J2 (0,10 U/mL), porém inferior para cepa JS10 (1,12 U/mL). Para xilanase, Ladeira (2013) obteve um máximo de 0,51 U/mL, compatível como o valor encontrado para cepa S1J2 (0,52 U/mL), mas inferior ao encontrado para JS10 (0,83 U/mL).

5.1.3 Avaliação das temperaturas ótimas das cepas S1J2 e JS10

As determinações das temperaturas ótimas, para as atividades celulolíticas e xilanoalíticas, após cultivo em meio utilizando bagaço de cana-de-açúcar, estão apresentados nos Gráficos 6 e 7, para cepa S1J28 e Gráficos 8 e 9, para cepa JS10, respectivamente.

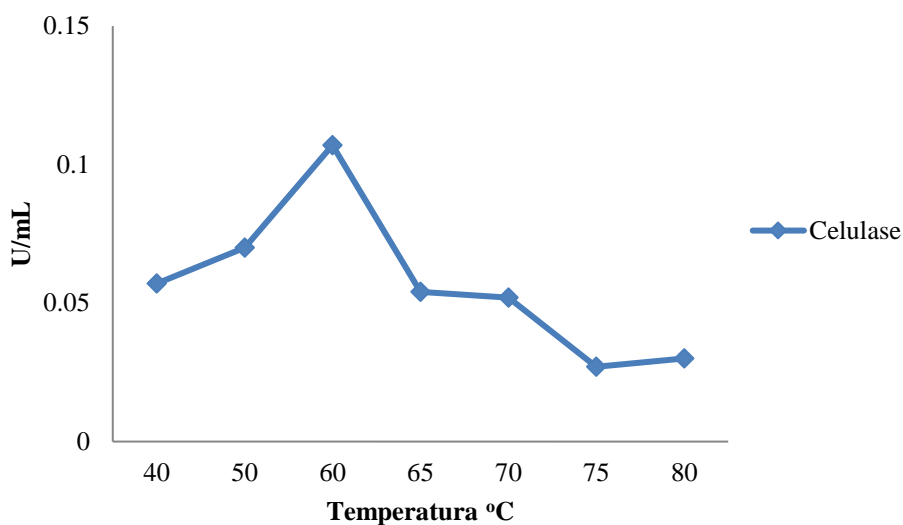


Gráfico 6 - Temperatura ótima para atividade celulolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

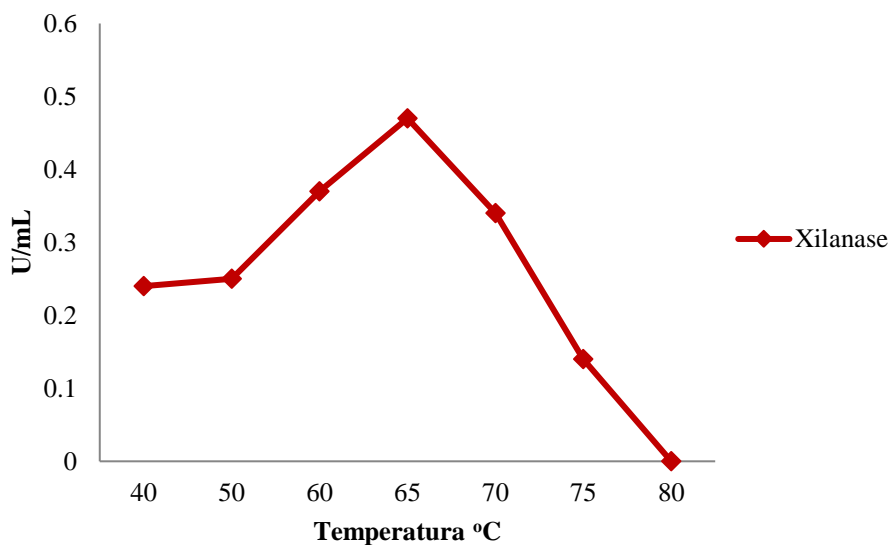


Gráfico 7 - Temperatura ótima para atividade xilanolítica da cepa S1J2, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

