



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



KLEDSON LOPES BARBOSA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CELULASE DE
BACTÉRIAS DO TRATO INTESTINAL DE *Diatraea saccharalis***

Maceió - AL

2019

KLEDSON LOPES BARBOSA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CELULASE DE
BACTÉRIAS DO TRATO INTESTINAL DE *Diatraea saccharalis***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências com área de concentração em Bioquímica e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Rodrigues dos Santos Malta

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Maceió - AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

B238p Barbosa, Kledson Lopes.
Produção, caracterização e purificação de celulase de bactérias do trato intestinal de *diatraea saccharalis* / Kledson Lopes Barbosa. - 2019.
114 f. : il. color.

Orientadora: Valéria Rodrigues dos Santos Malta.
Co-orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 93-114.

1. Bactérias grã-negativas. 2. Celulase - Purificação. 3. *Diatraea saccharalis*. 4. Bagaço de cana - Indústria. 5. Biotecnologia - Indústria. I. Título.

CDU: 579.222: 664.113



PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **KLEDSON LOPES BARBOSA** intitulada: **“PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CELULASE DE BACTÉRIAS DO TRATO INTESTINAL DE *DIATRAEA SACCHARALIS*”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 25 de fevereiro de 2019, às 9h, na Sala de Reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Valéria Rodrigues dos Santos Malta
(Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
(Coorientadora - PPGEQ/CTEC/UFAL)

Profa. Dra. Martha Suzana Rodrigues dos Santos Rocha
(IFAL)

Prof. Dr. João Inácio Soletti
(PPGEQ/CTEC/UFAL)

Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)

DEDICATÓRIA

A Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas e principalmente ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia – PPGQB, do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB).

Ao órgão de fomento CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Valéria Rodrigues dos Santos Malta pela orientação, por ter me aceitado como orientando e por todos os momentos de descontração durante essa etapa de minha vida.

A minha Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida, pela orientação, compreensão e principalmente por toda ajuda para realização deste trabalho, e por fazer parte dos grandes momentos da minha vida acadêmica (mestrado e doutorado). A ela, dedico meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior, por disponibilizar toda infraestrutura do Laboratório de Microscopia e Genética de Microrganismos para realização dos experimentos de biologia molecular e por toda sua contribuição neste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Sônia Salgueiro Machado, por sua grande contribuição na realização deste trabalho, por compartilhar suas ideias, seus ensinamentos e principalmente com as análises de purificação de proteínas.

Aos professores da banca examinadora por sua contribuição e sugestões essenciais.

A minha família, meu bem maior, cujo amor não cabe em mim. A vocês dedico toda a minha felicidade de ter chegado até aqui.

A equipe do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos, pela disponibilidade dos equipamentos, pelo convívio prazeroso e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos, Jumelice, Márcia, Martha, Mônica, Nilson, Sheila, Thatiana por todos os momentos vividos, pelas boas risadas que compartilhamos, meus sinceros agradecimentos.

Tentar determinar a estrutura de uma proteína através de espectroscopia UV, é a mesma coisa que tentar determinar a estrutura de um piano ouvindo o som deste quando jogado escada abaixo.

[Francis Crick biólogo molecular britânico, 1916]

RESUMO

O desenvolvimento de processos para produção de celulases com alta atividade específica é um desafio para a biotecnologia industrial. Embora o desempenho das celulases comerciais tenha melhorado significativamente na última década, o mesmo não aconteceu com as celulases produzidas em laboratórios de pesquisa, sendo, a produção desse tipo de enzima ainda um fator de custo elevado nos processos que exigem seu uso. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a presença de bactérias celulolíticas isoladas do trato intestinal de larvas de *Diatraea saccharalis* a fim de determinar seu potencial uso na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar. Para isto, realizou-se uma triagem de bactérias celulolíticas do trato intestinal de larvas de *Diatraea saccharalis* através de meios de cultura específicos utilizando o bagaço da cana-de-açúcar e carboximetilcelulose – CMC como únicas fontes de carbono. Nesse cenário, utilizou-se como biomassa indutível de celulase o bagaço da cana-de-açúcar por meio de fermentação em estado líquido. Através de um planejamento experimental foram determinadas as melhores condições de produção de celulase (concentração do inóculo e pH). Realizou-se a caracterização físico-química-morfológica da biomassa por meio de análises cromatográficas (CLAE) e espectroscópicas (FTIR, DRX). Em seguida, aplicou-se técnicas eletroforéticas para mensurar o perfil proteico da endoglucanase dos isolados bacterianos celulolíticos, técnicas de purificação associadas às eletroforéticas para determinar o peso molecular das proteínas e técnicas moleculares (PCR e sequenciamento de DNA) para identificação de genoma bacteriano. Os resultados de caracterização química mostraram que a celulose e hemicelulose diminuíram após o pré-tratamento, sugerindo perda de carboidratos e formação de outros produtos como furfural, HMF, ácido acético e ácido fórmico. Os espectros de FTIR revelaram semelhança entre os espectros dos materiais não tratados e pré-tratado, evidenciando, qualitativamente, que o pré-tratamento foi eficiente na extração da hemicelulose e lignina. Os picos nos difratogramas do DRX confirmaram a remoção de lignina e hemicelulose da biomassa pré-tratada. No entanto, para o índice de cristalinidade não houve mudança significativa (73,25 e 73,70% para biomassa não tratada e pré-tratada, respectivamente). A coloração de Gram dos isolados bacterianos celulolíticos revelou a presença de um bacilo Gram-positivo encapsulado, e três bactérias Gram-negativas. A atividade de degradação de CMC revelou maior atividade de celulase extracelular para os isolados INTB2, INTB3 e INTB4. Para atividade de endoglucanase extracelular, Os 4 isolados reportaram padrões semelhantes de excreção de endoglucanase, no entanto, o isolado INTB4 foi o que reportou menor atividade extracelular (3,0 cm). Os resultados de produção de celulase através do isolado INTB3 mostraram-se mais estáveis em comparação aos demais isolados INTB1, INTB2, INTB4. Quanto a purificação, após precipitação com sulfato de amônio a atividade específica para o extrato INTB3 foi de 30,13 U/mg, para INTB4 19,97, INTB2 11,15 e INTB1 5,53 U/mg. A PAGE nativa apresentou para os quatros isolados 3 bandas de proteínas correspondentes a ~89, 58 e 48 kDa. No SDS-PAGE os extratos enzimáticos investigados (bruto e precipitado) refletem múltiplas proteínas detectadas no gel e revelam que as enzimas apresentaram várias bandas (entre 150 a 17 kDa). A análise do zimograma-CMC exibiu atividade celulolítica, sugerindo que as enzimas conseguiram hidrolisar a carboximetilcelulose sódica e possuem pelo menos dois tamanhos, ~ 89 e 58 kDa. O método aplicado para o isolamento da celulase do isolado INTB3 apresentou um único pico de atividade celulolítica e através de SDS-

PAGE a 12%, observou-se 3 bandas proteicas em torno de 113, 76, 52 kDa. No presente estudo, Dos microrganismos isolados para produção enzimática, o INTB3 foi identificado como o principal produtor de celulase, tendo a maior atividade específica após purificação parcial (30,13 U/mg). A purificação da endoglucanase de INTB3 através da cromatografia por exclusão de tamanho triplicou (96,25 UI/mL) a atividade específica celulolítica. Mais distante outros estudos tornam-se importantes para dar continuidade a estes experimentos para obter alto rendimento de produção, purificação e aplicação de celulase.

Palavras-chave: Bactérias celulolíticas. Celulase. Purificação. *Diatraeae saccharalis*.

ABSTRACT

The development of processes for the production of cellulases with high specific activity is a challenge for industrial biotechnology. Although the performance of commercial cellulases has improved significantly in the last decade, the same has not happened with cellulases produced in research laboratories, being the production of this type of enzyme still a high cost factor in the processes that require its use. Thus, the present study aimed to investigate the presence of cellulolytic bacteria isolated from the intestinal tract of *Diatraea saccharalis* larvae in order to determine their potential use in the hydrolysis of sugarcane bagasse. For this, cellulolytic bacteria were screened from the intestinal tract of *Diatraea saccharalis* larvae through specific culture media using sugarcane bagasse and carboxymethylcellulose (CMC) as sole carbon sources. In this scenario, sugarcane bagasse was used as the inducible biomass of cellulase by means of liquid fermentation. Through an experimental planning were determined the best conditions of cellulase production (inoculum concentration and pH). The physico-chemical-morphological characterization of the biomass was performed by means of chromatographic (HPLC) and spectroscopic analyzes (FTIR, XRD). Then electrophoretic techniques were used to measure the endoglucanase protein profile of cellulolytic bacterial isolates, electrophoretic purification techniques to determine molecular weight of proteins and molecular techniques (PCR and DNA sequencing) for bacterial genome identification. The results of chemical characterization showed that cellulose and hemicellulose decreased after pretreatment, suggesting carbohydrate loss and formation of other products such as furfural, HMF, acetic acid and formic acid. FTIR spectra revealed similarity between untreated and pretreated material spectra, qualitatively evidencing that pretreatment was efficient in extracting hemicellulose and lignin. Peaks in the XRD diffractograms confirmed the removal of lignin and hemicellulose from the pretreated biomass. However, for the crystallinity index there was no significant change (73.25 and 73.70% for untreated and pretreated biomass, respectively). Gram staining of cellulolytic bacterial isolates revealed the presence of one Gram-positive encapsulated bacillus and three Gram-negative bacteria. The degradation activity of CMC revealed higher extracellular cellulase activity for the isolates INTB2, INTB3 and INTB4. For extracellular endoglucanase activity, the 4 isolates reported similar patterns of endoglucanase excretion, however, the INTB4 isolate reported the lowest extracellular activity (3.0 cm). The results of cellulase production through the INTB3 isolate showed to be more stable compared to the other isolates INTB1, INTB2, INTB4. As for purification, the specific activity for the INTB3 extract was 30.13 U/mg for INTB4 19, 97, INTB2 11,15 and INTB1 5,53 U/mg, after precipitation with ammonium sulfate. Native PAGE presented to the four isolates 3 protein bands corresponding to ~ 89, 58 and 48 kDa. In SDS-PAGE the enzyme extracts investigated (crude and precipitated) reflect multiple proteins detected in the gel and show that the enzymes presented several bands (between 150 and 17 kDa). The zymogram-CMC analysis exhibited cellulolytic activity, suggesting that the enzymes were able to hydrolyze sodium carboxymethylcellulose and have at least two sizes, ~ 89 and 58 kDa. The method applied for the cellulase isolation of the INTB3 isolate presented a single peak of cellulolytic activity and through 12% SDS-PAGE, 3 protein bands were observed around 113, 76, 52 kDa. In the present study, of the microorganisms isolated for enzymatic production, INTB3 was identified as the main producer of cellulase, having the highest specific activity after partial purification (30.13 U/mg). A purificação da endoglucanase de INTB3 através da cromatografia

por exclusão de tamanho triplicou (96,25 UI/mL) a atividade específica celulolítica. Mais distante outros estudos tornam-se importantes para dar continuidade a estes experimentos para obter alto rendimento de produção, purificação e aplicação de celulase.

Key-Words: Cellulolytic bacteria. Cellulase. Purification. *Diatraea saccharalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Aspectos fisiológicos decorrentes da infecção por larvas de <i>Diatraea</i> sp. em plantas de cana-de-açúcar.....	23
Figura 2	Estrutura tridimensional de uma endoglucanase de <i>Streptomyces lividans</i> CelB2 em complexo com 2-desoxi-2-fluorocelotriose.....	26
Figura 3	Estrutura tridimensional de uma endo-beta-1,4-glucanase específica de xiloglucano (GH5) da microflora intestinal ruminal, em complexo com glicose e [tris(hydroxymethyl)aminomethane].....	27
Figura 4	Estrutura tridimensional da beta glicosidade 1A de <i>Thermogota neapolitana</i>	28
Figura 5	Padrões dominantes para sistemas de enzimas microbianas degradantes da parede celular vegetal.....	32
Figura 6	Arquitetura de celulosoma microbiano.....	35
Figura 7	Expressão de celulases e celulosomas em bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.....	36
Figura 8	Principais enzimas do complexo enzimático celulolítico.....	37
Figura 9	Esquema do mecanismo da biodegradação da celulose.....	38
Figura 10	Reação de inversão na hidrólise da celulose por celulases.....	40
Figura 11	Reação de retenção na hidrólise da celulose por celulases.....	40
Figura 12	Resumo gráfico das etapas experimentais.....	45
Figura 13	Espectros FTIR para o BCA <i>in natura</i> , e BCA pré-tratado por explosão a vapor a 120 °C.....	65
Figura 14	Difratogramas das amostras de bagaço da cana-de-açúcar: (A) pré-tratado com água a 120 °C, (B) não tratado.....	66
Figura 15	Coloração de Gram das bactérias celulolíticas isoladas do intestino das larvas de <i>Diatraeae saccharalis</i> C2, C3, KP e PA.....	69
Figura 16	Atividade celulolítica das bactérias simbióticas em meio salino mínimo suplementado com CMC, incubados a 30 °C por 10 dias.....	70
Figura 17	Medição da atividade de endo-glucanase extracelular dos isolados bacterianos.....	71
Figura 18	Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB2.....	72
Figura 19	Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB4.....	73
Figura 20	Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB3.....	74
Figura 21	Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB1.....	75
Figura 22	Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do isolado INTB2.....	77
Figura 23	Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do isolado INTB4.....	78
Figura 24	Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do isolado INTB3.....	79
Figura 25	Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do isolado INTB1.....	80
Figura 26	Taxa de crescimento em adição de etanol.....	82

Figura 27	PAGE Nativa de enzimas celulases dos isolados bacterianos de <i>Diatraeae saccharalis</i> coradas com Azul de Coomassie brilhante R-250.....	84
Figura 28	SDS-PAGE de enzima celulase dos isolados bacterianos de <i>Diatraeae saccharalis</i> em gel corado com Azul de Coomassie brilhante R-250.....	85
Figura 29	Análise de zimograma da enzima celulase dos isolados INTB1, INTB2, INTB3 e INTB4 isolados do trato intestinal das larvas de <i>Diatraeae saccharalis</i>	87
Figura 30	Isolamento da endoglucanase do isolado INTB3 através de cromatografia por exclusão de tamanho em Sephacryl S-100.....	88
Figura 31	SDS-PAGE (corado com Azul de Coomassie brilhante R-250) a 12% da endoglucanase purificada do isolado INTB3.....	89
Figura 32	Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA extraído dos isolados bacterianos em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra.....	90
Figura 33	Eletroforese em gel de agarose 1,5% para amplificação do DNA dos isolados bacterianos por Reação em Cadeia de Polimerase em tampão TAE 1x e corado com <i>SybrGreen</i> adicionado no preparo da amostra.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Bactérias produtoras de enzimas celulolíticas	31
Tabela 2	Composição do meio de cultura ágar salino mínimo para isolamento de bactérias capazes de crescer com restrição de fonte de carbono.....	51
Tabela 3	Composição do meio de cultura ágar salino mínimo suplementado com CMC.....	51
Tabela 4	Composição do meio de cultura LB suplementado com CMC.....	52
Tabela 5	Composição do meio de cultura salino mínimo para atividade extracelular CMCase.....	53
Tabela 6	Composição do caldo mínimo – preparação do inóculo para produção de celulases.....	54
Tabela 7	Composição do gel de resolução 15%.....	57
Tabela 8	Composição do gel de resolução 8%.....	58
Tabela 9	Composição do meio de cultura nutriente líquido para multiplicação da massa celular bacteriana.....	59
Tabela 10	Composição e rendimento sólido do BCA não tratado e pré-tratado por explosão a vapor em autoclave a 120 °C.....	61
Tabela 11	Componentes liberados na fração líquida da caracterização química do BCA não-tratado e pré-tratado.....	63
Tabela 12	Intensidade relativa das bandas no espectro infravermelho de diferentes grupos na amostra de BCA não tratado e pré-tratado.....	64
Tabela 13	Índice Cristalino do bagaço da cana-de-açúcar Não-tratado e Pré-tratado.....	67
Tabela 14	Precipitação do extrato proteico de celulase com (NH ₄) ₂ SO ₄ a 80% de saturação.....	83

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Determinação de lignina insolúvel na fração sólida.....	47
Equação 2	Determinação de lignina solúvel na fração líquida.....	47
Equação 3	Determinação de proteínas.....	49
Equação 4	Determinação de cinzas totais.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BCA	Bagaço da cana-de-açúcar
C	Carbono
°C	Graus Celsius
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios-X
EV	Explosão de Vapor
FTIR	Espectroscopia de infravermelho de transformação de Fourier
g	Grama
GH	Hidrolase de glicosídeos
g.L	Grama litros
H	Hidrogênio
HMF	Hidroximetilfurfural
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
KBr	Brometo de Potássio
kDa	Kilodalton
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mili litros
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mol	Molar
M	Molar
Mv	Mili volts
NaOH	Hidróxido de sódio
PAGE	Poliacrilamida de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDB	Banco de dados de proteína

pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
rDNA	DNA ribossomal
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
sp	Espécie
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
µl	Microlitros
µm	Micrômetro
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral.....	22
2.2	Específicos.....	22
3	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	A cultura da cana-de-açúcar.....	23
3.1.1	Evolução multifuncional das celulases microbianas.....	24
3.1.1.1	Potencial enzimático da microflora intestinal de insetos.....	24
3.1.1.2	Celulase endógena do intestino de insetos.....	28
3.1.1.3	Produção, caracterização e função das celulases microbianas...	30
3.1.1.4	Espécies de bactérias produtoras de celulase e degradantes de celulose.....	30
3.2	Mecanismo de degradação de celulose por bactérias celulolíticas.....	32
3.2.1	Estrutura e funções do celulosossoma.....	34
3.2.2	Características da parede celular e transporte de proteínas de bactérias Celulolíticas.....	35
3.2.3	Estrutura e funções das celulases.....	37
3.2.3.1	Diferenças entre exoglucanases e endoglucanases.....	39
3.2.3.2	Reações de retenção e inversão na hidrólise da celulose.....	39
3.3	Desafios e perspectivas na produção de celulases bacterianas.....	41
3.4	Aplicações industriais de celulase microbiana.....	42
4.4.1	Indústria de Alimentos.....	42
3.4.2	Indústrias têxtil.....	43
3.4.3	Indústria de papel.....	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Caracterização química do bagaço da cana-de-açúcar.	46
4.1.1	Hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar.....	46
4.1.1.1	Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar.....	46
4.1.1.2	Determinação de lignina insolúvel na fração sólida.....	46
4.1.1.3	Determinação de lignina solúvel na fração líquida.....	47
4.1.1.4	Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF	47
4.1.1.5	Determinação de proteínas.....	48
4.1.1.6	Determinação de cinzas totais.....	49
4.2	Caracterização morfológica do bagaço da cana-de-açúcar não trato e pré-tratado.....	49
4.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho médio por Transformada de Fourier.....	49
4.2.2	Difração de Raios-X	49
4.3	Obtenção das larvas de <i>Diatraeae saccharalis</i> , isolamento de bactérias celulolíticas e produção de celulases.....	50
4.3.1	Larvas de <i>Diatraeae saccharalis</i>	50
4.3.2	Preparo do inóculo para seleção de microrganismo.....	50
4.3.3	Isolamento de bactérias celulolíticas do intestino de larvas <i>Diatraea Saccharalis</i>	51

4.4	Determinação da atividade total de celulase.....	52
4.4.1	Determinação da atividade extracelular CMCase.....	52
4.4.1.1	Desenvolvimento do inóculo para atividade enzimática em meio líquido.....	53
4.4.1.1.1	Quantificação da atividade de celulase produzida em meio líquido.....	54
4.5	Efeito de diferentes parâmetros na produção de celulase.....	55
4.5.1	Efeito de diferentes pH na produção de celulase.....	55
4.5.2	Efeito da concentração de substrato na produção de celulase.....	55
4.6	Determinação da taxa de crescimento em etanol.....	55
4.7	Etapas de purificação de celulase.....	56
4.7.1	Precipitação salina.....	56
4.7.1.1	Purificação da endoglucanase.....	56
4.7.1.1.1	Quantificação de proteínas.....	56
4.7.1.1.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida de Dodecil Sulfato de Sódio	57
4.7.1.1.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida nativa.....	57
4.7.1.1.4	Análise zimográfica-CMC.....	58
4.8	Análise molecular das bactérias celulolíticas.....	58
4.8.1	Extração do DNA das bactérias celulolíticas.....	58
4.8.1.1	Eletroforese do DNA extraído.....	60
4.8.1.1.1	Reação de polimerase em cadeia	60
4.9	Análise estatística.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1	Caracterização química do bagaço da cana-de-açúcar.....	61
5.1.1	Caracterização morfológica.....	64
5.1.1.1	Espectroscopia infravermelha de transformação de Fourier.....	64
5.1.1.2	Difração de raio-X.....	66
5.2	Isolamento e caracterização de bactérias celulolíticas.....	68
5.2.1	Isolamento de bactérias celulolíticas da flora intestinal das larvas de <i>Diatraeae saccharalis</i>	68
5.3	Avaliação de diferentes parâmetros para produção de celulases.....	72
5.3.1	Efeito da produção de celulase em meio líquido sob diferentes pH.....	72
5.3.2	Efeito da produção de celulase em meio líquido sob diferentes concentrações de substrato (p/v) em pH 6,0.....	76
5.3.3	Teste de tolerância a etanol.....	81
5.4	Purificação de celulase dos isolados bacterianos.....	83
5.4.1	Determinação de isoformas e peso molecular.....	83
5.5	Análise molecular dos isolados celulolíticos.....	89
6	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos para produção de celulases com alta atividade específica é um desafio para a biotecnologia industrial. Indústrias emergentes do segmento de mercado biotecnológico estão aumentando rapidamente com frequência e exigem enzimas com bom desempenho. Entre elas, as indústrias de bebidas (GALANTE et al., 1998; SUKUMARAN et al., 2005; SINGH et al., 2007; BAMFORTH, 2009), têxtil (SHAH, 2013) e biocombustível (SRIVASTAVA et al., 2018) correspondem a uma parcela significativa na economia mundial a cada ano.

Embora as celulases comerciais tenham melhorado significativamente na última década, o mesmo não aconteceu com as celulases produzidas em laboratórios de pesquisa. Haja vista a grande dificuldade em isolar microrganismos produtores de enzimas com alta atividade específica. Por esse motivo, esse tipo de enzima permanece um fator de alto custo em processos que exigem seu uso (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). As celulases apresentam um obstáculo em países como o Brasil, onde não existe produção industrial de celulases. Sabe-se que a produção industrial da enzima celulase é realizada pela fermentação de cepas altamente desenvolvidas de fungos por empresas americanas e europeias (ELLILÄ et al., 2017).

A maioria das bactérias são capazes de tolerar condições extremas (por ex., elevadas temperaturas e pH) e representam uma excelente fonte para a busca e isolamento de novas enzimas celulolíticas. Uma vez que possuem grande facilidade de manutenção, rápido crescimento, fácil manipulação genômica. Com esse objetivo, várias pesquisas têm se voltado para investigação de sistemas naturais que decompõem eficientemente polímeros da parede celular de plantas. Os artrópodes são parte de um filo de animais invertebrados que conseguem sobreviver em vários nichos ecológicos e seu trato digestivo possui uma microbiota variada que vai desde fungos, bactérias até protozoários que são potenciais para obtenção de novas enzimas celulolíticas. Vários trabalhos vêm relatando uma variedade de celulases e hemicelulases que foram isoladas do trato digestivo de insetos tais como *Apriona germari*, *Dendroctonus armandi*, *Eucryptorrhynchus chinensis* (WATANABE; TOKUDA, 2010; SU et al., 2013).

Com o passar dos anos, as áreas agricultáveis de cana-de-açúcar sofreram expressivo aumento e, como resultado, tornaram-se susceptíveis a infestações por

pragas. Uma potencial ameaça que leva substancialmente a perda da produtividade dessa cultura no Brasil é a broca da cana-de-açúcar, devido sua frequência e danos potenciais (BOTELHO et al., 1999). Duas espécies de broca com incidência no Brasil tem chamado atenção por serem as principais pragas que atacam a cana-de-açúcar, causando significativas perdas econômicas: *Diatraea saccharalis* Fabricius (1974) e *Diatraea flavipennella* Box (1931) (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A *Diatraea saccharalis* possui distribuição em todo o Brasil, enquanto a *Diatraea flavipennella* é restrita ao estado de Alagoas e estados vizinhos da região Nordeste (FREITAS, 2006). Devido à rápida capacidade destas espécies em alimentar-se de cana-de-açúcar, existe a possibilidade das espécies deste gênero terem desenvolvido um consórcio com bactérias simbiotes capazes de produzir celulasas com alta eficiência de hidrólise dos tecidos de cana-de-açúcar (DANTUR et al., 2015).

A broca da cana-de-açúcar causa sérios danos às culturas de *Saccharum officinarum*. Estas larvas desenvolvem-se dentro do tecido vegetal, onde se alimentam até a maturidade. Com relação a sua dieta lignocelulolítica, hipotetizamos que a flora bacteriana de seu trato digestório contribui para a degradação da celulose. Neste sentido, apesar dos esforços direcionados para desenvolver a produção de enzimas celulolíticas, ainda não há um sistema de produção totalmente viável a partir dos microrganismos clássicos.

Uma das principais razões para execução deste estudo é avaliar o sistema celulolítico de bactérias colonizadoras do intestino das larvas de *Diatraea saccharalis* visando propor uma alternativa de uso no processo de hidrólise enzimática das fibras da biomassa vegetal. Devido a isto, esta pesquisa centra-se nos seguintes objetivos:

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a presença de bactérias celulolíticas isoladas do trato intestinal de larvas de *Diatraea saccharalis* para produção de enzimas celulolíticas.

2.2 Específicos

Isolar estirpes de bactérias produtoras de enzimas celulolíticas do intestino de larvas *Diatraea saccharalis* capazes de crescer em carboximetilcelulose e bagaço da cana-de-açúcar como única fonte de carbono.

Realizar caracterização físico-química e morfológica da biomassa do bagaço da cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento por explosão a vapor a fim de entender as diferentes respostas.

Estabelecer as condições de produção das enzimas celulolíticas.

Determinar a atividade catalítica das celulasas, atividade extracelular das endoglucanases produzidas pelas bactérias celulolíticas.

Purificar e caracterizar a celulase da bactéria celulolítica com maior atividade catalítica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura industrial de grande valor econômico principalmente nos países do subcontinente América do Sul. O sucesso econômico desta cultura está relacionado ao seu uso não só para o abastecimento de alimentos, mas também para a produção de biocombustível (MOLNÁR et al., 2016; DAVOLOS et al., 2015). O plantio desta cultura é realizado há séculos para produção de açúcar e etanol e através desta tecnologia incentivaram-se vários programas de melhoramento genético a fim de se obter outras variedades. Por muito tempo, o açúcar era uma especialidade de alto valor. Com o passar do tempo, se tornou uma das calorias de alimentos mais acessíveis devido à redução do custo na sua produção (LEAL et al., 2013).

Em contraste, os cultivares de cana-de-açúcar tem sofrido constantes ataques através das larvas de *Diatraea*, causando perdas significativas do rendimento em muitas áreas de plantio (HUANG; LEONARD; ANDOW, 2007), uma vez que a *Diatraea* produz galerias nas plantas de cana-de-açúcar (Figura 1) completando o seu desenvolvimento e levando a morte dos tecidos vegetais (DAVOLOS et al., 2015; MOLNÁR et al., 2016).

Figura 1 – Aspectos fisiológicos decorrentes da infecção por larvas de *Diatraea sp.* em plantas de cana-de-açúcar. 1A) Larvas de *Diatraea sp.* hospedando a cavidade interna dos tecidos vegetais da cana-de-açúcar; 1B) Morte dos tecidos vegetais causada pelo parasitismo por *Diatraea*.



Fonte: Autor, 2019.

