

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis**

**Farley Souza Ribeiro Menezes**

**DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES CELULOLÍTICAS  
DE MICRO-ORGANISMOS SELVAGENS ISOLADOS SOB PLANTAÇÕES DE  
EUCALIPTO NO CERRADO MINEIRO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**Diamantina**

**2019**



**Farley Souza Ribeiro Menezes**

**DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES CELULOLÍTICAS  
DE MICRO-ORGANISMOS SELVAGENS ISOLADOS SOB PLANTAÇÕES DE  
EUCALIPTO NO CERRADO MINEIRO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

**Diamantina**

**2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M543d Menezes, Farley Souza Ribeiro.  
Determinação das propriedades celulolíticas de micro-organismos selvagens isolados sob plantações de eucalipto no cerrado mineiro visando a produção de bioetanol. / Farley Souza Ribeiro Menezes. – Diamantina, 2019.  
123 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis) -  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Celulase. 2. Enzimas. 3. Fontes renováveis. I. Laia, Marcelo Luiz. II.  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de  
Pós-Graduação em Biocombustíveis. III. Título.

**CDD 662.88**

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Viviane Pedrosa – CRB-6/2641

**Farley Souza Ribeiro Menezes**

**DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES CELULOLÍTICAS  
DE MICRO-ORGANISMOS SELVAGENS ISOLADOS SOB PLANTAÇÕES DE  
EUCALIPTO NO CERRADO MINEIRO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales  
do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz Laia

Data de aprovação: 31/05/2019

---

Prof. Dr. Sandro Luiz Barbosa dos Santos - UFVJM

---

Prof. Dr. José Barbosa dos Santos - UFVJM

---

Prof. Dr. Emerson Delano Lopes - IFNMG

---

Prof. Dr. Rogério Alexandre Alves de Melo - UFVJM

---

Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia  
Presidente

**Diamantina - MG**

*Dedico esta Tese a meus pais, Tadeu e Suely (in memoriam),  
a meus irmãos, Shirley e Harley e a meu filho,  
Pedro Henrique. Seria impossível sem vocês!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concedidas durante a vida, por permitir que eu concluísse com sucesso os objetivos, alcançando com sucesso as vitórias, por ter me amparado sempre com todo Seu amor. Obrigado Senhor!

Ao Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia por ter me acolhido como orientado. Obrigado pela amizade, atenção, paciência e confiança no desenvolvimento dos trabalhos.

À minha amada mãe Suely (*in memorian*) que prestou todo o seu esforço e dedicação para que este sonho se realizasse, e infelizmente nos deixou tão cedo. Obrigado minha rainha.

A meu pai Tadeu, meus irmãos Shirley, Harley, e à minha namorada Thácilla por todo carinho, dedicação e paciência. Quantas vezes pensei em desistir e vocês foram minha base!

Aos meus filhos Pedro Henrique e Helena. Vocês são meus motivos de luta.

Aos meus avós vovô Sinval (*in memorian*) e vovó Juju (*in memorian*), que também nos deixaram infelizmente no decorrer do curso. Obrigado por todo apoio e confiança.

A todos os meus demais familiares, avós, primos, tios, sobrinhos, por toda paciência e confiança.

À equipe do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) pelo companheirismo e amizade. Anny, Tarcísio, Giza, Tamirinha, Maria Cecília, Vivi, Janaína, Matheus, Ariadne, Kamilinha, Renata, Bianca e Jéssica.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis pela oportunidade e a seus professores pelo aprendizado.

Aos irmãos da República Copo Cheio, pela amizade nos anos convvidos, Cleriston, Fidel, Thiago, Saymon, Henrique, Amadeus, Paulo, Vitor, Davi, Antony e Rodrigo.

Aos colegas de trabalho da Escola Estadual Felício Pereira de Araújo. Em especial ao diretor Charles Gutemberg, Vonaide, Claudiney, Tânia, Lurdinha, Elmides, Val, Tião da secretaria e Bia. Aos colegas de trabalho da Escola Estadual Professor Alcides de Carvalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)**

**“Depois de escalar uma montanha muito alta, descobrimos que há muitas outras montanhas por escalar.” (Nelson Mandela)**

**“Não está na natureza das coisas que o homem realize um descobrimento súbito e inesperado. A ciência avança passo a passo e cada homem depende do trabalho de seus predecessores.” (Ernest Rutherford)**



## RESUMO

MENEZES, F.S.R. **Determinação das propriedades celulolíticas de micro-organismos selvagens isolados sob plantações de eucalipto no cerrado mineiro visando à produção de bioetanol.** Tese (doutorado) do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, 2017.

O aumento da demanda por biocombustíveis tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias de produção de etanol e provocado a busca por fontes renováveis de produção deste biocombustível visando mitigar os efeitos causados pelos combustíveis fósseis ao meio ambiente e evitar uma futura carência. O uso de biomassa celulósica para produção de etanol de segunda geração tem se mostrado alternativa vantajosa sendo necessária a utilização de enzimas do complexo celulase produzidas pelos microrganismos decompositores. Esses micro-organismos são capazes de converter a celulose em unidades de açúcares fermentescíveis, podendo gerar etanol. Para este trabalho, foram selecionados cinco micro-organismos potenciais produtores para avaliação da expressão de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase em meio líquido, com índices de atividade enzimática: 22, 10.33, 7.33, 5.33 e 5.44, cedidos pelo Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal da UFVJM. A produção em meio líquido alcançou aproximadamente  $0,2 \text{ U.mL}^{-1}$  de endoglucanase e  $0,035 \text{ U.mL}^{-1}$  de  $\beta$ -glicosidase. Em seguida, procedeu-se à identificação molecular destas cinco espécies selecionadas, onde foram identificadas as bactérias IM32-90 como *Xanthobacter flavus*, IM32-91 como pertencente à família *Methylobacteriaceae*, IM1-74 da família *Xanthobacteraceae*, IM25-9 da família *Streptomycetaceae* e IM1-5 da família *Paenibacilaceae*. IM32-91 foi utilizado para comparar a produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase utilizando carboximetilcelulose, celulose microcristalina e casca de eucalipto pré-tratada por moagem, e posterior otimização do processo de produção das enzimas analisando as variáveis temperatura e pH. A carboximetilcelulose se mostrou mais eficiente quanto à produção das celulases, mostrando diferença significativa sobre celulose microcristalina e casca de eucalipto em pó. A melhor condição de produção de endoglucanase foi observada em temperatura  $28^\circ\text{C}$  e pH 6,0 ( $0,250 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e  $\beta$ -glicosidase em pH 5,0 temperatura  $28^\circ\text{C}$ .

**Palavras-chave:** Celulase; enzimas, fontes renováveis.

## ABSTRACT

MENEZES, F.S.R. **Determination of the cellulolytic properties of wild microorganisms isolated under eucalyptus plantations in the Cerrado of Minas Gerais, aiming at the production of bioethanol.** Thesis (Doctorate) Postgraduate Biofuels Program, Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri - UFVJM, 2017.

Increasing demand for biofuels has driven the development of new ethanol production technologies and has prompted the search for renewable sources of biofuels production to mitigate the effects of fossil fuels on the environment and avoid future shortages. The use of cellulosic biomass for the production of second generation ethanol has proved to be an advantageous alternative requiring the use of cellulase complex enzymes produced by decomposing microorganisms. These microorganisms are able to convert the cellulose into fermentable sugar units, which can generate ethanol. Five potential microorganisms were selected for the evaluation of the expression of endoglucanase and  $\beta$ -glycosidase in liquid medium, with enzymatic activity indexes: 22, 10.33, 7.33, 5.33 and 5.44, assigned by the Laboratory of Genetics and Forest Biotechnology of the UFVJM. Production in liquid medium reached approximately 0.2 U.mL<sup>-1</sup> of endoglucanase and 0.035 U.mL<sup>-1</sup> of  $\beta$ -glycosidase. Then, molecular identification of these five species was identified, where they identified the bacteria IM32-90 as *Xanthobacter flavus*, IM32-91 as belonging to the family *Methylobacteriaceae*, IM1-74 of the family *Xanthobacteraceae*, IM25-9 of the family *Streptomycetaceae* and IM1 -5 of the family *Paenibacilaceae*. IM32-91 was used to compare the production of endoglucanase and  $\beta$ -glycosidase using carboxymethylcellulose, microcrystalline cellulose and eucalyptus bark pretreated by milling, and later optimization of the enzyme production process by analyzing the temperature and pH variables. Carboxymethylcellulose showed to be more efficient in the production of cellulases, showing significant difference on microcrystalline cellulose and eucalyptus peel powder. The best endoglucanase production condition was observed at 28 ° C and pH 6.0 (0.250 U.mL<sup>-1</sup>) and  $\beta$ -glucosidase at pH 5.0 at 28 ° C.

**Keywords:** Cellulase, enzymes, renewable sources.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Número de artigos relacionados a biocombustíveis publicados anualmente pelos principais colaboradores. A plotagem mostra partes da contribuição cumulativa de cada país (ou grupo de países) para o período de 1990 a 2014.....	23
<b>Figura 2:</b> Rompimento da estrutura da biomassa lignocelulósica pelo pré-tratamento.....	28
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose.....	31
<b>Figura 4:</b> Modulo de ligação a carboidrato (CBM).....	32
<b>Figura 5:</b> Curva analítica de glicose.....	48
<b>Figura 6:</b> Curvas de crescimento dos cultivos em 240 horas.....	50
<b>Figura 7:</b> Curvas de produção de endoglucanase pelas cinco linhagens avaliadas durante 240 horas de cultivo. A: IM1-74; B: IM25-9; C: IM32-90; D: IM-1-5; E: IM32-91; F: Atividade máxima de endoglucanase.....	51
<b>Figura 8:</b> Curvas de produção de $\beta$ -glicosidase das cinco linhagens avaliadas durante 240 horas de cultivo. A: IM1-74; B: IM25-9; C: IM32-90; D: IM-1-5; E: IM32-91; F: Atividade máxima de $\beta$ -glicosidase.....	53
<b>Figura 9:</b> Esquema to teste de gradiente de temperatura de amplificação dos pares de oligonucleotídeos.....	63
<b>Figura 10:</b> Análise da integridade do DNA genômico das culturas de IM32-90, IM21-91, IM1-74, IM25-9 e IM1-5. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo.....	65
<b>Figura 11:</b> Produto da PCR gerado pela amplificação do DNA genômico referente ao fragmento de DNA ribossômico 16S de cada amostra.....	67
<b>Figura 12:</b> Perfil de temperatura de pareamento de pares de bases dos pares de oligonucleotídeos avaliados.....	68
<b>Figura 13:</b> Perfil de amplificação das amostras de DNA dos cinco microrganismos com os primers e temperaturas mais eficientes.....	69
<b>Figura 14:</b> Perfil da amplificação das amostras de DNA após purificação.....	70
<b>Figura 15:</b> Alinhamento da sequência contígua de IM32-90 com genótipos cadastrados no Blast.....	77
<b>Figura 16:</b> Alinhamento no software MEGA6 dos genótipos cadastrados no banco de genes com a sequência contígua de IM32-90.....	78
<b>Figura 17:</b> Árvore filogenética de IM32-90 confeccionada no Blast.....	79
<b>Figura 18:</b> Análise Filogenética Molecular de IM32-90 pelo Método da Máxima Verossimilhança.....	80

<b>Figura 19:</b> Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM32-90 com sequências cadastradas no RDP.....	82
<b>Figura 20:</b> Alinhamento da sequência contígua de IM32-91 com genótipos cadastrados no Blast.....	84
<b>Figura 21:</b> Alinhamento no software MEGA6 dos genótipos cadastrados no banco de genes com a sequência contígua de IM32-91.....	85
<b>Figura 22:</b> Árvore filogenética de IM32-91 confeccionada no Blast.....	86
<b>Figura 23:</b> Análise Filogenética Molecular de IM32-91 pelo Método da Máxima Verossimilhança.....	87
<b>Figura 24:</b> Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM32-91 com sequências cadastradas no RDP.....	87
<b>Figura 25:</b> Alinhamento da sequência contígua de IM1-74 com genótipos cadastrados no Blast.....	90
<b>Figura 26:</b> Alinhamento no software MEGA6 dos genótipos cadastrados no banco de genes com a sequência contígua de IM1-74.....	91
<b>Figura 27:</b> Árvore filogenética de IM1-74 confeccionada no Blast.....	92
<b>Figura 28:</b> Análise Filogenética Molecular de IM1-74 pelo Método da Máxima Verossimilhança.....	93
<b>Figura 29:</b> Alinhamento da sequência contígua de IM25-9 com genótipos cadastrados no Blast.....	95
<b>Figura 30:</b> Alinhamento no software MEGA6 dos genótipos cadastrados no banco de genes com a sequência contígua de IM25-9.....	96
<b>Figura 31:</b> Árvore filogenética de IM25-9 confeccionada no Blast.....	97
<b>Figura 32:</b> Análise Filogenética Molecular de IM25-9 pelo Método da Máxima Verossimilhança.....	98
<b>Figura 33:</b> Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM25-9 com sequências cadastradas no RDP.....	99
<b>Figura 34:</b> Alinhamento da sequência contígua de IM1-5 com genótipos cadastrados no Blast.....	101
<b>Figura 35:</b> Alinhamento no software MEGA6 dos genótipos cadastrados no banco de genes com a sequência contígua de IM1-5.....	102
<b>Figura 36:</b> Árvore filogenética de IM25-9 confeccionada no Blast.....	103
<b>Figura 37:</b> Análise Filogenética Molecular de IM1-5 pelo Método da Máxima Verossimilhança.....	104

<b>Figura 38:</b> Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM1-5 com sequências cadastradas no RDP.....	105
<b>Figura 39:</b> Meios de cultura contendo os três substratos diferentes como principal fonte de carbono: Celulose Microcristalina (CE), Casca de Eucalipto em pó (CE) e Carboximetilcelulose (CMC).....	112
<b>Figura 40:</b> Avaliação da produção de endoglucanase e $\beta$ -glicosidase utilizando CMC, Celulose Microcristalina e Casca de Eucalipto em pó como principais fontes de carbono....	115
<b>Figura 41:</b> Produção de endoglucanase em diferentes condições de pH e temperatura.....	118
<b>Figura 42:</b> Produção de $\beta$ -glicosidase em diferentes condições de pH e temperatura.....	118

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Vários recursos terrestres para energias renováveis e sustentáveis e seus constituintes químicos (%).....	27
<b>Tabela 2:</b> Principais aplicações das celulases.....	34
<b>Tabela 3:</b> Composição do meio de cultura utilizado para início de crescimento do inóculo...	47
<b>Tabela 4:</b> Análise de variância (ANOVA) da produção de endoglucanase pelos cinco microrganismos avaliados.....	52
<b>Tabela 5:</b> Índices de atividade enzimática expresso em meio sólido e atividades de endoglucanase e $\beta$ -glicosidase das cinco cepas avaliadas em meio líquido.....	54
<b>Tabela 6:</b> Análise de variância (ANOVA) da produção de $\beta$ -glicosidase pelos cinco microrganismos avaliados.....	54
<b>Tabela 7:</b> Oligonucleotídeos utilizados no teste de seleção de primers efetivos na amplificação das amostras de DNA dos microrganismos.....	61
<b>Tabela 8:</b> Sequências Forward e Reverse geradas pela análise de sequenciamento.....	70
<b>Tabela 9:</b> Sequências contíguas de cada microrganismo confeccionadas no software Bioedit. ....	74
<b>Tabela 10:</b> Análise de variância ANOVA da produção de endoglucanase.....	116
<b>Tabela 11:</b> Análise de variância ANOVA da produção de $\beta$ -glicosidase.....	116
<b>Tabela 12:</b> Picos de produção de endoglucanase e $\beta$ -glicosidase nas diferentes condições de pH e temperatura avaliados.....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°GL	Graus Gay Lussac
atm	Atmosfera
BGLs	Beta-glicosidasas
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CBHs	Celobiohidrolases
CGEN	Gestão do Patrimônio Genético
cm	Centímetros
CBM	Módulo de Ligação a Carboidrato
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
CRBs	Centro de Recursos Biológicos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNS	Ácido Dinitrossalicílico
D.O.	Densidade óptica
EC	Comissão de Enzimas
EGs	Endoglucanases
FES	Fermentação em Estado Sólido
FPLC	Cromatografia Líquida de Proteína Rápida
FPU	Unidades de Papel de Filtro
GWh	Giga Watts hora
h	Hora
IAE	Índice de Atividade Enzimática
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice Enzimático
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
LGBF	Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
MG	Minas Gerais
min	Minutos
mM	Milimolar
ml	Mililitro

NaOH	Hidróxido de Sódio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de Amônio
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
RNAse	Enzima Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
s	Segundos
TE	Tampão tris-EDTA
TAE	Tampão tris-ácido acético-EDTA
WDCM	Centro Mundial de Dados para Micro-organismos



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$ - Beta

® Marca registrada

% Porcentagem

°C Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
1 Introdução geral.....	20
2 Objetivos.....	21
2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	21
2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	21
3 Etapas realizadas.....	21
3.1 <i>Avaliação da produção de celulasas em meio líquido</i> .....	21
3.2 <i>Identificação molecular das cinco espécies utilizadas</i> .....	21
3.3 <i>Estudo da produção de celulasas empregando diferentes substratos</i> .....	22
4 Revisão de literatura.....	23
4.1 <i>Bioetanol: potencial produtivo e tecnologias</i> .....	23
4.2 <i>Diversidade da Microbiota Brasileira</i> .....	25
4.3 <i>Utilização da Biomassa Lignocelulósica</i> .....	25
4.4 <i>Pré-tratamento da biomassa</i> .....	27
4.5 <i>Celulasas: classificação e ação enzimática</i> .....	29
4.6 <i>Micro-organismos Produtores de Celulasas</i> .....	33
4.7 <i>Principais aplicações das celulasas</i> .....	34
4.8 <i>Identificação molecular de micro-organismos</i> .....	35
5 Referências bibliográficas.....	37
<b>CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE E <math>\beta</math>-GLICOSIDASE POR MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS SOB PLANTIO DE EUCALIPTO NO CERRADO DE MINAS GERAIS</b> .....	45
1. Introdução.....	45
2. Materiais e métodos.....	46
2.1 <i>Meio de cultura e inóculo</i> .....	46
2.2 <i>Cultivo dos micro-organismos para produção de endoglucanase e <math>\beta</math>-glicosidase</i> .....	47
2.3 <i>Avaliação da produção de endoglucanase</i> .....	48
2.4 <i>Avaliação da produção de <math>\beta</math>-glicosidase</i> .....	49
3. Resultados e discussão.....	49
3.1 <i>Curvas de crescimento</i> .....	49
3.2 <i>Perfil de produção de endoglucanase</i> .....	51
3.3 <i>Perfil da produção de <math>\beta</math>-glicosidase</i> .....	52
4. Conclusão.....	55

5.	Referências bibliográficas.....	56
----	---------------------------------	----

### **CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS IM32-90, IM32-91, IM1-74, IM25-9 E IM1-5 ISOLADAS SOB PLANTIO DE EUCALIPTO.....**

59

1-	Introdução.....	59
2-	Materiais e métodos.....	60
2.1	<i>Obtenção das bactérias.....</i>	60
2.2	<i>Extração do DNA genômico.....</i>	60
2.3	<i>Amplificação dos DNAs 16s.....</i>	61
2.3.1	<i>Seleção dos primers.....</i>	61
2.3.2	<i>Teste de gradiente de temperatura.....</i>	62
2.3.3	<i>PCR para purificação do DNA.....</i>	63
2.4	<i>Purificação do DNA.....</i>	63
2.5	<i>Reação de Sequenciamento.....</i>	64
2.6	<i>Identificação Molecular.....</i>	64
3-	Resultados e discussão.....	65
3.1	<i>Extração do DNA genômico.....</i>	65
3.2	<i>Seleção dos primers.....</i>	65
3.3	<i>Teste gradiente de temperatura.....</i>	68
3.4	<i>PCR para purificação do DNA.....</i>	68
3.5	<i>Gel do DNA purificado.....</i>	69
3.6	<i>Sequenciamento.....</i>	70
3.7	<i>Identificação molecular.....</i>	76
3.7.1	<i>IM32-90.....</i>	76
3.7.2	<i>IM32-91.....</i>	83
3.7.3	<i>IM1-74.....</i>	89
3.7.4	<i>IM25-9.....</i>	94
3.7.5	<i>IM1-5.....</i>	100
4-	Conclusão.....	106
5-	Referências bibliográficas.....	107

### **CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO DE CELULASES PELA BACTÉRIA IM32-91 ISOLADA SOB PLANTAÇÕES DE EUCALIPTO NO CERRADO MINEIRO UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS.....**

110

1.	Introdução.....	110
----	-----------------	-----

2.	Materiais e métodos.....	111
2.1	<i>Micro-organismo</i> .....	111
2.2	<i>Fermentação submersa</i> .....	111
2.3	<i>Atividade enzimática</i> .....	112
2.3.1	<i>Avaliação da produção de endoglucanase (CMCase)</i> .....	112
2.3.2	<i>Avaliação da atividade de <math>\beta</math>-glicosidase (Celobiase)</i> .....	113
2.4	<i>Otimização do processo de produção de celulase</i> .....	113
3.	Resultados e discussão.....	113
3.1	<i>Produção de endoglucanase e <math>\beta</math>-glicosidase utilizando diferentes fontes de carbono</i> .....	114
3.2	<i>Otimização do processo de produção de celulases</i> .....	117
4.	Conclusão.....	120
5.	Referências bibliográficas.....	121
	 <b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	 123

## CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento contínuo da população mundial e da economia industrializada tem provocado o rápido aumento da demanda global de energia. O desenvolvimento de tecnologias alternativas para a produção de energia tem sido prioridade no setor de pesquisa e desenvolvimento, devido a essa crescente demanda de combustíveis de petróleo e consequente impacto no meio ambiente. Além desses fatores, o aumento do consumo de petróleo importado pode influenciar no crescimento econômico. A bioenergia produzida a partir da biomassa destaca-se como uma fonte de energia alternativa sustentável, com grande aceitação em vários setores como o público, industrial e político (GAURAV *et al.*, 2017).