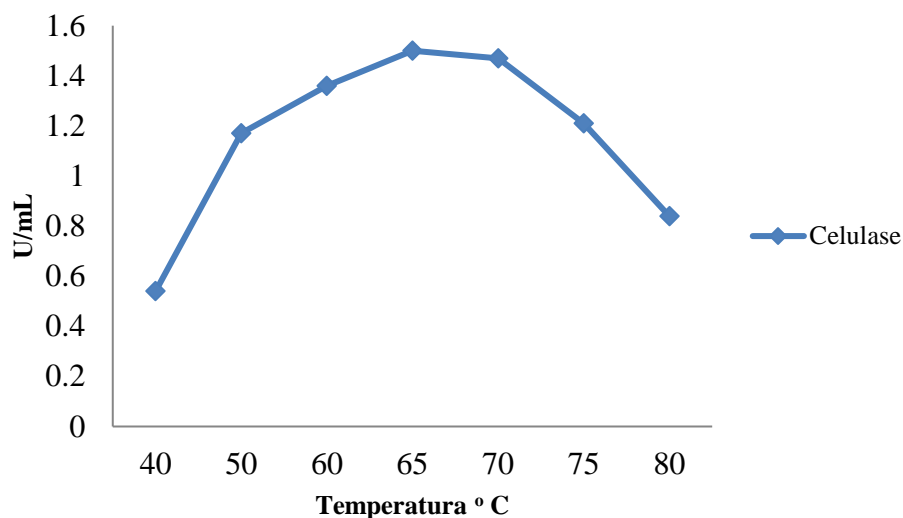


Gráfico 8 - Temperatura ótima para atividade celulolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

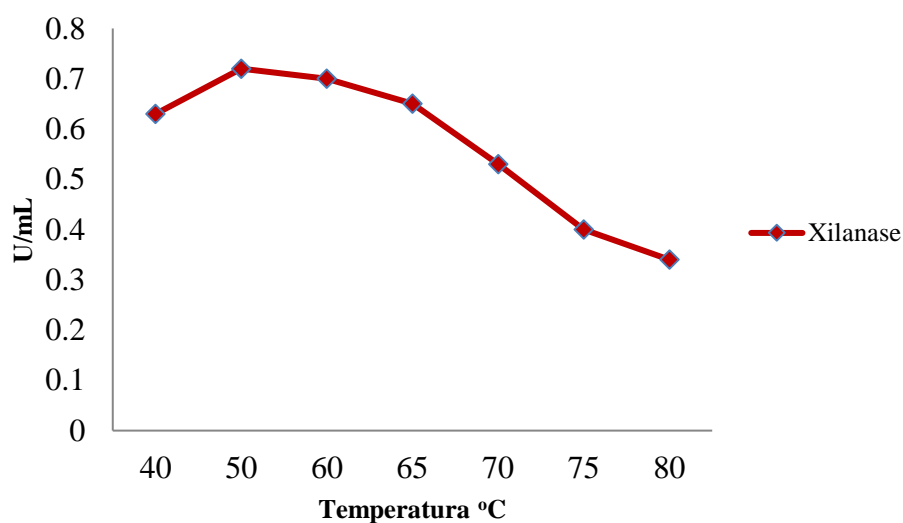


Gráfico 9 - Temperatura ótima para atividade xilanolítica da cepa JS10, após cultivo em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

Diferentes processos industriais fazem uso de enzimas, como celulases e xilanases, utilizadas como biocatalizadores (ADRIO; DEMAIN, 2014), onde, muitos desses, ocorrem sob condições específicas, como altas temperaturas e presença de solventes orgânicos, nos quais as enzimas podem ser inativas. Portanto, a investigação de enzimas com propriedades distintas, como a capacidade de atuar em valores mais elevados de pH, em altas temperaturas,

entre outros fatores, são de grande interesse industrial, visto que, podendo contribuir para otimização desses processos (KAR; RAY, 2011; KUHAD et al., 2016).

Neste trabalho, as temperaturas ótimas, das cepas S1J2 e JS10, ficaram em torno de 60° C e 65° C, para a atividade celulolítica, e em torno de 65° C e 60° C, para a atividade xilanolíticas, respectivamente (Gráficos 6, 7, 8 e 9).

A cepa S1J2 apresenta temperaturas ótimas mais pontuais, isto é, ela perde cerca de 40 a 50% da sua atividade, 5°C acima ou a baixo do seu ótimo, tanto para celulase, como para xilanase (Gráficos 6 e 7). Já a cepa JS10 apresenta uma maior estabilidade enzimática, permanecendo com a atividade, abaixo ou acima do ótimo, celulolítica, na faixa entre 50° C (78%) e 75° C (81%) e xilanolítica, 40° C (87,5%) e 70° C (74%) (Gráficos 8 e 9).