Conhecida como broca da cana-de-açúcar, a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) é originária do hemisfério ocidental e ocorre entre as regiões do sul dos Estados Unidos até as Antilhas, e da América Central até Argentina (Figura 1). Este inseto por muitos anos vem sendo considerado uma das maiores pragas da cana-de-açúcar no continente sul-americano (MACEDO; MACEDO, 2004). No Brasil, sua distribuição se dá em todas as regiões produtoras da cana-de-açúcar, com predominância do Sudeste e Nordeste, no nordeste, pode-se destacar os estados de Alagoas e Pernambuco (SIMÕES et al., 2015).

No Brasil, as larvas de *Diatraea saccharalis* têm causado grandes preocupações aos produtores de cana-de-açúcar, uma vez que se adaptaram bem as condições climáticas do país. Esta questão ganha mais sentido quando se observa que, diferente do que ocorre nos Estados Unidos, aqui no Brasil é improvável a mudança na preferência do hospedeiro por outra cultura, haja vista a alta distribuição e produção da cana-de-açúcar (GIRÓN-PÉREZ et al., 2014). A cultura em questão trata-se de uma monocultura que apresenta uma longa duração para produção, e isso faz dela uma planta vulnerável ao estabelecimento de determinadas pragas, como é o caso da *Diatraea saccharalis* (MOLNÁR et al., 2016). Deste modo, torna-se necessário conhecer os aspectos evolutivos que levaram ao sucesso desses predadores as culturas de cana-de-açúcar, uma vez que esta praga traz grandes prejuízos com perdas econômicas significativas.

3.1.1 Evolução multifuncional das celulases microbianas

3.1.1.1 Potencial enzimático da microflora intestinal de insetos

Os artrópodes fazem parte de um dos grupos de animais mais abundantes na natureza. Isso se deve tanto a sua diversidade quanto a sua capacidade de sobreviver em distintos nichos ecológicos. Acredita-se que no trato intestinal dos insetos contenha 10 vezes mais microrganismos do que o seu número de célula e 100 vezes mais genes microbianos do que os genes de animais (RAJAGOPAL, 2009).

Os microrganismos do trato digestório dos insetos são adquiridos tanto pelo ambiente como pela dieta e, a partir disso, passam a desempenhar papel importante na digestão e no metabolismo. Um pequeno número de simbioses é transmitido de forma vertical e a relação de simbiose é mutuamente essencial (SHIGENOBU et al.,

(2000) *apud* KRISHNAN et al., (2014). No entanto, para que consigam se estabelecer, as bactérias encontradas no intestino passam por um processo de seleção que é dependente da composição química, pH, disponibilidade de oxigênio e tempo de retenção do bolo alimentar (LEE et al., 2013).

Na relação ecológica de simbiose destaca-se o comportamento de nutrição, uma vez que os microrganismos fornecem nutrientes escassos ou os que não estejam disponíveis na dieta dos insetos (ENGEL; MORAN, 2013). Nessa dinâmica, as enzimas hidrolíticas fazem parte dos principais metabólitos bioativos de grande importância biotecnológica (BERASATEGUI et al., 2016), que inclui principalmente a biotransformação da celulose em açúcares simples no intestino médio dos insetos (DOUGLAS, 2009).

Para se estabelecer e sobreviver na natureza através de uma dieta restrita em matéria sólida vegetal, os herbívoros tiveram que utilizar enzimas capazes de degradar a parede celular das plantas e utilizar os polímeros de celulose e hemicelulose como fonte de energia. Geralmente em insetos herbívoros, as enzimas celulolíticas são produzidas por microrganismos simbióticos associados ao trato intestinal do animal. Estas enzimas atuam de forma sinérgica para destruir completamente os polissacarídeos em oligômeros e monômeros disponibilizando desta forma, a energia necessária às funções vitais, ou ainda atuam degradando a parede celular vegetal o suficiente para fornecer acesso ao citoplasma digerível (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012). Este mecanismo é facilmente percebido em animais que se alimentam de folhas, uma vez que a dieta não exige altas quantidades de celulose (SHELOMI; HECKEL; PAUCHET, 2016).

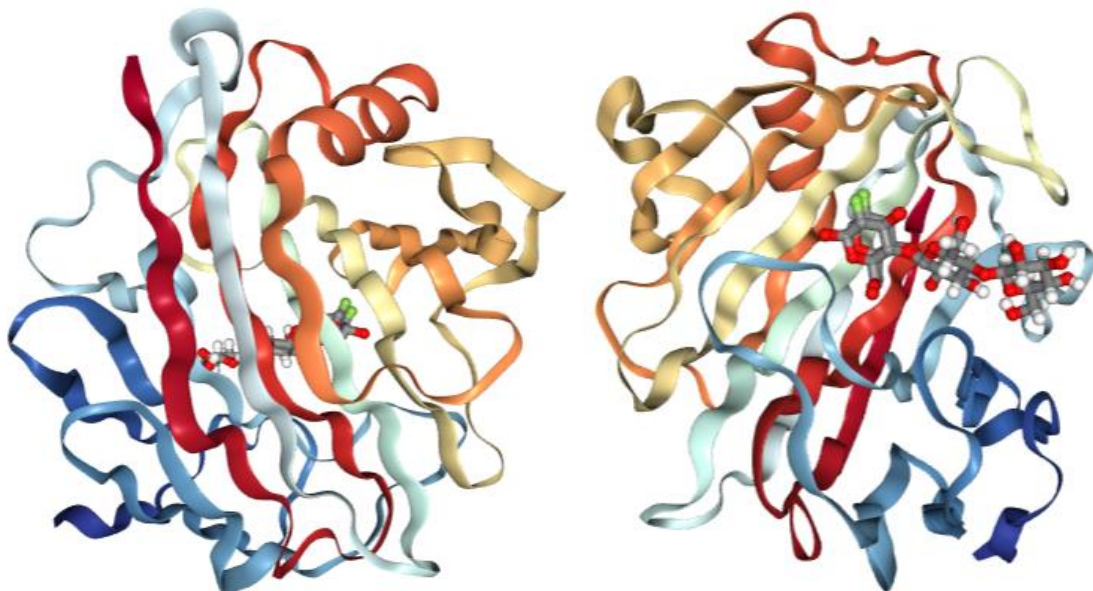
Dentre as enzimas degradantes da parede celular vegetal, a mais estudada é a hidrolase de glicosídeos da família 9 (GH9), produzida por microrganismos celulolíticos. Acredita-se que essa classe de enzimas esteve presente no antepassado na vida metazoária, tendo sido encontrada em genomas de animais moluscos e tunicados (DAVISON; BLAXTER, 2005). Por outro lado, numa perspectiva mais recente os cientistas tem discutido a possibilidade da produção endógena de celulasas independente de microrganismos intestinais, especialmente em invertebrados (LO; TOKUDA; WATANABE, 2011; FISCHER; OSTAFE; TWYMAN, 2013).

A triagem de insetos herbívoros tem mostrado a presença de pelo menos um gene da família GH9 (FISCHER; OSTAFE; TWYMAN, 2013). No sequenciamento

genômico de cupins foi relatado até quatro genes de celulases (TERRAPON et al., 2014). Em insetos *Coleoptera* foram reportados a presença de GH5 endógeno, GH45 e GH48 (PAUCHET et al., 2010; KIRSCH et al., 2012), os quais foram adquiridos através de microrganismos em sucessivos eventos horizontais de transferência de genes (FISCHER; OSTAFE; TWYMAN, 2013).

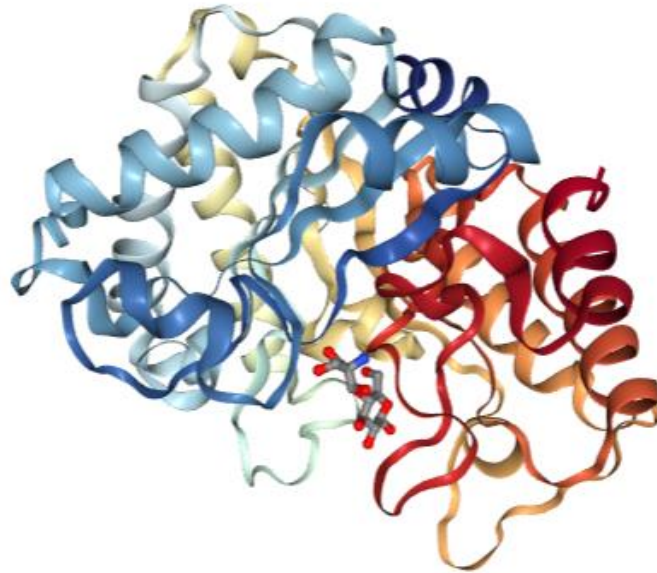
As GH9 são apontadas quase exclusivamente como endo- β -1,4-glicanases (Código *Protein Data Bank* - PDB: 3.2.1.4, Figura 2), ativas sobre carboximetilcelulose (CMC) e celulose amorfa, embora algumas delas possam apresentar atividade xiloglicanase (endo- β -1,4-xyloglicanase) em vez de celulase (PDB: 3.2.1.151, Figura 3, LOMBARD et al., 2014). Relata-se ainda, que as GH9 microbianas que degradam resíduos celulolíticos e hemicelulolíticos são raras e muitas vezes demonstram baixa atividade específica (ECKERT et al., 2003). Ademais, estas podem estar presentes em complexos multi-enzimáticos ou em outras famílias de GH, como por exemplo, GH44 xiloglicanolítico (HIRANO et al., 2013) e GH5 mananolítico (SU; MACKIE; CANN, 2012).

Figura 2 - Estrutura tridimensional de uma endoglicanase de *Streptomyces lividans* CelB2 em complexo com 2-desoxi-2-fluorocelotriose. A resolução atômica (1.2 Å) mostra duas espécies distintas no cristal.



Fonte: Sulzenbacher et al., 1999.

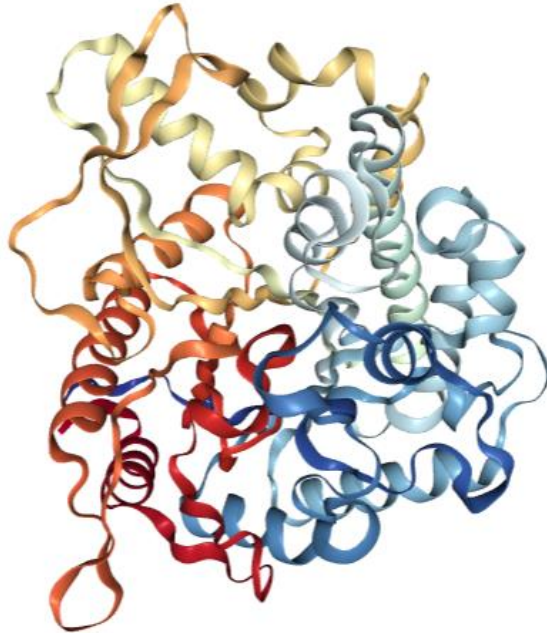
Figura 3 - Estrutura tridimensional de uma endo-beta-1,4-glucanase específica de xiloglucano (GH5) da microflora ruminal, em complexo com glicose e [tris(hydroxymethyl)aminomethane]. A GH5 é uma das maiores famílias de hidrolases de glicosídeos com pelo menos 20 atividades distintas.



Fonte: Dos Santos et al., 2015.

Ao que tudo indica, existe até o momento um único registro bifuncional de atividade celulolítica e hemicelulolítica descrito para uma enzima da família GH9 encontrada em cupim (*Reticulitermes flavipes*), cuja capacidade catalítica mostrou produção de grandes quantidades de resíduos de glicose a partir da xilana quando combinada com a GH1 β -glicosidade (PDB: 3.2.1.21, Figura 4) (SCHARF et al., 2011). Entretanto, este achado tornou-se alvo de questionamentos, uma vez que a xilana não possui glicose e por este não ser um produto conhecido da atividade da xilanase (BIELY; PUCHART, 2006; PASTOR et al., 2007). No entanto, a falta de evidências não descarta a função bifuncional da enzima, uma vez que ainda não foram analisados todos os clados vivos produtores de celulasas (SHELOMI; HECKEL; PAUCHET, 2016).

Figura 4 - Estrutura tridimensional da beta glicosidade 1A de *Thermotoga neapolitana*. A glicosidade em questão catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas terminais ligada ao oxigênio na extremidade não redutora de glicosídeos/oligossacarídeos. A enzima com esta especificidade possui potencial na conversão de material lignocelulósico.



Fonte: Kulkarni et al., 2017.

Ademais, relata-se que a biodisponibilização de glicose a partir de xilana é possivelmente uma contaminação do material com compostos contendo glicose. Pois, mesmo que a xilana contenha cadeias laterais de glicose, estas estariam anexadas nas posições 2-O e 3-O dos resíduos de xilose, e, portanto, não poderiam ser removidas pela hidrólise da endo- β -1,4-ligase GH9 (SHELOMI; HECKEL; PAUCHET, 2016).

Segundo Brennan et al. (2004), as xilanases atuam sobre a digestibilidade da xilose libertando os açúcares de pentose, na forma de polissacarídeos, oligossacarídeos ou monômeros. Sendo assim, a atividade da xilanase deve ser mensurada pela detecção da redução de xilose. Além disto, as xiloglucanases são conhecidas principalmente por ser sintetizadas a partir de bactérias e fungos (BENKO et al., 2008; CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012).

3.1.1.2 Celulase endógena do intestino de insetos

Há pouco mais de duas décadas levantou-se a teoria de que as celulases poderiam ser produzidas de forma endógena em insetos que se alimentam de

madeira, visto que esses animais necessitam de enzimas especializadas para degradar o complexo lignocelulose e utilizar seus açúcares na forma de nutrientes (WATANABE; TOKUDA, 2010a). Nesta perspectiva, o estudo da função e presença das celulasas em metazoários estão sendo reavaliado, uma vez que as celulasas, em particular as endoglucanases da família de hidrolase de glicosídeo GH9, têm sido encontradas em vários grupos de organismos vivos (DAVISON; BLAXTER, 2005).

Achados recentes mostraram a presença de celulasas de GH9 em gafanhotos (ADEMOLU; IDOWU, 2016), celulasas de GH45 e xilanases GH11 em besouros folívoros (PAUCHET et al., 2010; KIRSCH et al., 2012; PAUCHET; HECKEL, 2013). Insetos do gênero *Lepidoptera* foram mencionados como possíveis portadores de celulasas, pois, nos tecidos de seu intestino médio foi encontrada a expressão de beta-1,3-glucanase, uma proteína bacteriana de reconhecimento de lipopolissacarídeos. Embora esta não seja reconhecida como uma celulase pode apresentar função de digestão (PAUCHET et al., 2009).

A investigação da produção endógena de celulase em *Pheretima hilgendorfi* (minhoca) foi realizada no epitélio intestinal da região intermediária. Após sequenciamento dos aminoácidos da celulase, observou-se maior homologia para celulasas de invertebrados do que para as de bactérias pertencentes a família GH9. Os resultados deste estudo sugerem que a minhoca tem capacidade de produzir celulasas endógenas para a digestão de materiais celulolíticos (NOZAKI et al., 2009).

Um estudo com *Corbicula japonica* foi realizado para entender como o gene *CjCel9A* estaria envolvido fisiologicamente na decomposição da celulose. A associação das análises de *Western Blot*, hibridização *in situ* e análises de imunohistoquímicas reportaram que a produção e secreção de celulasas neste molusco acontece exclusivamente no epitélio dos túbulos digestivos na glândula digestiva. Isto indica que a celulase endógena de *C. japonica* é produzida na glândula digestiva e transportada para o estilo cristalino para atuar como componente da digestão através da sua atividade celulolítica (SAKAMOTO et al., 2008).

Outras identificações e caracterização de celulasas foram realizadas em moluscos da espécie *Lophotrochozoa* (LI et al., 2009) e em ouriço-do-mar (NISHIDA et al., 2007). Segundo Park et al. 2017, a função fisiológica das celulasas de origem animal se enquadra em duas principais funções, sendo elas: i) função digestiva para

hidrólise da celulose ingerida, conforme relatam Nakashima et al. (2002) e Nozaki et al., (2009). ii) Em parasitas, a atividade da celulase está baseada em processos invasivos no hospedeiro (HU et al., 2013).

Alta atividade de celulase endo- β -1,4-glucanase foi identificada no intestino médio anterior do inseto *Eurycantha calcarata*. Análises de espectrometria de massa revelaram a presença de dois genes endoglucanase (EcEG1 e EcEG2). Após isolamento e purificação destas enzimas, foi obtida alta homologia com as endoglucanases da família de hidrolases glicosídicas (GH9), sugerindo de fato uma origem endógena da enzima (SHELOMI; WATANABE; ARAKAWA, 2014).

A fim de se ampliar novas descobertas de celulases endógenas, a capacidade bioquímica para digestão de celulose do caranguejo *Parasesarma erythodactyla* serviu de motivação para identificar uma endo- β -1,4-endoglucanase no hepatopâncreas deste artrópode. Esta celulase apresentou homologia elevada em comparação as GH9, onde sugere-se que a produção de celulase seja endógena, por ser uma característica comum entre os caranguejos detritívoros de manguezais (BUJ; LEE, 2014).

Observa-se que a presença de enzimas celulolíticas endógenas em diferentes grupos de animais promove a digestão da celulose presente nas cargas orgânicas dos ecossistemas os quais estão inseridos. Ademais, pode-se, a partir destes mecanismos, promover a transição do metabolismo da celulose no meio ambiente para os processos biotecnológicos que envolvem a produção de insumos químicos e energia. Independente da forma como estas enzimas são secretadas, Ueda et al. (2014) relatam que o objetivo é sempre o mesmo, sua aplicação associada a produção de biocombustíveis.

3.1.1.3 Produção, caracterização e função das celulases microbianas

3.1.1.4 Espécies de bactérias produtoras de celulases e degradantes de celulose

As celulases são enzimas que estão envolvidas em muitas estratégias de sobrevivência de vários microrganismos. Em bactérias, por exemplo, relata-se que metade delas possui genes que expressam a síntese destas enzimas para degradar a biomassa vegetal a que estão expostas, servindo-se desta forma das frações de carboidratos presente no material celulósico (KOECK et al., 2014). Na Tabela 1, estão descritas algumas espécies de bactérias produtoras deste complexo enzimático.

Tabela 1 – Bactérias produtoras de enzimas celulolíticas

Microrganismos	Enzima	Autor
<i>Thermotoga neapolitana</i>	β -glicosidase	Kulkarni et al., 2017
<i>Bacillus megaterium</i> <i>Paracoccus yeei</i>	CMCase	Ferbiyanto; Rusmana; Raffiudin, 2015
<i>Bacillus cereus aquático</i>	CMCase	Chantarasiri, 2015
<i>Bacillus vallismortisi</i>	Celulase	Gaur; Tiwari, 2015
<i>Cellulosibacter alkalithermophilus</i>	CMCase; celobiohidrolase, β -glicosidade	Baramée et al., 2015
<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella variicola</i>		
<i>Bacillus pumilus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	CMCase	Yang et al., 2014
<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	Celulase	Brunecky et al., 2013b
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Exoglucanase	Tran; I; Lin, 2013
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	Celulase	Asha et al., 2012
<i>Paenibacillus</i>	β -1,4-endoglucanase	Adlakha et al., 2011
<i>Cellulomonas sp.</i>	Endoglucanase	Yin; HuanG; Lin, 2010
<i>Fervidobacterium nodosum</i>	Endoglucanase	Zheng et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i>	Celulase	Prakash et al., 2009

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Relata-se que cerca da metade das bactérias que possui genes para as celulasas sejam saprófitas, mecanismo de decomposição que faz delas microrganismos eficientes na degradação da biomassa vegetal (MEDIE et al., 2012). Embora essa vantagem seja importante na natureza e prospectada para os processos industriais, acredita-se que poucas delas possuam mais de 3 genes para celulasas. Haja vista que a biotransformação da celulose em monômeros de glicose é dependente de pelo menos 3 enzimas celulolíticas (endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidade), isto se torna um desafio para hidrolisar a porção amorfa e cristalina da celulose (SCHWARZ; ZVERLOV; BAHL, 2004).

A maioria das bactérias celulolíticas excretam β -glucanases geralmente na forma de endoglucanases, que clivam as ligações β -1,4-glicosídicas formando β -glucanos solúveis ou carboximetilcelulose (CMC). No entanto, a despolimerização

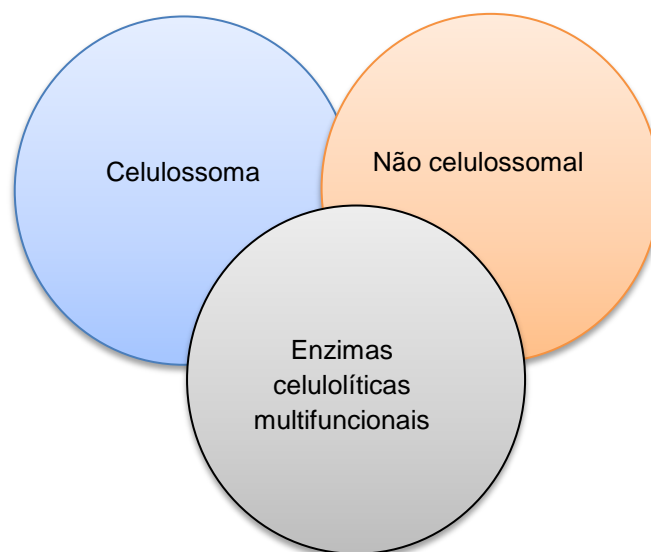
da CMC não significa a total degradação da celulose, indica apenas uma condição prévia de conversão da forma cristalina da celulose (MEDIE et al., 2012).

Os microrganismos realmente capazes de produzir enzimas celulolíticas são cada vez mais explorados para a produção de energia sustentável, uma vez que conseguem degradar material vegetal, produzir produtos químicos desejados através de processos de fermentação da biomassa, possuindo um complexo multi-enzimático possível de ser utilizado em processos industriais e biotecnológicos (KOECK et al., 2014).

3.2 Mecanismos de degradação da celulose por bactérias celulolíticas

Na natureza foram encontrados três padrões dominantes (Figura 5) que ocorrem no sistema de enzimas microbianas envolvidas na degradação da parede celular das plantas na natureza (KOECK et al., 2014).

Figura 5 - Padrões dominantes para sistemas de enzimas microbianas degradantes da parede celular vegetal



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Estas três configurações (Figura 5) representam o sistema de celulasas microbianas. Além disto, as enzimas celulosômicas e não-celulosômicas podem estar ligadas a superfície celular da bactéria por interações covalentes e não covalentes (HIMMEL et al., 2010).

O que se sabe a respeito do complexo enzimático celulosossomal é que os seus componentes estão ligados através de interações do tipo proteína-proteína de alta afinidade. Estas, por sua vez, são altamente específicas entre o domínio *dockerins* nos componentes enzimáticos e nos módulos da proteína coesina de andaime (CipA). Esta última estrutura contém múltiplos módulos de coesão permitindo que diferentes enzimas se agreguem ao complexo celulolítico de forma aleatória (KOECK et al., 2014).

Além dos módulos de coesão, existem relatos de que a proteína CipA possui módulos de ligação ao carboidrato do tipo CBM3 (módulo de ligação à celulose), que liga o complexo celulolítico a superfície da celulose cristalina. Nessas circunstâncias, ocorre alta densidade do complexo enzimático na superfície do substrato próximo ao local de ligação, aumentando a atividade enzimática sob a celulose. Dessa maneira, ocorre a absorção direta de produtos da degradação de celulose e celo-dextrina por parte da célula bacteriana.

Há relatos da presença de um segundo sistema de celulase em *Clostridium thermocellum*, embora considerado uma suposição que foi identificado na sequência genômica deste microrganismo, sendo formado por endocelulase e exocelulase que atuam juntas na etapa de hidrólise (BERGER et al., 2007). Por se tratar de enzimas solúveis, estas podem contribuir na hidrólise da celulose a uma maior distância da superfície celular (ZVERLOV; SCHWARZ, 2008).

Os dois componentes do sistema de celulase de *Clostridium thermocellum* fazem parte do modelo mais simples capaz de degradar a celulose cristalina, visto que o processo hidrolítico ocorre de forma lenta e incompleta. Dada esta característica, está mais favorável para hidrólise de hemicelulose (ZVERLOV; SCHWARZ, 2008). Dois genes foram reportados com atividade em celulose e β -1,4-glucana solúvel, Cel9Z e Cel48Y, respectivamente. Sendo eles responsáveis pela digestão da celulose por atuarem em sinergismo (RIEDEL; RITTER; BRONNENMEIER, 1997).

As enzimas classificadas como CelZ são do tipo endoglucanase e exoglucanase, já CelY refere-se a exoglucanase com atividade de celodextrina-hidrolase (BRONNENMEIER, K; STAUDENBAUER, W, 1993; BRONNENMEIER; RÜCKNAGEL; STAUDENBAUER, 1991). Tanto CelZ como CelY são celulases livres que interagem com o substrato através de módulos de ligação de carboidratos (CBM) (HIMMEL et al., 2010).

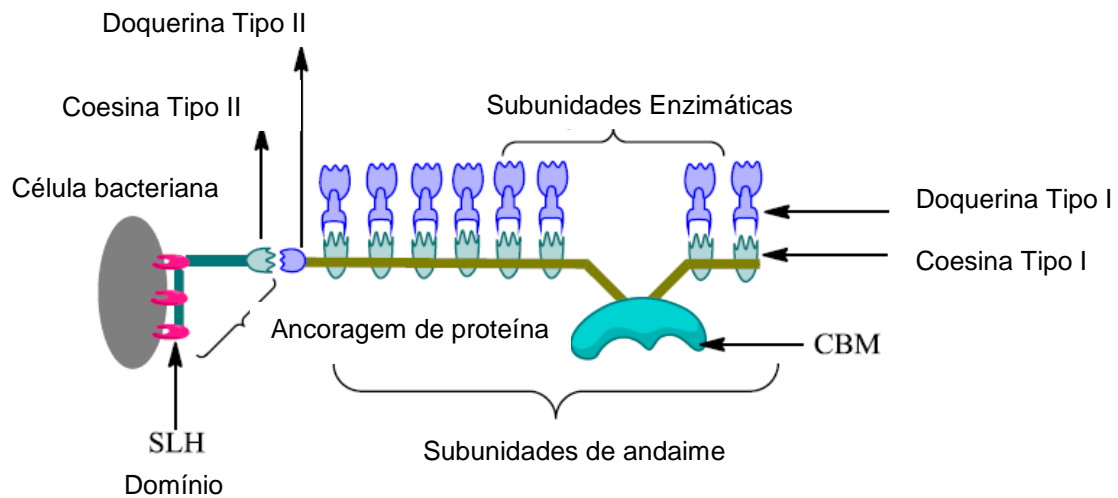
Neste terceiro mecanismo estão presentes as enzimas multifuncionais que possuem dois ou mais sítios catalíticos, aptos a realizar a digestibilidade dos componentes da parede celular dos vegetais. Nestas enzimas geralmente estão presentes vários módulos de ligação da celulose, fazendo delas proteínas multi-modular de alto peso molecular (MORAIS et al., 2012).

As enzimas celulolíticas multifuncionais geralmente estão livres, ou podem estar incorporadas nos celulosomas. Ademais, elas podem se apresentar de quatro tipos diferentes: sistema celulase-celulase, hemicelulase-hemicelulase, hemicelulase-celulase e hemicelulase-esterase de carboidratos. Quanto sua estrutura, podem ter dois módulos catalíticos e pelo menos um CBM (HIMMEL et al., 2010). Dentre as enzimas multifuncionais desta classe, a CelA corresponde ao sistema celulase-celulase, cuja especificidade foi encontrada para degradar de forma rápida e eficiente este substrato (KOECK et al., 2014).

3.2.1 Estrutura e funções do celulosoma

No celulosoma a proteína de andaime serve de ancoragem para as subunidades enzimáticas. Nesta proteína também são encontradas coesinas e doquerinas. As doquerinas de um lado se ligam as subunidades enzimáticas e do outro, as coesinas (Figura 6). Embora essa arquitetura seja altamente específica, o arranjo celulósico não se apresenta uniforme em todas as espécies de bactérias. Essa heterogeneidade se deve a variação específica das espécies nas propriedades andaime, ocasionando diferentes composições de celulosomas. Ademais, os andaimes podem conter entre 6 a 9 diferentes coesinas. A depender das subunidades enzimáticas, existe a possibilidade de se formar diferentes celulosomas dentro de um único microrganismo (DOI; KOSUGI, 2004).