O uso da biomassa lignocelulósica ou de resíduos agrícolas para produção de biocombustíveis apresenta vantagens, pois pode ser capaz de reduzir consideravelmente as emissões de gases de efeito estufa quando comparados com o uso do petróleo. A presença de alto nível de celulose e hemiceluloses na biomassa lignocelulósica é a principal vantagem para a produção de bioetanol, uma vez que a despolimerização desses dois carboidratos permite a liberação de açúcares fermentescíveis. Para a conversão da celulose, deve-se realizar algum tipo de pré-tratamento para a remoção desses componentes que estão ligados por ligações covalentes cruzadas e ligações não covalentes ([ARIYAJAROENWONG \*et al.\*, 2015](#)).

A chave da tecnologia de conversão da biomassa a açúcares fermentáveis, como a glicose, é a hidrólise enzimática, considerada a técnica mais promissora (WANG *et al.*, 2015).

A despolimerização eficiente dos polissacarídeos presentes nas biomassas vegetais é obtida pela aplicação de um extenso conjunto de enzimas ativas contra carboidratos. A conversão de celulose requer a ação sinérgica de três enzimas-chave: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidases. As celulasas pertencem à família das hidrolases de glicosídeos e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas que despolimerizam a celulose em açúcares fermentáveis, proteínas complexas multi-enzimáticas (BRINK & VRIES, 2011; BEHERA & RAY, 2016).

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de enzimas celulolíticas por micro-organismos isolados sob plantio de eucalipto pertencentes ao banco de microrganismos

do Laboratório de Genética e Biologia Florestal do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo Geral***

Estudar as propriedades celulolíticas de micro-organismos selvagens isolados do cerrado mineiro.

### **2.2 *Objetivos específicos***

- Avaliar a produção de celulases por cinco micro-organismos selecionados do banco de micro-organismos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal do Departamento de Engenharia Florestal da UFVJM;
- Realizar a identificação molecular dos micro-organismos selecionados com maior potencial para a produção de celulases;
- Estudar o efeito de diferentes substratos na indução da produção de celulases;
- Aperfeiçoar o processo de produção de celulases por um micro-organismo selecionado.

## **3 ETAPAS REALIZADAS**

### **3.1 *Avaliação da produção de celulases em meio líquido***

Foram selecionados cinco micro-organismos, do banco de micro-organismos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal – LGBF da UFVJM, que apresentaram índices de atividade enzimática acima de 2,5 dentre os isolados. Estes foram submetidos a cultivo em meio líquido por 240 horas para avaliação quantitativa da produção de celulase. Os resultados desta etapa foram descritos no Capítulo 2: Avaliação da produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase por micro-organismos isolados sob plantio de eucalipto no cerrado de Minas Gerais.

### **3.2 *Identificação molecular das cinco espécies utilizadas***

As cinco estirpes utilizadas para produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase utilizadas na etapa anterior passaram por processo de identificação molecular. O DNA total foi extraído, amplificado e purificado a região do rRNA 16S. Reações de sequenciamento utilizando oligonucleotídeos específicos foram procedidas, e o sequenciamento foi realizado. As sequências obtidas passaram por tratamento e foram então alinhadas com o BLASTn e o RDP. Após o alinhamento, procedeu-se a confecção da árvore filogenética utilizando o software MEGA6, assim como a árvore filogenética do BLASTn para comparação. Os resultados desta etapa foram descritos no Capítulo 3: Identificação molecular das bactérias celulolíticas IM32-90, IM32-91, IM1-74, IM25-9 e IM1-5 isoladas sob plantio de eucalipto.

### **3.3 *Estudo da produção de celulases empregando diferentes substratos***

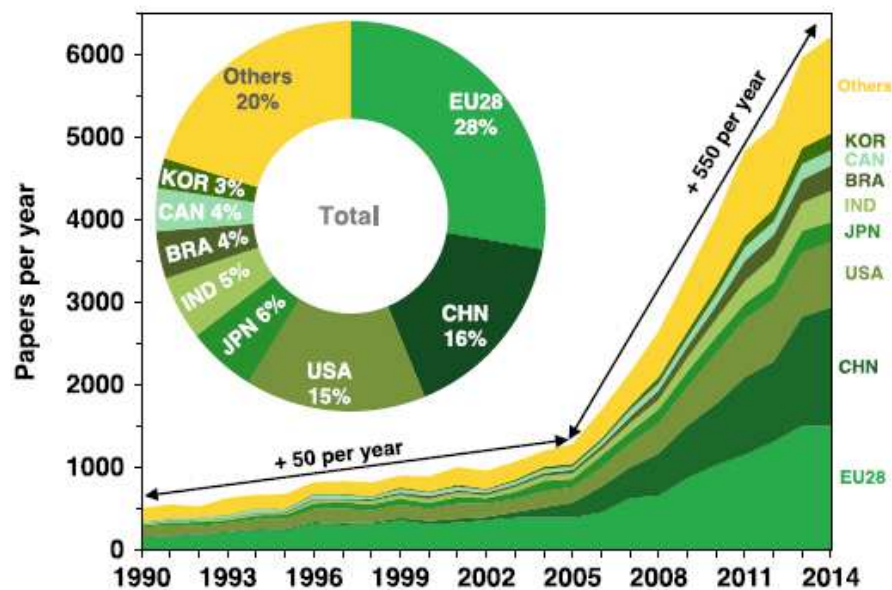
Nesta etapa foram avaliados diferentes substratos para produção de enzimas celulolíticas. Fermentações foram realizadas utilizando substratos comerciais como carboximetilcelulose (CMC) e celulose microcristalina (ambos da marca Synth<sup>®</sup>), e casca de eucalipto pré-tratado por moagem. Foram avaliadas diferentes temperaturas e pHs, além de um meio modificado quanto à composição de nutrientes, com intuito de otimizar a produção de celulases pelo micro-organismo que apresentou melhores resultados. Os resultados desta etapa se encontram descritos no Capítulo 4: Produção de celulases pela bactéria IM32-91 isolada sob plantações de eucalipto no cerrado mineiro utilizando diferentes substratos.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 *Bioetanol: potencial produtivo e tecnologias*

O esgotamento dos combustíveis fósseis associado ao crescimento contínuo da população mundial e da economia industrializada tem provocado o rápido aumento da demanda global de energia. O desenvolvimento de tecnologias alternativas de energia tem sido prioridade no setor de pesquisa e desenvolvimento (Figura 1), devido à crescente demanda de combustíveis de petróleo e conseqüente impacto no meio ambiente. O aumento do consumo de petróleo importado pode levar à turbulência no crescimento econômico. A bioenergia produzida a partir da biomassa destaca-se como uma fonte de energia alternativa sustentável, com grande aceitação em vários setores como o público, industrial e político (GAURAV *et al.*, 2017).

**Figura 1:** Número de artigos relacionados a biocombustíveis publicados anualmente pelos principais colaboradores. A plotagem mostra partes da contribuição cumulativa de cada país (ou grupo de países) para o período de 1990 a 2014.



Fonte: AZADI *et al.*, 2017.

Em termos de custos, o bioetanol e o biodiesel permanecem ao longo do tempo como os biocombustíveis mais competitivos. O bioetanol, como combustível limpo e renovável, vem ganhando cada vez mais atenção, por mostrar grandes benefícios ambientais, podendo ser produzido a partir de diferentes tipos de matérias-primas renováveis tais como



cana de açúcar, milho, trigo, mandioca (primeira geração), biomassa de celulose (segunda geração) e biomassa de algas (terceira geração) (BAEYENS *et al.*, 2015; MILLINGER *et al.*, 2017).

O Brasil possui liderança tecnológica no setor devido ao lançamento do Proálcool na década de 1970. Nos anos 2000, o País despontou novamente na produção do biocombustível, mas passou a enfrentar concorrência maior de norte-americanos e da União Europeia (DA SILVA *et al.*, 2013).

Segundo dados da Empresa de Pesquisa Energética (Brasil, 2015), a indústria de etanol no Brasil processa aproximadamente 630 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para produzir 35,4 milhões de toneladas de açúcar, 28,5 milhões de m<sup>3</sup> de etanol e 32,300 GWh de energia elétrica anualmente. O etanol combustível produzido a partir da cana-de-açúcar é usado em grande escala como etanol anidro em veículos *flex*, como uma mistura de etanol anidro com gasolina.

A fermentação em batelada alimentada com reciclo de células é o processo utilizado por cerca de 70-80% das destilarias para produzir etanol, reutilizando 99,5% das células em fermentação sequencial, o que contribui para reduzir o tempo de fermentação para 6-11 h e aumentar o rendimento de etanol a 90-92%, com uma concentração final de etanol variando entre 8 e 11°GL (BASSO *et al.*, 2008; BRETHAUER ; WYMAN, 2010;).

A biomassa lignocelulósica serve como fonte potencial para a produção de bioetanol de segunda geração, apresentando-se disponível e de baixo custo, bem como o fato de ser renovável e não competir com a produção de alimentos para consumo humano ou animal. A presença de alto nível de celulose e hemiceluloses na biomassa lignocelulósica é a principal vantagem para a produção de bioetanol. Porém, como a biomassa lignocelulósica é composta também por lignina, deve-se realizar algum tipo de pré-tratamento para a remoção de hemiceluloses e lignina que estão ligadas por ligações covalentes cruzadas e ligações não covalentes (CHENG *et al.*, 2008).

Além da biomassa de plantas, as microalgas também estão sendo investigadas como matéria-prima para a produção comercial de biocombustíveis de terceira geração, devido ao seu potencial de escalabilidade e vantagens de sustentabilidade em relação às demais matérias-primas convencionais (BATAN; QUINN; BRADLEY, 2013).

Existe uma probabilidade de 75% de que os biocombustíveis de microalgas excederão 20% do mercado de biocombustíveis até 2030. Isto está condicionado à melhoria e ao desenvolvimento das mudanças tecnológicas e

ambientais, políticas e dos mercados de bioenergia e dos novos alimentos derivados de microalgas (GAMBELLI *et al.*, 2017).

#### 4.2 *Diversidade da Microbiota Brasileira*

O Brasil é um país com uma grande extensão territorial, ocupando 8,5 milhões de km<sup>2</sup>, dos quais a maior parte localiza-se entre o Trópico de Capricórnio e o Equador, apresentando muitas zonas climáticas diferentes que levam a grandes variações ecológicas e diversos biomas. A Amazônia, maior floresta tropical do mundo, ocupa 49% do território brasileiro; o Pantanal, maior planície de inundação, 1,7%; o Cerrado, 23,9%; a Caatinga, 9,9%; os Prados de Pampas, 2%; e a Mata Atlântica, 13%. O litoral brasileiro possui mais de 3,5 milhões de km<sup>2</sup> e inclui ecossistemas como recifes de corais, dunas, manguezais, lagos, estuários e pântanos. O cerrado e a caatinga são, respectivamente, os biomas de savana e

semiárido mais diversos do planeta (BRASIL, 2019; SOARES-FILHO *et al.*, 2014).

O Brasil abriga mais de 10% do número total de espécies conhecidas na Terra, com grande diversidade de plantas e micro-organismos. Os micro-organismos do solo desempenham papéis vitais nas funções do ecossistema, onde atuam também como decompositores sendo que as comunidades microbianas do solo podem ser fortemente estruturadas. A coleta, o isolamento, a identificação e a conservação de micro-organismos em Centros de Recursos Biotecnológicos (CRB) são muito importantes para o desenvolvimento científico e tecnológico de uma nação, pois muitas linhagens microbianas são relevantes para a agricultura e para as indústrias farmacêutica, biotecnológica e de alimentos. Vários programas de organizações federais e estaduais têm incentivado a formação de uma rede de pesquisadores para estudar os recursos naturais e a biodiversidade da nação, investigando os sistemas enzimáticos com potencial de degradação da biomassa e aplicação biotecnológica na área de bioenergia (VALENCIA; CHAMBERGO, 2013; WU *et al.*, 2017).

As coleções de micro-organismos permitem o conhecimento sobre sua diversidade, facilitando sua exploração biotecnológica. Uma pesquisa sobre o *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM), alimentado pela Federação Mundial de

Coleções Culturais e pela Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) mostrou que existem 46 coleções de culturas brasileiras registradas. A maioria dessas coleções culturais está localizada no Sudeste do Brasil (SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013).

### **4.3 Utilização da Biomassa Lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica tem sido retratada como matéria-prima potencial de baixo custo para a produção de produtos químicos e biocombustíveis pela degradação e conversão dos três principais componentes da parede celular (lignina, hemicelulose e celulose), em vista da alta eficiência e proteção do meio ambiente (XU *et al.*; 2018). A chave dessa tecnologia é a conversão da biomassa em açúcares fermentáveis, como a glicose, pela hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, considerada a técnica mais promissora (WANG *et al.*, 2015).

A biomassa lignocelulósica pode ser classificada em alguns grupos: gramíneas perenes, plantas aquáticas, materiais florestais (madeira), resíduos agrícolas (palhas de cereais, e bagaço) e porção orgânica de resíduos sólidos municipais, todos com potencial para ser usado para produção de etanol. Em geral, a biomassa lignocelulósica parece ser a mais promissora e abundante em todo o mundo, podendo ser usada para produzir etanol sem necessidade de terras extras ou interferência na produção de alimentos e culturas alimentares (ZABED *et al.*, 2017). A quantidade de recursos renováveis celulósicos produzidos pela fotossíntese é de mais de 100 bilhões de toneladas por ano em todo o mundo. A celulose é um dos principais componentes de materiais celulósicos (XU *et al.*, 2016).

A conversão bioquímica de matérias-primas lignocelulósicas em biocombustíveis avançados envolve três etapas principais: o pré-tratamento, que aumenta a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática; hidrólise enzimática para liberar açúcares solúveis e fermentação para produzir etanol (WU *et al.*, 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2017).

Gaurav *et al* (2017) relataram que plantas e algas são fontes de matéria-prima de biocombustíveis e podem ser explorados para produção de energia renovável baseada em biomassa. Na tabela 1 está listada a constituição química da parede celular de vários tipos de subprodutos agrícolas sustentáveis e renováveis já utilizados para produção de biocombustíveis.

**Tabela 1:** Vários recursos terrestres para energias renováveis e sustentáveis e seus constituintes químicos (%).

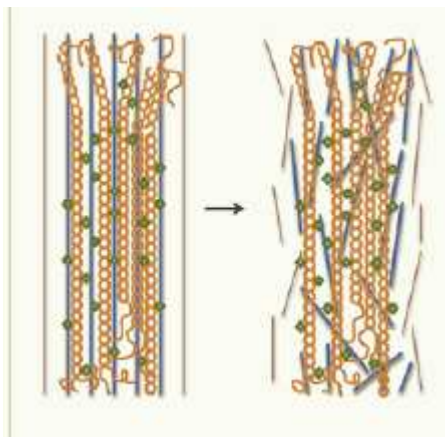
<b>Recursos agrícolas</b>	<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Lignina</b>
Resíduos de abacaxi	19.4	22.4	4.7
Resíduos de floresta (exploração de madeira)	46.3	28.3	26.5
Bagaço de cana	26–50	25–28	23–25
Casca de coco	44.2	12.1	32.8
Cascas de soja	29–51	10–20	1–4
Palha de milho	31–41	20–34	16–23
Palha de trigo	32–49	23–39	5–19
Seda de algodão	80–85	10–15	3.5–05
Casca de arroz	35.1	20.9	17.6
Resíduos de banana	31.9	18.0	22.4
Colza	27.6	20.2	18.3

**Fonte:** GAURAV *et al.* (2017).

#### 4.4 *Pré-tratamento da biomassa*

Existem diferentes métodos de pré-tratamento que podem romper a estrutura da biomassa lignocelulósica (Figura 2) de modo a produzir várias frações e torná-la mais acessível e reativa à degradação enzimática, facilitando a sacarificação. O objetivo do pré-tratamento é melhorar a hidrólise enzimática de carboidratos (celulose e hemicelulose) e, conseqüentemente, aumentar a eficiência geral de bioconversão para produção de açúcares. Para alcançar esse objetivo, vários métodos foram propostos e vários reagentes e catalisadores para diferentes substratos foram desenvolvidos. Os métodos mais conhecidos são: explosão a vapor, moagem, água quente, tratamento ácido, tratamento alcalino e outros métodos. O resultado varia amplamente em termos de suas características físicas e químicas (KIM; LEE; KIM, 2016; WOJTUSIK *et al.*, 2017).

**Figura 2:** Rompimento da estrutura da biomassa lignocelulósica pelo pré-tratamento.



Fonte: YUN *et al.*, 2016.