Os dados acima, corroboram com os encontrados por Li et al. (2008) e Grisi (2011), os quais observaram atividade ótima celulolítica a 50° C, em isolados bacterianos, que matinha de 70% a 80% da atividade entre 65-75° C, respectivamente.

Outros autores, Seo et al. (2013); De Marco (2012), Padilha et al. (2014), também observaram atividades celulolíticas e xilanolíticas, em temperaturas ótimas, variando entre 50 e 70°C, a semelhança dos resultados encontrados neste trabalho.

5.2 Cepas produtoras de EPS

De acordo com Maugeri (2001) os polissacarídeos microbianos, como EPS, apresentam algumas vantagens em relação às gomas produzidas por outros organismos, pois não dependem de fatores climáticos, podendo ser produzidos em uma quantidade determinada. Desta forma, a prospecção de novos polímeros microbianos, que possam apresentar características específicas, podem ser de interesse industrial, pela sua maior facilidade de produção e recuperação no processo.

Dentre as 65 cepas bacterianas isoladas neste trabalho, 10 cepas se apresentaram como produtoras de EPS, evidenciadas pela característica típica do polímero, como viscosidade das colônias, as quais foram denominadas EPSM, sendo cinco cepas foram provenientes do solo e cinco da torta de filtro (Tabela 11).

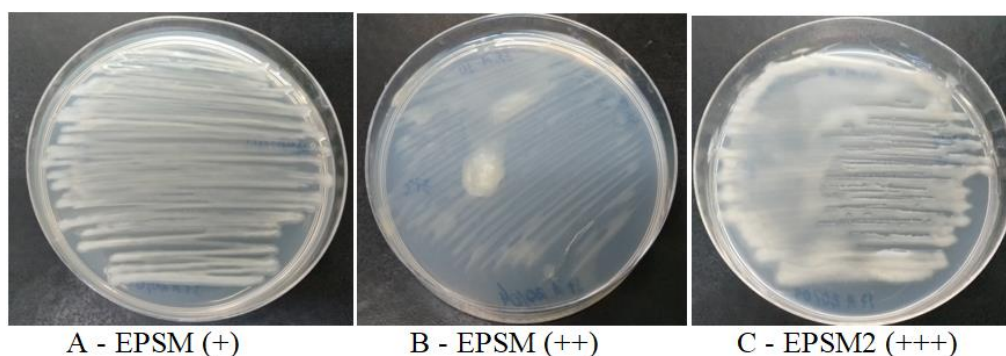
As 10 cepas isoladas como produtoras de EPS foram confirmadas quanto à produção do polímero, em placas contendo MMD-Gli e MMD-Sac, nos quais, sete foram consideradas com baixa produção (+) (Figura 13A); duas com média produção (++) (Figura 13B) e uma com alta produção (+++) (Figura 13C), de acordo com a viscosidade.

Tabela 11 – Cepas produtoras de EPS, em MMD-Glicose¹ e MMD-Sacarose².

Cepa	Local de Isolamento	EPS	
		MMD-Gli ¹	MMD-Sac ²
EPSM1	TF ¹	++	++
EPSM2	TF	+++	+++
EPSM3	TF	+	+
EPSM4	TF	+	+
EPSM5	TF	+	+
EPSM6	S ²	+	+
EPSM7	S	+	+
EPSM8	S	+	+
EPSM9	S	++	++
EPSM10	S	+	+

¹TF – Torta de Filtro; ²S – Solo; Produção de EPS: + (baixa); ++ (média); +++ (alta).

Figura 12 – Produção de EPS, de acordo com a quantidade de viscosidade.



Fonte: Autor (2018).

5.2.1 Produção e quantificação do EPS

A cepa EPSM2, considerada com alta produção em placa, foi utilizada para produção em meio líquido e quantificação do polímero. Esta cepa foi parcialmente caracterizada como bacilo Gram positivo, com presença de endósporos central.

A Tabela 12 apresenta os valores de quantificação do EPS da cepa EPSM2, após cultivo com e sem aeração, em MMD, contendo glicose e sacarose, como fonte de carbono. Os polímeros extraídos representam um extrato bruto do EPS, necessitando, posteriormente de purificação, para avaliar sua composição.

Tabela 12 - Quantificação do EPS produzido pela cepa EPSM2.