Figura 6 – Arquitetura do celulosoma microbiano



Fonte: Adaptado de Juturu; Wu, 2014.

Conforme se observa na ilustração esquemática, a estrutura celulosoma se liga a superfície da célula bacteriana através de proteínas de ancoragem (domínio SLH). Em adição, a presença de CBM contribui na ancoragem da estrutura ao substrato. A co-estrutura da proteína andaime não enzimática fornece suporte as subunidades enzimáticas celulosômicas. Já as subunidades de enzimas, se ligam as coesinas através da doquerina (JUTURU; WU, 2014; DESVAUX, 2005).

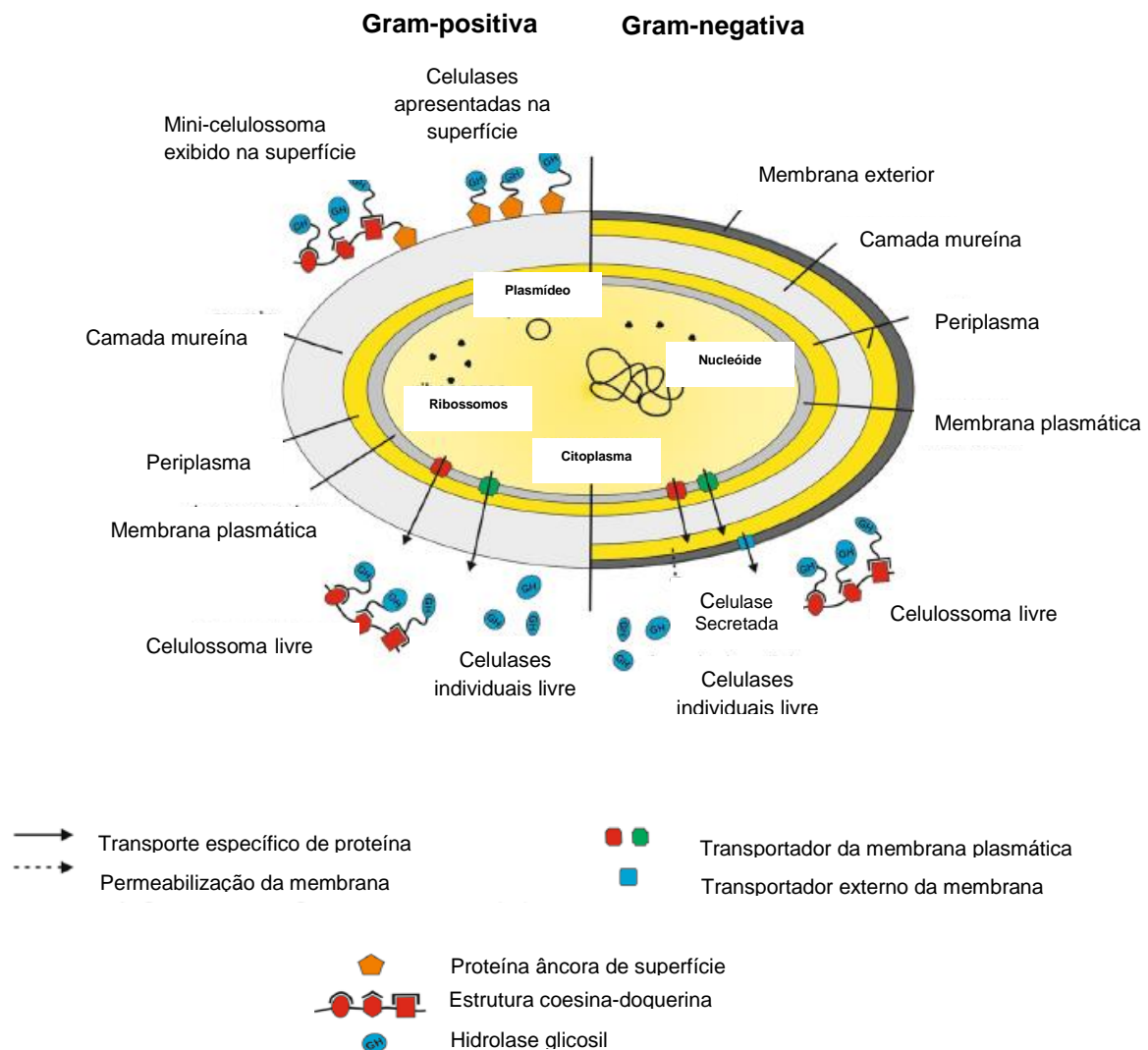
Diante do exposto, é possível verificar que toda a estrutura do celulosoma corrobora com um arsenal de atividades que facilita a adesão direta e de forma específica ao substrato, além de causar competição entre outros microrganismos do mesmo nicho ecológico. Em adição, a proximidade da célula com celulose, permite maior absorção de celo-oligossacarídeos solúveis, antes mesmo que alcancem o meio extracelular. Neste sentido, o celulosoma permite maior liberação de açúcares quando as enzimas operam em sinergismo, pois, o processamento da celulose ocorre ao longo de toda a cadeia através das celulasas (DESVAUX, 2005).

3.2.2 Características da parede celular e transporte de proteínas de bactérias celulolíticas

Muitas bactérias são utilizadas para a expressão de celulasas. Nelas, encontram-se diferenças na estrutura da parede celular, nos compartimentos subcelulares que direcionam as proteínas bem como na forma de excreção proteica (LAMBERTZ et al., 2014). Além destas disparidades, as bactérias são classificadas como Gram-positivas e Gram-negativas, que apresentam características específicas

a nível de parede celular. Sabe-se até a presente data, que as bactérias Gram-positiva operam o mecanismo de secreção de proteínas integrando os caminhos do transportador de arginina e secreção, instrumento envolvido na excreção de proteínas através da membrana citoplasmática (DESVAUX et al., 2009). Por outro lado, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana acessória que limita o transporte extracelular de proteínas. Logo, as bactérias gram-negativas lidam com uma diversidade de rotas para a secreção de celulases (YAN; WU, 2013). Estas diferenças encontram-se ilustradas na Figura 7.

Figura 7 – Expressão de celulases e celulosomas em bactérias Gram-positiva e Gram-negativas



Fonte: Adaptado de (LAMBERTZ et al., 2014)

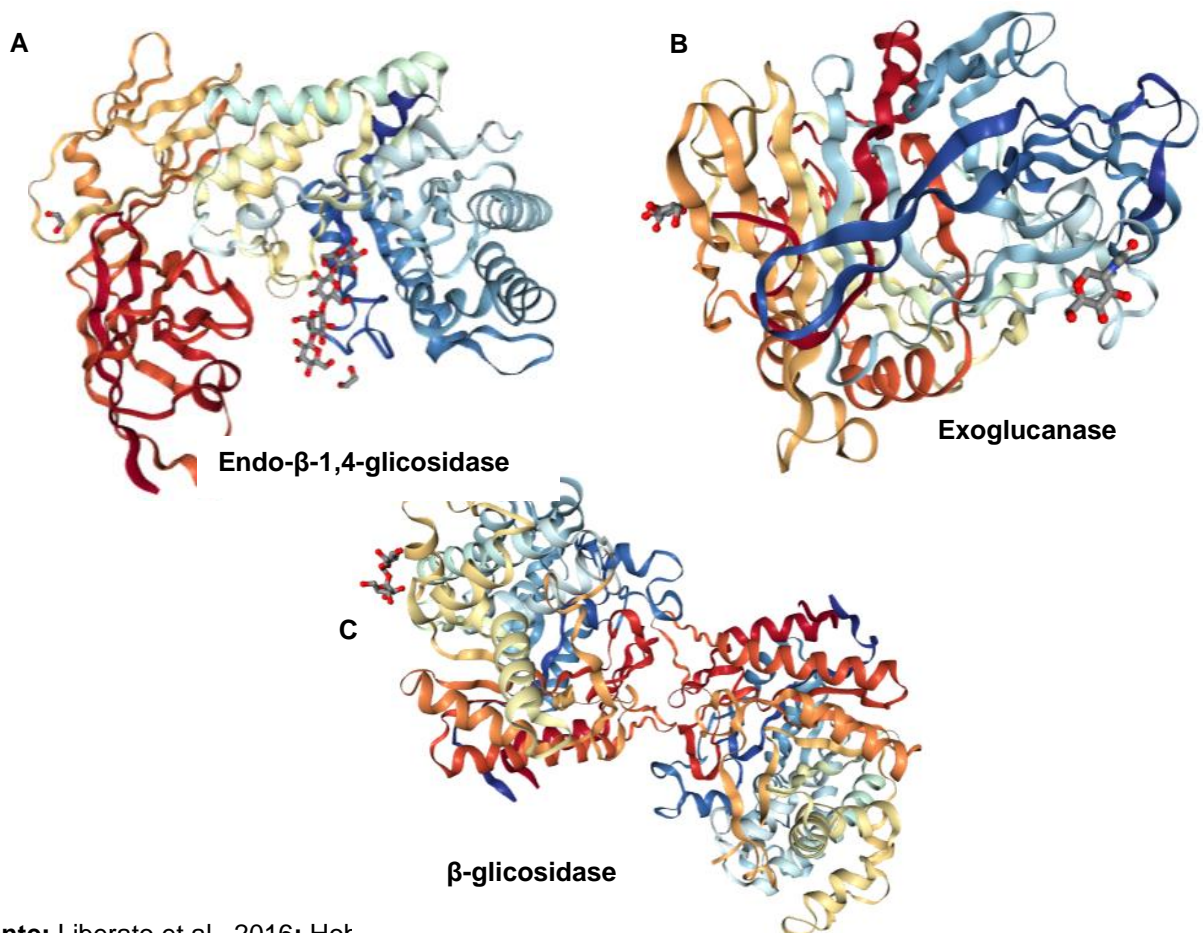
Conforme se observa na Figura 7, as celulases expressas são direcionadas para o citoplasma bacteriano onde serão armazenadas ou encaminhadas ao

periplasma através dos transportadores específicos de proteínas. Como mencionado anteriormente, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, esta sendo espessa, restringe o transporte de proteínas extracelulares, sendo assim, a secreção de proteínas acontece por intermédio de um transportador de proteína específico, denominado permeabilização da membrana. Nas células bacterianas Gram-positivas, a secreção é mais eficiente, as enzimas são secretadas prontamente, quer seja individual ou sob a forma de celulosoma, ou ainda, ancoradas na superfície da célula (LAMBERTZ et al., 2014).

3.2.3 Estrutura e funções das celulasas

As principais enzimas celulolíticas investigadas para a hidrólise da celulose são as endoglucanases (PDB: 3.2.1.4), exoglucanases (PDB: 3.2.1.176) e β -glicosidades (PDB: 3.2.1.21). As conformações tridimensionais destas proteínas podem ser visualizadas na Figura 8.

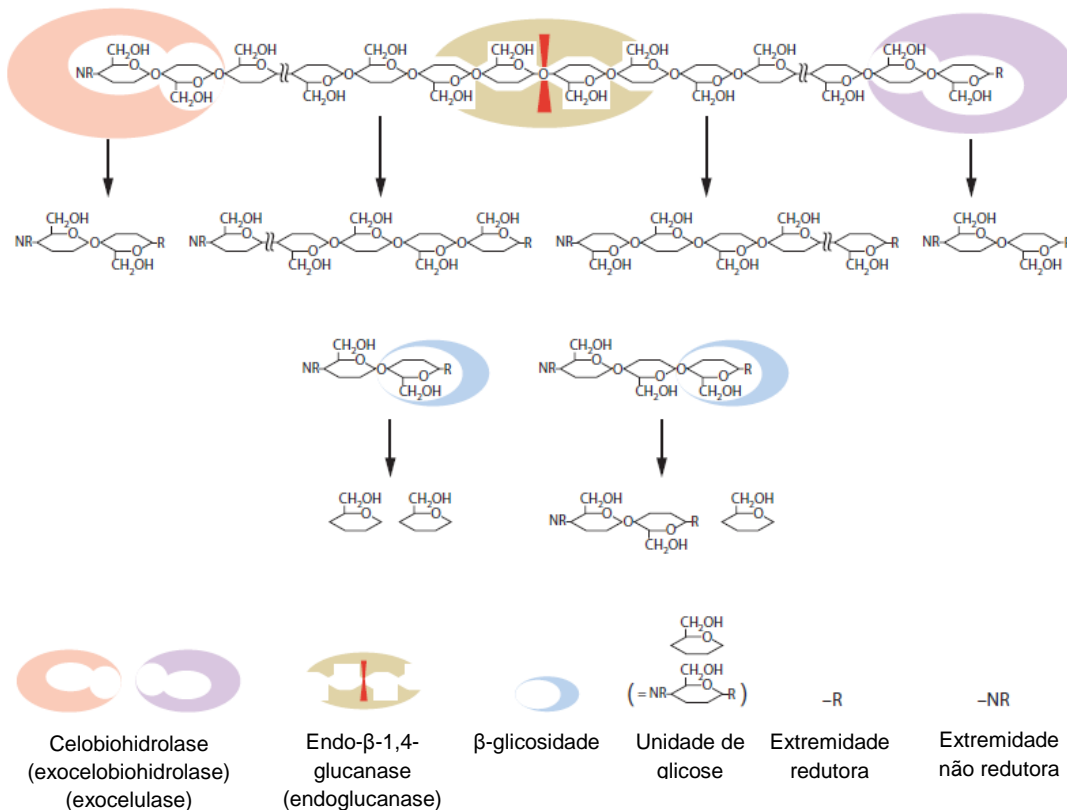
Figura 8 - Principais enzimas do complexo enzimático celulolítico. Onde: A) mostra a estrutura cristal de um tri-modular GH5 (subfamília 4) de endo- β -1,4-glucanase. B) exoglucanase e C) β -glicosidade



Fonte: Liberato et al., 2016; Hok ...

As endoglucanases clivam as ligações glicosídicas da região amorfa da celulose gerando oligômeros de cadeia longa de extremidade não redutora e redutora. Em seguida, estes oligômeros serão alvo de ataque de outras enzimas denominadas exoglucanases (também conhecidas por celobiohidrolases), estas por sua vez irão clivar a celulose gerando pequenas cadeias de oligossacarídeos, o que dará origem a inúmeras estruturas de celobiose. Logo depois, as unidades de celobiose serão hidrolisadas a glicose pela enzima β -glicosidade, estágio final que completa a hidrólise enzimática (JUTURU; WU, 2014). Esta cascata de reações enzimáticas pode ser visualizada na Figura 9.

Figura 9 – Esquema do mecanismo da biodegradação da celulose.



Fonte: Adaptado de Watanabe; Tokuda, 2010b.

As exoglucanases [1,4- β -D-glicano celobiohidrolases (PDB: 3.2.1.91) ou 1,4- β -D-glicano glucohidrolases (PDB: 3.2.1.74)], agem nos terminais não redutores e redutores das regiões amorfas da celulose, causando sua hidrólise e liberação de celobioses ou glicose, respectivamente. Mais à frente, as β -glicosidases (1-4- β -D-glicosidases ou celobiasas) hidrolisam a celobiose (ou celo-oligômeros) gerando monômeros de glicose a partir das regiões não redutoras. A partir das

exoglucanases é formada a celobiose, embora a maioria das endoglucanases também a produzam, assim como pequenas quantidades de glicose e celotriose (JUTURU; WU, 2014; WATANABE; TOKUDA, 2010b).

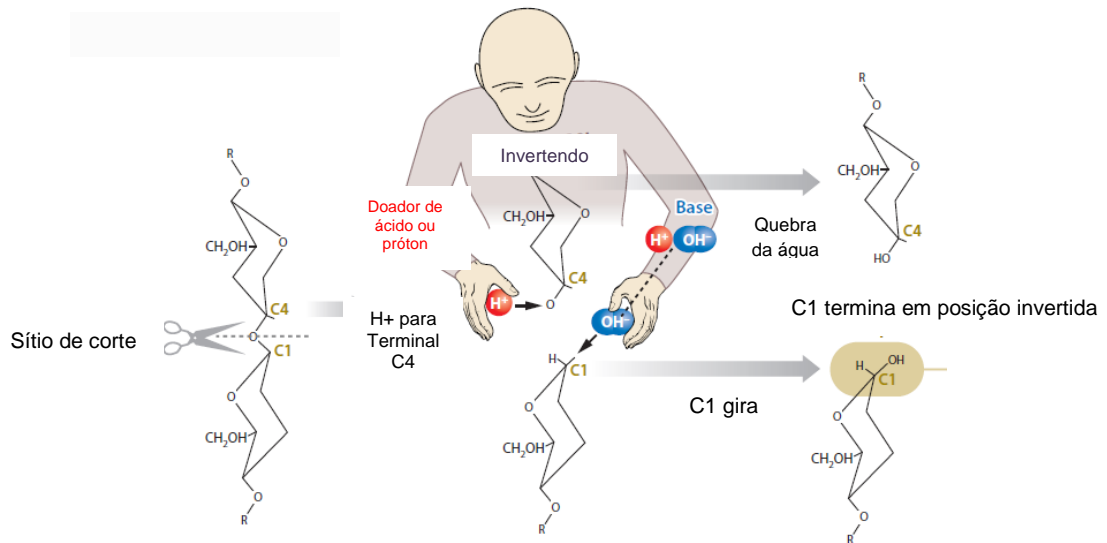
3.2.3.1 Diferenças entre exoglucanases e endoglucanases

Tratando-se da performance, as duas enzimas possuem a mesma função, que é a hidrólise das ligações glicosídicas da cadeia de celulose. Estruturalmente, o local de ligação da celulose com a enzima acontece na região de *loop*. No entanto, para as exoglucanases essa região é mais longa e o túnel que se forma finalizam os resíduos catalíticos. Normalmente, os substratos alcançam o sítio catalítico após contato com o túnel. As endoglucanase possuem regiões de *loop* mais curta e isto faz com que a fenda de ligação seja mais aberta facilitando o acesso do substrato ao sítio catalítico (UBHAYASEKERA et al., 2005).

3.2.3.2 Reações de retenção e inversão na hidrólise da celulose

Dependendo da forma estrutural, as enzimas celulolíticas podem gerar reações de retenção e inversão na hidrólise da celulose. Dois grupos carboxílicos presentes no centro catalítico destas enzimas são responsáveis por hidrolisar as ligações β -1,4 das cadeias de celulose. Na enzima que catalisa reação de inversão, um grupo carboxílico doa um próton ao terminal C4 no local da hidrólise. No outro grupo carboxílico, ocorre atração e assim ganha H^+ da molécula de água, em seguida, o íon hidroxila produzido é doado para o terminal C1. Esta cascata de reações enzimáticas altera a conformação do novo carbono anomérico (terminal C4) a partir da conformação da ligação β -1,4 mesmo antes da hidrólise (Figura 10).

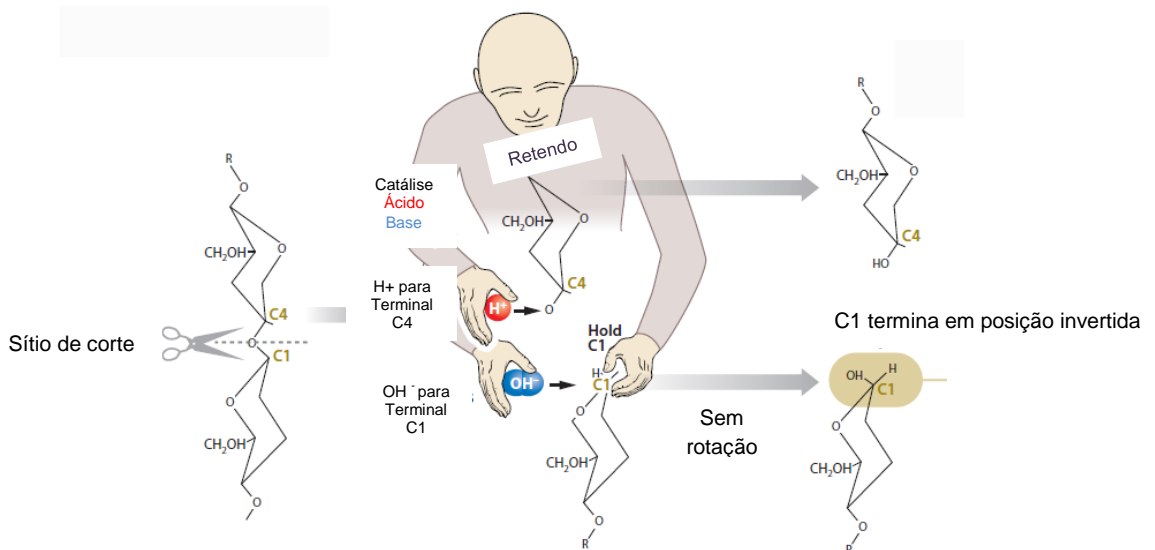
Figura 10 – Reação de inversão na hidrólise da celulose por celulasas



Fonte: Adaptado de Watanabe; Tokuda (2010b).

Quando a enzima realiza catálise de retenção, o grupo carboxílico doa um H^+ ao terminal C4 produzindo um íon hidroxílico formado a partir de uma molécula de água, e agora fará parte do terminal C1. O outro grupo carboxílico do lado oposto, tende a ser ionizado e atrai prótons para o C1 no local de corte. No final desta reação, tem-se um carbono anomérico no terminal C4 mantendo a conformação original, conforme pode ser visto na Figura 11 (ZECHEL; WITHERS, 2000; WHITE; ROSE, 1997).

Figura 11 – Reação de retenção na hidrólise da celulose por celulasas



Fonte: Adaptado de (WATANABE; TOKUDA, 2010b)

3.3 Desafios e perspectivas na produção de celulases bacterianas

A busca por celulases tem aumentado significativamente, e este efeito é consequência das instabilidades do cenário político que resulta em aumento no preço do petróleo e seus derivados. Devido a isto, a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica ganha cada vez mais espaço, principalmente em países desenvolvidos que priorizam as questões ambientais. Outro fato bastante importante que deve ser considerado, é o cenário comercial, que tem apoiado veementemente as empresas produtoras de enzimas tais como Genecor e Novozymes. Estas empresas se consolidam fortemente com pesquisas inovadoras para fornecer ao mercado internacional coquetéis enzimáticos do complexo hemicelulósico para degradação da biomassa vegetal. Entretanto, os custos da tecnologia ainda se encontram onerosos o bastante para impedir a competição, por exemplo, do bioetanol celulósico com o bioetanol da cana-de-açúcar. Por esse motivo, torna-se cada vez mais urgente a bioprospecção de microrganismos produtores de novas celulases (KUHAD et al., 2016).

Os sistemas de expressão recombinante de celulases em bactérias mostraram-se difíceis ao ponto de expor uma série de desafios a serem superados (GARVEY et al., 2013). Embora existam estes entraves, observa-se que com o passar do tempo, houve progresso na expressão e manipulação de enzimas celulolíticas e do celulosoma bacteriano. Portanto, há relatos de que um conjunto homólogo de celulases de *Bacillus subtilis* foi complementado através da introdução de uma sequência heteróloga para codificação de celulase (MANABE et al., 2013; PAYNE et al., 2013; LIU; DU, 2012).

Outro avanço positivo foi relatado quando bactérias não-celulolíticas foram manipuladas geneticamente passando a produzir celulases, a saber, *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis*, e outros metabólitos secundários a partir da indução por substratos celulósicos como fonte de carbono (YAMADA; HASUNUMA; KONDO, 2013; BOKINSKY et al., 2011). Mesmo que esses mecanismos ainda não estejam consolidados, a possibilidade de manipular bactérias transformando-as em microrganismos celulolíticos, parece ser uma das perspectivas para o futuro (LA GRANGE; DEN HAAN; VAN ZYL, 2010).

A produção de proteínas recombinantes em hospedeiros heterólogos é restrita a miligramas e gramas por litro. Por isso, se faz necessário a adoção de outros métodos como a otimização de códons, seleção de cepas com altos níveis de

expressão, co-expressão de proteínas auxiliares, engenharia de organelas celulares e avaliação dos níveis de produção enzimática para incrementar a produtividade. Visto que quantidades suficientes de enzimas, produção em larga escala, reciclagem e reutilização de celulases, bem como a modelagem de celulases para aplicações industriais são essenciais (JUTURU; WU, 2014).

Por isto, é crucial para o futuro da biotecnologia da produção de celulases, a identificação de sistemas efetivos para expressão de celulase recombinante, uma vez que a produção destas enzimas ainda é um fator crítico na validação econômica, que serve de obstáculo ao estabelecimento de um sistema a nível industrial. O que se sabe, é que os pesquisadores estão usando abordagens da biologia molecular para superar as dificuldades na expressão heteróloga destas proteínas, como, por exemplo, o uso de diferentes promotores ou otimização de sequências para aumentar a produção de proteínas, assim como o uso de bactérias que fornecem modificação pós-tradução, permitindo maiores rendimentos. Outro fator importante, é a expressão de celulase de um único domínio para expressão de proteínas com altos rendimentos, que remove o problema dos baixos rendimentos devido ao dobramento incorreto ou em processamento (LAMBERTZ et al., 2014).

3.4 Aplicações industriais de celulase microbiana

Complexos enzimáticos formulados a base de celulase ou coquetéis mistos compostos de celulases e hemicelulases e outras enzimas são utilizados por diversas indústrias, incluindo as de biocombustíveis, alimentos, bebidas, papel, têxteis, farmacêutica e agrícola. A hidrólise da celulose mediada por essas enzimas resulta na disponibilização de açúcares que servem como substrato para produção de vários produtos de valor agregado com potencial comercial, como o bioetanol, ácidos orgânicos, açúcares e alimentos para animais (SINGH et al., 2016; SREEDHARAN et al., 2016).

3.4.1 Indústria de alimentos

Os coquetéis celulolíticos e a combinação destes com outras enzimas são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos. Como, por exemplo, na preparação de sucos de frutas e legumes, e produção de ração animal (MENENDEZ et al., 2015; SINGH et al., 2016). Na indústria de alimentos, celulases, hemicelulases e pectinases são utilizadas combinadas para promover o maceramento, melhorar o

desempenho do processo e reduzir a viscosidade dos néctares e purês de frutas como damasco, pêssigo, ameixa e mamão. Visto que facilita a extração e clarificação de sucos de frutas e verduras (MINUSSI et al., 2002; DE CARVALHO et al., 2008; KUHAD et al., 2011). Outras aplicações nas indústrias de alimentos também incluem a extração de compostos fenólicos do bagaço de uva (MEYER et al., 1998; MENENDEZ et al., 2015), redução do amargor de frutas cítricas para formulação de sucos com sabor e aroma melhorados (KUHAD et al., 2011; SREEDHARAN et al., 2016), bem como melhorar a textura, sabor e outras propriedades sensoriais de frutas e vegetais (MEYER et al., 1998; MENENDEZ et al., 2015).

Na indústria de alimentação animal, as celulasas são muito empregadas para formulação de dietas monogástrica, uma vez que melhoram a digestibilidade dos alimentos à base de cereais e conseqüentemente seu valor nutritivo pela incorporação dos carboidratos das fibras dos vegetais (HIMMEL et al., 1999; DHIMAN et al., 2002; BEAUCHEMIN et al., 2003). A exemplo disto, o *Bacillus subtilis* é utilizado para produção de celulasas para degradação da casca da soja com intuito de enriquecer seu valor nutricional para alimentação monogástrica de animais (WONGPUTTISIN et al., 2014; MENENDEZ et al., 2015). Nas indústrias de bebidas, tais como cerveja e vinho, as celulasas são empregadas durante o processo de fermentação para melhorar a qualidade e rendimento das bebidas. Essas enzimas, são responsáveis por reduzir a viscosidade do mosto para uma melhor filtrabilidade. Além de melhorar a propriedade sensorial (KUHAD et al., 2011).

3.4.2 Indústrias têxtil

Nesse segmento industrial, as celulasas são empregadas para proporcionar limpeza, polimento e acabamento do tecido. O meio como essas enzimas agem está relacionado com a remoção das impurezas do algodão cru, visto que essas enzimas participam diretamente da hidrólise dos componentes celulósicos de superfície, promovendo maior superfície de contato para outras enzimas atuarem nos componentes não celulósicos, tais como pectinases, proteases e lipases (SHAH, 2013; SINGH et al., 2016).