Diferentes tipos de processos físicos, como trituração mecânica (corte, ou moagem) e irradiação (raios gama, feixes de elétrons ou micro-ondas) podem ser usados para melhorar a digestibilidade dos materiais lignocelulósicos. Estes processos mecânicos são necessários para reduzir materiais lignocelulósicos maciços em pequenas peças e facilitar os processos de pré-tratamento seguintes. Após o corte, vários métodos de moagem podem ser usados para moer a biomassa lignocelulósica em pó fino. O fresamento pode reduzir significativamente o tamanho das partículas e o grau de cristalinidade do material lignocelulósico e, conseqüentemente, melhorar a hidrólise enzimática. É necessária a entrada de energia relativamente alta para alcançar uma alta taxa de hidrólise enzimática e produção de açúcar fermentável, o que torna a fresagem não economicamente viável. A irradiação não pode remover hemiceluloses ou lignina dos materiais lignocelulósicos ou reduzir o tamanho das partículas, sendo usada de forma auxiliar, juntamente com outros processos de pré-tratamento. Feixe de elétrons ou raios gama combinados com esmagamento mecânico, pré-tratamentos hidrotérmicos ou químicos podem melhorar ainda mais a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Embora o pré-tratamento de irradiação mostrou um efeito positivo na melhoria da digestibilidade de materiais lignocelulósicos, o custo de instalação é muito caro para aplicações industriais (SUN *et al.*, 2016).

O pré-tratamento químico é utilizável devido a suas vantagens: as substâncias químicas são mais fáceis de obter, mais baratas e são principalmente duráveis com armazenamento adequado. As substâncias químicas degradam a parede lignocelulósica e a cadeia complexa de carboidratos por reação química direta que requer menos energia, embora demande mais tempo e produza comparativamente

menor rendimento de açúcar (para tratamento alcalino). Existem vários componentes usados no pré-tratamento químico, como ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e ácido sulfúrico, sendo este último o mais comumente utilizado para o tratamento de materiais lignocelulósicos. Podem ser utilizados também ácidos orgânicos como ácido maléico, láctico e acético. Na prática, o pré-tratamento com ácido concentrado tem desvantagem por produzir inibidores da fermentação, além de corroer facilmente os equipamentos de produção e uma tendência de degradação dos monômeros de açúcar (ADITIYA *et al.*, 2016).

Enquanto o pré-tratamento ácido é uma boa opção principalmente contra a hemicelulose na biomassa lignocelulósica, pré-tratamento alcalino promove maior remoção do componente de lignina, fornecendo melhor acesso para enzimas do processo de hidrólise enzimática. O  $\text{NH}_4\text{OH}$  é comumente empregado para produção de bioetanol de segunda geração. Essas substâncias alcalinas são escolhidas por sua especialidade em degradar principalmente compostos de lignina. Em material lignocelulósico, o  $\text{NaOH}$  proporciona uma superfície interna melhor ao inchar e degradar a lignina. O pré-tratamento resulta em maior porosidade da biomassa e leva a um melhor rendimento de glicose após hidrólise enzimática, uma vez que rompe as ligações éster (ADITIYA *et al.*, 2016).

Apesar de vários tipos de pré-tratamento estarem disponíveis, o pré-tratamento biológico parece ser um processo ecológico promissor e não há geração de inibidores durante o processo (KARIMI; ESFANDIAR; BIRIA, 2017). No cenário atual existem poucas limitações no uso desta estratégia para o processo em escala piloto. O único e mais importante impasse é o tempo de incubação longo para a deslignificação efetiva. Isso pode ser minimizado até certo ponto usando consórcio microbiano. Atividades de pesquisa e desenvolvimento no sentido de ajustar o processo para que se torne economicamente viável são necessárias. O pré-tratamento biológico usando metabólito de um micro-organismo da natureza para produção de etanol celulósico é uma tecnologia promissora devido às suas vantagens como estratégia ecológica e economicamente viável para aumentar a taxa de sacarificação enzimática. Como nenhum produto químico é utilizado neste processo, não há necessidade de reciclagem de produtos químicos e não são formados compostos tóxicos para o meio ambiente. Neste processo são utilizados micro-organismos como fungos de podridão branca para a degradação de lignina e hemiceluloses da biomassa lignocelulósica. (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

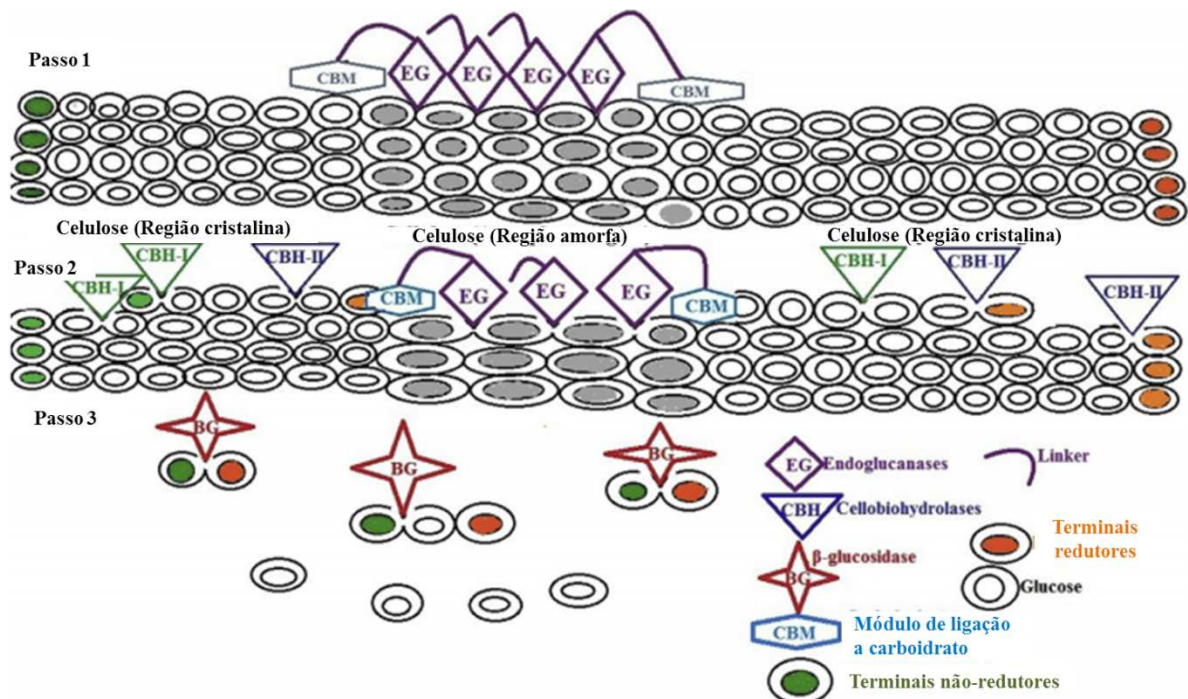
#### 4.5 *Celulases: classificação e ação enzimática*

O uso de celulases para obter produtos bioquímicos úteis a partir de matérias-primas celulósicas tem despertado grande interesse em pesquisas. As enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas dentro da matriz de celulose para produzir produtos intermediários úteis para uso biotecnológico diverso. A degradação enzimática de polissacarídeos vegetais tem muitas aplicações industriais, como no papel, indústria alimentícia e para produção sustentável de combustíveis e produtos químicos. Celulose, hemicelulose e pectina são os principais componentes dos polissacarídeos da parede celular da planta. Estes polissacarídeos são muitas vezes bem embalados, contêm muitos resíduos de açúcares diferentes e são ramificados com uma diversidade de estruturas. Para permitir a degradação eficiente desses polissacarídeos, é produzido um extenso conjunto de enzimas ativas contra carboidratos que podem ser organizadas em diferentes famílias com base na sequência de aminoácidos dos módulos catalíticos (BRINK; VRIES, 2011; OBENG *et al.*, 2017).

As celulases são complexos enzimáticos produzidos principalmente por micro-organismos como fungos e bactérias, que atuam com grande especificidade na clivagem de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas em cadeias de celulose, sendo classificadas de acordo com a nomenclatura União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como EC 3.2.1.x. (BINOD *et al.*, 2011; HENRISSAT, 1991). A IUBMB classificou as enzimas em seis grandes grupos (Classes), de acordo com o tipo de reação que catalisam. Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “E.C.” (*Enzyme Commission of the IUBMB*), que é composto por 4 dígitos: 1- classe, 2- subclasse dentro da classe, 3- grupos químicos específicos que participam da reação e 4- a enzima, propriamente dita. As celulases pertencem à família das hidrolases de glicosídeos e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas que despolimerizam a celulose em açúcares fermentáveis. São proteínas complexas multi-enzimáticas e requerem a ação sinérgica de três enzimas-chave: endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.176) (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) para a despolimerização de celulose a glicose (BEHERA e RAY, 2016).

As endoglucanases (EGs) são responsáveis pela endo-hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas na região amorfa da celulose, originando oligossacarídeos de cadeias diferentes e novas pontas livres nas fibras. Por essa razão, estas têm atraído atenção em aplicações biotecnológicas e industriais, como na biorrefinaria de etanol e nas indústrias de alimentos para animais. As celobiohidrolases (CBHs) degradam a celulose a partir dessas novas pontas livres, gerando o dissacarídeo celobiose. Existem dois tipos de CBHs, a CBH I que cliva terminais redutores da celulose, e a CBH II que age nos terminais não-redutores. As  $\beta$ -glicosidases (BGLs) finalizam o processo, com a transferência de grupos glicosil entre oxigênios nucleofílicos resultando na hidrólise de ligações  $\beta$ -glicosídicas de D-glicopiranosídeo e celobiose formados, produzindo glicose (Figura 3). Estas enzimas contribuem para a degradação de carboidratos e seus produtos são fontes de energia para micro-organismos (ZHOU *et al.*, 2017; KUHAD *et al.*, 2011; YANARDAĞ *et al.*, 2017; SINGHANIA *et al.*, 2017).

**Figura 3:** Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose.



Fonte: Adaptado de BEHERA *et al.*, 2017

A maioria das celulases são proteínas modulares formadas por domínios catalíticos discretos com um ou mais módulos de ligação à celulose (CBMs) ligados

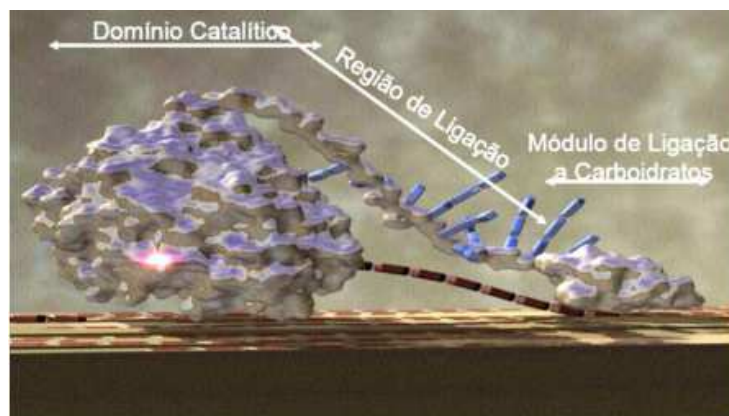


por conectores flexíveis. O CBM funciona como uma sonda celulósica, cuja principal função é reconhecer e se ligar à celulose, manter a enzima ligada e aumentar a concentração efetiva de enzimas na superfície, resultando em diferentes funções como o aumento da hidrólise de substratos insolúveis, redução da distância do domínio catalítico ao substrato e rompimento da estrutura de polissacarídeos. A retirada dos módulos faz com que a atividade da enzima seja reduzida (TAJWAR *et al.*, 2017; PRATES *et al.*, 2013).

Ao se ligarem à superfície cristalina da celulose, os CBMs expõem seus domínios catalíticos para o substrato específico e aumentam a eficiência catalítica. Além disso, acredita-se que os CBMs sejam capazes de romper a estrutura dos polissacarídeos e, assim, aumentar a taxa de hidrólise (RODRIGUES, 2014).

Com relação ao modo de interação a carboidratos, os CBMs podem ser divididos em três grupos principais: módulos tipo A, que reconhecem a superfície plana dos substratos cristalinos; CBMs do tipo B (endo), que se ligam a uma cadeia de polissacarídeos individual por um local de ligação em forma de fenda, e os módulos do tipo C (exo), que têm um sítio interagindo com as extremidades das cadeias polissacarídicas. Já foram reconhecidas até o momento 81 famílias de CBM com base na similaridade de sequência de aminoácidos (DVORTSOV *et al.*, 2018).

**Figura 4:** Modulo de ligação a carboidrato (CBM).



Fonte: FOELKEL, 2013.

A produção de celulasas pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles o pH, concentração do substrato, concentração do inóculo, linhagem do micro-

organismo utilizado, tipo de matéria-prima, tempo de cultivo, agitação e temperatura de cultivo (SALES *et al.*, 2010).

#### 4.6 *Micro-organismos Produtores de Celulases*

Muitas investigações foram conduzidas para buscar novos micro-organismos capazes de produzir enzimas celulases com maior atividade específica e maior eficiência (KUMARI *et al.*, 2011). Manisha e Yadav (2017) relataram a presença de micro-organismos celulolíticos em ambientes extremos como a Antártida, águas residuais contaminadas por óleo lubrificante, região semi-desértica de Coahuila, México (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Gêneros Oceanobacillus e Salinicoccus*), subprodutos da agroindústria (*Bacillus*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Lactococcus*, e gêneros de *Escherichia*), amostras de solo com matéria orgânica em decomposição (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *Serratia marcescens*). Dentre os fungos já estudados, muitos se destacaram por grande potencial de produção de enzimas celulolíticas: *Acremonium terricola*, *Aspergillus japonicus* Saito, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium lateritium*, *Monodictys castaneae*, *Nigrospora sphaerica*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. glandicola*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Phoma tropica*, *Phomopsis archeri*, *Tetraploa aristata*, *Xylaria sp.*, *Acremonium zeae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum graminicola*, *Penicillium echinulatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus giganteus* (VALENCIA; CHAMBERGO, 2013). Em estudo de produção de celulase por uma cepa do fungo filamentoso *Penicillium oxalium*, Saini *et al* (2015) obtiveram resultados de atividade de celulase de 0,7 FPU/mL e, após uma otimização dos parâmetros do processo, conseguiram aumentar a produção em 1,7 vezes, resultando em uma atividade máxima de celulase de 1,2 FPU/mL em 8 dias.

Huang *et al* (2012) e Behera *et al* (2017) relataram a produção de enzimas celulolíticas por diversas espécies bacterianas: *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sp.*, *B. subtilis*, *Brucella sp.*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Vibrio xiamenensis*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Paenibacillus sp.*, *Lysinibacillus sp.*, *Klebsiella ozaenae*, *Microbacterium oxydans*, *Microbacterium binotii*, *Micrococcus sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Microbacterium pumilum*, *Paracoccus sulfuroxidans*, *Ochrobactrum lupini*, *Ochrobactrum cytisi*, *Ochrobactrum haematophilum*, *Rhizobium radiobacter*, *Kaistia adipata*, *Devosia riboflavina*, *Labrys neptuniae*, *Ensifer adhaerens*, *Variovorax paradoxus*, *Shinella*

*zoogloeoides*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Os micro-organismos mais comumente usados para a produção de enzimas hidrolíticas são *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* (YADAV, 2017).

A atividade celulolítica em leveduras é relativamente rara. Carvalho (2013) relatou que em estudos de leveduras isoladas de madeira em decomposição, somente *Aureobasidium microstietum* e *Trichosporon pullulans* apresentaram atividade de celulase.

#### 4.7 Principais aplicações das celulases

Na tabela 2 estão descritas as principais aplicações das celulases.

**Tabela 2:** Principais aplicações das celulases.

Indústria	Função	Aplicação
Indústria alimentícia	Hidrólise dos componentes da parede celular; diminuição da viscosidade e manutenção da textura do suco de frutas.	Extração de suco de frutas, corante alimentar, alteração das propriedades sensoriais das frutas e legumes e óleo de azeitonas e sopas, controle da deterioração dos alimentos.
Alimentação animal	Pré-tratamento de silagens agrícolas e grãos para alimentação e hidrólise parcial de materiais lignocelulósicos	Melhoria da qualidade nutricional da alimentação animal; ganho de peso por frangos de corte e galinhas, diminuindo colonização de bactérias patogênicas no intestino grosso.
Cerveja e vinho	Hidrólise dos polissacarídeos da parede celular de plantas; modificação de resíduos aromáticos	Melhoria da maceração da pele e extração de cor de uvas, qualidade, estabilidade e clarificação e aroma de vinhos.
Têxtil e lavanderia	Atuar sobre o tecido de algodão e quebrar as fibras soltando assim o corante (sujeira) após lavagem, prevenção ou remoção permanente de felpas, desfibrilação, biopolimento.	Bio-apedrejamento de tecidos de jeans: biopolização de tecidos não-jeans contendo e acabamento biológico, produção de alta qualidade e sabão em pó ecológico, produção de tecidos de

		alta qualidade.
Polimento e papel	Polimento mecânico, bio-modificação de fibras, remoção do revestimento de tinta do papel	Aumentar a resistência à tração e altas qualidades de fibra, reduzir o consumo de energia, melhorando a drenagem de papel moinhos e fabricação de papéis suaves.
Indústria agrícola	Solubilização de paredes celulares de plantas ou fungos, inibição de germinação de esporos, alongamento do tubo germinativo e crescimento de fungos.	Produção de protoplastos vegetais ou fúngicos, cepas híbridas e mutantes, fertilidade do solo, crescimento da planta.
Indústrias P e D	Conjugação e fusão de genes; expressão de proteínas heterólogas e enzimas.	Purificação, imobilização e fusão de proteínas, enzimas e anticorpos; produção de moléculas híbridas para várias aplicações, produção de altos níveis de proteínas, enzimas e anticorpos.
Indústria de Biocombustíveis	Conversão de material celulósico em glicose e outros açúcares fermentáveis.	Produção de proteínas celulares simples ou produtos de fermentação como o etanol. Preparação de digestão, hidrólise rápida de celulose, hemicelulose e polímeros de beta-glucano em alimentos.
Indústria farmacêutica	Digestão da fibra de celulose.	Redução da poluição ambiental.
Gestão de resíduos	Degradação de resíduos celulósicos.	

Fonte: BEHERA *et al.*, 2017.

#### 4.8 Identificação molecular de micro-organismos

Avanços tecnológicos possibilitaram o uso de testes moleculares para identificação permitindo o uso de equipamentos analíticos para determinar o perfil molecular dos microrganismos, ferramentas promissoras no âmbito da taxonomia. As técnicas de biologia molecular têm se mostrado a alternativa mais eficiente e rápida na identificação.

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) abriu novos caminhos para a identificação de microrganismos. A PCR é uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida. Por esta técnica, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a rápida identificação de espécies. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (BRUNALE, 2017).

Para contribuir com o aumento significativo das metodologias de genética molecular e suas várias aplicações, foram desenvolvidas com o passar dos anos, a partir dos avanços na área de biologia molecular e genética, técnicas como PCR em tempo real, PCR multiplex e softwares de bioinformática. A metodologia de PCR uma alternativa para identificação de microrganismos por ser rápida e de baixo custo (OLIVEIRA, 2015).

Para a identificação molecular de microrganismos utiliza-se de regiões de genes codificadores de rRNA, que apresentam áreas variáveis e conservadas de um indivíduo para outro, portanto podem ser utilizadas para identificação de microrganismos. Isto permite que estas sequencias sejam amplificadas pelo método de PCR e que sejam sequenciadas. As sequencias escolhidas para identificação codificam a subunidade menor do RNA ribossomal, 16S rRNA para populações de bactérias e 18S rRNA e regiões espaçadoras internas (*ITS – internal transcribed spacer*) para fungos. A escolha dessas regiões é ideal por serem conservadas entre todas as bactérias ou fungos, facilitando o alinhamento das sequencias durante a etapa de comparação (PROSSER, 2002). Estas sequências são analisadas com bancos de dados por meio do auxílio de softwares que possibilitam a confecção de árvores filogenéticas e a identificação do microrganismo.

A Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST) localiza regiões de similaridade local entre sequências. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas a bancos de dados de sequências e calcula a significância estatística das correspondências. O BLAST pode ser usado para inferir relações funcionais e evolutivas entre sequências, bem como ajudar a identificar membros de famílias de genes (NCBI, 2019).

O Projeto de banco de Dados Ribossômico (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>) fornece à comunidade científica dados de sequência do gene rRNA alinhados que dispõe de ferramentas que permitem que os pesquisadores analisem suas próprias sequências de genes rRNA, podendo ser utilizado em diversos campos como saúde humana, ecologia microbiana, microbiologia, química dos ácidos nucleicos, taxonomia e filogenética. Além de fornecer dados de coleções de genes de subunidades pequenas de rRNA de bactérias, o RDP agora inclui uma coleção de genes de rRNA de subunidades fúngicas. O aumento da demanda de sequenciamentos para caracterizar populações microbianas ambientais nos últimos anos e o melhoramento das tecnologias resultou em um aumento do conjunto de dados ambientais. Desse modo, o RDP fornece um grande conjunto de ferramentas que facilitam a análise de dados de alta produtividade (COLE *et al.*, 2014).

O software de Análise Molecular de Genética Evolutiva (MEGA) foi desenvolvido para análises comparativas de sequências de DNA e proteínas que visam inferir os padrões evolutivos de genes, genomas e espécies. Possui interface gráfica do usuário com ferramentas visuais para exploração de dados e resultados de análises. Na versão 6.0, são encontradas instalações para a construção de árvores evolutivas moleculares escalonadas que são largamente utilizadas pelos cientistas em estudos que relatam divergências evolutivas para espécies, estirpes e genes duplicados (TAMURA *et al.*, 2013).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.

ARIYAJAROENWONG, P.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. Capability of sweet sorghum stalks as supporting materials for yeast immobilization to produce ethanol under various fermentation processes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 49, p. 79–84, 2015.

AZADI, P.; MALINA, R.; BARRETT, S. R. H.; KRAFT, M. The evolution of the biofuel science. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1479–1484, 2017.

BAEYENS, J; KANG, Q; APPELS, L; DEWIL, R; LV, Y; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60-88, 2015.

BASSO L.C.; AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil, **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155–1163, 2008.

BATAN, L.; QUINN, J. C.; BRADLEY, T. H. Analysis of water footprint of a photobioreactor microalgae biofuel production system from blue, green and lifecycle perspectives. **Algal Research**, v. 2, p. 196–203, 2013.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 86, p. 656–669, 2016.

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: **A review. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** v. 15, p. 197–210, 2017.

BINOD P.; JANU, K.U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. **Biofuels - Alternative Feedstocks and Conversion Processes**, p. 229–250, 2011.

BRASIL. Brasil em síntese. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2019. Disponível em: <https://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio.html>. Acesso em:26/08/2019.

BRASIL, 2015. Balanço Energético Nacional 2015: Ano base 2014. **Empresa de Pesquisa Energética**. Rio de Janeiro : *EPE*, 292 p., 2015.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4862–4874, 2010.



BRINK, J. V. D.; VRIES, R. P. D. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 91, p. 1477–1492, 2011.

BRUNALE, P. P. M. **Identificação molecular de micro-organismos cultiváveis contaminantes de diesel a e diesel B s500**. 2017. 94f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica Biológica) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2017.

CARVALHO, F. P. **Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro**. 2013. 118f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2013.

CHENG, Ke-Ke.; CAI, Bai-Yan.; ZHANG, Jian-An.; LING, Hong-Zhi.; ZHOU, Yu-Jie.; GE, Jing-Ping.; XU, Jing-Ming. Sugarcane bagasses hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105–109, 2008.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; McGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, 2014, Database issue D633–D642 doi:10.1093/nar/gkt1244.

DA SILVA, A. T. B.; SPERS, R. G.; WRIGHT, J. T. C.; DA COSTA, P. R. Cenários prospectivos para o comércio internacional de etanol em 2020. **Revista de Administração**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 727-738, 2013.

DE OLIVEIRA, C. M. **Quantificação e caracterização morfológica e molecular de populações de *Meloidogyne spp.* de regiões produtoras de soja do Brasil**. 2015. 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Goiás, Goiânia - GO, 2015.

DVORTSOV, I. A.; LUNINA, N. A.; CHEKANOVSKAYA, L. A.; GROMOV, A. V.; SCHWARZ, W. H.; ZVERLOV, V. V.; VELIKODVORSKAYA, G. A.; DEMIDYUK, I. V.; KOSTROV, S. V. Carbohydrate binding module CBM28 of endoglucanase Cel5D from *Caldicellulosiruptor bescii* recognizes crystalline cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 305–311, 2018.

FOELKEL, C. Aplicações da Biotecnologia em Processos Industriais de Fabricação de Celulose de Eucalipto. **Eucalyptus Online Book & Newsletter**, v. 32, 146p., 2013.

GAMBELLI, D.; ALBERTI, F.; SOLFANELLI, F.; VAIRO D.; ZANOLI; R. Third generation algae biofuels in Italy by 2030: A scenario analysis using Bayesian networks. **Energy Policy**, v. 103, p. 165–178, 2017.

GAURAV, N; SIVASANKARI, S; KIRAN, GS; NINAWA, A; SELVIN, J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 205–214, 2017.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991.

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, pág. 2563-2577; doi:10.3390/ijms13032563, 2012.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

KARIMI, M.; ESFANDIAR, R.; BIRIA, D. Simultaneous delignification and saccharification of rice straw as a lignocellulosic biomass by immobilized *Trichoderma viride* sp. to enhance enzymatic sugar production. **Renewable Energy**, v. 104, p. 88 – 95, 2017.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KUMARI, B. L.; SRI, M. H.; SUDHAKAR, P. Isolation of cellulase producing fungi from soil, optimization and molecular characterization of the isolate for maximizing the enzyme yield. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 5, p. 01-09, 2011.

- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, 280696, 2011.
- MANISHA; YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1727–1739, 2017.
- MILLINGER, M.; PONITKA, J.; ARENDT, O.; THRÄN, D. Competitiveness of advanced and conventional biofuels: Results from leastcost modelling of biofuel competition in Germany. **Energy Policy**, v. 107, p. 394–402, 2017.
- NCBI, Basic Local Alignment Search Tool. 2019. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 22 jan. 2019.
- OBENG, E. M.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C. M. Identifying additives for cellulase enhancement - A systematic approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 67–74, 2017.
- PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 244, p. 9-17, 2002.
- PRATES, E. T.; STANKOVIC, I.; SILVEIRA, R. L.; LIBERATO, M. V.; HENRIQUE-SILVA, F.; PEREIRA JR, N.; POLIKARPOV, I.; SKAF, M. S. X-ray structure and molecular dynamics simulations of endoglucanase 3 from *Trichoderma harzianum*: structural organization and substrate recognition by endoglucanases that lack cellulose binding module. **PLoS ONE** 8(3): e59069. doi 10.1371/journal.pone.0059069, 2013.
- RODRIGUES, R. S. **Produção, purificação e caracterização de celulases e hemicelulases do fungo da podridão-branca *Pycnoporus sanguineus* pf-2**. 2014. 146f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2014.
- SAINI, R.; SAINI, J. K.; ADSUL, M.; PATEL, A. K.; MATHUR, A.; TULI, D.; SINGHANIA, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 240–246, 2015.

SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, n.45, v.11, p.1290-1296, nov. 2010.

SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 2–8, 2013.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – an overview. **Bioresource Technology**, v.199, p. 76–82, 2016.

SINGHANIA, R.R., PATEL, A., PANDEY, A., GNASOUNOU, E. Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application, **Bioresource Technology** (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.126>

SOARES-FILHO, B.; RAJÃO, R.; MACEDO, M.; CARNEIRO, A.; COSTA, W.; COE, M.; RODRIGUES, H.; ALENCAR, A. Cracking Brazil's Forest Code. **Science**, v. 344, p. 363–364, 2014. DOI: 10.1126/science.124663.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

TAJWAR, R.; SHAHID, S.; ZAFAR, R.; AKHTAR, M. W. Impact of orientation of carbohydrate binding modules family 22 and 6 on the catalytic activity of *Thermotoga maritima* xylanase XynB. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 75–82, 2017.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol.** 30(12):2725–2729 doi:10.1093/molbev/mst197. 2013.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9–18, 2013.

WANG, Y. Z.; LIAO, Q.; LV, F. L.; ZHU, X.; RAN, Y.; HOU, C. J. Solid simultaneous saccharification and fermentation of rice straw for bioethanol production using nitrogen gas stripping. **RSC Advances**, v. 5, p. 55328 – 55553, 2015.

WOJTUSIK, M.; VILLAR, J. C.; ZURITA, M.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover. **Biomass and Bioenergy**, v. 98, p. 1-7, 2017.

WU, W.; DONG, C.; WU, J.; LIU, X.; WU, Y.; CHEN, X.; YU, S. Ecological effects of soil properties and metal concentrations on the composition and diversity of microbial communities associated with land use patterns in an electronic waste recycling region. **Science of the Total Environment**, 601–602 (2017) 57- 65.

WU, Z.; ZHANG, M.; WANG, L.; TU, Y.; ZHANG, J.; XIE, G.; ZHOU, W.; LI, F.; GUO, K.; LI, Q.; GAO, C.; PENG, L. Biomass digestibility is predominantly affected by three factors of wall polymer features distinctive in wheat accessions and rice mutants. **Biotechnol. Biofuels**, v. 6, p. 183, 2013.

XU, J.; XIONG, P.; HE, B. Advances in improving the performance of cellulase in ionic liquids for lignocellulose biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 961–970, 2016.

XU, X.; LIN, M.; ZANG, Q.; SHI, S. Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 88–95, 2018.

YADAV, S.K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.066>. 2017.

YANARDAĞ, I. H.; ZORNOZA, R.; BASTIDA, F.; BÜYÜKKILIÇ-YANARDAĞ, A., GARCÍA, C., FAZ, A.; MERMUT, A. R. Native soil organic matter conditions the response of microbial communities to organic inputs with different stability. **Geoderma**, v. 295, p. 1–9, 2017.

YUN, E. J.; KIM, H. T.; CHO, K. M.; YU, S.; KIM, S.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 311–318, 2016.

ZABED, H.; SAHU, J.N.; SUELY, A.; BOYCE, A.N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475–501, 2017.

ZHOU, Q.; JI, P.; ZHANG, J.; LI, X.; HAN, C. Characterization of a novel thermostable GH45 endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* and its biodegradation of pectin. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx N. xx, p. 1-6, 2017.

## CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE E $\beta$ -GLICOSIDASE POR MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS SOB PLANTIO DE EUCALIPTO NO CERRADO DE MINAS GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

A dependência mundial dos combustíveis fósseis tem causado efeitos desfavoráveis como a diminuição das reservas de petróleo bruto, diminuição da qualidade do ar, aumento da temperatura global e sérias alterações climáticas. Para promover a sustentabilidade e a independência de combustíveis fósseis, o bioetanol é agora considerado como o substituto da mistura ou da gasolina (ADITIYA *et al.*, 2016; TOOGOOD; SCRUTTON, 2018).

A biomassa lignocelulósica é considerada uma fonte promissora de energia renovável e pode ser utilizada para a produção de bioetanol de segunda geração (SQUINCA *et al.*, 2018). Atualmente, a maior parte do etanol lignocelulósico é produzida por hidrólise e fermentação. A sacarificação enzimática da biomassa vegetal é o método mais eficiente para a decomposição da lignocelulose em açúcares, embora o custo desta operação ainda seja um dos principais gargalos na comercialização de álcool de segunda geração e seja apontado como o ponto mais caro desta tecnologia em toda a cadeia de produção de bioetanol, respondendo por até 40% do custo total. Estas enzimas incluem endo e exoglucanases e beta glucosidases que atuam sinergicamente e são necessárias para a hidrólise eficiente de celulose a oligossacarídeos solúveis (CHOUDHARY *et al.*, 2017; CERDA *et al.*, 2017). A diminuição do custo das enzimas celulolíticas continua sendo um dos principais interesses na pesquisa do bioetanol, que pode reduzir o custo dessas enzimas em até 20% (DODDA *et al.*, 2018).

Dentre as enzimas celulolíticas, as endoglucanases iniciam a hidrólise cortando a estrutura da celulose, descobrindo extremidades redutoras e não redutoras, enquanto celobiohidrolases (exoglucanases) atuam sobre ambas as extremidades para liberar celo-oligossacarídeos e unidades de celobiose. Subsequentemente, as  $\beta$ -glucosidases clivam a celobiose para liberar moléculas de glicose. Além disso, durante a reação de hidrólise, as endoglucanases atuam na região amorfa que é mais solúvel na estrutura da celulose, enquanto as celobiohidrolases são ativas para clivar ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas das extremidades da cadeia (SRIVASTAVA *et al.*, 2018).

As celulases têm vários tipos de aplicações industriais, incluindo papel e celulose, lavanderia, alimentos, ração animal, cervejaria e vinho, têxtil, indústria de bioenergia (IDRIS *et al.*, 2017; BHARTI *et al.*, 2017). Pesquisas significativas foram desenvolvidas com foco no isolamento, identificação e otimização dessas enzimas, levando à comercialização de celulases. Celulases comercialmente disponíveis são uma formulação de endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (OBENG *et al.*, 2017).

O processo enzimático é livre de poluição e econômico (Li *et al.*, 2012). Essa característica dá um novo horizonte para encontrar microrganismos produtores de celulase rentáveis. Enzimas celulolíticas são sintetizadas por macro e micro-fungos, bactérias aeróbicas e anaeróbicas, actinomicetos e certos protozoários que degradam a celulose pela hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas da celulose (BEHERA *et al.*, 2017, DUTTA *et al.*, 2018).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase por cinco micro-organismos isolados de solo sob plantio de Eucalipto no cerrado de Minas Gerais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação da produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase foi procedida com a utilização dos micro-organismos 1-74, 25-9, 32-90, 1-5 e 32-91 do banco de microrganismos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, com índices de atividade enzimática (IAE) previamente calculados:  $IAE_{1-75} = 22$ ,  $IAE_{25-9} = 5,33$ ,  $IAE_{32-90} = 7,33$ ,  $IAE_{1-5} = 10,33$  e  $IAE_{32-91} = 5,44$ . Estes microrganismos foram isolados anteriormente em solos sob plantações de eucalipto na empresa Aperam Bioenergia S/A, localizada no município de Itamarandiba, região norte do estado de Minas Gerais, e então armazenados no banco de microrganismos do LGBF.

### 2.1 *Meio de cultura e inóculo*

Os micro-organismos cedidos para os inóculos conforme citado acima foram inoculados em placa com meio de cultura contendo carboximetilcelulose



(CMC) como principal fonte de carbono, conforme composição descrita na tabela 3, e incubados em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (SL 200/334 SOLAB®) a 28°C por 96 horas. O meio de cultura foi preparado a partir da mistura dos componentes descritos na tabela, com pH ajustado para 6,0, seguido de esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos (min) a 1 atm.

**Tabela 3:** Composição do meio de cultura utilizado para início de crescimento do inóculo.

Componentes	Quantidade (g)
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1
NaCl	0,1
Extrato de levedura	0,4
CMC	10
Ágar	15
Água destilada	1000 mL

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = Sulfato de magnésio hepta hidratado; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = Fosfato de potássio Monobásico; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = Fosfato de potássio Dibásico; NaCl = Cloreto de Sódio; CMC = Carboximetilcelulose

Após verificado o crescimento, foi feito uma raspagem do micro-organismo com auxílio de uma alça de platina, e o mesmo foi então inoculado em 12 mL de meio de cultura com composição semelhante ao citado acima, porém sem ágar, contido em um tubo Falcon de 15 mL, que foi incubado em SHAKER (SL 222 SOLAB®) a 28°C, 150 rpm por 96h.

## 2.2 *Cultivo dos micro-organismos para produção de endoglucanase e β-glicosidase*

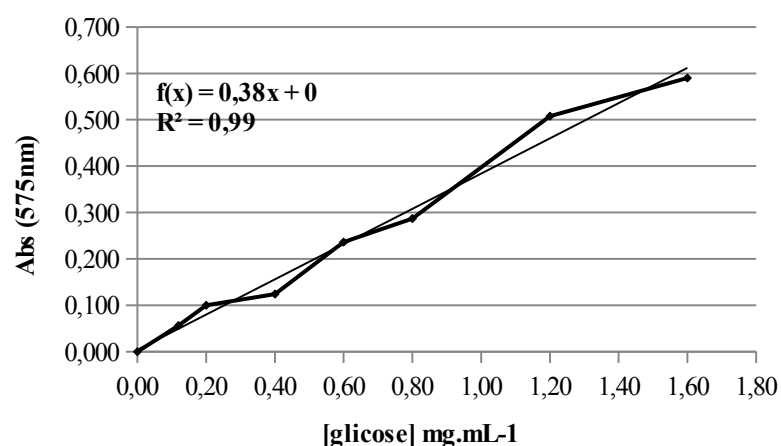
Após 96 horas de crescimento, retirou-se amostra de 2 mL do inóculo e procedeu-se à medida de densidade óptica em espectrofotômetro *Lamda Bio PerkinElmer*®. O inóculo foi então adicionado em um Erlenmeyer (500 mL) contendo 190 mL do meio descrito anteriormente (sem ágar) e incubado em *shaker* (SL 222 SOLAB®) a 28°C, 150 rpm por 240 horas. O crescimento dos micro-organismos foi acompanhado a cada 24 horas com medida de densidade óptica (D.O.) 600 nm e os resultados plotados em suas curvas de crescimento. Amostras de 2 mL foram retiradas

em intervalos de 24 horas e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min para avaliação da produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase.

### 2.3 Avaliação da produção de endoglucanase

A análise de atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase foi realizada de acordo com o método modificado do método padrão da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), descrito por Ghose (1987). Este método consiste na hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 1% (Synth) seguida da quantificação do teor de açúcares redutores solúveis liberados em um determinado intervalo de tempo. A concentração de açúcares redutores foi determinada segundo método descrito por Miller (1959), utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A reação foi preparada em tubos tipo Falcon (15 mL) contendo 1000  $\mu$ L de solução de CMC a 1% (p/v) em tampão acetato 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,8 (pré-aquecida por 5 minutos) e 1000  $\mu$ L do extrato enzimático. A reação foi incubada a 50°C, sendo retiradas alíquotas de 200  $\mu$ L nos tempos 0, 15 e 30 minutos de reação e acrescentado 200  $\mu$ L de DNS. Uma reação sem a presença do extrato enzimático (branco) foi preparada pela adição de 100  $\mu$ L DNS em 100  $\mu$ L de água destilada. As amostras e o branco foram submetidos a banho fervente (95 $\pm$ 1°C) por 5 minutos, seguidos de resfriamento em banho de água com gelo (0 $\pm$ 1°C) e adição de água destilada nas quantidades de 2 mL sobre a amostra e 1 mL sobre o branco. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, utilizando-se uma curva analítica de glicose como referência, nas concentrações de 0 a 1,6 mg.mL<sup>-1</sup>, com intervalos de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 5).