Cepa	Forma de cultivo	Quantificação (g/L)	
		Glicose	Sacarose
EPSM2	com agitação	1,38	0,86
	sem agitação	1,94	2,25

As produções do EPS em MMD, contendo glicose e sacarose, assim como a forma de cultivo, com e sem aeração, influenciaram na quantidade de polímero extraído.

A maior produção do EPS ocorreu em meio contendo sacarose (2,25 g/L), na forma de cultivo sem aeração, sendo bem reduzida (0,86 g/L), no cultivo com aeração (Tabela 11). A forma estática (sem aeração) foi a que melhor produziu o EPS, contribuindo com 29% e 61,8 % a mais na produção do polímero, quando cultivados em meio com glicose e sacarose, respectivamente.

Muneer; Belarbi (2011) obtiveram produção de EPS (0,1 e 0,56 g/L), de três isolados bacterianos, com valores menores do que os encontrados nesta pesquisa. Entretanto, isso se deve, provavelmente, pelo fato desses autores terem purificado os polímeros analisados, processo no qual ocorre separação de outros compostos presentes, após extração total do polímero.

Seesuriyachan et al. (2012) otimizaram o processo de produção de EPS, por bactéria láctea, obtendo um maior rendimento do polímero (259%), com valor em torno de 86,4 g/L, utilizando a metodologia de superfície de resposta, para obter melhores concentrações dos carboidratos utilizados, pH e temperaturas adequadas.

A complexidade do método usado para o isolamento e purificação dos EPSs, em geral, depende do meio de cultivo usado para a sua produção. Os métodos mais simples envolvem diálise do meio, após a centrifugação de biomassa, seguida de liofilização. A precipitação por etanol é usada para concentrar o EPS antes da diálise para isolamento, esta técnica é usada para isolamento de biopolímeros (RUAS-MADIEDO; REYESGAVILÁN, 2005).

Os exopolissacarídeos (EPS) estão no centro do interesse comercial, principalmente por parte das indústrias de cosméticos e alimentícias, que comercializam produtos bioativos e em pesquisas na área médica (TAKKU; KIMURA; OKUDA, 2001). Desta forma, a bioprospecção para obtenção de microrganismos, capazes de produzir novos tipos de polímeros se faz necessária, sendo uma ferramenta importante neste processo.

Os EPSs obtidos nesta pesquisa ocorreram de forma preliminar, obtendo o polímero de forma bruta, necessitando de maiores investigações, quanto aos aspectos de purificação, composição, toxicidade e emprego de melhores metodologias para otimização do processo de obtenção do bioproduto.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho a bioprospecção de microrganismos proveniente do solo e do resíduo torta de filtro, da região sucroalcoleira, demonstrou-se viável, quanto ao isolamento de bactérias produtoras de celulases e xilanase, bem como do exopolissacarídeo (EPS), os quais exibiram características de termoestabilidade e atuação em diferentes pHs dos bioprodutos.

Desta forma, as bactérias isoladas e testadas preliminarmente, quando a produção enzimática e de polímero, se apresentam como potenciais candidatas de interesse biotecnológico e industrial.

PERSPECTIVAS

- Identificar os isolados pela análise molecular (gene 16S RNA);
- Quantificar as enzimas em diferentes concentrações de fontes de carbono (resíduos agroindustriais), pH e temperatura, visando otimização do processo;
- Testar diferentes formas de extração e de purificação do EPS, visando um melhor rendimento do polímero.
- Publicar os resultados em revista científica.