A utilização destas enzimas nos processos de produção têxtil é importante para redução das emissões de CO₂, além de economizar aproximadamente 20. 000

litros de água por tonelada de tecido produzido. Assim como diminui os danos aos tecidos provenientes de tratamentos químicos e poluição das águas (SHAH, 2013).

Ademais, as aplicações de celulases são vantajosas para melhoria da qualidade e cuidados com o tecido (KUHAD et al., 2011). Celulases microbianas são atualmente eficientes para remoção de corante em excesso, degradar extremidades de fibras salientes do tecido para estabelecer um acabamento melhorado e suavidade e aparência desbotada ao jeans (GALANTE; FORMANTICI, 2013; SREEDHARAN et al., 2016).

3.4.3 Indústrias de papel

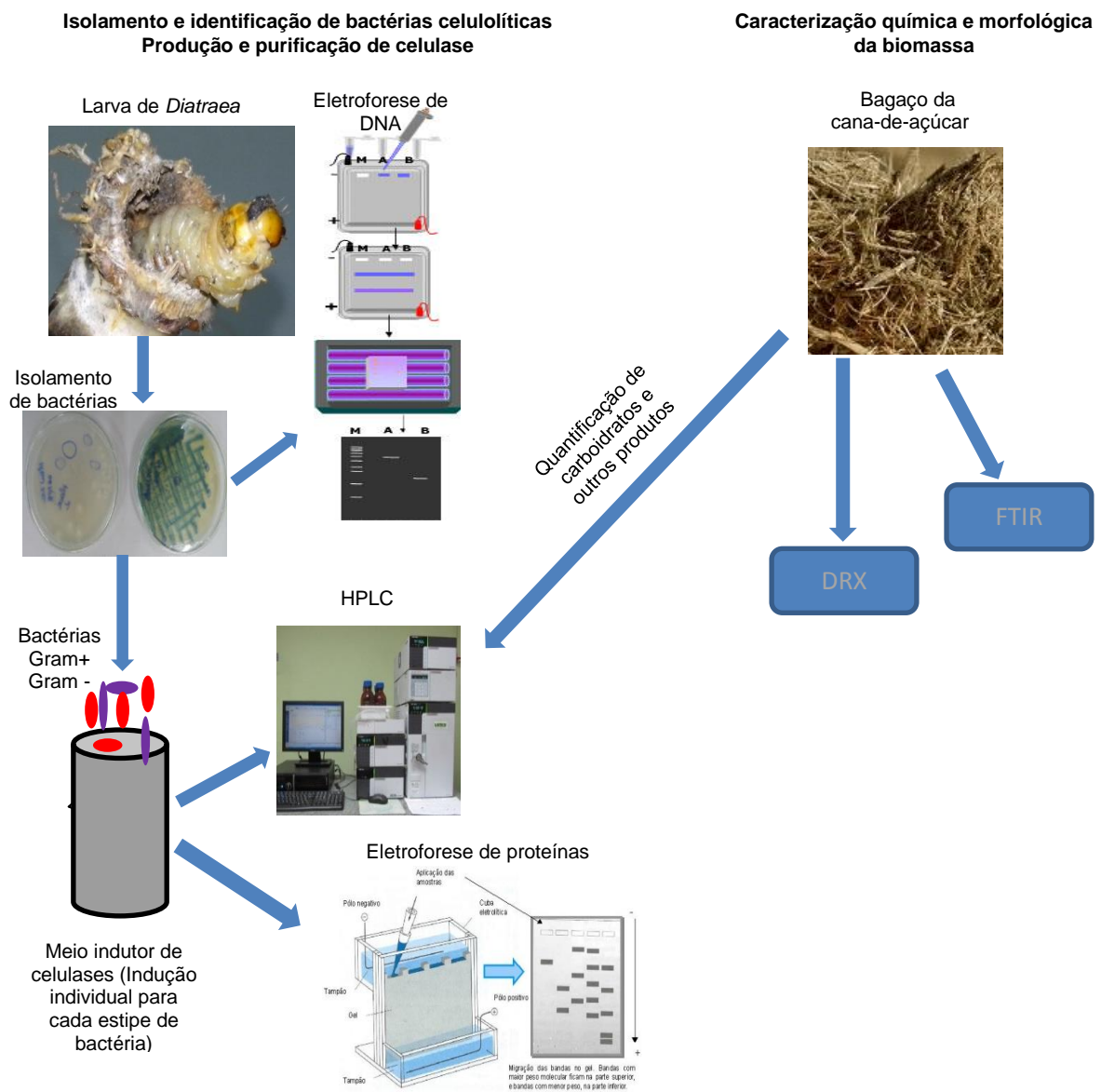
A reciclagem de papéis é de extrema importância para redução dos resíduos sólidos gerados durante o consumo de inúmeras atividades. Por outro lado, é intrinsecamente necessário para frear o desmatamento de florestas para fabricação de novos produtos de papel (JEFFRIES et al., 1994; LEE et al., 2007; IBARRA ET AL., 2012). A aplicação de celulases na produção de papel além de prevenir efeitos adversos no meio ambiente, proporciona a fabricação de papel biodegradável, bem como papel higiênico e cartões. Ademais, torna o processo econômico, por que promove economia energética e reduz o uso de consumo de aditivos branqueadores, como o cloro (KUHAD et al., 2011; SHWETA, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos seguintes laboratórios: Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia (LBE); Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA); Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM). Todos pertencentes à Universidade Federal de Alagoas – UFAL.

As etapas experimentais envolvidas no isolamento e identificação das bactérias celulolíticas, caracterização da biomassa, produção e purificação de celulase podem ser visualizadas na Figura 12.

Figura 12 – Resumo gráfico das etapas experimentais



4.1 Caracterização química do bagaço da cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado

4.1.1 Hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar com ácido sulfúrico

Amostras de 2 g do bagaço da cana-de-açúcar (cedidos pela usina Coruripe – AL) não-tratado e pré-tratado por explosão de vapor foram pesadas com precisão 0,1 mg e transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de ácido sulfúrico 72% v/v, sob constante agitação em banho termostaticado a 45 °C por 7 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas quantitativamente para erlenmeyers de 500 mL, onde teve-se o volume de 275 mL completado com água destilada. Os tubos foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 minutos a 121 °C. Passado o tempo de reação, realizou-se a descompressão da autoclave e esperou-se atingir a temperatura ambiente. Após filtração com papel de filtro, a fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve seu volume completado com água destilada. A solução foi utilizada para quantificação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel. A fração sólida foi seca em estufa a 45 °C para determinação da lignina insolúvel (GOUVEIA et al., 2009).

4.1.1.1 Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar

O pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar foi realizado sob o método de explosão de vapor (EV) em reator autoclave. Foram pesadas 10 gramas da biomassa, que foi suspensa em 90 mL de água destilada dentro de Erlenmeyers de 250 mL e posteriormente vedados com papel alumínio. Em seguida, os frascos foram colocados no reator autoclave por 45 minutos a 121°C em 1 atm. Transcorridos os 45 minutos de reação, desligou-se o reator e depressurizou-se imediatamente a válvula para retirada dos frascos. Por último, o material pré-tratado teve suas frações líquidas e sólidas separadas por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração sólida foi lavada com água destilada até que a água de lavagem atingisse pH 7 (SHARMA et al., 2007). Após lavagem, o bagaço pré-tratado foi acondicionado em estufa e mantido por 24 horas a 60°C (FAN; LEE; BEARDMORE, 1980). Depois disto, usado para caracterização química e hidrólise enzimática.

4.1.1.2 Determinação de lignina insolúvel na fração sólida

A determinação de lignina insolúvel foi conduzida de acordo com o método de Klasson modificado por Rocha et al. (1997). A fração sólida retida no papel filtro conforme descrita na sessão 4.1.1 foi lavada com 1500 mL de água destilada, transferida para pesa-filtros com secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa das amostras secas conforme a Equação 1 .

$$\% L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (1)$$

Onde: L_{Ki} = Lignina Klasson insolúvel; M_K = Massa de lignina insolúvel seca; M_C = massa de cinzas; M_A = massa da amostra seca.

4.1.1.3 Determinação de lignina solúvel na fração líquida

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 2 (ROCHA et al., 1997).

$$C_{lig} = 4.187 * 10^{-2} (A_T - A_{pd}) - 3.279 * 10^{-4} \quad (2)$$

Onde: C_{lig} = concentração de lignina solúvel, em g/L; A_T = absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; $A_{pd} = (C_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2)$ – absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) ϵ_1 e ϵ_2 são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L/g.cm.

4.1.1.4 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF

A determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (Phenomenex). A construção das curvas de calibração dos carboidratos foi realizada a partir de soluções padrões contendo celobiose, glicose, xilose e arabinose. A construção das curvas de calibração dos

ácidos orgânicos foi realizada através da injeção de soluções contendo ácido acético e ácido fórmico. As condições das análises foram: coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad); fase móvel: H_2SO_4 0,005 mol/L; vazão de 0,6 mL/min; temperatura do forno: 45 °C; em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD, empregando um detector de índice de refração Shimadzu modelo RID-6A. A determinação das concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) foi realizado baseado em curvas de calibração de furfural e hidroximetilfurfural determinadas por injeções de soluções padrões destes dois compostos. As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 μm e analisadas.

4.1.1.5 Determinação de proteínas

Para a determinação de proteína, aplicou-se a digestão da matéria orgânica, que consistiu em pesar 2 g de amostra e transferir para um tubo de Kjeldahl adicionando-se 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1:0,8 misturados e triturados em almofariz e pistilo). Na capela, adicionou-se ao tubo 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, o tubo foi acoplado ao digestor de Kjeldahl. A cada 15 min a temperatura foi elevada a 50 °C até que a mesma chegasse a 350 °C. Após as amostras apresentarem coloração incolor, desligou-se o aquecedor e aguardou-se 30 min para retirada dos tubos.

Na etapa de destilação do nitrogênio foram transferidos 25 mL de ácido bórico 4% para um Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 2 gotas de indicador vermelho de metila (0,25%) e 2 gotas de indicador verde de bromocresol (0,2%). O destilador de Kjeldahl foi preparado, mergulhando a saída do condensador no Erlenmeyer, na solução de ácido bórico. Em seguida, adicionou-se ao tubo de Kjeldahl, contendo a amostra digerida, água destilada até metade do tubo e 3 gotas de fenolftaleína 1%. O tubo foi acoplado ao destilador de Buchi. Após a solução estar aquecida, desligou-se o aquecimento e adicionou-se, lentamente, NaOH 40% até pH. A destilação foi feita até recolher 100 mL do destilado.

Na terceira e última etapa do procedimento realizou-se titulação do nitrogênio, que consistiu em titular a solução do Erlenmeyer utilizando o ácido clorídrico 0,1 N padronizado, até que surgisse o aparecimento da coloração avermelhada. O teor de proteína foi determinado pela Equação 3 (AOAC, 2012).

Proteína total (g/100g) =

$$\frac{V_{HCl} * f_{HCl} * N_{HCl} * F * 1,4}{P} \quad (3)$$

4.1.1.6 Determinação de cinzas totais

Na determinação de cinzas, inicialmente colocou-se o cadinho de porcelana em mufla a 550°C durante 1 hora para obtenção da tara (peso do cadinho sem sua carga) . Em seguida, o cadinho foi transferido para o dessecador por 30 minutos e pesado em balança analítica. Pesou-se 2 g da amostra neste recipiente previamente tarado. Por conseguinte, a amostra foi incinerada em mufla a 550°C durante 4 horas. Em seguida, a amostra foi retirada da mufla, transferida para o dessecador e esperou-se esfriar por 30 minutos. Pesou-se a amostra e calculou-se o teor de cinzas conforme a Equação 4 (AOAC, 2012).

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (4)$$

Onde: N = massa de cinzas (massa final da amostra menos a tara do cadinho); P = massa tomada da amostra

4.2 Caracterização morfológica do bagaço da cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado

4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho médio por Transformada de Fourier

Os espectros infravermelhos foram obtidos em um espectrofotômetro Varian 660-IR, por meio de um disco de KBr contendo 3% de amostras de bagaço da cana-de-açúcar (BCA) finamente trituradas. Inicialmente as amostras de BCA e o KBr foram pesados, para confecção das pastilhas. Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , a uma resolução de 4 cm^{-1} , 65 *scans* em modo de transmitância.

4.2.2 Difração de Raios-X (DRX)

A cristalinidade das fibras de celulose do bagaço da cana-de-açúcar foi avaliada por difração de raios-X por meio de um difractômetro Shimadzu XRD-6000

e radiação de $\text{CuK } \alpha$ com voltagem de 30 KV e corrente de 30 mA, com uma velocidade de cerca de 2 graus por minuto e escaneando em um ângulo (2θ) na faixa de 2° - 80° . Foi utilizado o método de pó para realização deste procedimento. O detector foi configurado para coletar dados de 2° por minutos com incremento de $0,02^\circ$ (PROVENCHER, 1982).

4.3 Obtenção das larvas de *Diatraea saccharalis*, isolamento de bactérias celulolíticas e produção de celulases

4.3.1 Larvas de *Diatraea saccharalis*

Foram utilizadas neste trabalho larvas de *Diatraea saccharalis* adquiridas dos cultivares de cana-de-açúcar da estação agroindustrial da Usina Coruripe – Fazenda Triunfo – Zona Rural, Município de Coruripe, pertencente ao Estado de Alagoas, Brasil.

4.3.2 Preparo do inóculo para seleção de microrganismos celulolíticos

Após coleta as larvas foram encaminhadas ao LTBA onde passaram por lavagem com água destilada estéril para remoção dos fragmentos de resíduos lignocelulósicos de cana-de-açúcar. Em seguida, foram esterilizadas com álcool a 70% e dessecadas assepticamente tendo seus intestinos retirados e triturados com lâminas de bisturi. Após obtenção do intestino em pequenos fragmentos, os mesmos foram homogeneizados em solução salina isotônica (9.9 mL), sendo a fração líquida desta solução inoculada em meio ágar salino mínimo suplementado com glicose e bagaço da cana-de-açúcar finamente moído como única fonte de carbono, conforme descrito na Tabela 2. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 3 dias (DANTUR et al., 2015).

Tabela 2 – Composição do meio de cultura ágar salino mínimo para isolamento de bactérias capazes de crescer com restrição de fonte de carbono

Nutriente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	1 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0.05 g.L ⁻¹
NaCl	3 g.L ⁻¹
CaCl ₂	0.05 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.L ⁻¹
Agar	20 g.L ⁻¹
Glicose	5 g.L ⁻¹
Bagaço de cana-de-açúcar	5 g.L ⁻¹
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Fonte: Dantur et al., 2015.

4.3.3 Isolamento de bactérias celulolíticas do intestino de larvas *Diatraea Saccharalis*

As colônias de bactérias capazes de crescer em celulose como fonte de carbono (sessão 4.3.2 – preparo do inóculo) foram isoladas em meio ágar salino mínimo suplementado com carboximetilcelulose (CMC) por 4 dias a 30 °C (Tabela 3), para confirmação da habilidade em degradar celulose (DANTUR et al., 2015).

Tabela 3 – Composição do meio de cultura ágar salino mínimo suplementado com CMC

Nutriente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	1 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0.05 g.L ⁻¹
NaCl	De c3 g.L ⁻¹
CaCl ₂	0.05 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.L ⁻¹
Agar	20 g.L ⁻¹
CMC	5 g.L ⁻¹
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Fonte: Dantur et al., 2015.

Transcorridos os 4 dias de incubação, as placas contendo as colônias de bactérias foram tratadas com solução aquosa vermelho do Congo 0,1% (w/v),

indicador específico da hidrólise da celulose, para identificar a zona de halo claro quando a CMC é degradada (TEATHER; WOOD, 1982).

4.4 Determinação da atividade total de celulase

Os isolados de bactérias com habilidade em degradar CMC foram adicionados em frascos de Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio líquido Luria-Bertani – LB (pH 7,0) suplementado com 5% de CMC (p/v) (Tabela 4) em incubadora shaker a 30 °C, 150 rpm, durante a noite.

Tabela 4 – Composição do meio de cultura LB suplementado com CMC

Nutriente	Quantidade
NaCl	10 g.L-1
Triptona	10 g.L-1
Extrato de levedura	5 g.L-1
CMC	5 g.L-1
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Fonte: Adaptado de Döbereiner johana, 1999.

Após 18 horas, 20 µL da suspensão de bactérias adaptadas em meio LB-CMC foram adicionados em *dropes* (3 cm) realizados em placas contendo meio ágar salino mínimo descrito previamente na sessão 4.3.2 (preparo do inóculo), e incubadas a 30 °C durante 14 dias. Após este período, as placas foram coradas com vermelho do Congo 0,1% (p/v) para determinar a degradação da celulose. As colônias de bactérias inoculadas nas placas que apresentaram uma zona clara ao redor dos *dropes* após tratamento com vermelho do Congo, foram selecionadas para os ensaios de atividade extracelular de CMCase (modificado de DÖBEREINER JOHANA, 1999).

4.4.1 Determinação da atividade extracelular CMCase

Da suspensão de bactérias crescidas em meio LB-CMC foram retirados 20 µL e adicionados em *dropes* de placas contendo meio ágar salino mínimo suplementando com 0,1% de glicose e 0,5% de CMC (p/v), conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição do meio de cultura salino mínimo para atividade extracelular CMCCase

Nutriente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	1 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0.05 g.L ⁻¹
NaCl	3 g.L ⁻¹
CaCl ₂	0.05 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.L ⁻¹
Agar	20 g.L ⁻¹
Glicose	1 g.L ⁻¹
CMC	5 g.L ⁻¹
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Fonte: Adaptado de Dantur et al., 2015.

As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 30 °C por 10 dias. Após o período de incubação, foram coradas com vermelho de Congo 0,1% (p/v), para visualização da atividade extracelular de endoglucanases e determinação do índice de atividade enzimática – EIA (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977; HUANG; SHENG; ZHANG, 2012; DANTUR et al., 2015).

4.4.1.1 Desenvolvimento do inóculo para atividade enzimática em meio líquido

Culturas puras foram individualmente conservadas em meio ágar salino mínimo suplementado com CMC (Tabela 5) e mantidas refrigeradas até o momento de uso. Para quantificação da atividade enzimática, as culturas puras foram previamente inoculadas em caldo mínimo (Tabela 6) e incubadas por 24 horas. Após incubação, o caldo de cultivo foi centrifugado a 8000 rpm por 20 minutos a 28 °C. Das células vegetativas remanescentes, foram retiradas 5 alçadas de 10 µL e usadas como fonte de inóculo para os ensaios de produção de celulases (IRE; EZEBUIRO; OGUGBUE, 2016).

Tabela 6 – Composição do caldo mínimo – preparação do inóculo para produção de celulases

Nutriente	Quantidade
K ₂ HPO ₄	7 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2 g.L ⁻¹
MgSO ₄	0.1 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	1 g.L ⁻¹
Citrato de sódio	0.5 g.L ⁻¹
Glicose	10 g.L ⁻¹
CMC	5 g.L ⁻¹
Água destilada (q.s.p)	1000 MI

Fonte: Adaptado de Ire; Ezebuio; Ogugbue, 2016.

4.4.1.1.1 Quantificação da atividade de celulase produzida em meio líquido

As células bacterianas adaptadas foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 250 mL de meio salino mínimo médio com diferentes fontes de carbono (CMC, celulose e bagaço da cana-de-açúcar) e incubados durante 14 dias em shaker a 150 rpm à 30 °C, com retirada de diferentes amostras (5, 10 e 14 dias após inoculação). As alíquotas foram centrifugadas primeiro a 5000 rpm por 15 minutos e depois por 20 minutos a 12000 rpm.

A quantificação da atividade da enzima endocelulolítica foi mensurada usando o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959). A reação constituiu da mistura de 500 µL de CMC 2% (p/v) em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5.0), ao qual foi adicionado anteriormente 500 µL do extrato enzimático. A mistura foi incubada em banho termostático a 40 °C por 20 minutos. Em seguida, os tubos da reação foram transferidos para banho termostático a 50 °C por diferentes pontos de tempo (2, 4, 6, 8, 10 minutos). Para parar a reação, foi adicionado 1000 mL do reagente DNS e a mistura foi aquecida a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, os tubos da reação foram colocados em banho de gelo por 5 minutos, depois, deixou-se a temperatura ambiente. As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 µmol de açúcares redutores (medido como glicose) por mL/min durante a reação (DANTUR et al., 2015).

4.5 Efeito de diferentes parâmetros na produção de celulase

4.5.1 Efeito de diferentes pH na produção de celulase

Para determinação do pH ótimo (pH que melhor induz o crescimento e produção enzimática), o inóculo bacteriano (sessão 4.3.6) foi adicionado em Erlenmeyers contendo 250 mL de meio salino mínimo médio com diferentes fontes de carbono (CMC, celulose e bagaço da cana-de-açúcar) e diferentes faixa de pH: 6, 7, 8 e 9 ajustados com HCl 0.1 M e NaOH 0.1 M. Os frascos foram incubados por 14 dias em shaker a 150 rpm à 30 °C, com retirada de diferentes amostras (5, 10 e 14 dias após inoculação). As alíquotas foram centrifugadas e a quantificação da atividade enzimática foi realizada conforme o item 4.3.7 (IRE; EZEBUIRO; OGUGBUE, 2016).

4.5.2 Efeito da concentração de substrato na produção de celulose

A produção ótima de celulase bacteriana foi determinada variando as concentrações de substrato no meio de cultura. Os meios de cultivos foram desenvolvidos em Erlenmeyers contendo 250 mL de meio salino mínimo médio e BCA nas concentrações 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, e 6% (p/v), suplementado com extrato de levedura 2% e triptona 2% (p/v). Aos frascos com caldo de cultivo foram inoculados posteriormente as bactérias obtidas a partir do caldo médio por 24 horas. O meio indutor de celulases foi mantido sob incubação a 32 °C em 150 rpm por 14 dias. Alíquotas foram retiradas em 5, 10 e 14 dias para determinação da atividade de celulase e quantificação de açúcares redutores (IRE; EZEBUIRO; OGUGBUE, 2016).

4.6 Taxa de crescimento celular em diferentes concentrações de etanol

Colônias puras de bactérias celulolíticas foram inoculadas em Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB e incubadas em shaker sob agitação de 150 rpm a 37 °C por 24 horas. Após este período, foi retirado 100 µL de amostra e adicionado a tubos de vidro contendo 9.9 mL de meio LB e etanol em diferentes concentrações: 2, 4, 6, 8, 10% (v/v), os quais foram incubados por 24 e 48 horas. As leituras de absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 600 nm, utilizando 100 µL de água em 9.9 mL de meio LB para zerar o aparelho (IRE; EZEBUIRO; OGUGBUE, 2016).

4.7 Etapas de purificação

4.7.1 Precipitação salina

Foi adicionado sulfato de amônio em quantidade proporcional ao fracionamento de 0-80%. O sal foi adicionado lentamente na amostra em banho de gelo até a solubilização, seguido de agitação em banho de gelo por 3 horas. Durante 20 minutos a amostra foi centrifugada a 8.000 rpm e temperatura de 4°C. O precipitado foi diluído em 2 mL de tampão Tris HCl 20 mM pH 7,5 e o sobrenadante (fração sobrenadante 80%) foi armazenado. A fração 0-80% foi inserida na membrana de diálise, a amostra foi dialisada em 1,5 litros de tampão de suspensão. O tampão foi trocado duas vezes a cada 4 horas e a última troca foi mantido *overnight*.

4.7.1.1 Purificação da endoglucanase

A fração com maior atividade endoglucanásica (200 µL) foi aplicada no sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, Uppsala) equipado com uma coluna de Gel de filtração, Sephacryl S-100 (60 x 0,5 cm), pré-equilibrada com acetato de sódio (0,1 M, pH, 5). A cromatografia foi realizada com tampão idêntico ao de equilíbrio a um fluxo de 0,1 mL/min. Recolheram-se frações de 2 mL e analisou-se a atividade enzimática individualmente (SILVA et al., 2018).

4.7.1.1.1 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteína foi determinada segundo método de Bradford (1976). No preparo do reagente, dissolveu-se 102,4 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, a solução foi agitada durante 60 minutos, seguido de adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução obtida foi completada para 1 L com água deionizada e manteve-se sobre agitação durante 10 minutos. Após duas filtrações em papel de filtro, o reagente de Bradford foi armazenado protegido da luz. A curva de calibração de proteínas foi construída empregando-se albumina de soro bovino (1mg/mL) como padrão na faixa de concentração de 5 µg/100 µL à 55 µg/100 µL. Adicionou-se 2500 µL de reagente de Bradford em cubeta de 3 mL, seguido de 100 µL de solução padrão de albumina, incubando por 5 minutos. A leitura de absorbância a 595 nm foi determinada em espectrofotômetro, utilizando 100 µL água em lugar de solução padrão para referência.

4.7.1.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE foi realizado de acordo com Champasri; Champasri; Woranam, (2015) com algumas modificações, utilizando o gel separador na concentração de 15% (Tabela 7). 15 μ L das amostras de proteínas foram misturadas com 5 μ L do tampão de amostra contendo Tris HCl pH 6.8 a 62.5 M, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001% e aquecidas por 5 minutos antes de serem levadas ao gel. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%) a 90 V até o final do gel separador. Em seguida, o gel foi mergulhado na solução corante contendo 0,15% Azul de Coomassie Brilhante R-250 em 50% de etanol e 10% de ácido acético (p/v) *overnight*. No dia seguinte, o gel foi descorado com solução descorante contendo 10% de ácido acético e 50% de metanol (v/v). E a posição da proteína foi determinada.

Tabela 7 – Composição do gel de resolução 15%

Soluções do Gel Inferior	Gel de 15% (q.s.p)	Soluções do Gel Superior	
Bis-Acrilamida 30%	2.500 μ L	Bis-Acrilamida 30%	800 μ l
Tris-HCl 2M, pH 8.8	937.5 μ L	Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1000 μ l
SDS 1%	500 μ L	SDS 1%	400 μ l
Persulfato de Amônia	250 μ L	Persulfato de Amônia	200 μ l
TEMED 1%	250 μ L	TEMED 1%	200 μ l
Água deionizada	562.5 μ L	Água deionizada	1.400 μ l
Total	5 mL	Total	4 mL

Fonte: SILVA et al., 2015

4.7.1.1.3 Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida

A eletroforese nativa foi realizada de acordo com Champasri; Champasri; Woranam (2015). 15 μ L das amostras de proteínas foram misturadas com 5 μ L do tampão da amostra, exceto alguns componentes, como, SDS e β -mercaptoetanol. As amostras sem aquecimento foram carregadas em gel de separação na concentração de 8% (Tabela 8). A eletroforese foi realizada em 4 °C com tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%) a 30 V até o final do gel separador. Em seguida, o gel nativo foi mergulhado em tampão acetato de sódio 100

mM pH 5.2 por 1 hora. Transcorrido este tempo, o gel nativo foi corado com Azul de Coomassie Brilhante R-250 *overnight* e descorado conforme descrito anteriormente (sessão 4.5.3). E a posição da proteína no gel nativo de poliacrilamida foi monitorada.

Tabela 8 – Composição do gel de resolução 8%

Soluções do Gel Inferior	Gel de 8% (q.s.p)	Soluções do Gel Superior	
Bis-Acrilamida 30%	1.333 µL	Bis-Acrilamida 30%	800 µl
Tris-HCl 2M, pH 8.8	937.5 µL	Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1000 µl
SDS 1%	500 µL	SDS 1%	400 µl
Persulfato de Amônia	250 µL	Persulfato de Amônia	200 µl
TEMED 1%	250 µL	TEMED 1%	200 µl
Água deionizada	1.730 µL	Água deionizada	1.400 µl
Total	5 mL	Total	4 mL

Fonte: SILVA et al., 2015

4.7.1.1.4 Análise zimográfica-CMC

A eletroforese do gel zimograma foi realizada de acordo com Champasri; Champasri; Woranam, (2015) com modificações. 15 µL das amostras de proteínas foram misturadas com 5 µL do tampão da amostra descrito anteriormente (sessão 5.3.8.3). As amostras sem aquecimento foram carregadas em gel de separação na concentração de 8% contendo 0,1 % de CMC (p/v). A eletroforese foi realizada em 4 °C com tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%) a 50 V até o final do gel separador. Em seguida, o gel do zimograma foi mergulhado em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5.2 por 1 hora. Transcorrido este tempo, o gel foi corado com vermelho do Congo 0,2% (p/v) *overnight*. O gel foi descorado com solução de NaCl 2 M até uma zona clara ser observada. A posição da proteína no gel zimograma foi monitorada.