**Figura 5:** Curva analítica de glicose



Fonte: Autor

Uma unidade de atividade Endoglucanase foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores, expresso em glicose, por minuto, por volume (litros) de extrato enzimático. Os dados foram submetidos à análise de variância considerando um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05 utilizando o software ORIGIN PRO 8.

#### **2.4 Avaliação da produção de $\beta$ -glicosidase**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi quantificada segundo método descrito por Ghose (1987) a qual consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de celobiose a 1% em tampão citrato 100  $\text{mmol.L}^{-1}$  e pH 4,8, na presença do extrato enzimático. O meio reacional foi composto por 100  $\mu\text{L}$  da solução de substrato e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático acondicionados em tubos tipo *Eppendorf* incubados em banho-maria a 50°C por 30 minutos, seguido de banho fervente (95 $\pm$ 1°C) por 1 min e resfriamento em banho de gelo. Alíquotas de 15  $\mu\text{L}$  foram retiradas para quantificação do teor de glicose, utilizando procedimento padrão enzimático Glicose-oxidase/Peroxidase - GOD-POD (LLOYD, 1969) com leitura espectrofotométrica a 510 nm. Para cada reação enzimática foi preparada uma sem a presença do extrato enzimático (branco), seguindo o mesmo procedimento acima descrito para a amostra.

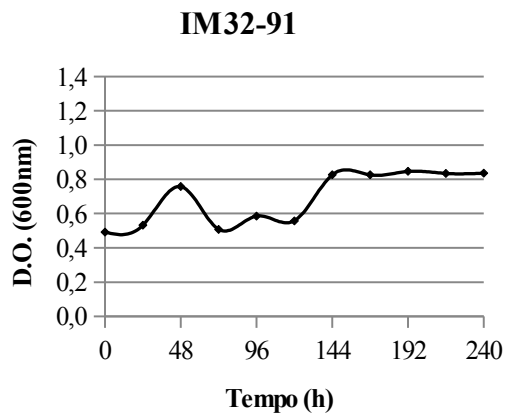
A unidade de atividade  $\beta$ -glicosidase foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto de reação, por volume de extrato enzimático. Os dados foram submetidos à análise de variância considerando um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05 utilizando o software ORIGIN PRO 8.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Curvas de crescimento**

As curvas de crescimento foram plotadas de acordo com os resultados de  $\text{D.O}_{600}$  obtidos a cada 24 horas durante os cultivos (Figura 6). A maioria dos micro-organismos tiveram o pico de crescimento entre 48-72 horas de cultivo, não atingindo um alto valor de crescimento. No geral, os valores de  $\text{D.O}_{600}$  foram próximos de 1, com exceção do IM25-9 em que os resultados atingiram valores superiores a 4 com 48 horas de cultivo, demonstrando maior crescimento microbiano. O micro-organismo IM32-90 apresentou o menor crescimento, com valor de  $\text{D.O}_{600}$  inferior a 0,800.

**Figura 6:** Curvas de crescimento dos cultivos em 240 horas.

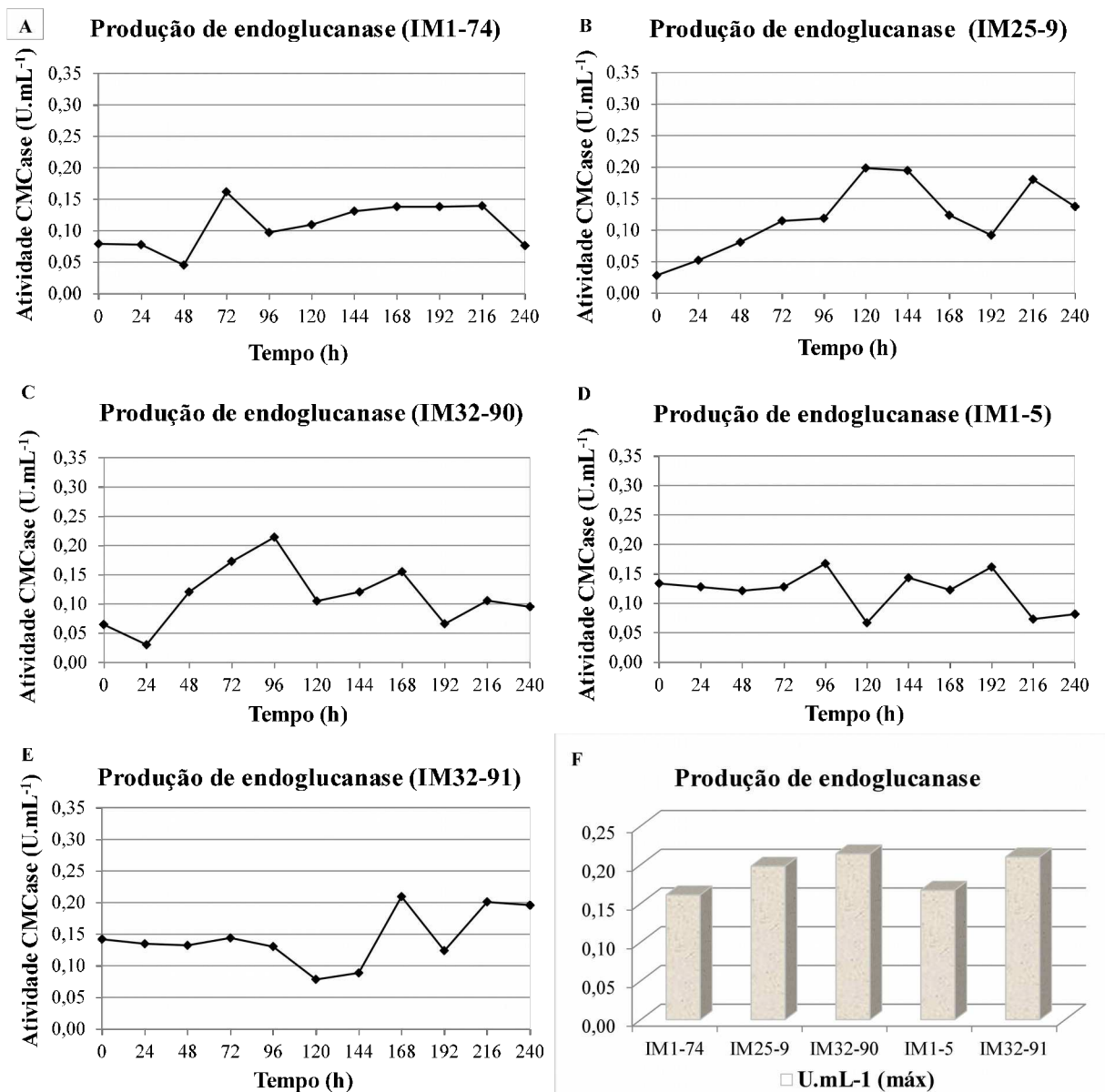


Fonte: Autor.

### 3.2 Perfil de produção de endoglucanase

As cinco linhagens de micro-organismos selecionados anteriormente conforme os índices de atividade enzimática ( $IAE_{1-75} = 22$ ,  $IAE_{25-9} = 5,33$ ,  $IAE_{32-90} = 7,33$ ,  $IAE_{1-5} = 10,33$  e  $IAE_{32-91} = 5,44$ ) foram cultivadas em meio contendo CMC como principal fonte de carbono e foram monitoradas durante 240 h para avaliação das atividades de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, conforme mostrado nas figuras 7 e 10.

**Figura 7:** Curvas de produção de endoglucanase pelas cinco linhagens avaliadas durante 240 horas de cultivo. A: IM1-74; B: IM25-9; C: IM32-90; D: IM-1-5; E: IM32-91; F: Atividade máxima de endoglucanase.



Fonte: Autor.

Analisando as figuras de 7A a 7F, pode-se observar que existe comportamento relativamente similar para atividades de endoglucanase produzidas pelas linhagens estudadas. As maiores atividades de endoglucanase (CMCase) foram observadas em 96 horas de fermentação para o micro-organismo IM32-90 ( $0,214 \text{ U.mL}^{-1}$ ), 120 horas para o IM25-9 ( $0,198 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e 168 horas para o IM32-91 ( $0,210 \text{ U.mL}^{-1}$ ).

A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa em nível de significância de 0,05 entre a produção de endoglucanase dos cinco microrganismos avaliados (Tabela 4).

**Tabela 4:** Análise de variância (ANOVA) da produção de endoglucanase pelos cinco microrganismos avaliados.

One Way ANOVA					
Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean square	F Value	Prob>F
				1.5198	
Model	4	0.00947	0.00237	3	0.24653
Error	15	0.02338	0.00156		
Total	19	0.03285			

Hipótese nula: A significância de todos os níveis são iguais.

Hipótese alternativa: A significância de um ou mais níveis são diferentes.

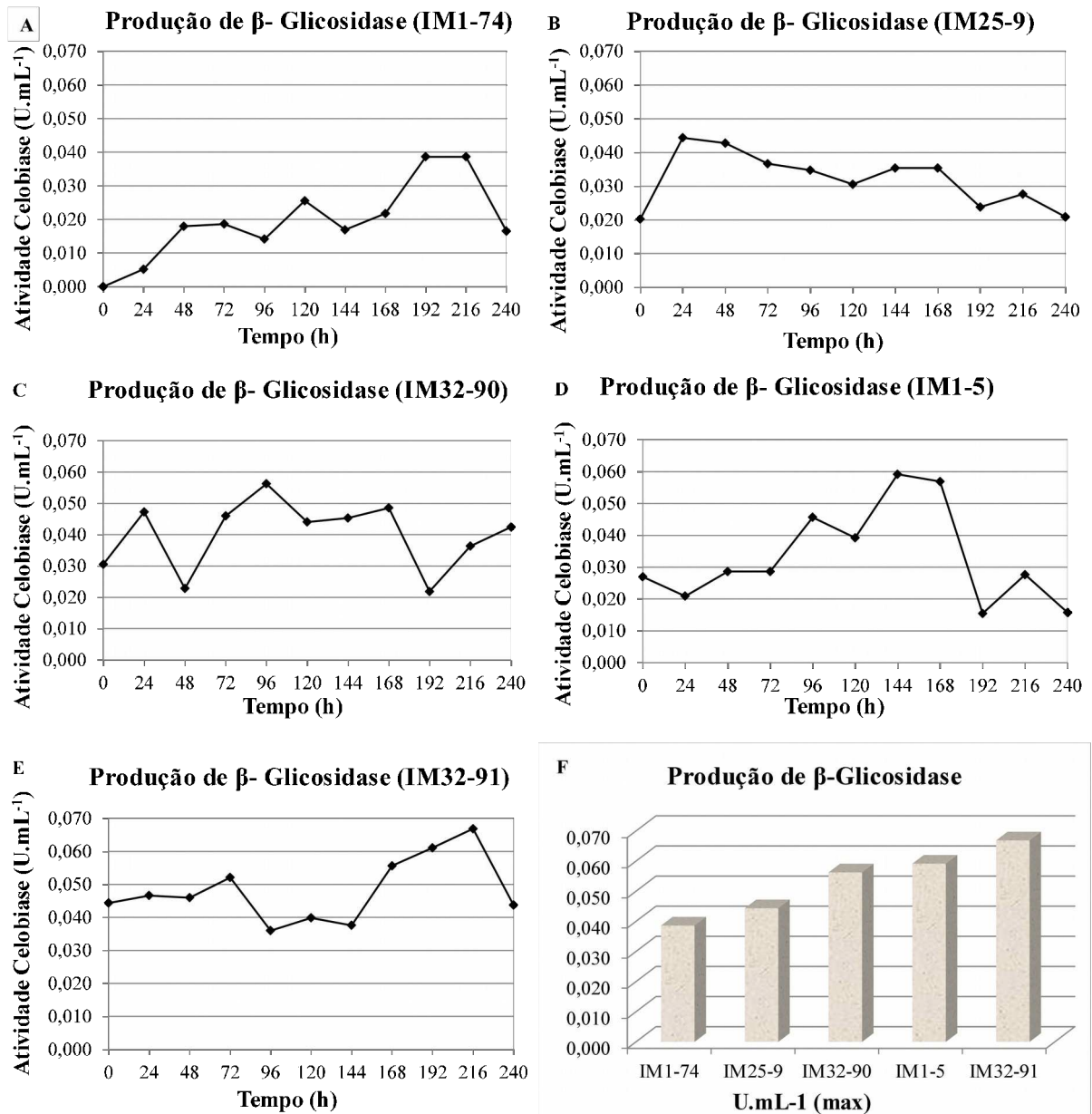
**Em nível de significância de 0.05, as médias das populações não foram significativamente diferentes.**

### 3.3 Perfil da produção de $\beta$ -glicosidase

A produção de  $\beta$ -glicosidase pelas cinco linhagens selecionadas foi observada durante 240 horas. As curvas de produção são mostradas na figura 8.

**Figura 8:** Curvas de produção de  $\beta$ -glicosidase das cinco linhagens avaliadas durante 240 horas de cultivo. A: IM1-74; B: IM25-9; C: IM32-90; D: IM-1-5; E: IM32-91; F: Atividade máxima de  $\beta$ -glicosidase.





Quanto à atividade da celobiase, foi possível observar que a cepa IM32-91 mostrou-se mais ativa ( $0,067 \text{ U.mL}^{-1}$ ) após 216 h de cultivo, seguida da cepa IM1-5 ( $0,059 \text{ U.mL}^{-1}$ ) a 144 h de cultivo. Após 216 h de fermentação, a atividade de celobiase da cepa IM32-91 começou a diminuir.

Avaliando as atividades enzimáticas em meio sólido e líquido, observou-se que a estirpe IM1-74 que em estudo anterior apresentou o maior índice de atividade enzimática (IAE = 22) apresentou a menor atividade enzimática em meio líquido para endoglucanase ( $0,161 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e  $\beta$ -glicosidase ( $0,039 \text{ U.mL}^{-1}$ ), como mostrado na tabela 5.

**Tabela 5:** Índices de atividade enzimática expresso em meio sólido e atividades de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase das cinco cepas avaliadas em meio líquido.

Cepa	IAE	Endoglucanase (U.mL <sup>-1</sup> )	$\beta$ -glicosidase (U.mL <sup>-1</sup> )
IM1-74	22,00	0,161	0,039
IM25-9	5,33	0,198	0,044
IM32-90	7,33	0,214	0,056
IM1-5	10,33	0,167	0,059
IM32-91	5,44	0,210	0,067

A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa em nível de significância de 5% na produção de  $\beta$ -glicosidase pelos cinco microrganismos avaliados (Tabela 6).

**Tabela 6:** Análise de variância (ANOVA) da produção de  $\beta$ -glicosidase pelos cinco microrganismos avaliados.

One WayANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean square	F Value	Prob>F
Model	4	0.002	4.99157E-4	1.0913	0.41185
Error	10	0.00457	4.57398E-4		
Total	14	0.00657			

Hipótese nula: A significância de todos os níveis são iguais.

Hipótese alternativa: A significância de um ou mais níveis são diferentes.

**Em nível de significância de 0.05, as médias das populações não foram significativamente diferentes.**

Em geral, a atividade enzimática de endoglucanases deste trabalho se mostrou semelhante à de outros organismos já estudados, como em Yang *et al* (2011) que obtiveram 0.24 U.mL<sup>-1</sup> em um estudo que avaliou a produção enzimática por *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes faecalis* e *Fusarium sporotrichioides*. Resultado semelhante também foi obtido por Mohapatra *et al* (2018) ao avaliar a produção de celulase por *Aspergillus fumigatus* isolado de resíduos celulósicos em decomposição, mostrando uma maior atividade de endoglucanase (0,287 U.mL<sup>-1</sup>) obtida a 30°C, o que mostra que a celulase está ativa nesta faixa de temperatura. Carvalho (2013) obteve 0,164 U.mL<sup>-1</sup> cultivando *Cryptococcus laurentii* em meio suplementado com 2% de farelo de trigo. Priyanka *et al* (2017) obtiveram 0,077 U.mL<sup>-1</sup> de endoglucanase como valor máximo produzido pelo fungo *Paecilomyces variotii* ao testar diferentes concentrações de CMC como fonte de carbono.

A estirpe IM32-91, que possui um dos menores índices de atividade enzimática dentre os micro-organismos selecionados (IAE = 5,44), se apresentou

como melhor produtor de  $\beta$ -glicosidase ( $0,067 \text{ U.mL}^{-1}$ ), e segundo melhor produtor de endoglucanase ( $0,210 \text{ U.mL}^{-1}$ ). A maior produção de endoglucanase observada foi atingida pela estirpe IM32-90 ( $0,214 \text{ U.mL}^{-1}$ ). Os valores de produção de  $\beta$ -glicosidase foram satisfatórios em comparação aos encontrados por Vyas e Chhabra (2017), que cultivaram a levedura *Cystobasidium oligophagum* em meio contendo CMC como fonte de carbono nas mesmas condições e obtiveram  $0,031 \text{ U.mL}^{-1}$  após 72 horas de incubação.

A produção de enzimas celulolíticas pode ser aumentada por alterações nas condições de meio de cultivo, como uso de suplementação do meio de cultura e micro-organismos recombinantes. Anusree *et al* (2016) cultivaram bactérias recombinantes *Corynebacterium glutamicum* com genes de *Xanthomonas campestris* para avaliação da produção de endoglucanase e *Saccharophagus degradans* para produção de  $\beta$ -glicosidase em meio suplementado com  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de CMC, obtendo resultados de  $8 \pm 0,4 \text{ U}$  de  $\beta$ -glicosidase e  $4,5 \pm 0,2 \text{ U}$  de endoglucanase; e em meio suplementado com  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de celobiose, obtiveram  $9,0 \pm 0,5 \text{ U}$  de  $\beta$ -glicosidase e  $2 \pm 0,13 \text{ U}$  de endoglucanase.

A análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 0,05 mostrou que não houve diferença significativa na produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase pelos cinco microrganismos produtores das celulasas avaliadas. Estes resultados indicam que qualquer uma das estirpes avaliadas pode ser utilizada para a produção dessas enzimas, podendo ter seus processos de produção otimizados em trabalhos futuros.

#### **4. CONCLUSÃO**

Das cinco estirpes selecionadas para este estudo em meio líquido, uma estirpe (IM32-91) foi considerada como potencial produtor de celulase, apresentando a maior atividade hidrolítica em carboximetilcelulose e celobiose.

Este estudo demonstrou que o índice de atividade enzimática determinado em meio sólido não deve ser considerado um parâmetro para estimar a produção de celulasas em meio líquido, pois a estirpe que apresentou maior atividade possui o menor índice de atividade enzimática.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.

ANUSREE, M.; WENDISCH, V. F.; NAMPOOTHIRI, K. M. Co-expression of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase in *Corynebacterium glutamicum* DM1729 towards direct lysine fermentation from cellulose. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 239–244, 2016.

BHARTI, A. K.; KUMAR, A.; KUMAR, A.; DUTT, D. Exploitation of *Parthenium hysterophorous* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. **J. Radiat. Res. Appl. Sci.** xxx, p. 1-10, 2017.

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 197–210, 2017.

CARVALHO, F. P. **Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro**. Tese de Doutorado – 118 p. Lavras: UFLA, 2013.

CERDA, A.; MEJÍAS, L.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. **Bioresource Technol.**, v. 243, p. 1059–1068, 2017.

CHOUDHARY, J; SINGH, S; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 342 – 346, 2017.