7. Referências Bibliográficas

- ADRIO, JL;DEMAIN, AL Células Microbiais e Enzimas - Um Século de Progresso. Em Métodos em Biotechnology. Microbial Enzymes and Biotransformations; Barredo, JL, Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, EUA, Volume 17, pp. 1-27, 2014.
- ALSAYADI MUNEER, M. S.; BELARBI, M. Production of Exopolysaccharides by Probiotic Bacteria in the Presence of Bile Acids. Yemeni Journal for Medical Sciences. v. 5, p 15-22, 2011.
- ARTUSO, A. Biooprospectin, benefit sharing, and biotechnological capacity building. Development, v. 30, n. 8, 2002.
- ASSIS, D.J., BRANDÃO, L. V., COSTA, L. A. S., FIGUEIREDO, T. V. B., SOUSA, L. S., PADILHA, F. F., DRUZIAN, J. I. A Study of the Effects of Aeration and Agitation on the Properties and Production of Xanthan Gum from Crude Glycerin Derived from Biodiesel Using the Response Surface Methodology. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172, 2769-2785, 2014.
- AVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L.T. Frutos do Cerrado: preservação gera muitos frutos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2003. 41p.
- AZERI, C.; TAMER, A.U.; OSKAY, M. Thermoactive cellulase-free xylanase production from alkaliphilic *Bacillus* strains using various agro-residues and their potential in biobleaching of kraft pulp. African J. Biotechnol., v. 9, n. 1, p. 63-72, 2010.
- AZEVEDO, C.M.A. Bioprospecção: Coleta de Material Biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. 2 ed. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica; 2003. caderno 17.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. Advance in applied Microbiology. vol. 43, p. 141-194, 1997.
- BECKER, N. B.; BARATTO, C. M.; GELINSKI, J. M. L. N. Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. Evidência. v. 9, n. 1-2, p. 67-82, 2009
- BERWANGER A. L. S., DOMINGUES N. M., VANZO L. T., LUCCIO M., TREICHEL H., PADILHA F. F., SCAMPARINI A. R. P. Production and rheological characterization of biopolymer of *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 using conventional and industrial media. Applied Biochemistry and Biotechnology, 129-132, 2006.
- BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances, 15: 583-620, 1997.
- BONASSA, B.; SCHNEIDER, L. T.; FRIGO, K. D. A.; FEIDEN, A.; TELEKEN, J. G.; FRIGO, E. P. Subprodutos Gerados na Produção de Bioetanol: Bagaço, Torta de Filtro, água de Lavagem e Palhagem. Rev. Bras. Ener. Ren., v. 4, p. 144-166, 2015.
- BOREM, Aluizio. A História da Biotecnologia. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento v. 34, n. VIII, p. 10–12 , 2005.9788533619920.
- BRANDÃO, L.V.; NERY, T. B. R.; MACHADO, B. A. S.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, p.217-222, 2008.

BRANDÃO, L. V., ASSIS, D. J., LÓPEZ, J. A., ESPIRIDÃO, M. C. A., ECHEVARRIA, E. M., DRUZIAN, J. I. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(4), 737-746, 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, JR. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v.33, n.1, p. 181-188, jan. 2010.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. Biomass power generation: sugarcane bagasse and trash (Disponível em: <<http://new.ctc.com.br/>>. Acesso em: 12 junho 2018.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: *Biochemistry, molecular biology and applications*. *Biotechnology Applied Biochemical*. v.17, p.259-289, 1993.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v.26, n.2, p.105-112, 2005.

CERNING, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Le Lait*, 75(4-5), 463–472.

DAHMS, A S. *Biotechnology : What It Is , What It Is Not , and the Challenges in..* p. 271–278. 2004.

DRUZIAN, J. I.; PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.27, n.1, p.26-31, 2007.

EIRAS, C.; PASSOS, I. N. G.; BRITO, A. C. F.; SANTOS JÚNIOR, J. R. Nanocompósitos eletroativos de poli -o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.5, p.1158-1162, 2007.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Serviço de Produção da Informação; Rio de Janeiro, EMBRAPA solos, 412p., 1999.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v .26, n. 1, p.71-82, 2005.

FARIAS MVD, VITAL MJS (2008) Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em roraima, Brasil. Universidade Federal de Roraima – UFR

FUENTERIA, A.M.; VALENTE, P. Screening of enzyme-producing yeast and yeast-like fungi from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. *Tecno-Lógica*, v.9, n 1. p. 9-24, jan/jun. 2004.

GRISI, T. C. S. L. Diversidade de Bacteria e Archaea do solo do Cariri paraibano e prospecção de celulases e xilanases em clones metagenômicos e isolados bacterianos. Tese Doutorado RENORBIO-UFPB. (2011). Disponível em:< <http://tede.biblioteca.ufpb.br/bitstream/tede/342/1/arquivototal.pdf>>. Acessado em: 18 maio 2018.

KAR, S.; RAY, R. C. purification, characterization and application of thermostable exopolysaccharidase from *Streptomyces ermoensis* mtcc 7317. *Journal of Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 133-147, 2011.

KUHAD, R. C et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 55, p. 249-272, 2016.