4.8 Análise molecular das bactérias celulolíticas

4.8.1 Extração do DNA das bactérias celulolíticas

Culturas bacterianas com atividade celulolítica foram desenvolvidas em tubos do tipo Falcon[®], contendo 10 mL do meio de cultura nutriente líquido (Tabela 9), por 24 horas, a 37 °C, sobre agitação constante de 150 rpm.

Tabela 9 – Composição do meio de cultura nutriente líquido para multiplicação da massa celular bacteriana

Nutriente	Quantidade
Extrato de carne	1 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	2 g.L ⁻¹
Peptona	5 g.L ⁻¹
NaCl	5 g.L ⁻¹
Glicose	5 g.L ⁻¹
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Fonte: Dias Rosa, 2008

Transcorrido o tempo, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos, descartando-se o sobrenadante até obter um precipitado de massa celular, o qual foi ressuscitado em 1 mL de tampão de extração em tubos de eppendorf (Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 2,5 mM, NaCl 75 mM e 1/10 de volume do Docedil Sulfato de Sódio (SDS) a 10%) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Em seguida, foi adicionado à suspensão bacteriana 0,2 g de carbonato de silício estéril. O microtubo contendo tampão, massa celular e carbonato de silício foi agitado em aparelho tipo “vortex” a 2000 rpm por 2 minutos, para romper a parede celular.

Após agitação, os tubos foram incubados a 50°C por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se 2/3 do volume de NaCl 5M, e incubou-se a 4°C por 30 minutos. Após este período, centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 rpm, e transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos e adicionou-se 1 volume igual de clorofórmio, homogeneizou-se vagarosamente e centrifugou-se por 10 minutos em 10.000 rpm. A fração aquosa foi transferida para outro microtubo e adicionou-se um volume igual de isopropanol, incubou-se em temperatura ambiente por 5 minutos seguido de centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. Logo depois, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (DNA) foi seco à temperatura ambiente por 5 minutos. Por último, adicionou-se 40 µL de TE pH: 8.0 contendo RNase (10 mg/mL) e incubou-se a 37°C por 60 minutos (DIAS ROSA, 2008). As amostras foram armazenadas em freezer (-20 °C) até o momento de uso nas análises de eletroforese e PCR.

4.8.1.1 Eletroforese do DNA extraído

Após extração realizou-se um gel de agarose 0,8% (p/v) a fim de verificar a qualidade do DNA extraído. A esse gel foram aplicadas alíquotas de uma solução contendo 2 µL de DNA, 3 µL de água Milli-Q e 1 µL do corante azul de bromofenol. Utilizou-se como padrão de comparação marcador invitrogen na concentração de 1 µg/µL. Após 2 horas de eletroforese a 90 volts o gel foi visualizado em um aparelho Transluminador com luz UV (DIAS ROSA, 2008).

4.8.1.1.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Após avaliação da qualidade do DNA, foi realizado o PCR do gene ribossomal 16S dos DNAs extraídos, o qual foi amplificado utilizando-se oligonucleotídeos universais 27F 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' e 1492R 5' TACCTTGTTACGACTT 3' (FRANK et al., 2008). A PCR foi realizada utilizando-se 1,0 µL de DNA, 10,0 pmol de cada oligonucleotídeo, 10 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂, 2,5 µL de PCR Buffer 10x e 1U de Taq DNA Polimerase para um volume final de 25 µl. A PCR foi submetida as seguintes condições reacionais: aquecimento inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento do oligonucleotídeo a 57 °C por 30 segundos, e alongamento a 72 °C por 1 minuto. Um alongamento final de 5 minutos após os ciclos. Os produtos amplificados foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1% com 5 volts/cm, por 40 minutos. Em seguida, o gel foi visualizado em um aparelho transluminador com luz UV (DIAS ROSA, 2008).

4.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados utilizando três réplicas para cada amostra. Os dados foram expressos como média ± e desvio padrão. Para a análise estatística utilizou-se o *software* Origin versão 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do bagaço da cana-de-açúcar

Os resultados da composição química do bagaço da cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado em termo de açúcares, bem como os componentes inibitórios são mostrados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10 - Composição química do BCA não tratado e pré-tratado por explosão a vapor em autoclave a 120 °C

% , base seca		
	BCA não tratado	BCA pré-tratado
Celulose	37,51±2,03	30,82±1,11
Hemicelulose	21,32±0,93	17,14±0,46
Lignina de Klasson	30,30±3,91	24,30±0,64
Lignina solúvel	8,98±0,29	9,06±1,03
Lignina total	39,27±3,98	33,23±1,58
Proteína	1,47±0,01	—
Cinzas totais	5,40±0,54	4,03±0,81
Total	104,97	85,22

Fonte: Autor, 2019

Conforme mostra a Tabela 10, o teor de lignina diminuiu no BCA pré-tratado em comparação ao BCA não-tratado, indicando que houve ruptura na estrutura do bagaço da cana-de-açúcar, degradação da hemicelulose e transformação da lignina. Ademais, sabe-se que este polímero trata-se de um suporte estrutural das plantas, e que não possui carboidratos em sua composição (BADGER, 2002). Sendo assim, Chin et al., (2011) discutem que altos teores de lignina dificultam o processo de hidrólise da biomassa vegetal. No Brasil, os processos envolvendo deslignificação da biomassa vegetal baseiam-se na utilização de hidróxido de sódio e sulfureto de sódio. No entanto, estes processos geram resíduos poluentes (VALIM et al., 2017). Por esta razão, o método empregado neste estudo parece ser uma alternativa interessante.

As frações de carboidratos C6 e C5, celulose e hemicelulose, respectivamente, também diminuiram após o pré-tratamento, sugerindo perda de

carboidratos e formação de outros produtos como furfural, HMF, ácido acético e ácido fórmico. Ademais, a taxa de hemicelulose é menor para os dois tipos de bagaço, se comparados com a fração celulose. A respeito disto, Farhat et al., (2017) discorreram que nos materiais lignocelulósicos, a hemicelulose é o segundo componente renovável mais abundante após a celulose. Os autores também realizaram um estudo de extração e caracterização de hemicelulose e observaram comportamento similar ao deste estudo, uma vez que no pré-tratamento quando a temperatura foi elevada de 160 a 200 °C, os rendimentos sólidos correspondentes diminuíram de 86,16 a 62,60%.

Sendo assim, estes resultados encontram-se de acordo com a literatura. Em adição, observa-se que a fração hemicelulósica do BCA pré-tratado teve diminuição de 19,60% em relação ao BCA não tratado. Estes resultados vão ao encontro com Hongdan; Shaohua; Shubin, (2013) que relatam que a água quente líquida é amplamente empregada para remover a hemicelulose e romper a estrutura intacta da biomassa lignocelulósica.

Conforme pode ser visto na Tabela 10, o aumento da temperatura do pré-tratamento diminuiu o balanço mássico do BCA de 104,97 para 85,22%. Quanto à celulose, os resultados mostram que a condição de pré-tratamento causou mais decomposição na celulose do que na hemicelulose. Este efeito é desvantajoso ao processo, pois, a quantidade de celulose significa o potencial de conversão em glicose dos resíduos lignocelulósicos.

Por outro lado, o BCA não-tratado liberou uma quantidade maior de açúcares como glicose e xilose, o BCA pré-tratado conservou as frações de carboidratos celobiose e arabinose, conforme se observa na Tabela 11.

Tabela 11 – Componentes liberados na fração líquida da caracterização química do BCA não-tratado e pré-tratado

	Análise de açúcares (g.L ⁻¹)				Análise de ácidos orgânicos (g.L ⁻¹)			
	Glicose	Xilose	Arabinose	Celobiose	Ac. Acético	Ac. Fórmico	Furfural	HMF
BCA Não-tratado	1,40 ±0,04	0,82 ±0,02	—	—	0,084 ±0,01	0,05 ±0,00	0,02 ±0,00	0,01 ±0,00
BCA Pré-tratado	1,19 ±0,04	0,65 ±0,02	—	—	0,063 ±0,00	0,031 ±0,00	0,02 ±0,00	—

Fonte: Autor, 2019

Os açúcares glicose e xilose foram os principais produtos da fração líquida da caracterização química, com rendimentos de 84,45 e 79,66%, respectivamente. Estes rendimentos foram obtidos da biomassa do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado a 120 °C e 45 minutos. Além disto, na Tabela 11, é possível observar que os rendimentos de arabinose e celobiose para os dois tipos de BCA não tiveram diferenças importantes, o que pode indicar que, para se obter arabinose da hemicelulose é mais difícil do que a xilose, e que este carboidrato se encontra em menores quantidades na hemicelulose.

A diminuição de glicose no bagaço pré-tratado pode estar relacionada com a degradação da glicose em HMF, assim como da xilose em ácidos acético, fórmico e furfural como uma condição de pré-tratamento severo assim como relataram Hongdan; Shaohua; Shubin (2013). Segundo um estudo sobre inibidores e mecanismos inibitórios de Palmqvist; Hahn-Hagerdal (2000), durante o pré-tratamento os açúcares se degradam em furfural e HMF, enquanto o grupo acetil da hemicelulose se degrada em ácido acético por causa da condição ácida fraca. Conforme mostra a Tabela 11, o ácido acético esteve presente em maior concentração em comparação aos demais inibidores.

Segundo Hongdan; Shaohua; Shubin, (2013), os derivados de furanos, assim como furfural e HMF são obtidos pela desidratação da pentose e hexose, respectivamente. O resultado deste estudo revelou que os inibidores (Tabela 11)

estiveram praticamente nas mesmas concentrações para as duas formas do bagaço caracterizado.

5.1.1 Caracterização morfológica

5.1.1.1 Espectroscopia infravermelha de transformação de Fourier (FTIR)

Para entender as mudanças na estrutura química após o pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar, foram obtidos espectros infravermelhos (Figura 13) da amostra não tratada (linha azul) e amostra pré-tratada (linha verde). As intensidades relativas das bandas de absorção foram atribuídas na Tabela 12.

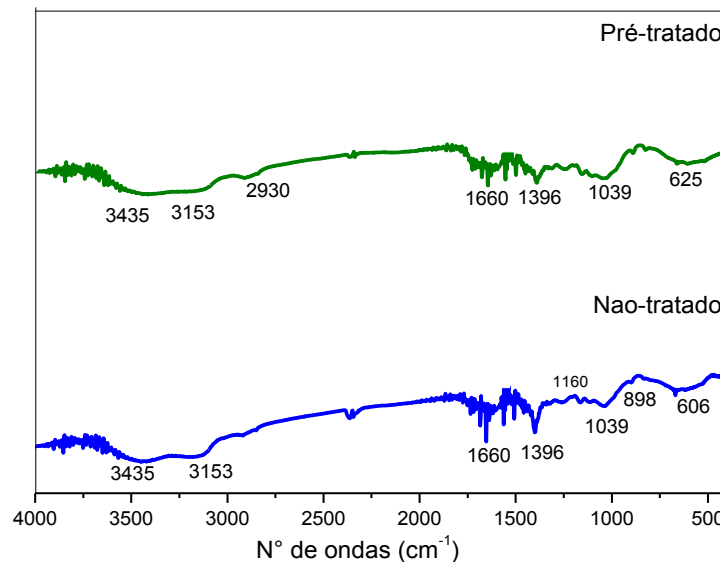
Tabela 12 – Intensidade relativa das bandas no espectro infravermelho de diferentes grupos na amostra de BCA não tratado e pré-tratado

Atribuições da absorção FTIR do bagaço da cana-de-açúcar	Absorção relativa de diferentes grupos em amostras de bagaço (n° de ondas)
Vs O-H	3435
Vs O-H	3153
C-H (<i>deformação axial</i>)	2930
C-H (<i>deformação angular</i>)	1396
C-O (<i>deformação angular</i>)	1160
Piranoose	1039
β -glicosídicas-glicana	898

Fonte: Autor, 2019.

Através da análise comparativa dos espectros, observa-se a existência de bandas atribuídas aos grupos hidroxílicos (estiramento O-H celulósico) em 3435 cm^{-1} e 3153 cm^{-1} , respectivamente, deformação axial dos grupos C-H em 2930 cm^{-1} , deformação angular dos grupos C-H em 1396 cm^{-1} , deformação angular de ligações C-O de álcoois primários em 1160 cm^{-1} , banda de absorção das ligações C-O-C, que representa a vibração do anel de piranoose em 1039 cm^{-1} e ligações β -glicosídicas entre unidades de glicana em 898 cm^{-1} , características de celulose. Pode-se observar a semelhança entre os espectros dos materiais não tratado e pré-tratado, evidenciando, qualitativamente, que o pré-tratamento foi capaz de remover parte da hemicelulose e lignina produzindo celulose comparável à celulose comercial (Figura 13).

Figura 13 - Espectros FTIR para o BCA não tratado e BCA pré-tratado por explosão a vapor a 120 °C.



Fonte: Autor, 2019

Segundo Phinichka; Kaenthong (2016), a espectroscopia FTIR é um método não destrutivo usado para obter informações importantes sobre a estrutura química e a cristalinidade de uma fibra celulósica. Os espectros são separados em diferentes regiões, e deste modo, supõe-se que a banda 1660 cm⁻¹ esteja relacionada com a água adsorvida em celulose e hemicelulose (POLETTI; PISTORI; ZATTERA, 2013).

A mudança ocasionada na estrutura cristalina da celulose altera as vibrações das ligações através de uma redução de intensidade ou mesmo do desaparecimento das bandas características dos domínios cristalinos (DE FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014). Por esta razão, na Figura 13, o BCA pré-tratado reporta menos energia absorvida. Portanto, esta diminuição de intensidade reflete em alteração do grau de cristalinidade da celulose no bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado em explosão a vapor. Por outro lado, os espectros das amostras pré-tratada e não tratada não mostraram diferenças importantes, o que sugere pouca mudança na biomassa, uma vez que reportou pequenas diferenças nas bandas espectrais nas duas frações do bagaço da cana-de-açúcar.

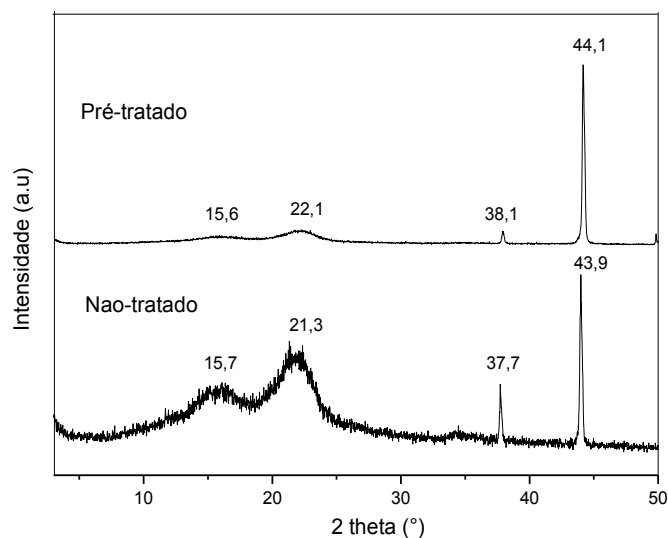
Para Zhao; Zhang; Liu (2012), a celulose cristalina é mais recalcitrante a digestão microbiana e enzimática, em comparação com a celulose amorfa. E para

aferir a recalcitrância de um determinado material lignocelulósico, frequentemente se utiliza o índice de cristalinidade, o qual pode ser obtido através de várias técnicas que incluem DRX, FTIR e Raman (PARK et al., 2010).

5.1.1.2 Difração de raio-X

No difratograma do BCA pré-tratado apresentado na Figura 14, observa-se dois picos na região dos ângulos de Bragg de intensidade do sinal em 2θ igual a $15,6$ e $15,7^\circ$ atribuído as regiões amorfas, e outro pico em 2θ igual a $22,1$ e $21,3^\circ$ atribuído as regiões cristalinas. No difratograma da celulose do BCA o pico na região de intensidade do sinal em $2\theta=21,3^\circ$ é atribuído a regiões cristalinas (LI; RENNECKAR, 2011). Apresenta-se também um pico em 2θ igual a $37,7^\circ$ e outro em $43,9^\circ$ mostrados no difratograma, onde tais eventos são atribuídos a fração da celulose. A observação destes dois picos revela a remoção de lignina e hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar. De forma similar, o pico de difração em $21,3^\circ$ é mais evidente e estreito na celulose do BCA não tratado em relação ao BCA pré-tratado (pouco perceptível), indicando a remoção de lignina e hemicelulose.

Figura 14 - Difratogramas das amostras de bagaço da cana-de-açúcar: (A) pré-tratado com água a 120°C , (B) não tratado



Fonte: Autor, 2019

Em um estudo de caracterização das fibras de *Sisal*, Lima et al., (2013) reportam picos de planos cristalinos característicos de celulose de materiais lignocelulósicos em 23 e 34°, resultados estes próximos dos encontrados neste estudo. Os autores ressaltam que hemicelulose e lignina são macromoléculas amorfas e que a celulose distribui-se aleatoriamente, formando ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Kapoor et al., (2017) estudaram o efeito do pré-tratamento da radiação gama sob o bagaço da cana-de-açúcar em relação as suas propriedades morfológicas e estruturais. Estes descreveram padrões de DRX de celulose amorfa entre 16-20° e celulose cristalina em torno de 20-25°. Enquanto os deste estudo foram 15,6-17° e 21,3-22,1°, respectivamente. Deste modo, a proximidade dos difratogramas leva a considerar a acurácia do método empregado bem como a viabilidade do pré-tratamento adotado. Outros estudos também apontam picos de aproximadamente 22° sendo estrutura cristalina típica de celulose (SANTOS et al., 2013; ZAINI et al., 2013; KARGARZADEH et al., 2012; ROSA et al., 2012; YU et al., 2012).

Após o pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar, Leão et al., (2017) observaram aumento do índice de cristalinidade. Isto pode estar relacionado com a clivagem e a perda de hemicelulose e de lignina por dissolução, aumentando assim a cristalinidade, conforme apontam (ZAINI et al., 2013).

O cálculo do índice de cristalinidade (ICr) é mostrado na Tabela 13. Pode-se perceber que ambas as amostras apresentaram ICr semelhantes. O ICr do BCA não tratado é de 73,23%. Já o BCA pré-tratado possui ICr de 73,70%. Diante destes achados, é possível observar que o tempo de pré-tratamento de explosão a vapor na autoclave a 120 °C não produziu efeito significativo no aumento da cristalinidade.

Tabela 13 – Índice Cristalino do bagaço da cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado

Amostras	Índice Cristalino (%)
BCA não tratado	73,23 ± 0,04
BCA pré-tratado	73,70 ± 0,01

Fonte: Autor, 2019

Espera-se que através do pré-tratamento ocorra aumento do índice de cristalinidade, no entanto, os resultados registrados nesse estudo revelaram ICr muito próximo nas duas condições do BCA. Corrales et al., (2012b) defendem a hipótese de que o aumento do ICr de amostras pré-tratadas se relacione com a remoção parcial da fração de hemicelulose. Os autores ainda discutem que a quantidade de glicose liberada a partir da celulose da região amorfa, não se faz relevante para o pré-tratamento. Quanto ao efeito do pré-tratamento, Pereira Ramos (2003) retrata que o vapor da alta pressão é responsável por modificar a estrutura da parede celular vegetal produzindo um material marrom escuro, onde a hemicelulose parcialmente hidrolisada é recuperada através de lavagem, resultando em uma fração insolúvel em água, sendo esta composta por celulose, hemicelulose residual e lignina quimicamente modificada.

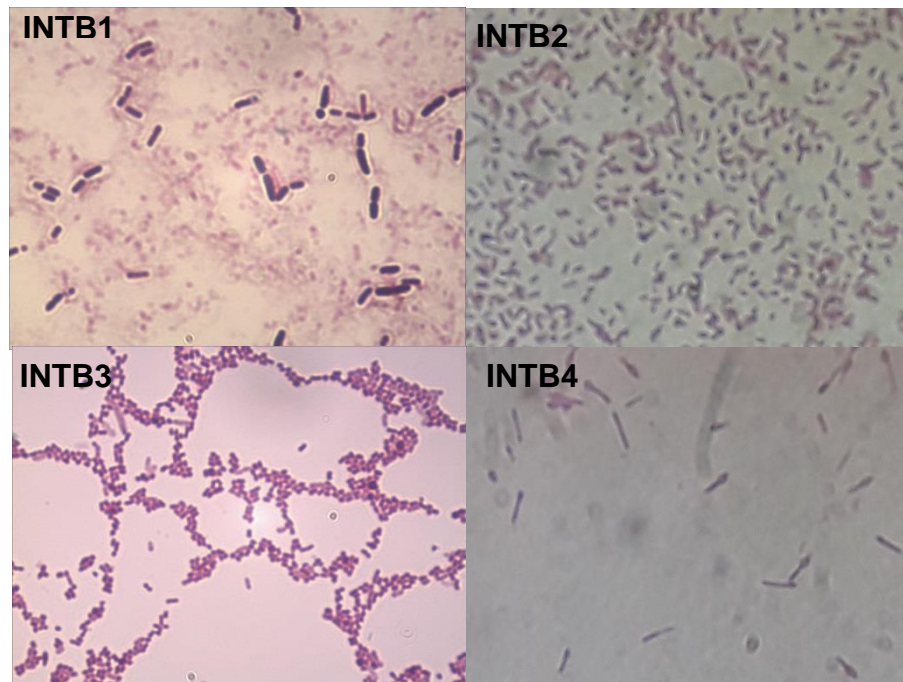
5.2 Isolamento e caracterização de bactérias celulolíticas

5.2.1 Isolamento de bactérias celulolíticas da flora intestinal das larvas de *Diatraea saccharalis*

A partir das placas iniciais de seleção de bactérias simbióticas com atividade celulolítica, 4 colônias bacterianas sob condições aeróbicas foram selecionadas por apresentarem capacidade de crescimento em meio salino mínimo suplementado com bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono. As mesmas foram nomeadas por INTB1, INTB2, INTB3 e INTB4.

INTB1 é uma bactéria com morfologia de bacilo aos pares, encapsulado e Gram-positiva. O isolado INTB2 mostrou ser uma bactéria do tipo cocobacilo e Gram-negativa. O isolado INTB3 é uma bactéria do tipo diplococos Gram-negativa e sua morfologia é arredondada e convexa. A cepa INTB4 é uma bactéria em forma de bacilo Gram-negativa (Figura 15).

Figura 15- Coloração de Gram das bactérias celulolíticas isoladas do intestino das larvas de *Diatraeae saccharalis* INTB1, INTB2, INTB3, INTB4

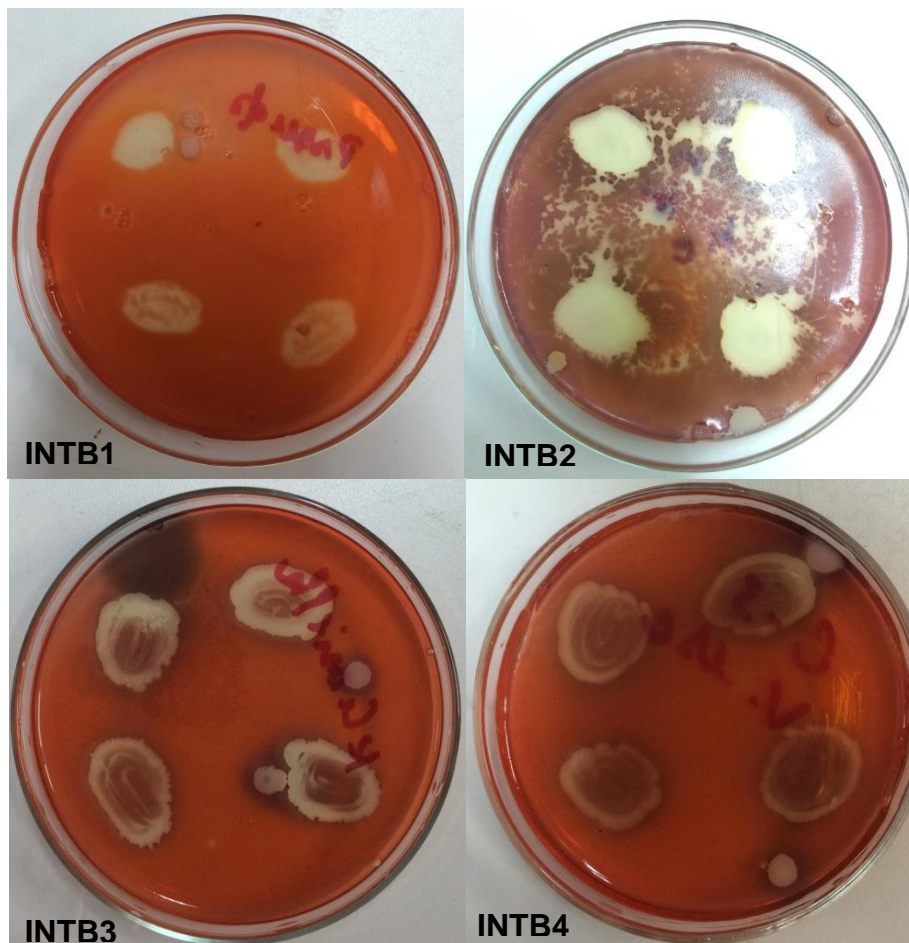


Fonte: Autor, 2019

A atividade de degradação da CMC deduzida através da formação de uma zona clara ao redor do inóculo, revelado após coloração com vermelho de Congo, é mostrada na Figura 16.

A atividade de endoglucanase extracelular foi avaliada através das placas de Petri (Figura 16) contendo os isolados bacterianos, e mostraram maior atividade de celulase extracelular para INTB2, INTB3 e INTB4. O isolado INTB1 foi o que apresentou menor área de degradação da CMC. Dantur et al., (2015) relatam para o mesmo teste diâmetros de halos acima de 5.0 cm para os gêneros de *Klebsiella* e *Bacillus*.

Figura 16 - Figura 16 – Atividade celulolítica das bactérias simbióticas em meio salino mínimo suplementado com CMC, incubados a 30 °C por 10 dias



Fonte: Autor, 2019

Para testar a hipótese de que insetos herbívoros dependem dos microrganismos presentes em seu trato intestinal para hidrolisar a celulose em monômeros de açúcares menores, Rinke et al., (2011), investigaram a atividade celulolítica de bactérias pertencentes ao intestino de *Sphenophorus levis*, uma população generalizada de praga da cana-de-açúcar. O isolamento, análise do gene 16S e os testes de atividade celulolítica revelaram cinco gêneros de bactérias capazes de degradar a CMC, das quais: *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Paenibacillus* foram os identificados.

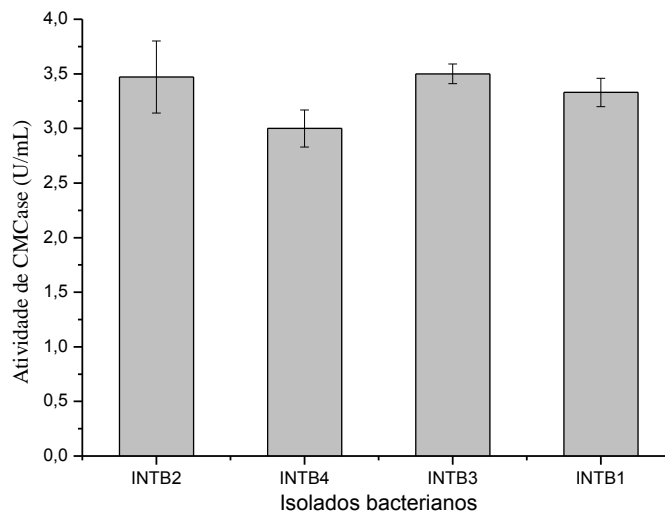
Insetos *Bombyx mori* L. foram domesticados e alimentados com folhas de amoreira por Anand et al., (2010) para isolamento de bactérias celulolíticas. Onze isolados do trato digestivo foram identificados, dos quais, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas sp.* eram celulolíticos e xilanolíticos. Estas bactérias

foram também descritas pela capacidade de degradar polissacarídeos em pH alcalino.