DODDA S. R.; AICH, A.; SARKAR, N.; JAIN, P.; JAIN, S.; MONDAL, S.; AIKAT, K.; MUKHOPADHYAY, S. S. Structural and functional insights of  $\beta$ -glucosidases identified from the genome of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Molecular**

**Structure**, v. 1156, p. 105-114, 2018.

DUTTA, S. D.; TARAFDER, M.; SLAM, R.; DATTA, B. Characterization of cellulolytic enzymes of *Fusarium* soil isolates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 279–285, 2018.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p. 257–268, 1987.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S. S.; SUKUMARAN, R. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technol**, v. 242, p. 265–271, 2017.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computat. Struct. Biotechnol. J.** v. 2, n.3, p. 1-11, 2012.

LLOYD, J. B.; WHELAN, W. J. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. **Analytical Biochemistry**, v.30, p.467-470, 1969.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p. 426-428, 1959.

MOHAPATRA, S.; PADHY, S.; MOHAPATRA, P. K. D.; THATOI, H. N. (2018). Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, *Pennisetum* species through cellulose from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*. **Bioresource Technol.** doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.023>.

OBENG, E. M.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C. M. Identifying additives for cellulase enhancement—A systematic approach. **Biocatal. Agr. Biotechnol.** v. 11, p. 67–74, 2017.

PRIYANKA, P.; YUVRAJ, C.; FARHA, S.; ARANGANATHAN, V. Isolation of cellulose degrading fungi from soil and optimization for cellulase production using carboxy methyl cellulose. **Int. J. Life Sci. & Pharma Research.** v. 7, p. 56-60, 2017.

SQUINCA, P.; BADINO, A. G.; FARINAS, C. S. A closed-loop strategy for endoglucanase production using sugarcane bagasse liquefied by a home-made enzymatic cocktail.

**Bioresource Technology**. v. 249, p. 976-982. 2018.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renew. Sust. Energ. Rev.** v. 82, p. 2379-2386, 2018.

TOOGOOD, H. S; SCRUTTON, N. S. Retooling microorganisms for the fermentative production of alcohols. **Curr. Opin. Biotech.** v. 50, p. 1–10.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.010>, 2018.

VYAS S, CHHABRA M. Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium* oligophagum JRC1: a cellulase and lipase producing oleaginous yeast. **Bioresource Technology**. v. 223, p. 250–258, 2017.

YANG, H. *et al.* Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases. **Bioresource Technology, Essex**, v. 102, n. 3, p. 3546 – 3550, 2011.

## CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS IM32-90, IM32-91, IM1-74, IM25-9 E IM1-5 ISOLADAS SOB PLANTIO DE EUCALIPTO

### 1- INTRODUÇÃO

O esgotamento dos combustíveis fósseis não-renováveis atrelado ao aumento da poluição tem levado à necessidade de busca por fontes alternativas de energia renovável tais como os biocombustíveis como bioetanol de diferentes matérias-primas (MOHAPATRA *et al.*, 2018).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, sendo a celulose um polissacarídeo com ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. A sacarificação enzimática desta biomassa é um processo não poluente que visa aumentar a produção de açúcares redutores fermentáveis (GUO *et al.*, 2018). As celulasas tem recebido atenção especial nos últimos anos por sua capacidade de sacarificar a celulose de materiais lignocelulósicos liberando glicose que pode ser convertida em etanol celulósico por fermentação (MARQUES *et al.*, 2018).

As celulasas podem ser produzidas por um grande número de organismos, incluindo bactérias, actinobactérias, fungos filamentosos, bem como plantas e animais. A produção por micro-organismos ocorre por fermentação em estado sólido (SSF), caracterizado como um processo que ocorre na ausência de “água livre”, usando um material sólido como suporte; ou por fermentação submersa (SF) em meio de cultura líquido (PASSOS *et al.*, 2018).

Sreena e Sebastian (2018) relataram os potenciais celulolíticos de bactérias pertencentes a diferentes gêneros, como *Acetivibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Ruminococcus* e *Thermomonospora*.

Vários ensaios de identificação baseados em DNA podem ser usados de acordo com o objetivo, permitindo detectar DNA ou RNA. A extração e detecção de DNA são mais comuns e tecnicamente mais simples que de RNA devido à maior estabilidade do DNA. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma amplificação *in vitro* do DNA alvo de um organismo único que utiliza sequências de DNA iniciadores ou oligonucleotídicos (*primers*) específicos e DNA polimerase. Os primers selecionados devem ter uma sequência exclusiva que se liga especificamente e seletivamente a sequência alvo de DNA previamente definida. A aplicação de ferramentas moleculares modernas podem fornecer dados precisos de comparação da sequência de DNA (EL-SAYED *et al.*, 2017).

## 2- MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das bactérias

As estirpes IM32-90, IM32-91, IM1-74, IM25-9 e IM1-5 foram cedidas do banco de micro-organismos do Laboratório de Biotecnologia e Genética Florestal (LGBF) do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

### 2.2 Extração do DNA genômico

A extração do DNA total das células bacterianas foi realizada no LGBF, de acordo com o protocolo descrito por Ausubel *et al* (1992).

As células de cada um dos cinco isolados armazenados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Nutritivo com auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada e cultivadas por 48 horas em BOD a  $28^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento, as células de cada um dos isolados foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno de 1,5 mL. Em seguida, as células foram ressuspensas sob agitação em 576  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0). Foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio) e 3  $\mu\text{L}$  de proteinase K ( $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e a suspensão foi incubada por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este tempo, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M e 80  $\mu\text{L}$  de CTAB/NaCl (0,7M NaCl, 10% CTAB, *Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*), agitou-se gentilmente e incubou-se a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Para fazer a separação do material genético das impurezas celulares (lipídeos, proteínas e maioria dos polissacarídeos), adicionou-se igual volume de CIA [clorofórmio : álcool isoamílico (24:1)] e homogeneizou-se cada amostra o máximo possível. As amostras foram então centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm e, após a centrifugação, a fase aquosa de cada tubo foi transferida cada uma para um novo tubo de 1,5 mL. O processo de retirada das impurezas com CIA foi realizado novamente com centrifugação a 14.000 rpm por 5 min e cada sobrenadante de cada tubo foi novamente transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Após removidas as impurezas, o material genético foi precipitado por adição de 0,6 volume de isopropanol, misturado gentilmente e deixado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min, resultando no aparecimento de um pélete na parede do tubo. O isopropanol foi descartado e



procedeu-se a adição de 1.000  $\mu\text{L}$  de etanol 70% para lavagem do pélete contendo o material genético com centrifugação de 12.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos secados a vácuo. Os péletes foram ressuspensos em 50  $\mu\text{L}$  de TE contendo enzima RNase. As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por 30 minutos para degradação das moléculas de RNA.

Após o processo de extração, a qualidade e integridade das amostras de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA) previamente corado com brometo de etídio (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) e visualizado sob luz ultravioleta. O volume restante foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

## 2.3 Amplificação dos DNAs 16s

### 2.3.1 Seleção dos primers

Cada amostra de DNA previamente extraída foi amplificada por PCR utilizando pares de oligonucleotídeos (*primers*) iniciadores específicos para região 16S rDNA de bactérias.

Foram utilizados os seguintes pares de *primers*: descritos por Ramos *et al* (2010) (tabela 7):

**Tabela 7:** Oligonucleotídeos utilizados no teste de seleção de primers efetivos na amplificação das amostras de DNA dos microrganismos.

<b>Filo</b>	<b><i>Foward primer (5' – 3')</i></b>	<b><i>Reverse primer (5' – 3')</i></b>
<i>Euryarchaeota</i>	AACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAG	GTGTGTGCAAGGAGCAGGACGTAT
<i>Crenarchaeota</i>	ATAAGCGGGGGCAAGTCTGGTGT	ACCTGCCGTGGCCCCCTCCTTCT
<i>Bacteroidetes</i>	CAGACTCCTACGGGAAGGCAGCAG	TAACCCGACACCTCACGGCAGCAG
<i>Firmicutes</i>	TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA	TGCGGGACTTAACCCAACATCTCA
<i>Spirochaetes</i>	CCAGACTCCTACGGGAGGCAG	CTCGTGCCGTGAGGTGTTGGG
<i>Proteobacteria e Deferribacteres</i>	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTC	GCTGACGACAGCCATGCAGCACCT
<i>ITS1/ITS4</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	TCCTCCGCTTATTGATATGC

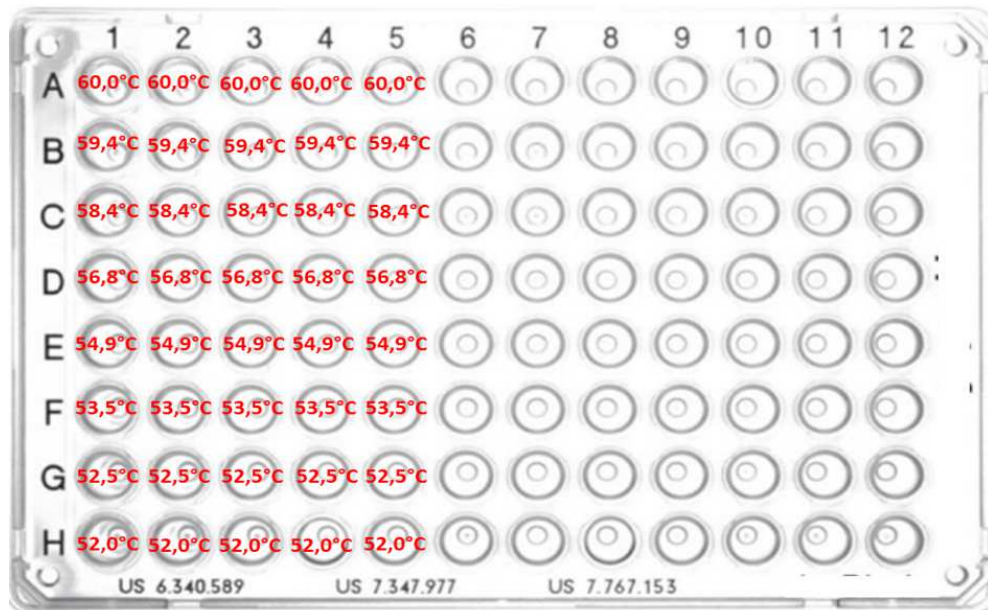
As reações de PCR foram preparadas para um volume total de 25  $\mu\text{L}$ : para cada 2  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA extraído adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de cada primer foward (F) e reverse (R), 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (nucleotídeos), 1  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão (10x), 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima Taq DNA polimerase (5 U. $\mu\text{L}^{-1}$ ) e 15  $\mu\text{L}$  de água tipo I esterilizada. O programa de ciclos foi realizado em termociclador BIORAD modelo MyCycler nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 5 min, 30 ciclos a 95°C por 30 s, 30 s a 55°C e 1 min a 72°C. Após

30 ciclos, as amostras passaram por amplificação de 10 min a 72°C. Ao término da amplificação, as amostras foram mantidas no termociclador a 4°C até a retirada. As amostras de DNA amplificadas foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) sob tensão de 70 volts em tampão de corrida TAE 1 x (Tris-Acetato-EDTA) previamente corado com brometo de etídio (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>). Ao final, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta e os volumes restantes das amostras de DNA armazenados a -20°C. Os *primers* que foram efetivos nas amplificações foram utilizados posteriormente na avaliação do gradiente de temperatura.

### 2.3.2 Teste de gradiente de temperatura

O teste de gradiente de temperatura foi realizado com a finalidade de selecionar as melhores temperaturas de amplificação de cada par de oligonucleotídeos durante a PCR. Para dar prosseguimento ao trabalho, os melhores pares de oligonucleotídeos resultantes da seleção pela etapa anterior foram selecionados para a avaliação de melhor temperatura. Foram montadas 5 reações para cada par de oligonucleotídeo selecionado para o teste contendo cada uma: 1 µL de cada amostra de DNA (das cinco amostras, formando um mix de DNA), 55,52 µL de água tipo I esterilizada, 10,40 µL de tampão (10x), 4,16 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 8,32 µL de dNTP, 1 µL de cada *primer* (F e R), 1,6 µL de enzima Taq DNA polimerase. As reações foram agitadas cuidadosamente e 13 µL foi transferido para cada poço da placa. O programa de ciclos foi realizado em termociclador BIORAD modelo MyCycler nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 5 min, 30 ciclos a 95°C por 30 s, 30 s em temperatura de gradiente e 1 min a 72°C. A variação de temperatura ocorreu conforme o esquema da figura 9:

**Figura 9:** Esquema do teste de gradiente de temperatura de amplificação dos pares de oligonucleotídeos.



Fonte: Autor.

### 2.3.3 PCR para purificação do DNA

Após a seleção da melhor temperatura para cada par de primer, foi realizada uma nova PCR com cada par de primer selecionado para cada amostra de DNA.

## 2.4 Purificação do DNA

As amostras de DNA resultantes foram purificadas utilizando kit MinElute Reaction Cleanup. Cada amostra de DNA foi diluída em água tipo I esterilizada e o volume foi completado para 20  $\mu$ L. Acrescentou-se 300  $\mu$ L de tampão ERC às amostras e aplicou-se cada amostra em uma coluna MinElute, submetendo as colunas a centrifugação a 10000 rpm por 1 min. Os filtrados foram descartados e cada coluna recolocada no mesmo tubo de coleta. Em seguida foi adicionado 750  $\mu$ L de tampão PE na coluna MinElute e o material centrifugado novamente por 1 min a 10000 rpm. Os filtrados foram novamente descartados e as colunas reposicionadas. Para remoção completa dos resíduos, as colunas foram novamente centrifugadas por 1 min por 10000 rpm. Após a centrifugação, cada coluna foi recolocada em um novo tubo de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 10  $\mu$ L de tampão EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) no centro da membrana e manteve-se as colunas em repouso por 1 min. As colunas foram então submetidas a uma nova centrifugação por 1 min a 10000 rpm para obtenção do

DNA purificado. As colunas foram descartadas e os DNAs purificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) sob tensão de 70 volts em tampão de corrida TAE 1 x (Tris-Acetato-EDTA) previamente corado com brometo de etídio (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>). Ao final, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta e os volumes restantes das amostras de DNA armazenados a -20°C para posterior reação de sequenciamento.

## 2.5 *Reação de Sequenciamento*

Para realização do sequenciamento, as amostras de DNA de cada bactéria foram submetidas a PCR após duas reações de sequenciamento com o kit de sequenciamento do *Big Dye Terminator*, sendo uma contendo o *primer* F e outra contendo o *primer* R. As reações foram montadas em tubos de 200 µL. Em cada tubo de reação, Adicionou-se 1 µL de cada amostra de DNA purificado, 4 µL de água tipo I, 2 µL de tampão de sequenciamento, 2 µL de BigDye e 1 µL do primer (F ou R). O programa de ciclos foi realizado em termociclador BIORAD modelo MyCycler nas seguintes condições: desnaturação a 96°C por 1 min, 35 ciclos a 96°C por 10 s, 5 s a 52°C e 4 min a 60°C. Após 35 ciclos, as amostras passaram por amplificação de 4 min a 60°C. Ao término da amplificação, as amostras foram mantidas no termociclador a 4°C até a retirada. Ao finalizar o processo no termociclador, adicionou-se 80 µL de isopropanol 75% em cada amostra e as mesmas foram mantidas em repouso por 15 min. Após este tempo, centrifugou-se a 3040 x g em centrífuga de microplaca por 30 min a 20°C, descartou-se o sobrenadante e lavou-se duas vezes com 200 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 3040 x g por 10 min a 20°C na mesma centrífuga. As amostras foram secadas a vácuo, ressuspendidas em 10 mL de formamida, desnaturadas por 5 min a 95°C e submetidas a sequenciamento no sequenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia CA), conforme recomendações sugeridas pelo fabricante.

## 2.6 **Identificação Molecular**

As sequências genéticas resultantes do sequenciamento foram submetidas a tratamento no software BioEdit Sequence Alignment Editor, onde foram geradas sequências consenso de cada amostra amplificada pelos *primers* F e R. As sequências consenso foram alinhadas e comparadas com sequências do BLAST (*Basic Local Alignment SearchTool* – [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)) e com o banco de dados específicos para bactérias RDP (*Ribosomal Database Project* - <http://rdp.cme.msu.edu>).

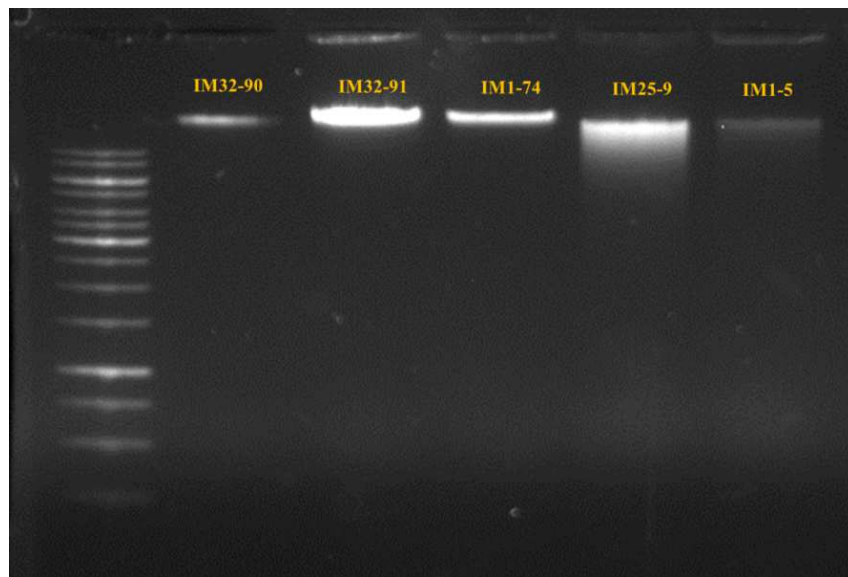
As sequências com identidades mais próximas da sequência consenso de cada bactéria foram selecionadas junto com a mesma e foram submetidas à montagem da árvore filogenética com utilização do software MEGA6.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Extração do DNA genômico

Após a extração do DNA genômico das culturas, procedeu-se a análise da integridade do DNA em gel de agarose a 0,8%, como mostrado na Figura 10. Pode-se notar que todas as preparações contêm DNA integro.

**Figura 10:** Análise da integridade do DNA genômico das culturas de IM32-90, IM21-91, IM1-74, IM25-9 e IM1-5. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo.