- KUMAR, A.; SRIVASTAVA, A.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. smart polymers: Physical forms and Bioengineering applications. *Progress in polymer science*, v. 32, n. 10, p. 1205-1237, out. 2007.
- LAMA, L.; CALANDRELLI, V.; GAMBACORTA, A.; NICOLAUS, B. Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research Microbiol.*, v. 155, p. 283-289, 2004.
- MACIEL, J. C.; ANDRAD, P. L.; NERI, D. F. M.; CARVALHO JUNIOR., L. B.; CARDOSO, C. A.; CALAZANS, G. M. T.; ALBINO AGUIAR, J.; SILVA, M. P. C. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam, NL, v.324, p.1312-1316, 2012.
- MATOS, A. T. Tratamento e Aproveitamento Agrícola de Resíduos Sólidos. Viçosa, Minas Gerais: Ed. UFV, 2014.
- MATSUYAMA, H., KAMESAKI, T., SASAKI, R., MINAMI, H., YUMOTO, I. Production of two types of exopolysaccharide by *Novosphingobium rosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(2),152-156, 2003.
- MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA U. A., AQUARONE E., BORZANI W., SCHMIDELL W., *Biotecnologia industrial*, vol 3, Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blucher, 2001.
- MISAKI, A. Structural aspects of some functional polysaccharides. In: NISHINARI, K., DOI, E. *Food hydrocolloids: structures, properties and functions*. Editora Springer Science & Business Media, 1993.
- MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Application of Fractional Factorial Design to Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, SP, v.38, p.1-7, 2007.
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426, 1959.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, v.3, n.5, p. 9-23, jan/jun.2009.
- MORRIS, G., HARDING, S. Polysaccharides, Microbial. *Applied Microbiology: Industrial*, 482-494, 2009.
- MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. DA FONSECA & J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* C7L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21, n.1, p.82-85, 2001..
- OLIVEIRA RFD, CEREDA MP, OLIVEIRA CED (2012) Leveduras com atividade de fermentação em caldo de cana, isoladas sob estresse, de frutos do Cerrado. Universidade Católica Dom Bosco – UCDB.
- OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; FANTINATTIGARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. *MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais*, v.7, p. 1-19, out, 2006.

PEREIRA JÚNIOR, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos (Séries em Biotecnologia). v. 1, Escola de Química/UFRJ. Rio de Janeiro: UFRJ Ed., 2008.

PRASERTSAN, P. et al.. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 468-475, 2008.

PULS, J. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis, *Macromol. Symp.* 120, 183, 1997.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* n. 56, v. 7, p. 2093-2098, 1990.

RINAUDO, M. On the relation structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: NISHINARI K., DOI E. *Food hydrocolloids: structures, properties and functions*. Editora Springer Science & Business Media, 1993.

RUAS-MADIEDO, R.; REYES-GAVILÁN, C. G. Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *American Dairy Science Association*, v. 88, p. 843–856, 2005.

SANTOS A. A.; DEOTI J. R.; MÜLLER G.; DÁRIO M.G.; STAMBUK B. U.; ALVES JUNIOR S. L. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas, v. 20, p. 1-9, 2011.

SEESURIYACHAN, P.; KUNTIYA, A.; HANMOUNGJAI, P.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T.; LEKSAWASDI, N. Optimization of Exopolysaccharide Overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid State Fermentation under High Salinity Stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v. 76, n.5, p. 912-917, 2012.

SMIBERT, R. M., KRIEG, N. R., 1994. Phenotypic characterization. in *methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, 611-651.

SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. Microbial Esterases: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.2, n.7, p. 135-146, 2013.

SYNNES, M. Bioprospecting of organisms from the deep sea: scientific and environmental aspects. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v.9, n.1, p. 53-59, ago. 2007.

STEPHEN, A. M., CHURMS, S. C. Introduction. In: STEPHEN A. M., PHILIPS G. O., WILIANS P. A. *Food polysaccharides and Their Applications*, Taylor & Francis, 2 ed., 2006.

SUBRAMANIYAN, S. E PREMA, P. Cellulase free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 183, p.1-7, 2000.

SUMNER J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 47, p. 5-9, 1921.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech*, v.16, p.41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Introduction and definition. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*, Cambridge University Press, 1990.

SUTHERLAND, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663–674.

SUTHERLAND I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 12, 393-448,1994.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound Agaricus blazei Murrill and its mechanism of action. *J. Nutr.*, v. 131, p. 1409-1413, 2001.