O consórcio microbiano do trato intestinal das larvas de *Lepidoptera*, *Coleoptera* e adultos de *Isoptera* também foram investigados para seleção de bactérias celulolíticas. Ao total, 45 cepas foram identificadas como degradadoras de celulose, sendo o gênero *Bacillus spp.* o mais frequente. Em relação as bactérias Gram-negativas, o gênero mais representado foi *Pseudomonas spp* (MANFREDI; PEROTTI; MARTÍNEZ, 2015).

Conforme se observa na Figura 17, as bactérias isoladas apresentaram atividade extracelular quando incubadas em meio suplementado com CMC. Os 4 isolados reportaram padrões semelhantes de excreção de endoglucanase. No entanto, em termos de produtividade, o isolado INTB4 foi o que reportou menor atividade extracelular, apesar dessa diferença não ser significativa em comparação a INTB1, INTB2 e INTB3. Estes resultados mostraram-se compatíveis com os padrões de crescimento e os perfis de hidrólise enzimática da CMC nas placas de Petri.

Figura 17 - Medição da atividade de endoglucanase extracelular dos isolados bacterianos



Fonte: Autor, 2019

Anagnostakis; Hankin (1975) foram os primeiros pesquisadores a relacionar o índice de atividade enzimática extracelular, que é a presença do halo na região de inóculo de microrganismos celulolíticos com a degradação do substrato. Os autores indicaram que bactérias com índice de atividade enzimática acima de 2,5 cm seriam consideradas como produtoras de enzimas celulolíticas. Deste modo, os 4 isolados

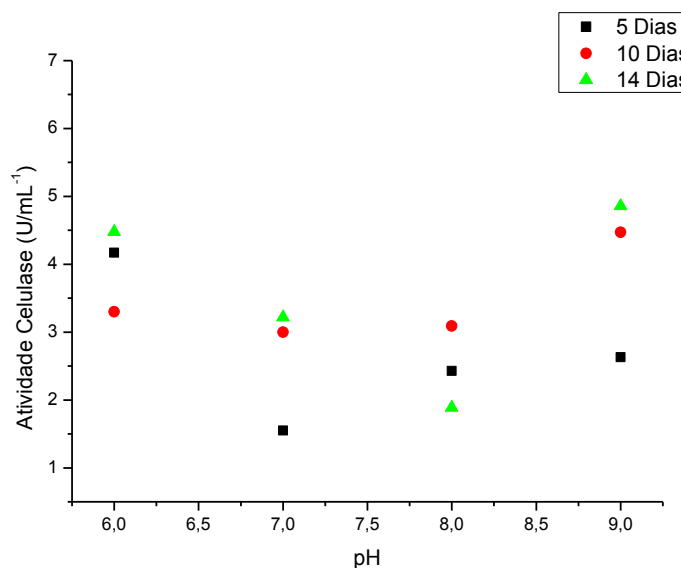
bacterianos descritos neste estudo estão de acordo com os dados relatados na literatura, uma vez que INTB1, INTB2, INTB3 e INTB4 reportaram atividade de CMCase de 3,3, 3,47, 3,5, 3,0 μm , respectivamente.

5.3 Avaliação da produção de celulases pelos microrganismos isolados

5.3.1 Efeito da produção de celulase em meio líquido sob diferentes pH

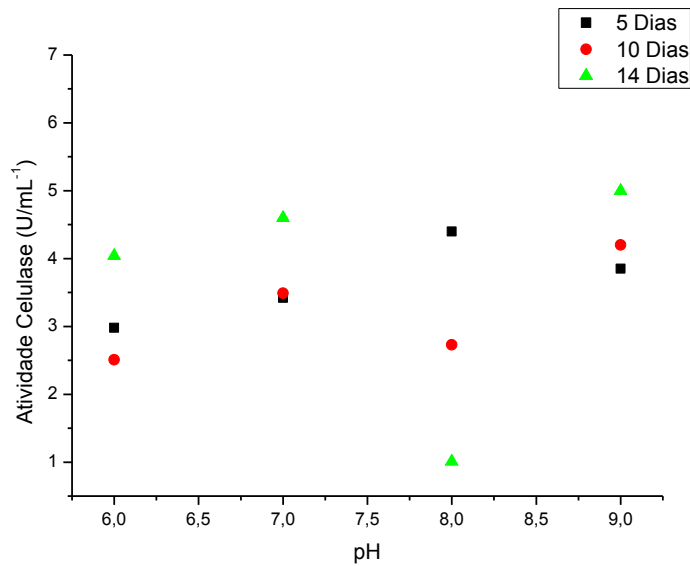
Dados ilustrados na Figura 18 mostram claramente que os maiores níveis de atividade enzimática alcançados pelo isolado INTB2 foram determinados em pH 6,0 e 9,0 em 5, 10 e 14 dias de experimento. Sendo estes 4,17 e 4,48 U/mL^{-1} para o 5° e 14° dias, respectivamente, e, 4,47 e 4,86 U/mL^{-1} para o 10° e 14° dias, nesta ordem. Já os menores valores de atividade enzimática foram reportados para os pH 7,0 e 8,0.

Figura 18 – Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB2



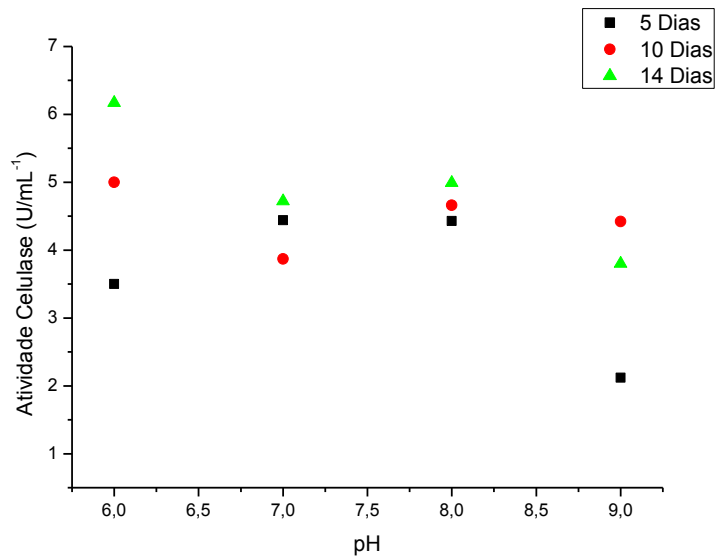
Fonte: Autor, 2019

Os resultados ilustrados nas Figuras 18 e 19 mostram que a produção de celulase através de INTB2 e INTB4, expressada como atividade enzimática, aumentou consideravelmente a medida em que o pH passa de 8,0 para 9,0. Com exceção do inóculo correspondente a 5 dias de cultivo Além disso, O período de incubação de 14 dias foi positivo apenas para os isolados INTB2 e INTB4.

Figura 19 – Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB4

Fonte: Autor, 2019

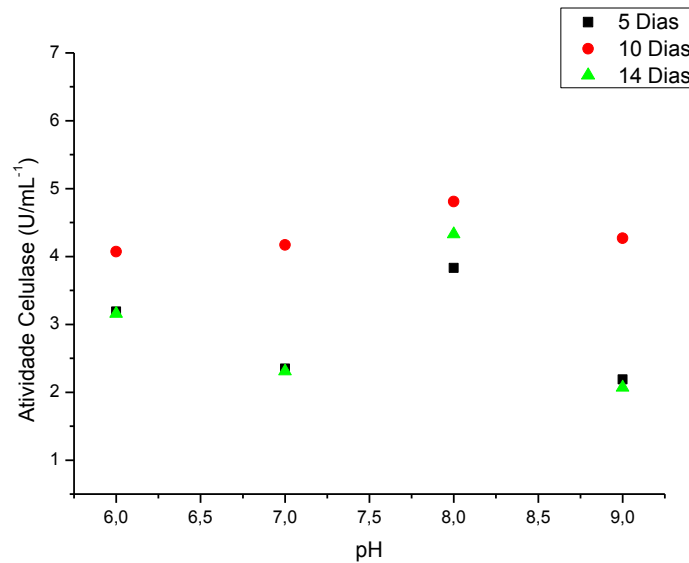
Os resultados de produção de celulase através do isolado INTB3 mostraram-se mais estáveis em comparação aos demais isolados INTB1, INTB2, INTB4. Como se observa na Figura 20, houve pouco declínio da atividade enzimática entre as diferentes faixas de pH estudadas, exceto para o pH 9,0, que reportou acentuado declínio nos dias 5 e 14 de cultivo. Dada a estabilidade na produção de celulase sob estes parâmetros, a cepa INTB3 mostrou ser uma célula mais eficiente em comparação aos demais isolados em termos de produtividade enzimática. Haja vista que a mesma mostrou-se mais resistente a mudança de pH.

Figura 20 – Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB3

Fonte: Autor, 2019

Como mostra o isolado INTB1 (Figura 21), a maior atividade de celulase foi obtida para a degradação do bagaço da cana-de-açúcar em pH 8,0 para ambas as amostragens, sendo esses valores expressos em 3,83, 4,81 e 4,33 U/mL⁻¹ para o 5°, 10° e 14° dias, respectivamente. Nota-se também que a atividade enzimática reduz drasticamente a medida que o pH passa a ser mais alcalino (pH 9,0), reportando atividade enzimática de 2,19 e 2,07 U/mL⁻¹, para o 5° e 14° dias de incubação, respectivamente.

Figura 21 – Efeito de diferentes pH na produção de celulase por INTB1



Fonte: Autor, 2019

Outros estudos relatam resultados diferentes do nosso, visto que reportaram maior atividade de celulase em pH 7,0 que foram registrados com cepas de *Streptomyces sp.* F2621 (TUNCER et al., 2004), *Streptomyces* BRC1 e BRC2 (CHELLAPANDI; JANI, 2008), *Anoxybacillus flavithermus* (SALAH; IBRAHIM; EL-DIWANY, 2007) e *Streptomyces griseorubens* (PRASAD; SINGH; BEDI, 2013).

Investigando a otimização da produção de celulases através de *Pseudomonas sp.* e *Bacillus sp.*, Arusha et al., (2016), verificaram que a produção máxima de celulase foi encontrada para uma temperatura de 30 °C em pH 5,0. A celulase parcialmente purificada mostrou alta atividade celulolítica para a estirpe *Pseudomonas sp.*

Pourramezan et al., (2012) isolaram e caracterizaram bactérias celulolíticas do intestino de térmita (*Microcerotermes diversus*), e mostraram que três gêneros de bactérias apresentaram atividade celulolítica. Sendo estes *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. Os autores descreveram também que quatro bactérias degradantes de celulose pertenciam as famílias *Enterobacteriaceae* e *Bacillaceae*. As estirpes de *Bacillus* B5B e *Acinetobacter* L9B foram as que reportaram hidrólise da celulose mais rápida do que os outros isolados, sendo a atividade de CMCase de 1,47 U/mL e 1,22 U/mL, respectivamente. Além disto, segundo os autores, a estabilidade da CMCase produzida por *Bacillus* B5B em uma

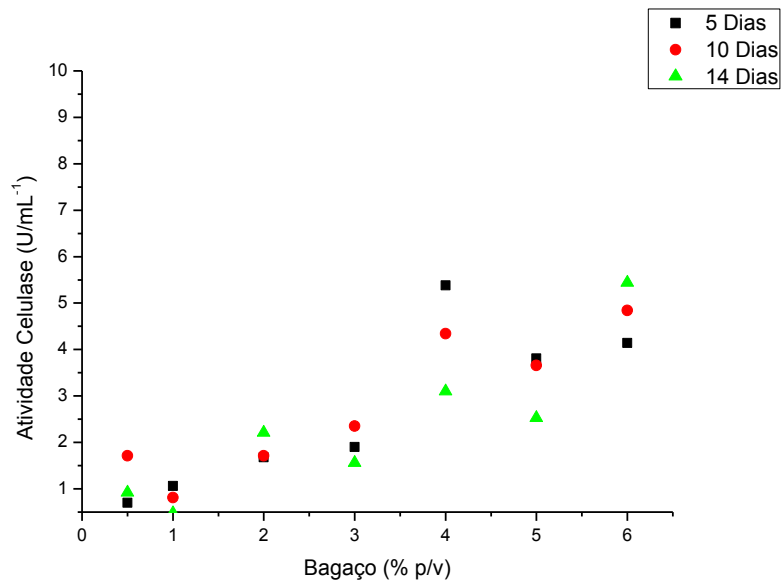
ampla faixa de pH e elevada temperatura, indicaram que a enzima pode ter um ótimo valor comercial.

Existe uma grande dificuldade em comparar as taxas de atividade enzimática entre um mesmo grupo de microrganismo, dadas as suas próprias características biológicas. Assim como, a influência exercida sobre o tipo de substrato a ser degradado. Heck; Hertz; Ayub, (2002) mencionam que as celulases procarióticas podem apresentar ações muito diferentes daquelas produzidas por fungos, bem como o pH pode variar entre estes microrganismos para a produção destas enzimas.

5.3.2 Efeito da produção de celulase em meio líquido sob diferentes concentrações de substrato (p/v) em pH 6,0

Dados ilustrados na Figura 22, indicam que a atividade enzimática aumentou gradativamente com o aumento do substrato e as maiores atividades de celulase foram mostradas com 4 e 6% de cargas de sólidos do substrato bagaço da cana-de-açúcar. A maior atividade de celulase para o isolado INTB2 foi de $5,38 \text{ U/mL}^{-1}$ com 5 dias de cultivo e de $5,44 \text{ U/mL}^{-1}$ com 14 dias de cultivo. Indicando que a concentração de substrato também é um fator importante que influencia o rendimento na produção de celulase. Outro estudo da produção de celulase com bagaço pré-tratado por vapor explodido, revelou que as condições da co-cultura obteve melhor desempenho utilizando concentração do substrato a 4,0% p/v (IRE; EZEBUIRO; OGUGBUE, 2016)

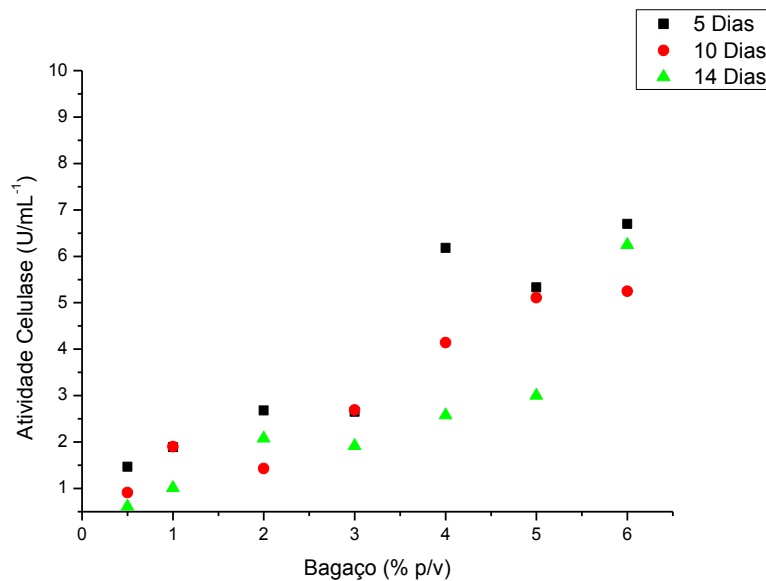
Figura 22 - Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do isolado INTB2



Fonte: Autor, 2019

No presente estudo, a cepa INTB4 (Figura 23) obteve maior produção de enzima entre o 5° e 14° dias (6,70 e 6,25 U/mL⁻¹, respectivamente), ambos com concentração de 6% do bagaço da cana-de-açúcar. Período próximo a estes para a produção de celulase, foi alcançado com 8 dias de incubação através da cepa de *Microbacterium sp.* (SADHU et al., 2011). Outro estudo desenvolvido por Sadhu et al., (2014), menciona que o tempo de incubação é um fator importante para se conseguir uma produção ótima de enzimas. De tal modo, os autores investigaram a produção de celulase através do *Bacillus circulans* sob diferentes fontes de carbono e tempo de incubação, que variou entre 2 e 10 dias. Os autores relataram maior produção de celulase no 8° dia de crescimento da bactéria.

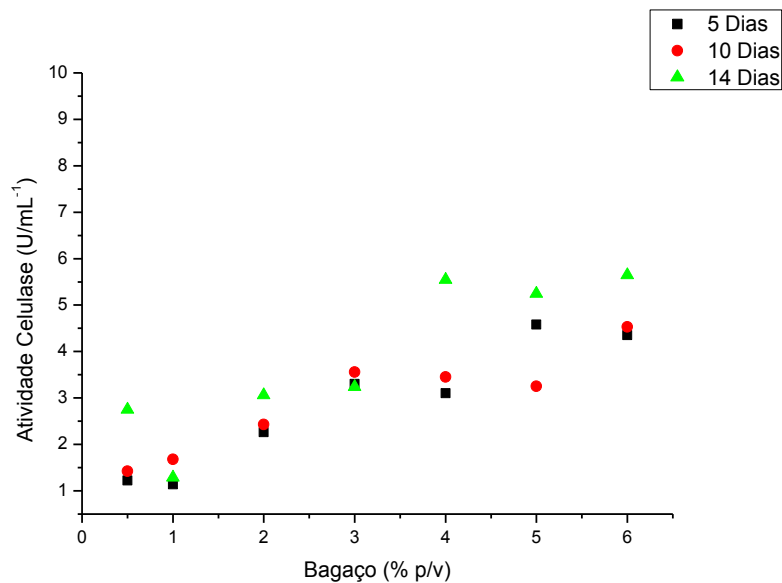
Figura 23 - Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do isolado INTB4



Fonte: Autor, 2019

Ao observar a Figura 24, verifica-se que o aumento da carga de sólidos eleva gradativamente a síntese da celulase que atingiu a atividade máxima (5,65 U/mL⁻¹) ao 14º dia com 6% do bagaço da cana-de-açúcar. Thirumale; Swaroopa Rani; Nand, (2001) mencionaram que a maioria das celulases microbianas são induzidas pela presença de celulose, embora não possa desencadear diretamente a síntese desta enzima, por se tratar de um substrato insolúvel, e que a presença de glicose causa sua inibição. Talvez a inibição causada na presença de glicose esteja relacionada com a facilidade que o microrganismo encontra para se alimentar utilizando diretamente o carboidrato, poupando-se de gastar energia para excreção enzimática para degradar complexos poliméricos de celulose em açúcares menores. Os autores ainda adicionam ao discurso que os sacarídeos solúveis como celobiose, sofrorose, lactose, trealose e galactose servem de indutores para a síntese de celulases.

Figura 24 - Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do isolado INTB3



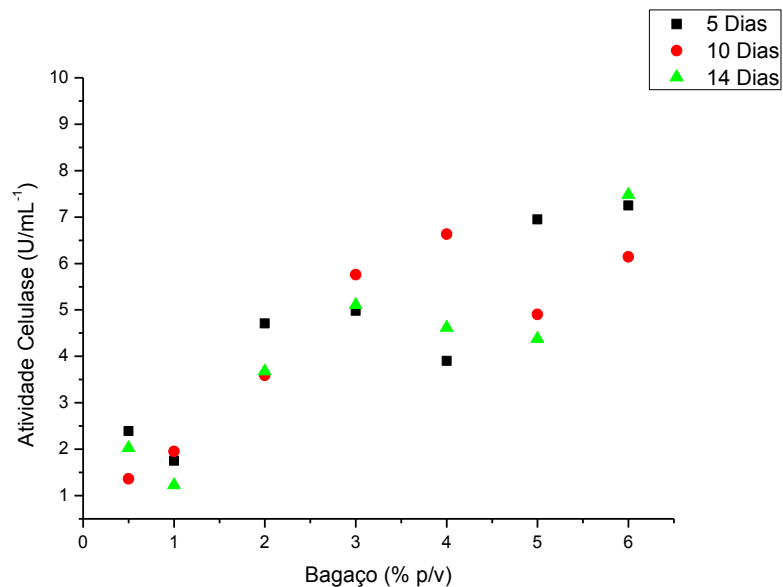
Fonte: Autor, 2019

Após observação contínua de 14 dias, a resposta do planejamento em que se utilizou diferentes cargas de sólidos (Figura 25), mostrou que a produção de celulase é pouco afetada do 5º dia ($7,25 \text{ U/mL}^{-1}$) para o 14º dia ($7,48 \text{ U/mL}^{-1}$), uma vez que não houve incremento significativo na produção de celulase. Deste modo, para estes experimentos, é possível concluir que indução de celulase até 5 dias de incubação seria o suficiente para conseguir apropriadas concentrações de atividade enzimáticas.

A concentração de 0,5% de substrato (bagaço da cana-de-açúcar) resultou em aumento da atividade em INTB2 com 10 dias ($1,71 \text{ U/mL}^{-1}$), INTB3 com 14 dias ($2,75 \text{ U/mL}^{-1}$), em INTB1 com 5 e 14 dias ($2,39$ e $2,03 \text{ U/mL}^{-1}$, respectivamente), e em 1% de concentração de bagaço, o incremento da atividade enzimática foi registrada basicamente para INTB4 ($1,89$ e $1,90 \text{ U/mL}^{-1}$) e INTB1 ($1,75$ e $1,95 \text{ U/mL}^{-1}$) com períodos de incubação 5 e 10 dias, respectivamente.

Prasad; Sethi (2013) discutiram que a diferença na atividade das enzimas celulasas depende da variedade lignocelulósica somados a vários fatores, como conteúdo variável da celulose em materiais lignocelulósicos, heterogeneidade na estrutura das fontes vegetais, assim como, nas habilidades dos organismos celulolíticos em secretar tais enzimas.

Figura 25 - Efeito da concentração de substrato sobre a produção de celulase do Isolado INTB1



Fonte: Autor, 2019

Como esperado, as quatro cepas avaliadas apresentaram capacidade para metabolizar o bagaço da cana-de-açúcar para seu crescimento e expressão de celulases, conforme verificado através da atividade enzimática. Isso mostra que o bagaço atua como um indutor de celulase. Da mesma forma, Gaur; Tiwari (2015) induziram a produção de celulase por *Bacillus vallismortis* e relataram produção máxima de celulase a partir do bagaço da cana-de-açúcar (4105 U/mL⁻¹).

Em um estudo de otimização do processo de produção de celulase a partir da combinação de resíduos de café e abacaxi utilizando *Acinetobacter* sp., Selvam et al., (2014) relataram a atividade celulolítica de 888 U/mL⁻¹ como a maior produção de celulases após 60 horas de cultivo, com carga de substrato de 3 g/L⁻¹. Afzal et al., (2012) isolaram bactérias celulolíticas do solo e verificaram que a atividade celulolítica estava relacionada com *Bacillus cereus*. Os resultados de indução enzimática revelaram atividade máxima de celulase de 45,42 U/mg em 72 horas de incubação. Em pH 6,0 foi encontrado 53,11 U/mg e avaliando a concentração do substrato, verificou-se 71,69 U/mg em 3% de carga de sólidos. Como pode-se perceber, estes resultados apresentaram maior atividade em relação ao nosso estudo.

Os estudos de otimização da produção de celulases são importantes para se conseguir concentrações ideais tanto de substrato como de inóculo para promover maior excreção destas enzimas pelos microrganismos celulolíticos. Nessa perspectiva, Mane et al., (2007) afirmam que a celulose é convertida em açúcares fermentescíveis pela enzima celulase, e que este processo traz ganhos positivos as unidades industriais que integram os processos de conversão da biomassa em biocombustíveis. Visto que, tratam-se de processos capazes de se utilizar uma vasta diversidade de substratos lignocelulósicos menos onerosos para síntese enzimática.

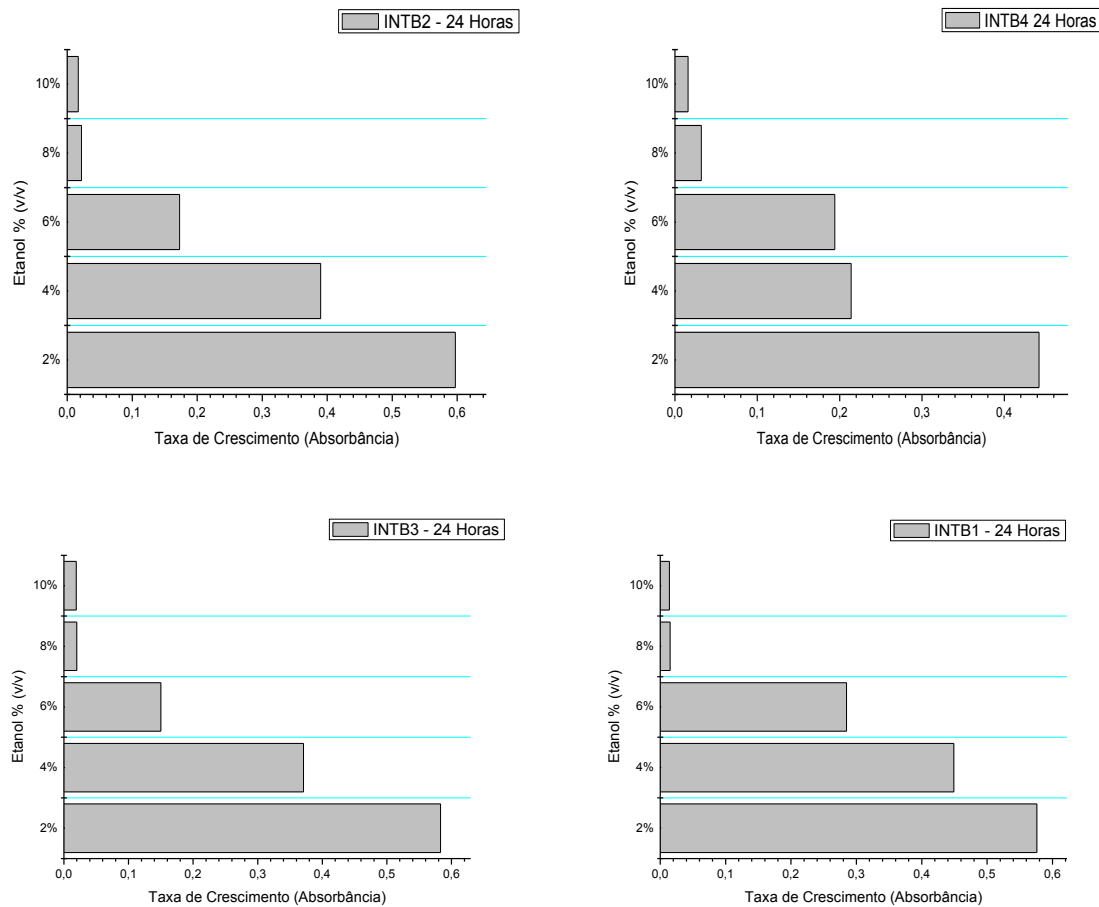
Contudo, o sucesso produtivo de celulase está relacionado ao microrganismo empregado. Deste modo, faz-se necessário a busca por novos microrganismos potenciais, uma vez que a capacidade de degradar celulose tornou-se ao longo do tempo uma característica distribuída entre bactérias aeróbicas, aeróbicas facultativas e anaeróbicas (SREEJA et al., 2013).

Nesta perspectiva, muitos estudos da produção de celulases estão sendo desenvolvidos com ampla cobertura de microrganismos, uma vez que as enzimas celulases apresentam funções diferentes. Um exemplo disto pode ser visto no estudo de Afzal et al., (2012), que reportaram o *Bacillus cereus* como uma cepa de bactéria produtora de celulase do tipo endoglucanase. Assim como Cherry; Fidantsef, (2003) mencionaram cepas de *Bacillus thuringiensis* como produtoras de enzimas extracelular.