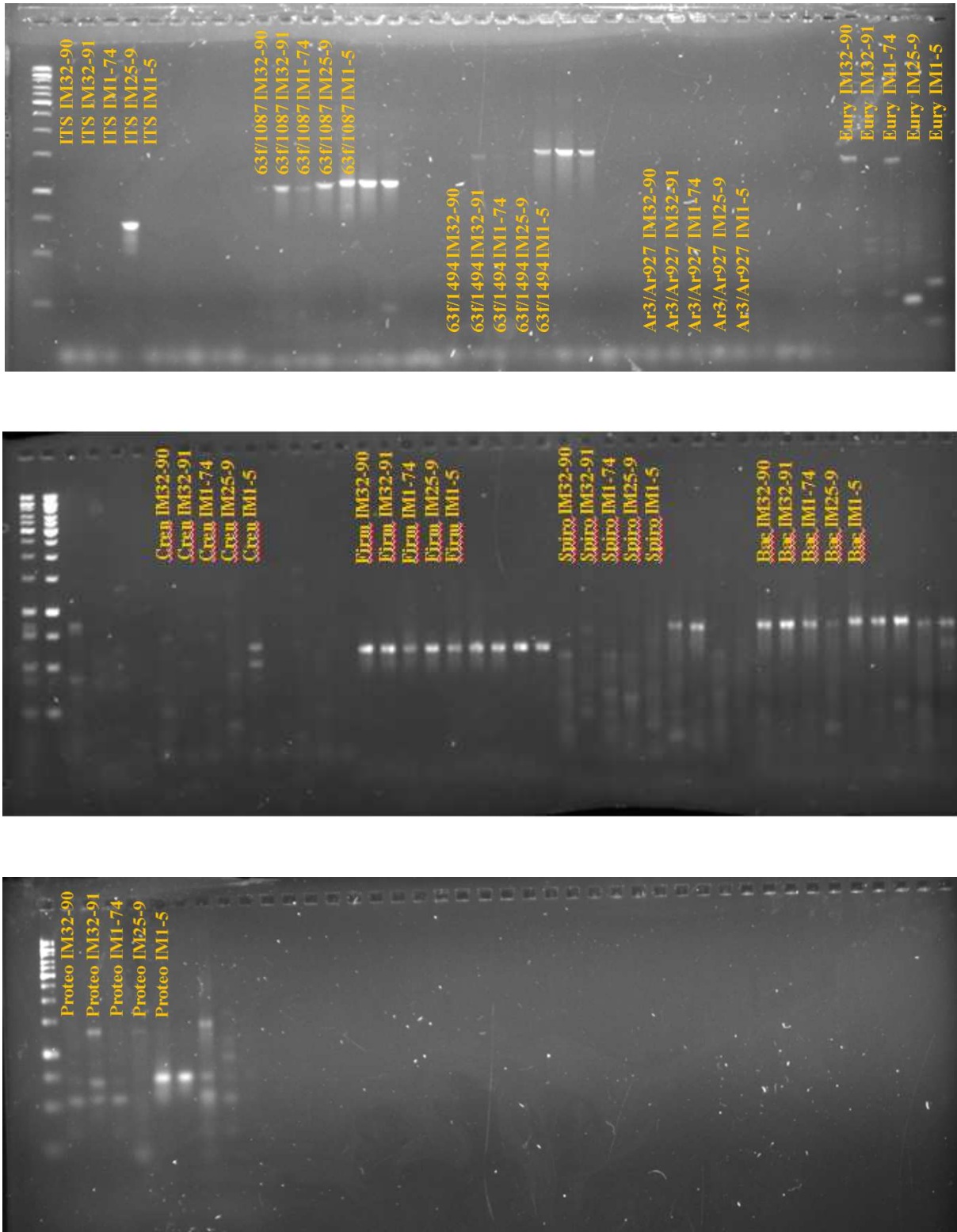
**Fonte:** Autor.

#### 3.2 Seleção dos primers

O produto da PCR gerado pela amplificação do DNA genômico referente ao fragmento de DNA ribossômico 16S de cada amostra está ilustrado na Figura 11. É possível observar que houve eficácia na amplificação ao utilizar os pares de oligonucleotídeos ITS (ITS-1 e ITS-4) somente para o micro-organismo IM25-9. O par 63F/1087R se mostrou eficiente na amplificação de IM32-91, IM25-9 e IM1-5. A amplificação utilizando o par de

primers 63f/1494r foi eficiente somente para IM1-5. Ar3F/Ar927R, EuryF/EuryR, CrenF/CrenR e SpiroF/SpiroR não se mostraram eficientes na amplificação do DNA destas culturas. O par de primers FirmF/FirmR foi o mais eficiente na amplificação, resultando em DNA íntegro para as cinco amostras avaliadas. BacF/BacR e ProteoF/ProteoR foram eficientes na amplificação de IM32-90, IM32-91, IM1-74 e IM1-5.

**Figura 11:** Produto da PCR gerado pela amplificação do DNA genômico referente ao fragmento de DNA ribossômico 16S de cada amostra.

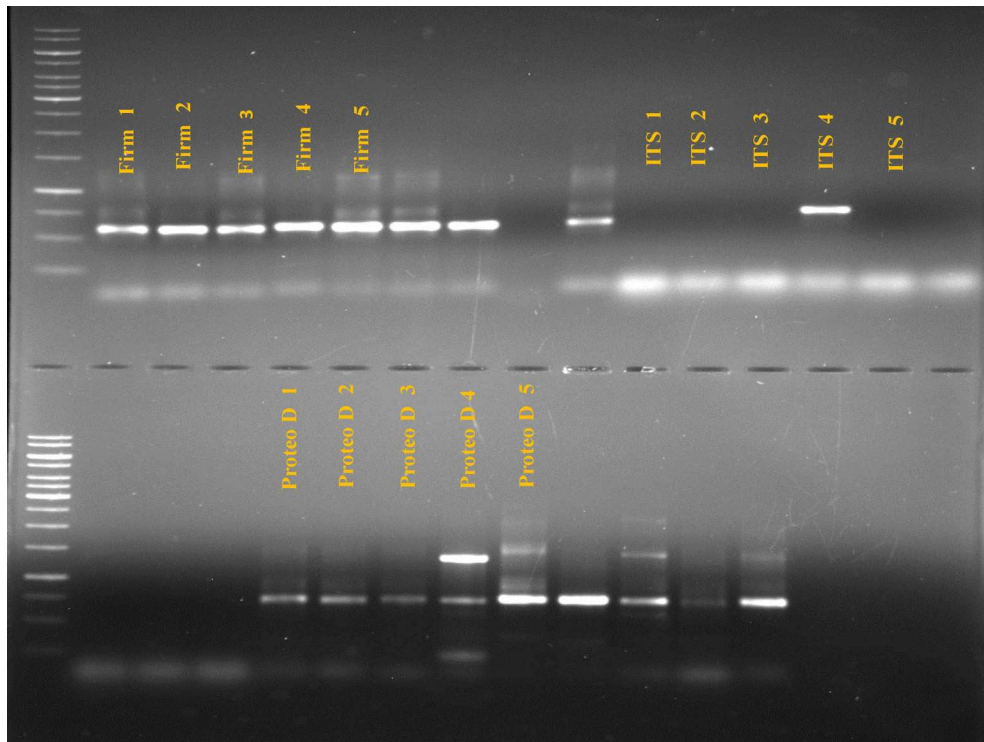


Fonte: Autor.





**Figura 13:** Perfil de amplificação das amostras de DNA dos cinco microrganismos com os primers e temperaturas mais eficientes.

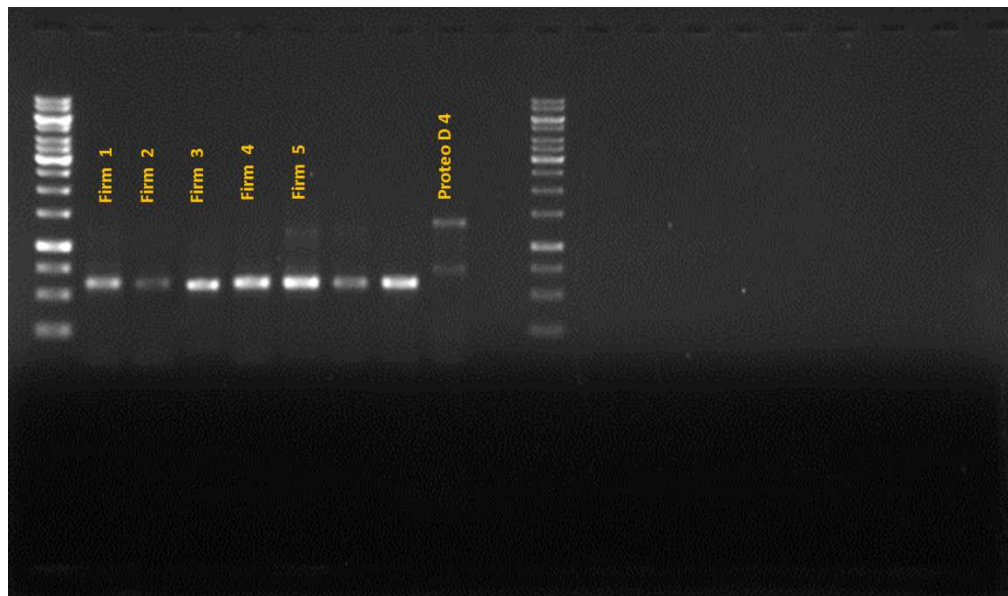


Fonte: Autor.

### 3.5 Gel do DNA purificado

As amostras de DNA foram submetidas à purificação utilizando o kit *MinElute Reaction Cleanup*. Foram utilizadas para purificação as amostras de melhor qualidade amplificadas com o par de *primers* FirmF/FirmR das cinco amostras de micro-organismos (IM32-90, IM32-91, IM1-74, IM25-9 e IM1-5), e a amostra de IM25-9 amplificada com o par de *primers* ProteoDF/ProteoDR. Após a purificação, os DNAs purificados foram submetidos a um gel 0,8% de agarose para verificar a qualidade da purificação. Os resultados foram positivos para as cinco amostras de DNA amplificadas com os *primers* FirmF/FirmR, conforme mostrado na Figura 14.

**Figura 14:** Perfil da amplificação das amostras de DNA após purificação.



Fonte: Autor.

### 3.6 Sequenciamento

O eletroferograma do sequenciamento realizado pelo sequenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer revelou as seguintes sequências de nucleotídeos descritos na Tabela 8:

**Tabela 8:** Sequências Foward e Reverse geradas pela análise de sequenciamento.

IM32-90	<b>Sequência F:</b>
	<p>CGCAGTCGATCGTCGGTCCAGATGCCCTTGATACTGGCGAGAAGTTGGGAACCCGGAGTAGG  TGAAATTCTTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGAAGGGCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGT  GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGA  TGCTAGCCGTTGGGGGTTTACCTCTCAGTGGCGCAGCTAACGCCTTAAGCATCCCCTGGG  GAGTACGGTTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGTTCTGCACAAGCCCCGCC  AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTTCTTTTTTAACTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGACGA  CTTCCGATTTTGTNTGTGTGNGTCGAGCAATGGACTCTGCTACTCTGCATGGACTGCCCCC  AGCTCGTGTCTGAGATGTTTCGGGTTTGCCACACCAGTTGCNTTTTTTTTACCTGCNCTGT  TATGTGCAGAGACAACGGCGGACAAGTTTCTTCTCTCGTGAGCGCGCTGTGTTA</p>
	<b>Sequência R:</b>
	<p>CACATGGTGCAGGTCCATTGCTGGAAGAAATCCGTCTCCGGAAGTCGTCCTGCATGTAAAGG  CTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGNATTA AACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC  CGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTTCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATGCTTAAGGCGTTA  GCTGCGCCACTGAGAGGTAAACCCCCAACGGCTAGCATCCATCGTTTACGGCGTGGACTAC</p>

	<p>CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCGAGCCAGTT  GGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCGAATATCTACGAATTCACCTCTACACTCGGAGTTC  CACCAACCTCTCTCGAACTCGAGATCGCCAGTATCAAGGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAG  GATTTACCCCCTGACTTAACGATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCCAGTGATTCGGAGCAACG  CTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAAAAGAAGGGTGCAGACCGGGGTGA  AATCCTGGGGTCAAACCTGGGAGAACTGCGGTTGATACGGGCCCATCTCGAGTGAGAGAGGG  GGTGGATGTCCTCCGGGGGTGGGGGGTATTCTCCGCTAATAACTAAAAAAGAGCAACAGCG  GCAAAGAAGG</p>
	<p><b>Sequência F:</b>  TATANCANTCAGCGTAAGGGCGCGTAGGCGGCCGATTAAGTCGGGGGTGAAATCTACCACAG  AATTGCCCTTCGATACTGGTTGCACCGGAAAGGACAGCGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAA  TTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGCCTTAACGATGANGAGGTCCGGTTCTGACGC  TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC  GATGAATGCCAGCCGTTGGCCTGCTTGCAGGTGAGTGGCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCC  GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG  GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACTCTTTTTATCCTTACCATCCCTTGACATGGCATGT  TAGCTCGAGAGATCGGGTGTCTCTTCGGAGGCGTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTC  AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACCACGACTCTTTGCCGCACTCATTGA  CCTTTTCTTGTTCAGCTCTAAGAACGAAGAACGATAGGTGTGTATACGTTGCGGCGTGGAGA  TTAGAGCTATGGGTCGCGTTTAGAAGCTTTGATTATCTTTATCGTGTAGTGAACCGCGGGTCTT  TTGATGAACAGAACTAACATGTCTCCTTTATTTTGTCTCG</p>
IM32-91	<p><b>Sequência R:</b>  GGGAGACGTTGCTGCACNTGAGTGCACGCCTCCGAAGAGGACACCCGATCTCTCGAGCTAA  CATGCCATGTAAGGGATGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG  CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTAACTTTCGCGACCGTACTCCCAGGCGGAA  TGCTTAATGCGTTAGCGGCGCCACTGACCTGCAAGCAGGCCAACGGCTGGCATTTCATCGTTT  ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCA  GAACCGGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTTCGCAATATCTACGAATTCACCT  CTACACTCGCAGTTCGGCTGTCTCTTCGGTCTCAAGCCAACCAGTATCGAAGGCAATTCTG  TGGTTGAGCCACAGGCTTTCACCCCCGACTTAATCGGCCGCTACGCGCCCTTTACGCCAG  TGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAAAAAANGGGT  CAAGGGGGCGTACGGGCTATTAGTCTGGGGTCAAACCTGCTTTTAGTTCTGAGTGGCTGGCT  TATGGTCCGGCTGGGACTACAATAAAGCACTTAACTCTGTATGCGCAGAGGAATCGCAGATG  CTTCTTTAAACCAAGAGCTCACGGCGCTTCTCCTGTCCGCTCTGGGGAATTAGGCTGCATAGC  TCGAGCTGATCCTGATCACACTCCTTGGAGGTCAACCAGTATAATGATCCCATACCTCTGCTC  TTTATGAAGAT</p>
IM1-74	<p><b>Sequência F:</b>  CGCTCGTGCATCACTGGCGTAAGCGCGCGTAGGCGGATCGATTAAGTCAGGTGAATCTCCGC  TCAACTCCAGAATTGCCCTTGATACTGGTTGGCGACGAAGAGGATGGTGGAACCTGCGAGTGT</p>

	<p>AGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGACTGGTTTCGG  TTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  GCCGTAAACGATGAATGCTAGCCGTTGGGGGTTTACCTGTCAGTGGCGCCGCTAACGCCTT  AAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCATCCCTTGA  CATGGCATGTCAACTCCAGAGATCGGATTTCTCCTCCAATGCATGTACACACGGGCTGTGTG  GGGTCTCCTCCTCTCGTGTGAGATATGGGGGAAGTAGCCCAAGCTAACTATCGCCGGC  CTGCCCTGTGTGTCTGAAGAATGAGACAAATCTCGGCTTCTAAGATTGTCTGCGTATGAAAG  AGTGTTACGTTTTGCTCTTTTTAAACAAATAAAACCACACCGCAGCGGGGCGGCGGCTTC  TTCTTTTAGTTTGACACTTCCCACCGCGCGCACGGCGGGAATGCTTTAGGGGTTCTCCACC  CCGGAAGAGAACAACCCACCCCTCTTTCTCGTTTTGGGACGGCGGGAGAATATGATATGT  ATATCTTTCTGTCTTCGCCGCCCTCCAACCGAACAACAAACCGTCACTCGCGTGCCTGGG  TTTACCTCATGATTACCATCTACCGCCGACGCCNAGGTCTCCCTCTCCCTTACCATATAT  AAAGAAAGAAACAGGTGGTNGGGGGGCCAACTTAACATAAACCAGCCCTA</p>
	<p><b>Seqüência R:</b></p> <p>GGGCCATGCAGCACCTGATGTGCACGCCCCCAATAGGACAAAATCATCTCTCGAGAATAAGT  GCTATGAGGAATGGGAAGGGGCTGCGCGTTGCTTTTCTTAAACATGCGCTCCGCTTGTGCG  GGGCCCCCAATTTTTTTTAGTTTTAATCTTGTGACCCCACTCCCCCGCGGAATGCTTTTAG  CGTTTTAGCTGCCACTCAGATGGGAAAACGCCCAACGGGGAATTTACATCTTTTAGGGCGT  GCACTACCGGGGTATCTAATCGTGTGTTGCTCCCCACTTTTTCGCCCTCAGCCTCAATATCGAC  CCACAGGGCCCTTTTCCCCTGTGGTGTTTTTCCAATATCTAAAATTTCCCCTCTACTCTCAG  ATTTCCACCCCTCTCTGTCACTCGACATCCCTATCTCAGGGGATTTTCTGGATTAGACCC  CGGGTTTTCCCCCAGATATAACGACCCCCACGTCTTTTTTACCCCAAGAGTTTCAGAAAC  ACTCTCCCCCTCTTATTACCCCGCCTGGGGGGGCATAAAAAAGGTTTTTAATAGACCGGTA  GTAAACTGGTGGAGCTTCGGTCAAGAACGGCGTTAACTAAAGGGATATCTCACGTTCCGGG  GGGGTTGGTGGCTCTCGGGAGTGTGGAGGGTGTACTTTGTAGAATATTCGAAAGAAAACC  AGGCGATGGGCTGGCGATCCTTCCTTCTGGTGCAGCTGAGGCTGAACACAGCGCCGTTTGG  TGGGAAAAAAAAGGATGTGCTAACTCCTCCACACAGAAAAAATTAACATTTTTGTGTCC  NCCGGTGTTTTCTCAAGGCGGTGAAAACAAAAGATCTTATAGTCCT</p>
IM25-9	<p><b>Seqüência F:</b></p> <p>TANGCATTANTGGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGTAGGCTT  AACCTCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGAGTTCGGAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT  AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGTTCTCAGAAATCTGGGCCGATAC  TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  GTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGACGCTAACGCATT  AAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  GCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCTTCTTTAAGAACCTTACCAAGGCTTG  ACATACACCGGAAAGCATTAGATATAGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGG  CTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGGACCTTTGCCACACTG  AGTGAGCTGCACTGTGACAGCTTGAGAAGGGAGACAAATTTGTGTCCTTCTACTCGCTGTA</p>

	<p>GTGTTTCAGGTTGTCACGTTGCCTCCCCTTCATCTCCAGCTCGACACGTGAGATGTACCCGTT CACTCTCGCAAACCCCGCCACTTTCTCTCTTACTCTCTGTGTTGAATATAGCGTTTATACT TTATTGGTGAACATCCCCACCTCCCCTCCCATTCTTCTTCTCCTTATCTTAATTAG</p> <p><b>Sequência R:</b></p> <p>TCGCATGAACCTGATACACCGACCACAAGGGGGGCACGTATCTCTAATGCTTTCCGGCTTAA GGCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTTCGAATTTACTCATGTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCC GTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTA TCCCCAGGNNGGGCCTTAATGCGTTAGC TGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTA CCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGA GATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATT CCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCGTATCGACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTCG GGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAA CGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGGGGCACGTAAAGGGATCATGCGTTATTCGGGAA GTATTGGGGGTAGAGAGCTCGTATGCGGCTTGTACGTCGGTGTGAAAGCCCGAGGCTTAAC CTCGGGTCTGCACTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTATGGGATATCGGAATTCATGGTGT AACAGCTGAATGCGCAGATATCACGCAGGAAACGGTGGCGAAAGCCGATCTCTGGCGCATC TGAGGCTGAAGAACGAAGCGCGAGGAGGATACAGGATTAGAGTACCTGGTCATTCCCCCGC GAACGGTGAGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTTCGTCGTGAGCCACTAAATGTATAAC TGCCCGCCGGGGGAAGACGTCTTACTAAAGAG</p>
IM1-5	<p><b>Sequência F:</b></p> <p>GNGAAGTGTGCGGATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGGTGTTTAA TTTGNNGGCTCAACCTCGGTTTCGGACCGGAAACTGGGAGACTTAAGAGAGGAAAGTGGAAT TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCCTAGAGATGTGGAGGAACACCCGGGGGGTATCCGCCCAT CTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGCCCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATTCCCTT GTTTCCCACGCCCTAAACGATGCATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCTAAG TTAACACAGTAAGCATGCCCCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTTCAAGGAATTG ACGGGGACCCCCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCCAAGCAACGCTAATAACCTTAC CAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGCTTAAAGATAAACCTTTCCTCCGACAGAAGTGACA AGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCAAAATACC GCGTACCTGACCTGCACTTCTTAGGGCGTGTTTTTGACGATTACTTAGTGTCTTACTACCGC CGTAGCGTTCCGGGGTGACACGTGGAGCACCGTTCGCTCCAGTTCGTGTACCTAAGATCTTA GGTCTGTCCCCGCATAAGCGTGACTCTCATCTTTTNAACCGACGCTCGGACACACCGATCA AAATAAGTGAACGAAGCCACCCGATCACGCCAACCCACTCCGTACCCCTGCATCTCTCGCC ACGGCAATCTATCGGTAGCTACGTGCCATTAAGTCCCGCCTGCCTGGCCCCATCACAGGATTC AACCATAATCCACTCTTCTACCTCACCTCCCCAGTTGGGACTAAACAGGCTGGAAAGTACTT TCTTTTAATTTGAGCTCT</p>
	<p><b>Sequência R:</b></p> <p>GCAACCATGCACCACCTGTCACCTCTGTCCCGAAGGAAAGAGCTGTATCTCTAAGCCGGTCA AGGGGTGAAGACCTGGTAAGGTGCTTCGCGTTGCTTCTAAAAAATAACTCCACTGCT TGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCACTCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGGAT GCTTACTGTGTTAACTTCGGCACCAAGGGGATCGAAACCCCTAACACCTAGCATGCATCGTTT</p>

ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCA GTTACAGGCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTCACCGC TACACGTGGAATTCCACTTTCCTCTCCTGCACTCCAGTCTCTCTGTTTCCGGTGCGAACCGAG GTTGAGCCTCGGGATTAAACACCAGACTTAAAAAACGCCTGCGCGCGCTTACGCCAATA ATTCCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGGACGTAACAACCCCTCCT GCGCACCATCGTTGTGGTCTAACCCTTTTTTTTATCTTATGGTATTCTACACCGTAAAAAATAG GTTTTAAGTTTTTCTCCTTTCCTTACNTTCGTTTTTC
---

As sequências F e R de cada microrganismo foi utilizada para montagem da sequência contígua com auxílio do *software* Bioedit, que foram dispostas na tabela 9.