TEATHER, R.N.; WOOD, P.J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied Environmental Microbiology*, v. 43, p. 777-780, 1982.

TONELI J. T. C. L., MURR F. E. X., PARK K. J. Estudo na reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 7(2), 181-204, 2005.

UNICA - União da Indústria de Cana de açúcar (2015). Conquistas do setor sucroenergético na matriz energética brasileira. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acessado em: 10 Junho de 2018.

VIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J. AND LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Review*, v. 13, p. 335-350, 1994.

YANG, D.; WENG, H.; WANG, M.; XU, W.; LI, Y.; YANG, H. Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15. *Mol. Biol. Rep.*, v. 37, n. 4, p. 1923-1929, 2010.

YIN, T.; MIAO, L.L.; GUAN, F.F.; WANG, G.L.; PENG, Q.; LI, B.X.; GUAN, G.H.; LI, Y. Optimized medium improves expression and secretion of extremely thermostable bacterial xylanase, XynB, in *Kluyveromyces lactis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, n. 11, p. 1471-1480, 2010.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 17, p. 75-90, 1988.

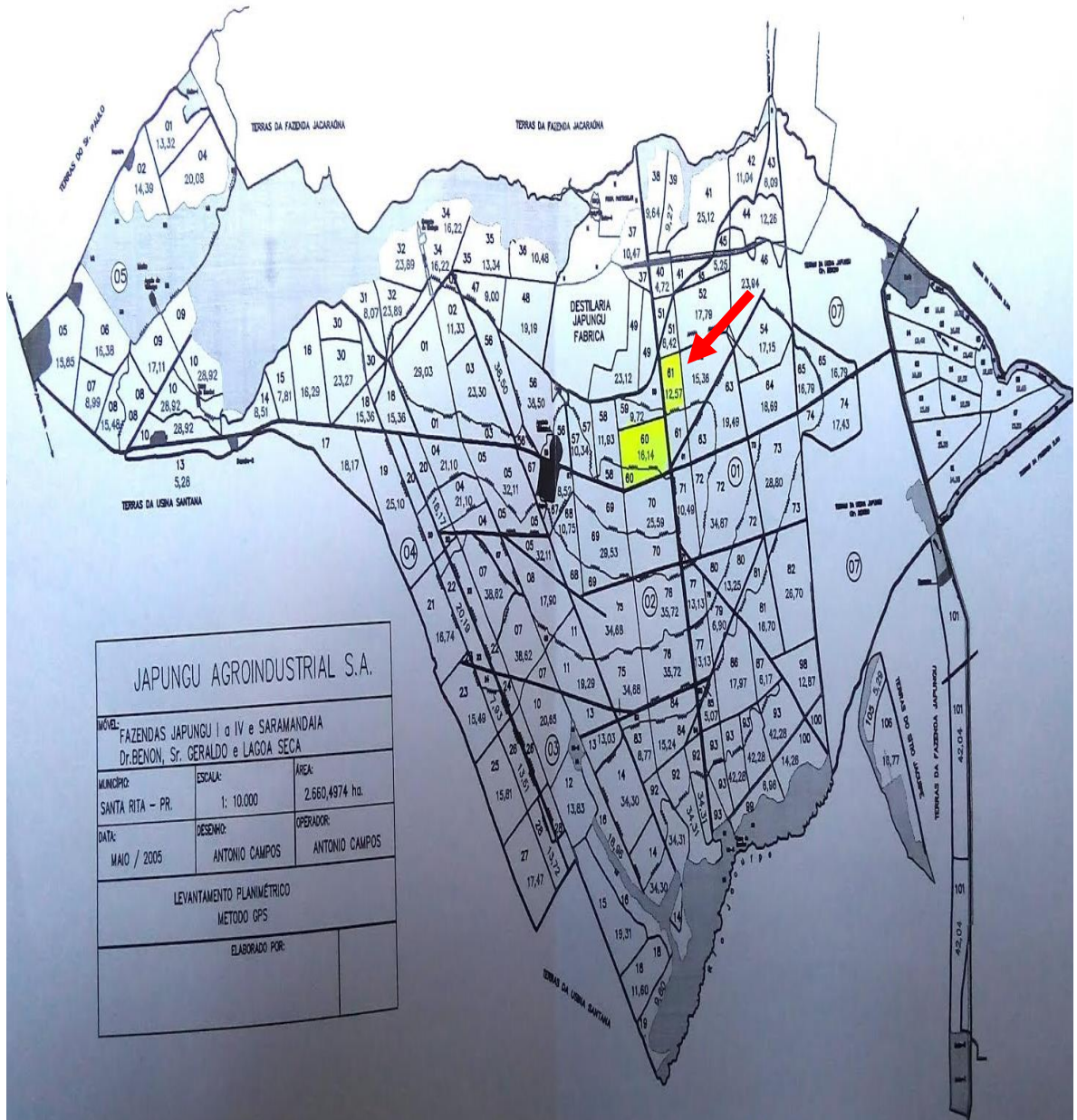
ZHANG, Y.-H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.*, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, v.10, n.14, p. 123-137, jul/dez. 2009.