5.3.3 Teste de tolerância a etanol

A capacidade de crescer em meio LB com diferentes concentrações de etanol dos quatro isolados bacterianos celulolíticos foi avaliada por 24 horas, assim como mostrado na Figura 26.

Figura 26 – Taxa de crescimento em adição de etanol



Fonte: Autor, 2019

Os resultados mostram que o desafio de crescer em meio suplementado com diferentes concentrações de etanol foi similar para todos os isolados. As cepas INTB1, INTB2, INTB3 e INTB4 revelaram ótima capacidade de crescer em concentrações de etanol a 2%. Apesar da similaridade entre os quatro isolados, INTB4 foi o que reportou menor taxa de crescimento em 4% de etanol. Enquanto que, em concentrações de 6% de etanol, INTB2 e INTB3 foram os isolados que reportaram menor viabilidade de crescimento. Quando os isolados foram expostos as concentrações de 8 e 10% de etanol, a viabilidade de crescimento foi drasticamente afetada. Os resultados mostram que as cepas INTB2, INTB3 e INTB1 poderiam realizar a hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar em até 4% de etanol sem comprometimento severo do rendimento da hidrólise.

5.4 Purificação de celulase dos isolados bacterianos

Considerando os diferentes extratos enzimáticos (Tabela 14), o INTB1 apresentou a menor atividade enzimática (total), sendo 2,16 UI/mL, corroborando com o resultado apresentado na Figura 16. O extrato INTB3 exibiu a maior atividade, que foi 11,45 UI/mL. Já os valores intermediários estiveram com INTB2 com atividade de 4,35 UI/mL e para INTB4 com 8,19 UI/mL.

Tabela 14 – Precipitação do extrato proteico de celulase com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação

Extrato proteico	Volume total (mL)	Volume do dialisado (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (μg)	Atividade específica (U/mg)
INTB2	180	2,13	4,35 \pm 0,89	390 \pm 0,33	11,15 \pm 1,22
INTB4	180	2,22	8,19 \pm 0,66	410 \pm 0,11	19,97 \pm 0,91
INTB3	180	2,15	11,45 \pm 0,23	380 \pm 0,16	30,13 \pm 0,88
INTB1	180	2,25	2,16 \pm 0,67	390 \pm 0,47	5,53 \pm 0,44

Fonte: Autor, 2019

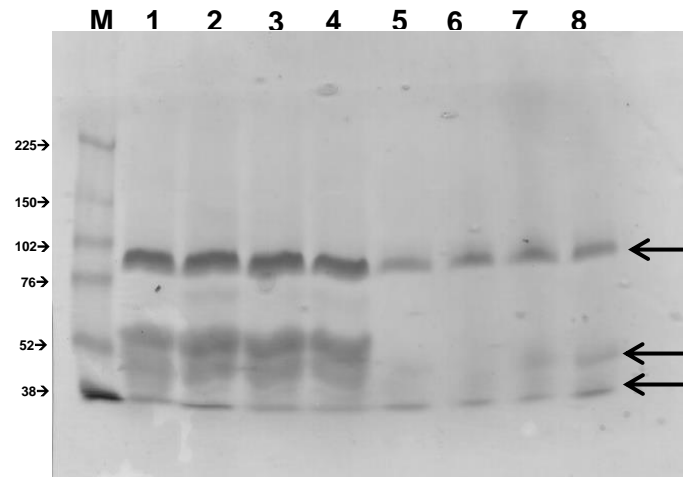
Na Tabela 14, verifica-se que a atividade específica para o isolado INTB3 foi de 30,13 U/mg, para INTB4 19,97, INTB2 11,15 e INTB1 5,53 U/mg. Os resultados mostram também que apesar de se utilizar um volume considerável de extrato enzimático, pouca quantidade de proteína é alcançada após precipitação com sulfato de amônio. Fazendo-se necessário utilizar grandes volumes para se obter uma maior concentração de celulase. Após a precipitação e diálise, a PAGE nativa (Figura 27) e SDS-PAGE (Figura 28) revelaram algumas bandas de proteínas.

5.4.1 Determinação de isoformas, estimativa do peso molecular usando SDS-PAGE, PAGE NATIVA e atividade CMC_{Case} em Zimograma-CMC

Para determinar o peso molecular das proteínas, as amostras foram investigadas usando dois tipos diferentes de PAGE: PAGE nativa e PAGE-SDS. Conforme mostram as Figuras 27 e 28.

A PAGE nativa apresentou várias bandas correspondentes ao complexo celulolítico. As três bandas mais intensas foram denominadas complexos Cel I, II e III. O peso molecular aparente das Cel I, II e III, com base nas suas mobilidades relativas, foram ~ 89, 58 e 48 kDa, respectivamente (Figura 27, PAGE NATIVA).

Figura 27 – PAGE nativa de proteínas dos isolados bacterianos de *Diatraeae saccharalis* corados com Azul de Coomassie brilhante R-250. Coluna M: marcador de peso molecular; Colunas 1, 2, 3 e 4: extrato enzimático bruto INTB2, INTB4, INTB3, INTB1, respectivamente; Colunas 5, 6, 7 e 8: proteínas precipitadas a 80% de saturação de sulfato de amônio. As setas pretas indicam a posição da enzima.



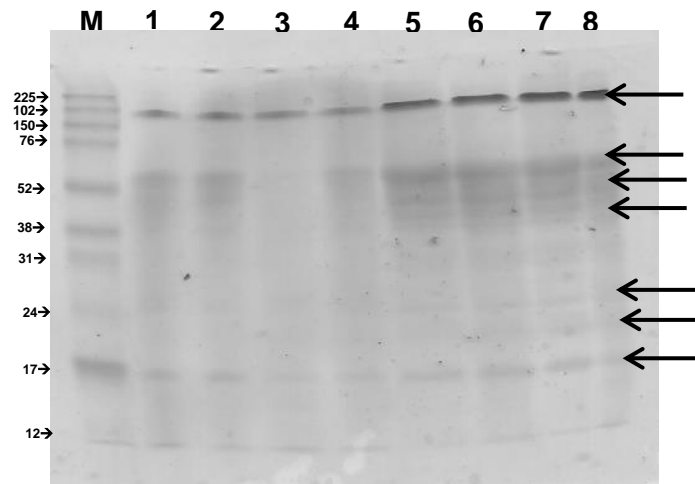
Fonte: Autor, 2019.

É possível observar através dos perfis de PAGE Nativa (Figura 27), que as massas moleculares das bandas das proteínas são idênticas em todas as amostras do extrato enzimático bruto e precipitado. SILVA et al., (2012) mencionam que este fenômeno pode estar relacionado a ausência de segregação de proteínas. Uma vez que o azul de Coomassie é utilizado para prevenir a segregação de proteínas por repulsão eletrostática (SCHÄGGER et al. 1994).

Segundo Ranoszek-Soliwoda et al., (2017), na PAGE nativa, a separação da proteína ocorre com base nas mudanças na carga líquida e no peso molecular de uma proteína, já na SDS-PAGE a carga de uma proteína é arrastada por moléculas de SDS que se ligam à superfície da proteína. Sendo assim, a separação baseia-se apenas no peso molecular em vez da carga líquida. Baseado em um estudo sobre separação de oligômeros de proteínas por eletroforese em gel nativo, Braz; Howard (2009) descrevem que a migração de proteínas em condições nativas é dependente da massa molecular, pI, pH do tampão, tipo e porcentagem do gel. Além disso, na presença do corante Azul de Coomassie, a migração também depende da ligação não específica do corante pela proteína para fornecer uma carga negativa líquida.

Os resultados do perfil eletroforético (SDS-PAGE) mostram que o extrato enzimático investigado (bruto e precipitado) refletem múltiplas proteínas detectadas no gel e revelaram que as enzimas apresentaram várias bandas (Figura 28).

Figura 28 – SDS-PAGE de proteínas dos isolados bacterianos de *Diatraeae saccharalis* em gel corado com Azul de Coomassie brilhante R-250. Coluna M: marcador de peso molecular; colunas 1, 2, 3 e 4: proteínas precipitadas a 80% de saturação com sulfato de amônio dos isolados INTB2, INTB4, INTB3 e INTB1, respectivamente; Colunas 5, 6, 7 e 8: extrato enzimático bruto das respectivas frações na mesma ordem. Os tamanhos das proteínas são mostrados à esquerda. As setas pretas indicam a posição da enzima.



Fonte: Autor, 2019.

Conforme se observa na Figura 28, as celulases desnaturadas foram separadas pelo uso de SDS-PAGE, e, revelaram bandas de proteínas que variaram entre 150 a 17 kDa tanto para as amostras precipitadas como para amostras do extrato bruto. Isto sugere que as enzimas foram adequadamente separadas após eletroforese de gel SDS. O extrato bruto mostrou até sete bandas visíveis, enquanto o precipitado mostrou apenas quatro bandas. Isto significa dizer que ocorre perda de proteínas com a precipitação de sulfato de amônio na purificação parcial.

Van Dyk et al., (2009) avaliaram o sistema celulolítico e hemicelulolítico de *Bacillus licheniformis* SVD1, e verificaram que a SDS-PAGE revelou até oito bandas visíveis, enquanto o zimograma apresentou duas bandas ativas de CMCase que variaram de 25 a 30 kDa. Annamalai et al., (2013) estudaram a produção de celulase por *Bacillus halodurans* CAS1 induzidos com biomassa lignocelulósica, e a análise da massa molar da celulase foi mostrada para um valor de 44 kDa. Zhang et al., (2016) reportaram pela primeira vez o isolamento e identificação funcional de celulase por *Pseudomonas mendocina*. A análise eletroforética através da detecção da atividade enzimática e o peso molecular da celulase produzida por *P. mendocina* revelou duas bandas com 42,4 e 20,4 kDa, no SDS-PAGE.

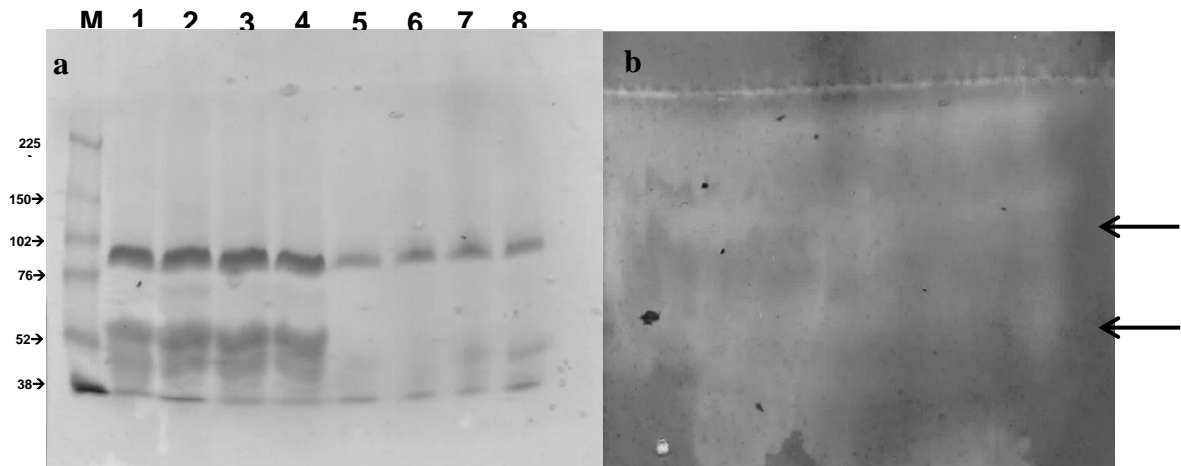
A cepa de *Klebsiella ozeanae* foi isolada de amostras de água e sedimentos para produção de celulase por Kalaiselvi; Jayalakshmi, (2013), e verificaram que as melhores condições para produção máxima de celulase esteve em 48 horas de incubação e temperatura de 35 °C. Os resultados exibidos da purificação parcial da celulase revelou um peso molecular de 32 kDa.

Bactérias produtoras de celulases foram isoladas de resíduos da indústria de papel, tecido, lixo de cozinha, jardim e resíduos de minhoca. A partir deste estudo, treze isolados apresentaram atividade celulolítica, sendo destes, seis com atividade máxima e treze com atividade mínima de celulase. A cepa *Klebsiella variicola* RBEB3 foi descrita a mais potencial para produção de celulase, deste modo, foi utilizada como inóculo para produção de celulase. O resultado da purificação verificou que o peso molecular da enzima era de 45 kDa por meio do SDS-PAGE (GOPINATH; SHAREEF; RANJIT, 2014).

O SDS PAGE (Figura 28) mostra que os complexos Cel I, II e III obtidos na PAGE nativa (Figura 27), desintegraram-se em componentes menores, e desta forma, é possível presumir que ambos não se tratam de proteínas de alta massa molecular, conforme visualizado no gel nativo.

A hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar depende principalmente da ação sinérgica das celulases e hemicelulases (SILVA et al., 2012). Portanto, para identificar a atividade de CMCase da enzima celulase, o zimograma-CMC foi combinado com a PAGE-NATIVA para estimar o tamanho molecular das proteínas com atividade celulolítica (Figura 29).

Figura 29 (a-b) - Análise de zimograma da enzima celulase dos isolados INTB2, INTB4, INTB3 e INTB1 do trato intestinal das larvas de *Diatraea saccharalis*. a) PAGE Nativa corado com Azul de Coomassie brilhante R-250. b) Gel de poliacrilamida contendo 2% de CMC corado com vermelho de Congo.



Fonte: Autor, 2019

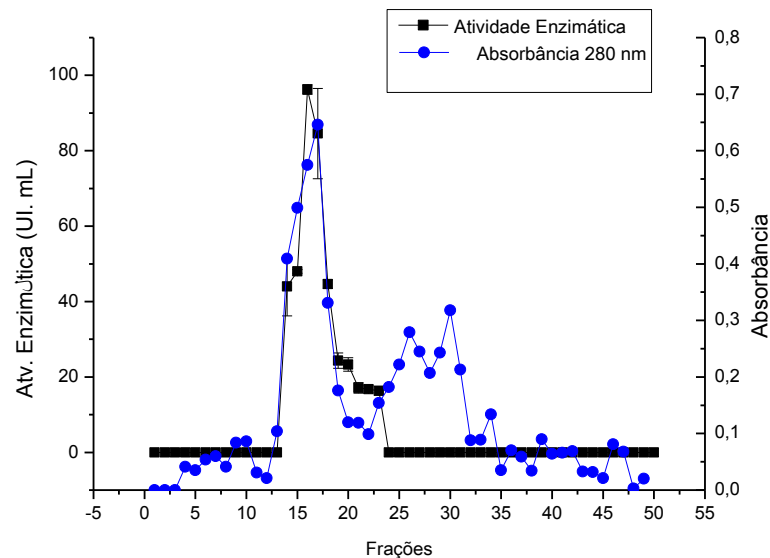
A análise do zimograma-CMC exibiu atividade celulolítica, sugerindo que as enzimas conseguiram hidrolisar a carboximetilcelulose sódica e possuem pelo menos dois tamanhos ~ 89 e 58 kDa, conforme mostrado na Figura 27 do gel nativo, onde a zona clara indica atividade de CMCCase. Sriariyanun et al., (2016) realizaram o isolamento de *Bacillus sp.* a partir do substrato de arroz, uma potencial bactéria produtora de celulase, e reportaram na análise de SDS-PAGE e zimograma-CMC que a proteína parcialmente purificada apresentou banda com atividade significativa de CMCCase correspondente a 48 kDa. Sendo assim, a proteína de aproximadamente 50 kDa mostrada neste estudo, está de acordo com este e outros estudos sobre investigação de CMCCase bacteriana, que foram descritas por possuírem tamanhos entre 35-57 kDa (JUTURU; WU, 2014; SADHU; MAITI, 2013).

É importante relatar que a análise zimográfica detectou atividades celulolíticas correspondentes a proteínas de diferentes massas moleculares e, conseqüentemente, esses resultados indicam que a hidrólise do substrato ocorreu através de pelo menos uma das proteínas obtidas na PAGE nativa (58 kDa), visto que, na PAGE nativa ocorre a integridade estrutural e funcional dos complexos multi-enzimáticos, conforme relataram Wittig; Schägger, (2008).

Bashir et al., (2013) investigaram a produção de celulases a partir de bactérias do trato intestinal de três artrópodes de diferentes nichos ecológicos: cupins, percevejos e broca de haste amarelo. Neste estudo, a produção de celulase avaliada no zimograma demonstrou zonas significativas de hidrólise da CMC. E a maioria das celulases secretadas correspondiam ao peso molecular de 72 a 130 kDa, e algumas celulases segregadas em torno de 43-53 kDa.

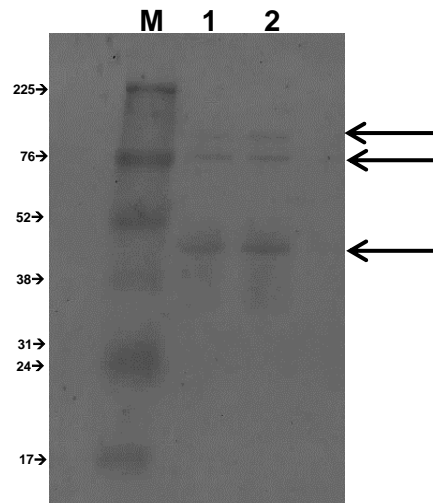
Padilha et al., (2015) induziram a produção de celulase por *Bacillus sp.* em fermentação submersa com bagaço da cana-de-açúcar. A análise do zimograma de CMCase produzida pela cepa mostrou massa molecular da enzima estimada em 55 kDa. Lee et al., (2008) induzindo a produção de celulase por *Bacillus amyloliquefaciens*, relataram peso molecular da enzima purificada de 53kDa. Como pode ser percebido, os pesos moleculares das celulases podem variar de acordo com a espécie da bactéria, mesmo que esta esteja dentro do mesmo gênero. Outros estudos também revelaram celulases de *Bacillus* com massa molecular de 24,4 e 185 kDa (RAWAT; TEWARI, 2012; QIAO et al., 2009).

Figura 30 – Isolamento da endoglucanase de isolado INTB3 através de cromatografia por exclusão de tamanho em Sephacryl S-100 (1 cm X 60 cm). A cromatografia foi realizada em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5) com um fluxo de 0,1 mL/min. A amostra aplicada correspondeu à fração de 80 a 100% de precipitação com sulfato de amônio. A concentração de proteínas foi estimada pela absorbância a 280 nm (triângulo) e a atividade enzimática através da hidrólise do substrato CMC U/mL (quadrado).



Como por ser visto na Figura 30, o método aplicado para o isolamento da celulase do isolado INTB3 apresentou um único pico de atividade celulolítica (96,25 UI/mL). A eficiência foi verificada utilizando o método de purificação através de SDS-PAGE a 12%, em que apresentou 3 bandas proteicas em torno de 113, 76, 52 kDa (Figura 31). As massas moleculares de celulases isoladas de outras espécies de bactérias celulolíticas tem variado de entre 67 kDa (ISLAM; ROY, 2018), 43,7 kDa (YIN et al., 2010), 80 kDa (GAUR; TIWARI, 2015), 54 kDa (BAJAJ et al., 2009).

Figura 31 - SDS-PAGE (corado com Azul de Coomassie brilhante R-250) a 12% da endoglucanase purificada do isolado INTB3. Linha 1: peso molecular padrão (kDa); Linha 2 e 3: enzima (duplicata) purificada correspondente à fração de cromatografia de exclusão de tamanho em Sephacryl S-100.



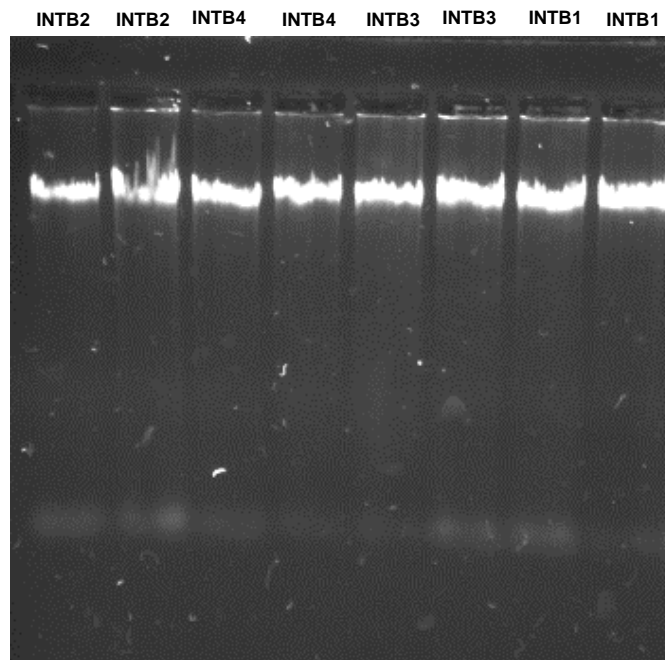
Fonte: Autor, 2019

5.5 Análise molecular dos isolados celulolíticos

A análise da extração do DNA em gel de agarose 0,8% (Figura 32), reportou que a quantidade de quebra do DNA foi aceitável, obtendo-se bandas visíveis com boa quantidade extraída. Como pode-se perceber, apenas o isolado INTB2 mostrou sinais de degradação do DNA bacteriano. As técnicas moleculares são ferramentas importantes que auxiliam na caracterização dos novos microrganismos, principalmente aqueles de interesse biotecnológico, que envolve estudos microbiológicos, bioquímicos e moleculares (RATHNAN; JOHN; BALASARAVANAN, 2013). Portanto, o método de extração de DNA com carbonato de silício mostrou-se eficiente para romper a parede celular das bactérias envolvidas nos ensaios.

Resultados satisfatórios através deste método também foram descritos por Dias Rosa (2008), onde conseguiu extrair DNA bacteriano em menor tempo e economicidade em relação aos métodos convencionais.

Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA extraído dos isolados bacterianos em tampão TAE 1x e corado com SybrGreen adicionado no preparo da amostra. Realizadas duplicatas para corrida eletroforética.



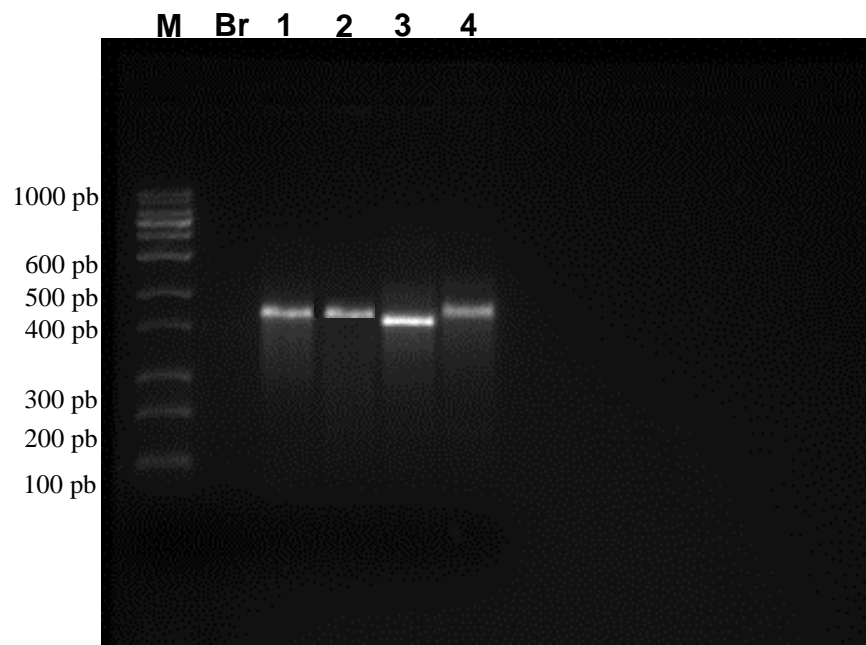
Fonte: Autor, 2019

Através da análise genética dos isolados (Figura 33), é possível observar uma ampliação homóloga nos tamanhos de fragmento, que foram de 300 pares de bases. Sendo assim, os padrões de amplificação não demonstraram variabilidade genética entre os espécimes estudados. Além disso, a qualidade do DNA mostrada com os oligonucleotídeos amplificados na região do 16S rDNA, revelou DNA íntegro e confiável para estudos subsequentes utilizando-se de PCR.

Análise molecular do gene 16S rDNA tem sido amplamente utilizada para identificação de bactérias celulolíticas (LI et al., 2016; DANTUR et al., 2015). Muitos destes estudos utilizaram os primers 27F e 1492R para amplificação do DNA através do método de PCR (NYONYO; SHINKAI; MITSUMORI, 2014; PATAGUNDI;

SHIVASARAN; KALIWAL, 2014; SAMSUDIN; WRIGHT; JASSIM, 2012; HUANG; SHENG; ZHANG, 2012).

Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% para amplificação do DNA dos isolados bacterianos por Reação em Cadeia de Polimerase em tampão TAE 1x e corado com *SybrGreen* adicionado no preparo da amostra. Linha M: Marcador 1 Kpb; Linhas 1, 2, 3 e 4: Amplificação do DNA de INTB2, INTB4, INTB3 e INTB1, nessa ordem.



Fonte: Autor, 2019

6 CONCLUSÕES

A caracterização química revelou diferenças entre a composição do bagaço não-tratado e pré-tratado, que pode ser visto com a diminuição do percentual dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina. Estes resultados contribuem para caracterização de diferentes biomassas exploradas na produção de biocombustível.

As análises por espectroscopia FTIR e DRX do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado a explosão de vapor em 120 °C por 45 minutos mostrou diferenças na complexidade da biomassa não tratada e pré-tratada.

Quanto ao índice de cristalinidade, não foram observadas diferenças importantes sob as duas condições da biomassa do bagaço da cana-de-açúcar aplicada neste estudo.

Os experimentos de otimização da produção de celulases mostraram-se importantes para aumentar a produtividade, sendo necessário ampliar esses resultados através de outros parâmetros, visando propor a seleção da estirpe com melhor desempenho para uso industrial. A indução enzimática sob pH 6,0, em concentrações de 4 e 6% de substrato (p/v) e após 5 dias revelaram-se as melhores condições para o incremento da atividade enzimática, indicando que as cepas isoladas toleram bem as condições ácidas do meio.

Os 4 isolados bacterianos INTB1, INTB2, INTB3, INTB4 foram capazes de tolerar até 6% de etanol (v/v) e mostrar capacidade de crescimento. No entanto, as condições mais favoráveis foram de até 4% de etanol sem perdas significativas da taxa de crescimento.

Dos microrganismos isolados para produção enzimática, o INTB3 foi identificado como o principal produtor de celulase, tendo a maior atividade específica após purificação parcial que foi de 30,13 U/mg. O perfil eletroforético das celulases dos quatro isolados mostra similaridade entre PAGE nativa, SDS-PAGE e Zimograma-CMC.

A purificação da endoglucanase de INTB3 através da cromatografia por exclusão de tamanho triplicou (96,25 UI/mL) a atividade específica celulolítica.

Mais distante, outros estudos tornam-se importantes para dar continuidade a estes experimentos para obter alto rendimento de produção, purificação e aplicação de celulase.

REFERÊNCIAS

- ADEMOLU, K. O.; IDOWU, A. B. Activity of digestive enzymes in *Zonocerus variegatus* (Orthoptera : Pyrgomorphidae) gut homogenates during post-embryonic development. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 31, n. 1, p. 29–33, 2016.
- ADLAKHA, N. et al. Synthesis and characterization of chimeric proteins based on cellulase and xylanase from an insect gut bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4859–4866, 2011.
- AFZAL, I. et al. Isolation and characterization of cellulase producing *Bacillus cereus* MRLB1 from soil. **Minerva Biotecnologica**, v. 24, n. 3, p. 101–109, 2012.
- AKIBA, S. et al. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 125–130, 1995.
- ANAGNOSTAKIS, L.; HANKIN, S. L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 38, n. 10, p. 570 – 572, 1975.
- ANAND, A. A. P. et al. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. **Journal of insect science (Online)**. v. 10, n. 107, p. 107, 2010.
- ANNAMALAI, N. et al. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. **Carbohydrate Polymers**. v. 94, n. 1, p. 409–415, 2013.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 2012.
- ARUSHA, P. N. et al. Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 13, p. 410–419, 2016.
- ASHA, B. M. et al. Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1501–1509, 2012.

BADGER, P. Ethanol from cellulose: A general review. **Trends in new crops and new uses**, p. 17–21, 2002.

BAGLEY, S. T. Habitat association of *Klebsiella species*. **Infect Control**. 6(2): 52-58, 1985

BAJAJ, B. K. et al. Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. **Indian Journal of Chemical Technology**. 16:382-7, 2009.

BAMFORTH, C. W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**. 50(3):353–357, 2009.

BARAMEE, S. et al. Alkaline xylanolytic-cellulolytic multienzyme complex from the novel anaerobic alkalithermophilic bacterium *Cellulosibacter alkalithermophilus* and its hydrolysis of insoluble polysaccharides under neutral and alkaline conditions. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 643–650, 2015.

BARRICK, J. E.; LENSKE, R. E. Genome dynamics during experimental evolution. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 12, p. 827–39, 2013.

BASHIR, Z. et al. Diversity and functional significance of cellulolytic microbes living in termite, pill-bug and stem-borer guts. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2558, 2013.

BEAUCHEMIN, K.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**. 81, 37-47, 2003.

BENKO, Z. et al. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 109–114, 2008.

BERASATEGUI, A. et al. **Potential applications of insect symbionts in biotechnology** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016.

BERGER, E. et al. Two noncellulosomal cellulases of *Clostridium thermocellum*, Cel9I and Cel48Y, hydrolyse crystalline cellulose synergistically. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, n. 2, p. 194–201, 2007.

BIELY, P.; PUCHART, V. **Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes.** Journal of the Science of Food and Agriculture. **Anais.** 2006

BOKINSKY, G. et al. Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 19949–19954, 2011.

BOTELHO, P. S. M. et al. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 491–496, 1999.

BRADFORD, M. M. Determinacion De Proteinas: Metodo De Bradford. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

BRAZ, V. A.; HOWARD, K. J. Separation of protein oligomers by blue native gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 388, n. 1, p. 170–172, 2009.

BRENNAN, Y. et al. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3609–3617, 2004.

BRONNENMEIER, K; STAUDENBAUER, W, L. Molecular biology and genetics of substrate utilization in clostridia. **Biotechnology**, v. 25, p. 261–309, 1993.

BRONNENMEIER, K.; RÜCKNAGEL, K. P.; STAUDENBAUER, W. L. Purification and properties of a novel type of exo-1,4- β -glucanase (Avicelase II) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. **European Journal of Biochemistry**, v. 200, n. 2, p. 379–385, 1991.

BRUNECKY, R. et al. Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 342, n. 6165, p. 1513–6, 2013a.

BRUNECKY, R. et al. Revealing Nature's Cellulase Diversity: The Digestion Mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. **Science**, v. 342, n. 6165, p. 1513–1516, 2013b.

BUI, T. H. H.; LEE, S. Y. Endogenous cellulase production in the leaf litter foraging

mangrove crab *Parasesarma erythodactyla*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 179, p. 27–36, 2014.

CALDERÓN-CORTÉS, N. et al. Endogenous Plant Cell Wall Digestion: A Key Mechanism in Insect Evolution. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 45–71, 2012.

CARLTON, J. M. et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5809, p. 207–12, 2007.

CHAMPASRI, C.; CHAMPASRI, T.; WORANAM, K. Purification, biochemical characterization of a *Macrotermes gilvus* cellulase and zymogram analysis. **Asian Journal of Biochemistry**, v. 10, n. 5, p. 190–204, 2015.

CHANTARASIRI, A. Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 3, p. 257–264, 2015.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. **Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil** **Tropical Plant Biology**, 2011.

CHELLAPANDI, P.; JANI, H. M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 122–127, 2008.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. **Directed evolution of industrial enzymes: An update** **Current Opinion in Biotechnology**, 2003.

CHIN, K. L. et al. Production of glucose from oil palm trunk and sawdust of rubberwood and mixed hardwood. **Applied Energy**, v. 88, n. 11, p. 4222–4228, 2011.

CORRALES, R. C. N. R. et al. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO₂ and SO₂. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 36, 2012a.

CORRALES, R. C. N. R. et al. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam

pretreated in the presence of CO₂ and SO₂. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 36, 2012b.

DANTUR, K. I. et al. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **AMB Express**, v. 5, p. 15, 2015.

DAVEY, H. M. Life, death, and in-between: Meanings and methods in microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5571–5576, 2011.

DAVISON, A.; BLAXTER, M. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1273–1284, 2005.

DAVOLOS, C. C. et al. Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 32–34, 2015.

DE CARVALHO, L. M. J.; DE CASTRO, I. M.; DA SILVA, C. A. B. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro-and ultra-filtration. **Journal of Food Engineering**. 87, 447-454, 2008.

DE FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. **Vinte anos de efeito sers. Quimica Nova**. v. 22. n. 4, p. 541-552, 1999.

DE FIGUEIREDO, L. P.; FERREIRA, F. F. The Rietveld Method as a Tool to Quantify the Amorphous Amount of Microcrystalline Cellulose. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1394–1399, 2014.

DESV AUX, M. *Clostridium cellulolyticum*: Model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 741–764, 2005.

DESV AUX, M. et al. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 139–145, 2009.

DHIMAN, T.; ZAMAN, M.; MACQUEEN, I.; BOMAN, R. Influence of corn processing and frequency of feeding on cow performance. **Journal of Dairy Science**. 85, 217-226, 2002.

DIAS ROSA, D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 259–261, 2008.

DÖBEREINER JOHANA. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. **Documento N°110**, p. 38, 1999.

DOI, R. H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 541–551, 2004.

DOS SANTOS, C. R. et al. Structural Basis for Xyloglucan Specificity and α -d -Xyl ρ (1 \rightarrow 6)- d -Glc ρ Recognition at the -1 Subsite within the GH5 Family. **Biochemistry**, v. 54, n. 10, p. 1930–1942, 17 mar. 2015.

DOUGLAS, A. E. **The microbial dimension in insect nutritional ecology****Functional Ecology**, 2009.

ECKERT, K. et al. Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile Alicyclobacillus acidocaldarius ATCC27009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 428–436, 2003.

ELLILÄ, S. et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**. 10:30, 1-17, 2017.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. **The gut microbiota of insects - diversity in structure and function****FEMS Microbiology Reviews**, 2013.

FAN, L. T.; LEE, Y.-H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 1, p. 177–199, 1980.

FARHAT, W. et al. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 370–377, 2017.

FELDGARDEN, M.; BYRD, N.; COHAN, F. M. Gradual evolution in bacteria: Evidence from *Bacillus* systematics. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3565–3573, 2003.

FERBIYANTO, A.; RUSMANA, I.; RAFFIUDIN, R. Characterization and Identification of Cellulolytic Bacteria from gut of Worker *Macrotermes gilvus*. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 22, n. 4, p. 197–200, 2015.

FISCHER, R.; OSTAFE, R.; TWYMAN, R. M. Cellulases from insects. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. [s.l: s.n.]. v. 136p. 51–64.

FRANK, J. A. et al. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2461–2470, 2008.

FREITAS. THE PREDOMINANCE OF DIATRAEA FLAVIPENNELLA (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IN SUGAR CANE FIELDS IN THE STATE OF ALAGOAS, BRAZIL. **Florida Entomologist**, 2006.

GALANTE, Y. M.; DECONTI, A.; MONTEVERDI, R.; **Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries**. In: Harman GF, Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium—Enzymes*. Vol. 2. London, UK: Taylor & Francis; pp. 311–326, 1998 (Biological Control and Commercial Applications).

GALANTE YM, FORMANTICI C. Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. **Current Organic Chemistry**. 7, 1399-1422, 2013.

GARVEY, M. et al. **Cellulases for biomass degradation: Comparing recombinant cellulase expression platforms****Trends in Biotechnology**, 2013.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. **BMC biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 19, 2015.

GIBSON, C. H.; SCHILD, R. E.; WICKRAMASINGHE, N. C. The Origin of Life from Primordial Planets. **International Journal of Astrobiology**, v. 10, n. 2, p. 25, 2011.

GIRÓN-PÉREZ, K. et al. Susceptibility of Brazilian populations of *Diatraea saccharalis* to Cry1Ab and response to selection for resistance. **Crop Protection**, v. 62, p. 124–128, 2014.

GOPINATH, S. M.; SHAREEF, I.; RANJIT, S. Isolation , Screening and Purification of Cellulase from Cellulase Producing *Klebsiella variicola*. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 6, p. 1398–1403, 2014.

GOUVEIA, E. R. et al. Validación de metodología para caracterización química de bagazo de caña-de-azúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GUASCH, A. et al. b-glucosidase from *Streptomyces* sp. **PDB**, 2002.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 109–115, 1977.

HAO, W.; GOLDING, G. B. Patterns of bacterial gene movement. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 7, p. 1294–1307, 2004.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213–218, 2002.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**. 10, 358-364, 1999.

HIMMEL, M. E. et al. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. **Biofuels**, v. 1, n. 2, p. 323–341, 2010.

HIRANO, N. et al. Cell-free protein synthesis and substrate specificity of full-length endoglucanase CelJ (Cel9D-Cel44A), the largest multi-enzyme subunit of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. **FEMS Microbiology Letters**, 2013.

HOBDEY, S. E. et al. Biochemical and structural characterizations of two *Dictyostelium* cellobiohydrolases from the Amoebozoa kingdom reveal a high level of conservation between distant phylogenetic trees of life. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 11, p. 3395–3409, 2016.

HONGDAN, Z.; SHAOHUA, X.; SHUBIN, W. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 391–396, 2013.

HU, L. et al. Molecular and biochemical characterization of the β -1,4-endoglucanase gene Mj-eng-3 in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 15–23, 2013.

HUANG, F.; LEONARD, B. R.; ANDOW, D. A. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. **Journal of economic entomology**, v. 100, n. 1, p. 164–171, 2007.

HUANG, S.; SHENG, P.; ZHANG, H. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 2563–2577, 2012.

IBARRA, D.; MONTE, M. C.; BLANCO, A. et al. Enzymatic deinking of secondary fibers: cellulases/hemicellulases versus laccase-mediator system. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 39, 1-9, 2012.

IRE, F. S.; EZEBUIRO, V.; OGUGBUE, C. J. Production of bioethanol by bacterial co-culture from agro-waste-impacted soil through simultaneous saccharification and co-fermentation of steam-exploded bagasse. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, n. 1, p. 26, 2016.

ISLAM, f.; ROY, N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. **Research note**. 11(445), 1-6, 2018.

JEFFRIES, T. W.; KLUNGNESS, J. H.; SYKES, M. S et al. Comparison of enzyme-enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. **Tappi journal**. 77, 173-179, 1994.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KALAISELVI, V.; JAYALAKSHMI, S. Cellulase from an estuarine *Klebsiella ozeanae*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 9, p. 109–118, 2013.

KAPOOR, K. et al. Study the effect of Gamma Radiation pretreatment of Sugarcane Bagasse on its Physico-chemical Morphological and Structural Properties. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 141, n. June, p. 190–195, 2017.

KARGARZADEH, H. et al. Effects of hydrolysis conditions on the morphology, crystallinity, and thermal stability of cellulose nanocrystals extracted from kenaf bast

fibers. **Cellulose**, v. 19, n. 3, p. 855–866, 2012.

KIRSCH, R. et al. Combining proteomics and transcriptome sequencing to identify active plant-cell-wall-degrading enzymes in a leaf beetle. **BMC genomics**, v. 13, p. 587, 2012.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnol Bioeng**. 109, 1083–1087, 2012.

KOECK, D. E. et al. Genomics of cellulolytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, 2014.

KRISHNAN, M. et al. Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, p. S16–S21, 2014.

KRISKO, A.; RADMAN, M. Biology of extreme radiation resistance: The way of *Deinococcus radiodurans*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 7, 2013.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**. 1-11, 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.

KULKARNI, T. S. et al. Crystal structure of ??-glucosidase 1A from *Thermotoga neapolitana* and comparison of active site mutants for hydrolysis of flavonoid glucosides. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 5, p. 872–884, 2017.

KULOYO, O. O. et al. *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 3173–3183, 2014.

LA GRANGE, D. C.; DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W. H. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010.

LAMBERTZ, C. et al. Challenges and advances in the heterologous expression of

- cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 135, 2014.
- LEAL, M. R. L. V. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 11–19, 2013.
- LEÃO, R. M. et al. Environmental and technical feasibility of cellulose nanocrystal manufacturing from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 518–529, 2017.
- LEE, C.; DARAH, I.; IBRAHIM, C. Enzymatic deinking of laser printed office waste papers: Some governing parameters on deinking efficiency. **Bioresource Technology**. 98, 1684-189, 2007.
- LEE, Y. J. et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 378–386, 2008.
- LEE, K. A. et al. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in drosophila. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 797–811, 2013.
- LI, H. et al. Diversity and activity of cellulolytic bacteria, isolated from the gut contents of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) fed on Sudan grass (*Sorghum sudanense*) or artificial feedstuffs. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 1, p. 153–164, 2016.
- LI, N. et al. Analysis of gene gain and loss in the evolution of predatory bacteria. **Gene**, v. 598, p. 63–70, 2017.
- LI, Q.; RENNECKAR, S. Supramolecular structure characterization of molecularly thin cellulose i nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 3, p. 650–659, 2011.
- LI, Y. et al. Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-beta-1,4-glucanase AC-EG65 from the mollusc *Ampullariacrossean*. Comparative biochemistry and physiology. Part B. **Biochemistry & molecular biology**, v. 153, n. 2, p. 149–56, 2009.
- LIBERATO, M. V. et al. Molecular characterization of a family 5 glycoside hydrolase suggests an induced-fit enzymatic mechanism. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23473, 2016.

LIMA, C. S. S. et al. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy**, v. 102, p. 254–259, 2013.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, 2012.

LIU, S. L.; DU, K. Enhanced expression of an endoglucanase in *Bacillus subtilis* by using the sucrose-inducible *sacB* promoter and improved properties of the recombinant enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 83, n. 2, p. 164–168, 2012.

LO, N.; TOKUDA, G.; WATANABE, H. Evolution and function of endogenous termite cellulases. In: **Biology of Termites: A Modern Synthesis**. p. 51–67 2010.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

MACEDO, N.; MACEDO, D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão Agrícola**, v. 1, n. 1, p. 38–46, 2004.

MAMO, G.; FARYAR, R.; KARLSSON, E. N. Microbial glycoside hydrolases for biomass utilization in biofuels applications. In: **Biofuel Technologies: Recent Developments**. p. 171–188, 2013.

MANABE, K. et al. Improved production of secreted heterologous enzyme in *Bacillus subtilis* strain MGB874 via modification of glutamate metabolism and growth conditions. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 18, 2013.

MANE, V. P. et al. Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 8, n. 10, p. 745–751, 2007.

MANFREDI, A. P.; PEROTTI, N. I.; MARTÍNEZ, M. A. Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1384–1393, 2015.

MEDIE, F. M. et al. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 227–234, 2012.

MENENDEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; RIVAS, R. Biotechnological applications of bacterial cellulases. **AIMS Journal**. 2(3), 163-182, 2015.

MEYER, A. S.; JEPSEN, S. M.; SØRENSEN, N. S. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46, 2439-2446, 1998.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**. 13, 205-216, 2002.

MÖLLERS, K. B. et al. Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, p. 64, 2014.

MOLNÁR, S. et al. A two-agent model applied to the biological control of the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) by the egg parasitoid *Trichogramma galloi* and the larvae parasitoid *Cotesia flavipes*. **BioSystems**, v. 141, p. 45–54, 2016.

MORAÏS, S. et al. Paradigmatic status of an endo- and exoglucanase and its effect on crystalline cellulose degradation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 78, 2012.

NAKASHIMA, K. et al. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 7, p. 777–784, 2002.

SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 82 (3), 2379-2386. 2018.

SRIVASTAVA, N. et al. Application of Cellulases in Biofuels Industries: An Overview. **Journal of Biofuels and Bioenergy**. 1(1):55-63, 2015.

NISHIDA, Y. et al. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. **Biochimie**, v. 89, n. 8, p. 1002–1011, 2007.

NOZAKI, M. et al. The contribution of endogenous cellulase to the cellulose digestion in the gut of earthworm (*Pheretima hilgendorfi*: Megascolecidae). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 762–769, 2009.

NYONYO, T.; SHINKAI, T.; MITSUMORI, M. Improved culturability of cellulolytic rumen bacteria and phylogenetic diversity of culturable cellulolytic and xylanolytic bacteria newly isolated from the bovine rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 3, p. 528–537, 2014.

PADILHA, I. Q. M. et al. Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulase synthesized by *Bacillus* sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 35–42, 2015.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.

PARK, I. Y. et al. A new earthworm cellulase and its possible role in the innate immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 67, p. 476–480, 2017.

PARK, S. et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 10, 2010.

PASTOR, F. I. J. et al. Xylanases : Molecular Properties and Applications. **Industrial Enzymes**, p. 65–82, 2007.

PATAGUNDI, B. I.; SHIVASARAN, C. T.; KALIWAL, B. Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 59–69, 2014.

PAUCHET, Y. et al. Immunity or digestion: Glucanase activity in a glucan-binding protein family from lepidoptera. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 4, p. 2214–2224, 2009.

PAUCHET, Y. et al. Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

PAUCHET, Y.; HECKEL, D. G. The genome of the mustard leaf beetle encodes two active xylanases originally acquired from bacteria through horizontal gene transfer. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 280, n. 1763, p. 20131021, 2013.

PAYNE, C. M. et al. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 36, p. 14646–14651, 2013.

PEREIRA RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, 2003.

PHINICHKA, N.; KAENTHONG, S. Regenerated cellulose from high alpha cellulose pulp of steam-exploded sugarcane bagasse. **Journal of Materials Research and Technology**, 2016.

POLETTI, M.; PISTOR, V.; ZATTERA, A. J. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. **Cellulose – Fundamental Aspects**, p. 45–68, 2013.

POURRAMEZAN, Z. et al. Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite *Microcerotermes diversus* (Silvestri). **Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 736–742, 2012.

PRAKASH, V. et al. Isolation , partial purification and characterization of cellulase from *Bacillus* isolates. **The Allahabad Farmer**, v. LXIV, n. January, p. 69–77, 2009.

PRASAD, M. P.; SETHI, R. Optimization of cellulase production from a novel bacterial isolate *Mesorhizobium* sp. from marine source. **Journal of Enzyme Research**, v. 4, n. 1, p. 39–45, 2013.

PRASAD, P.; SINGH, T.; BEDI, S. Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. **Journal of King Saud University - Science**, v. 25, n. 3, p. 245–250, 2013.

PROVENCHER, S. W. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. **Computer Physics Communications**, v. 27, n. 3, p. 213–227, 1982.

PUSPITA, I. D. et al. Are uncultivated bacteria really uncultivable? **Microbes and environments / JSME**, v. 27, n. 4, p. 356–66, 2012.

QIAO, J. et al. Cloning of a beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its functional expression in *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 334–42, 2009.

RAGAN, M. A.; BEIKO, R. G. Lateral genetic transfer: open issues. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences*, v. 364, n. 1527, p. 2241–2251, 2009.

RAJAGOPAL, R. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, 2009.

RANOSZEK-SOLIWODA, K. et al. Catalase-modified gold nanoparticles: Determination of the degree of protein adsorption by gel electrophoresis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 533–539, 2017.

RATHNAN, R. K.; JOHN, D.; BALASARAVANAN, T. Isolation , Screening , Identification and Optimized Production of Extracellular Cellulase From *Bacillus Subtilis* Using Cellulosic Waste As Carbon Source. **Internation Journal of Corrent Microbiology and Applied Sciences**. v. 2, n. 6, p. 2383–2386, 2013.

RAWAT, R.; TEWARI, L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. **Extremophiles**, v. 16, n. 4, p. 637–644, 2012.

RIEDEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (CelZ) and Avicelase II (CelY) in the degradation of microcrystalline cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, n. 2, p. 239–243, 1997.

RINKE, R. et al. Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2679–2691, 2011.

ROCHA, G. et al. **A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. Fifth brazilian symposium on the chemistry of lignins and**

other wood components, 1997.

ROSA, S. M. L. et al. Chlorine-free extraction of cellulose from rice husk and whisker isolation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1131–1138, 2012.

SADHU, S. et al. Lactose-enhanced cellulase production by *Microbacterium* sp. isolated from fecal matter of Zebra (*Equus zebra*). **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1050–1055, 2011.

SADHU, S. et al. Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 4, p. 323–332, 2014.

SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase Production by Bacteria : A Review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235–258, 2013.

SAKAMOTO, K. et al. Immunohistochemical, in situ hybridization and biochemical studies on endogenous cellulase of *Corbicula japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 2, p. 216–221, 2008.

SALAH, A.; IBRAHIM, S.; EL-DIWANY, A. I. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, n. 4, p. 473–478, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor laboratory press. 1998.

SAMSUDIN, A. A.; WRIGHT, A. D. G.; JASSIM, R. AL. Cellulolytic bacteria in the foregut of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8836–8839, 2012.

SANTOS, R. M. DOS et al. Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 707–714, 2013.

SCHÄGGER, H.; CRAMER, W. A.; VON JAGOW, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and

isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. **Analytical Biochemistry**. 217, 2 1994.

SCHARF, M. E. et al. Multiple levels of synergistic collaboration in termite lignocellulose digestion. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

SCHWARZ, W. H.; ZVERLOV, V. V.; BAHL, H. Extracellular glycosyl hydrolases from Clostridia. **Advances in Applied Microbiology**. v. 56. n. 1. p. 215-261, 2004.

SELVAM, K. et al. Process optimization of cellulase production from alkali-treated coffee pulp and pineapple waste using *Acinetobacter* sp. TSK-MASC. **International Journal Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 4, n. 25, p. 13045–13051, 2014.

SHAH, S.R. Chemistry and Applications of Cellulase in Textile Wet Processing. **Research Journal of Engineering Sciences**. v. 2 n. 7. p. 1-5, 2013.

SHARMA, N. et al. Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 310–316, 2007.

SHELOMI, M.; HECKEL, D. G.; PAUCHET, Y. Ancestral gene duplication enabled the evolution of multifunctional cellulases in stick insects (Phasmatodea). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, p. 1–11, 2016.

SHELOMI, M.; WATANABE, H.; ARAKAWA, G. Endogenous cellulase enzymes in the stick insect (Phasmatodea) gut. **Journal of Insect Physiology**, v. 60, n. 1, p. 25–30, 2014.

SHIGENOBU, S. et al. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. **Nature**, v. 407, n. 6800, p. 81–86, 2000.

SHWETA, A. Cellulases of bacterial origin and their applications: A review. **International Journal of Science and Research**. 3, 1652-1655, 2012.

SINGH, A.; KUHAD, R. C.; WARD, O. P. Industrial application of microbial cellulases. In: Kuhad RC, Singh A, editors. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*. New Delhi, India: I.K.International Publishing House. 345–358, 2007.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**. 6(174), 1-15, 2016.

SILVA, J. M. et al. In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 23–30, 2015.

SILVA, A. J. DA et al. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multi-enzymatic complexes. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2729–2738, 2012.

SILVA, T. P. et al. Production, purification, characterization, and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresource Technology**. 270, 263-269, 2018.

SIMÕES, R. A. et al. Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 129, p. 7–12, 2015.

SOUSA, A. et al. Evolution of commensal bacteria in the intestinal tract of mice. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 114–121, 2017.

SPITZER, J. The continuity of bacterial and physicochemical evolution: Theory and experiments. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 6, p. 457–461, 2014.

SREEDHARAN, S. et al. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **Journal of Nutrition and Food Sciences**. v. 6n. 1. p. 1-13, 2016.

SREEJA S.J. et al. Optimization of cellulase production by *Bacillus altitudinis* APS MSU and *Bacillus licheniformis* APS2 MSU, gut isolates of fish *Etroplus suratensis*. **International Journal of Advancements in Research & Technology**, v. 2, n. 4, p. 401–406, 2013.

SRIARIYANUN, M. et al. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp isolated from rice paddy field soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 23–28, 2016.

STEWART, E. J. Growing unculturable bacteria. **Journal of Bacteriology**. v. 194. n. 16. p. 4151-4160, 2012.

SU, L. J. et al. Evaluation of cellulolytic activity in insect digestive fluids. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2432–2441, 2013.

SU, X.; MACKIE, R. I.; CANN, I. K. O. Biochemical and mutational analyses of a multidomain cellulase/mannanase from *Caldicellulosiruptor bescii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2230–2240, 1 abr. 2012.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases—production, applications and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**. 64(11):832–844, 2005.

SULZENBACHER, G. et al. The crystal structure of a 2-fluorocellotriosyl complex of the *Streptomyces lividans* endoglucanase CelB2 at 1.2 Å resolution. **Biochemistry**, v. 38, n. 15, p. 4826–4833, 1999.

SZOSTAK, J. W. Attempts to define life do not help to understand the origin of life. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 29, n. 4, p. 599–600, 2012.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

TERRAPON, N. et al. Molecular traces of alternative social organization in a termite genome. **Nature Communications**, v. 5, n. May, p. 3636, 2014.

THIRUMALE, S.; SWAROOPA RANI, D.; NAND, K. Control of cellulase formation by trehalose in *Clostridium papyrosolvens* CFR-703. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 241–245, 2001.

TRAN, D. T.; I, Y. P.; LIN, C. W. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 5, p. 762–769, 2013.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 783–791, 2004.

UBHAYASEKERA, W. et al. Structures of *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D in complex with product and inhibitors. **FEBS Journal**, v. 272, n. 8, p. 1952–1964, 2005.

UEDA, M. et al. Cloning and expression of the cold-adapted endo-1,4-β-glucanase

gene from *Eisenia fetida*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 511–516, 2014.

VALIM, I. C. et al. Neural network modeling to support an experimental study of the delignification process of sugarcane bagasse after alkaline hydrogen peroxide pre-treatment. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 760–770, 2017.

VAN DYK, J. S. et al. The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 5, p. 372–378, 2009.

VANEECHOUTTE, M.; FANI, R. From the primordial soup to the latest universal common ancestor. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 7, p. 437–440, 2009.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 609–32, 2010a.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 609–632, 2010b.

WHITE, A.; ROSE, D. R. Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 7. n. 5. p. 645-651, 1997.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**. v. 14. n. 3. p. 259-263, 2011.

WITTIG, I.; SCHÄGGER, H. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. **Proteomics**. v. 8. n. 19. p. 3974-3990, 2008.

WONGPUTTISIN, P.; KHANONGNUCH, C.; KONGBUNTAD, W. et al. Use of *Bacillus subtilis* isolates from Tuanao towards nutritional improvement of soya bean hull for monogastric feed application. **Letters Applied Microbiology**. 59, 328-333, 2014.

YAMADA, R.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. **Biotechnology Advances**. v. 31. n. 6. p. 754-763, 2013.

YAN, S.; WU, G. Secretory pathway of cellulase: a mini-review. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 177, 2013.

YANG, W. et al. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 262–267, 2014.

YIN, L. J.; HUANG, P. S.; LIN, H. H. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium cellulomonas Sp. YJ5. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9833–9837, 2010.

YU, M. et al. Preparation and characterization of bamboo nanocrystalline cellulose. **BioResources**, v. 7, n. 2, p. 1802–1812, 2012.

ZAINI, L. et al. Isolation and Characterization of Cellulose Whiskers from Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Bast Fibers. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**. v. 4. n. 1. p. 37–44, 2013.

ZECHEL, D. L.; WITHERS, S. G. Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. **Accounts of Chemical Research**. v. 33, n. 1, p. 11–18, 2000.

ZHANG, J. et al. The isolation and functional identification on producing cellulase of *Pseudomonas mendocina*. **Bioengineered**, v. 7, n. 5, p. 382–391, 2016.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2012.

ZHENG, B. et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of thermophilic cellulase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, n. 3, p. 219–222, 2009.

ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. **Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems - Clostridium thermocellum and Clostridium stercorarium, thermophilic plant-fiber degraders**. Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais**.2008