ANEXOS

ANEXO 1

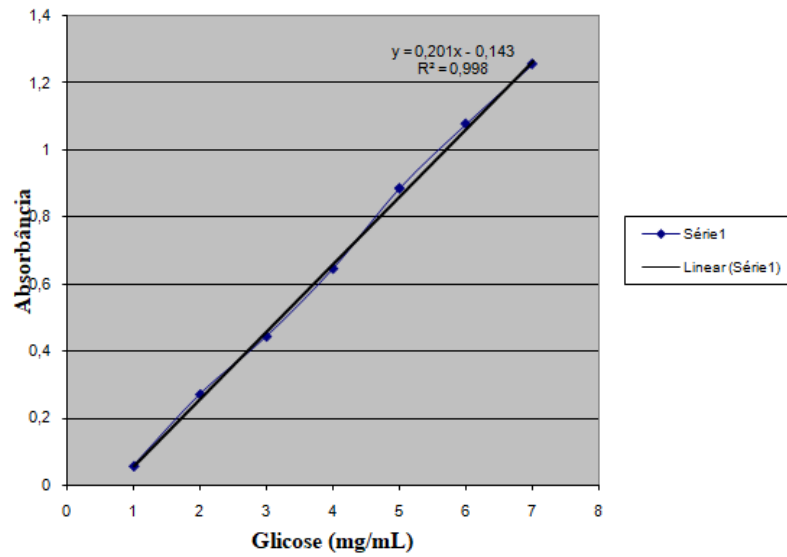
SOLO – procedente do Talhão 61 (área de plantio na Usina Japung (Seta).



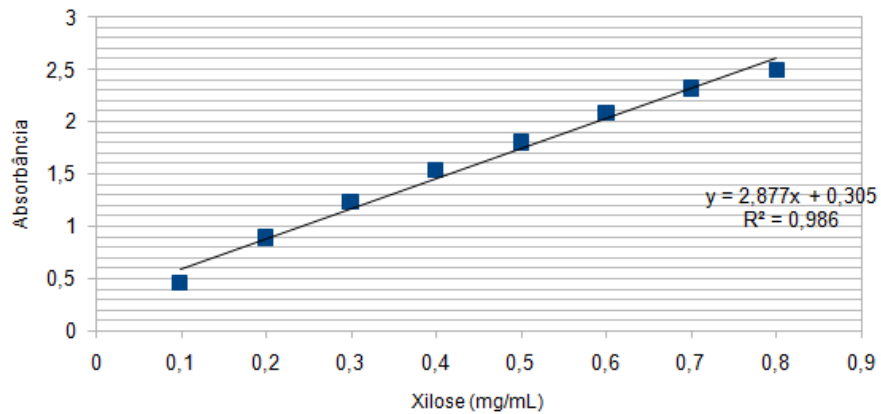
ANEXO 2

CURVAS PADRÃO PARA GLICOSE E XILOSE

Curva padrão Glicose



Curva padrão Xilose



ANEXO 3

MÉTODO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS)

Preparação do reagente DNS (MILLER, 1959)

O reagente DNS é composto por duas soluções preparadas em separado, que foram posteriormente misturadas:

Solução A: adicionou-se 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico a uma solução de 200 mL de hidróxido de sódio (2 M), recém-preparada;

Solução B: adicionou-se 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio a 500 mL de água destilada, sob aquecimento e agitação constantes. Ainda nessas condições, adicionou-se a solução A sobre a solução B, até a completa dissolução do DNS. Após resfriamento, transferir a mistura para balão volumétrico de 1.000 mL e o volume foi completado com água destilada. O reagente foi armazenado em frasco de polipropileno, ao abrigo da luz.