**Tabela 9:** Sequências contíguas de cada microrganismo confeccionadas no software Bioedit.

Micro-organismo	Sequência contígua
<b>IM32-90</b>	TTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGA ATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGTTAAGTCAGGGGTGAA ATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCCTTGATACTGGCGATCTCGAGTT CGAGAGAGGTTGGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATAT TCGGAAGAACCAGTGGAGAAGGCGGCCAACTGGCTCGATACTGACG CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGGATGCTAGCCGTTGGGGGGTTACCTCTCAG TGCGCAGCTAACGCCTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAG ATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCTGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATG GCAGGACGACTTCCGGAGACGGATTTCTTCCAGCAATGGACCTGC
<b>IM32-91</b>	GCGACAAAATAAAGGAGACATGTTAGTTTCTGATCAAAGACCCGCGGT TCACTACACGATAAAGATAATCAAAGCTTCTAAACGCGACCCATAGCTCT AATCTCCACGCCGCAACGTATACACACCTATCGTTCTTCGTTCTTAGAGC TGAAACAAGAAAAGGTCAATGAGTGCGGCAAAGAGTCGTGGTTGCGGG ACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC TGAGTGCACGCCTCCGAAGAGGACACCCGATCTCTCGAGCTAACATGCC ATGTCAAGGGATGGTAAGGATAAAAAGAGTTGCTTCGAATTAACCACA TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCGGGGGAGTTTGAATCT TGCGACCGTACTCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCGGCGCCACT GACCTGCAAGCAGGCCAACGGCTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACT ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTC AGAACCGGACCACATCAGCCGCCTTAAGGCGCCACTGGTGTCTTGCGA ATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCGCTGTCTCTTCCGGT CATCAAGCCAACCAGTATCGAAGGCAATTCTGTGGTTGAGCCACAGGCT TTCACCCCGACTTAATCGGCCGCTACGCGCCCTTACGCCCAGTGATA

	<p>TACGTATGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA  AAAAATGGTGTCAAGGGGGCGTACGGGCTATTAGTCTGGGGTGAAACCT  GTCTTTTAGTTCTGAGTGGCTGGCTTATGGTCGGGGCGACTAAATAAAGC  ACTAACTCTGTATGGCAGAGGAATCGCAGATGCTCTTTAAACCAAGAGC  TCACGGCGCTTCTCCTGTCCGCTCTGGGGAATTAGGTGCATAGCTCGAGC  TGATCCTGATCACACTCCTTGGAGGTCAACCAGTATA-  ATGATCCCATACTCTGCTCTTTATGAAGAT</p>
<b>IM1-74</b>	<p>CAGAGCCGAATAACAACACTGTGTGCACGCCTCCTACGAGGAAGACACAT  CGTCTTCTGAAGCTAACATCCCATGTCAAGGAATGGGAAGGTTCTGCGC  GTTGCTGTGCAATTAACCACATGCTCCACAGCTTGTGCGGGGCCCC  CTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCACCTACTCTCCAGGCGGAAT  GCTGTAAAGGCGTTTTAGCGGGGCCACTGACATGGCAAACCCCCAAAG  GCGTAGCATTTCATCTTTTACGGCGTGTGCAATACCAGGGTATCTAATCC  TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTACCGAACACAGTC  AGGGGCCGCTTCCCCACGGGTGTTCTGTCCGATATATCTAAAAATTTCA  CCTCTACACTCAGCAGTTCCTGTCTCCTCTCTCGAACTCAAGATCCGCC  AGTATCAAGGGCAATTCGTGAAGTTGAGACCACAGCCTTTTCACCCAG  ACTTA</p>
<b>IM25-9</b>	<p>CTCAGTGTGGCAAAGGTGCCTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC  ACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGG  GCACGTATATCTAATGCTTTCGGGTGCACTGTCAAGCCTTGTAAGGTTTC  TTAAAAGAAGCGTCGAATTAATGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGC  CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGAGG  GGCACTAAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCAC  ACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT  TCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGATGATCT  GCGAGCCAACGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCT  ACACCAGGAATTCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGTCCTGCCGTATCG  ACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTAGAGCTTTCACAACCGACGTGACAA  GCCGCCTACGAGCTCTTACGCCAATAATGCCGTGACA-  ACGCTTGCGCCCTACGTA</p>
<b>IM1-5</b>	<p>TTTGGGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT  GCACCACCTGTCACCTCTGTCCCGAAGGAAAGAGCTGTATCTCTAAGCC  GGTCAGACGGATGGTCAAGACCTGGTAAGGTGATTAGCGTTGCTTCGAA  AAAAAAAAAATACTCCACTGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGA  AGTTTCACTCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGGCATGCTTACTGTGTTA  ACTTAGGCACCAAGGGGATCGAAACCCCTAACACCTAGCATGCATCGTT  TACGGCGTGGGAATACAAGGGAATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT  CGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGGCCAGAAAGGCGCGCTCCCCACGGG  TGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTT  CCTCTCCTGCACACCAGTCTCCCAGTTTCCGGTCCGAACCGAGGTTGAG</p>

	ACTCAAGATTAAACACCAGACTTAAAAAACGCCTGCGCGCGCTTTACG CCCAATAATTCCGCACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTG GGACGTAA
--	--

### 3.7 Identificação molecular




A identificação molecular do 16S rDNA das estirpes bacterianas produtoras de enzimas celulolíticas foi feita por comparação da sequência contígua de obtida de cada microrganismo com o GenBank através do programa BLASTn (NCBI – [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)), bem como comparação com dados do RDP, conforme descrito a seguir.

#### 3.7.1 IM32-90


O alinhamento da sequência contígua do microrganismo IM32-90 apresentou 99% de identidade com genótipos cadastrados dentre espécies de *Xanthobacter flavus*, *Xanthobacter tagetidis* e *Xanthobacter aminoxidans*; 98% com espécies *Azorhizobium caulinodans*, *Azorhizobium spiritensis* e *Xanthobacter agilis*; e 97% com *Azorhizobium oxalatophilum* e *Azorhizobium doebereineriae*, conforme Figura 15.



**Figura 15:** Alinhamento da sequência contígua de IM32-90 com genótipos cadastrados no Blast.

← → ↻ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>   

**Sequences producing significant alignments:**  
 Select: [All](#) [None](#) Selected: 16

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) 

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter flavus strain NBRC 14759 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	966	966	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_113665.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter flavus strain 301 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	966	966	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_026307.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter taquetidis strain TagT2C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	961	961	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_026353.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter aminoxidans strain 14a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	948	948	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_025172.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans strain ORS 571 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	922	922	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_074185.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans strain NBRC 14845 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	922	922	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_113675.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans ORS 571 DNA, complete genome</a>	922	2767	99%	0.0	98%	<a href="#">AP009384.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans strain LMG 6465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	922	922	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_119216.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans strain LMG 6465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	917	917	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_118987.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Aquabacter spiritensis strain SPL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_104747.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter aqilis strain SA35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	905	905	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_026306.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans strain ORS 571 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	900	900	99%	0.0	97%	<a href="#">NR_036941.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans strain ORS 571 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	893	893	99%	0.0	97%	<a href="#">NR_115492.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium oxalatiphilum strain NS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	887	887	99%	0.0	97%	<a href="#">NR_108517.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium doebereineriae strain BR5401 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	878	878	99%	0.0	97%	<a href="#">NR_041839.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium doebereineriae strain BR5401 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	878	878	99%	0.0	97%	<a href="#">AF391130.1</a>

Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Após o alinhamento, os genótipos foram selecionados conforme na figura 15 e foi feito *download* das sequências em formato FASTA para montagem da árvore filogenética com utilização do software MEGA6.

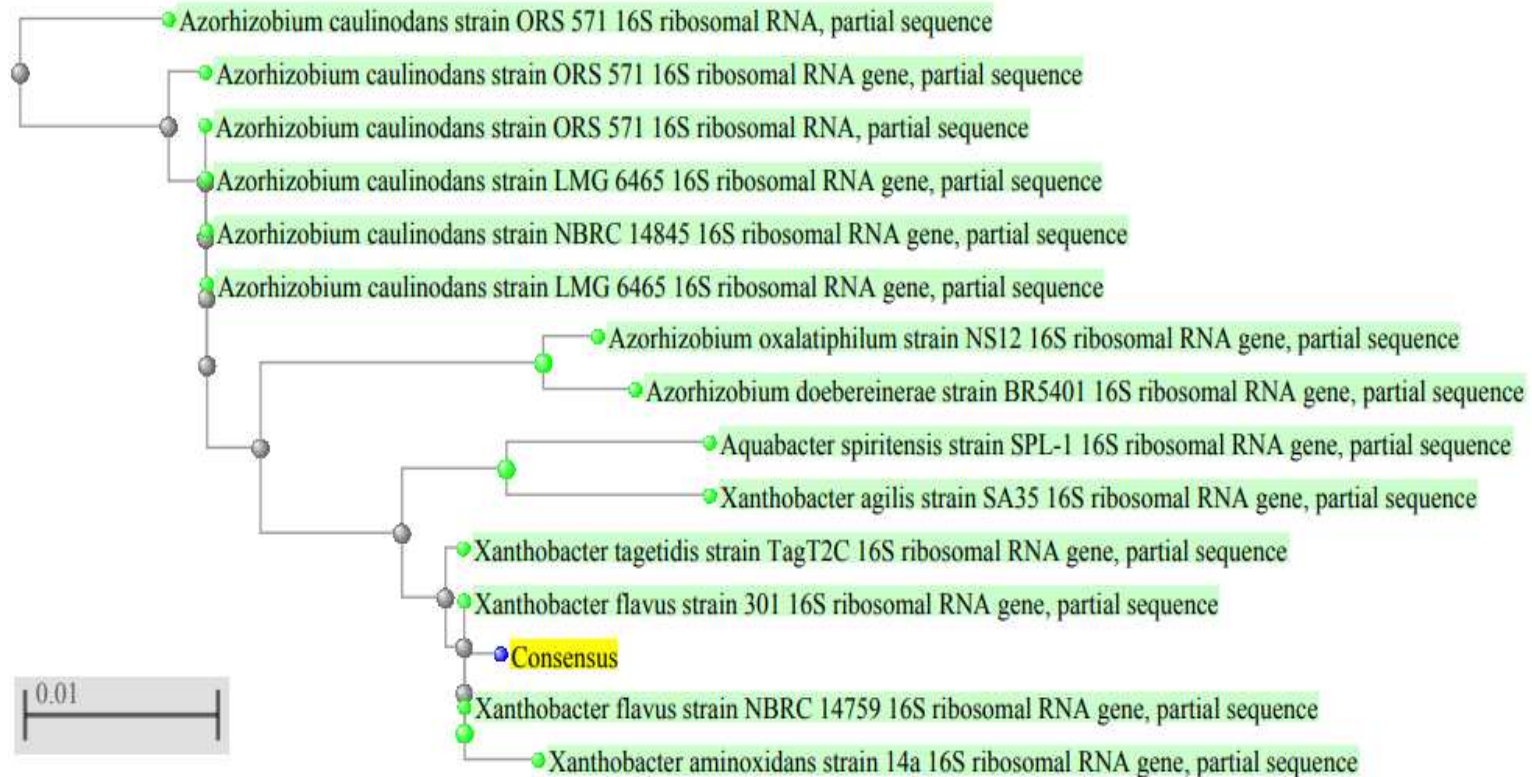
As sequências em formato FASTA foram alinhadas pelo software MEGA6, possibilitando verificar similaridade entre os genótipos, conforme a Figura 16.



Fonte: Autor.

A relação filogenética da sequência de nucleotídeos analisada no Blast agregou IM32-90 ao grupo monofilético constituído pela espécie *Xanthobacter flavus*, conforme Figura 17.

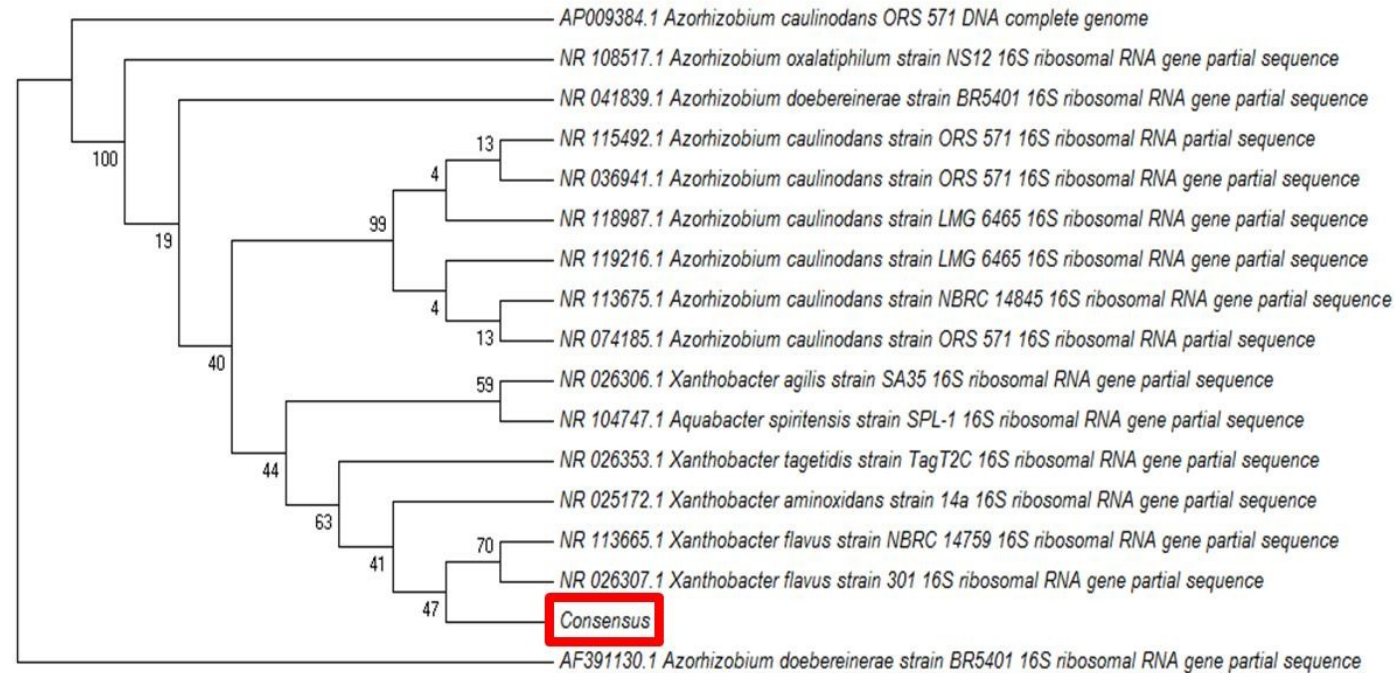
Figura 17: Árvore filogenética de IM32-90 confeccionada no Blast.



Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Outra árvore filogenética foi construída pelo método de distância, utilizando o algoritmo “Neighbor-Joining”, realizada com utilização do software Mega 6.0 (Figura 18).

**Figura 18:** Análise Filogenética Molecular de IM32-90 pelo Método da Máxima Verossimilhança



A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo Kimura de 2 parâmetros (Kimura, 1980). A árvore com a maior probabilidade de log (-2272.7945) é mostrada. A (s) árvore (s) inicial (is) para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ em uma matriz de distâncias entre pares estimadas usando a abordagem MVI (Maximum Composite Likelihood) e selecionando a topologia com valor de log likelihood superior. Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os sites (5 categorias (+ G, parâmetro = 5.7011)). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas no número de substituições por site. A análise envolveu 17 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 499 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA6 (Tamura et al, 2013).

Fonte: **MEGA6**.

A análise da árvore filogenética realizada pelo programa MEGA6 (Figura 18) sugere que o microrganismo IM32-90 se classifica como pertencente ao gênero *Xanthobacter*, com 99% de similaridade do genoma com três espécies: *Xanthobacter flavus*, *Xanthobacter aminoxidans* e *Xanthobacter tagetidis*.

Uma comparação das sequências de 16S rRNA entre *X. flavus* e *A. caulinodans* demonstrou que estas estão fortemente relacionadas (LEE *et al.*, 2008).

A sequência contígua de IM32-90 foi alinhada no RDP para análise filogenética em comparação com o Blast (Figura 19).

**Figura 19:** Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM32-90 com sequências cadastradas no RDP.



The screenshot shows a web browser window with the URL `rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_sum.jsp?qvector=204&depth=0&currentRoot=0&num=20`. The page features the RDP logo (three green hexagons) and a section titled "SeqMatch :: Summary". Below the title, there is a button labeled "Select All Match Hits to seqCART" and a "Display depth:" dropdown menu set to "Auto". A grey bar indicates "Lineage (click node to return it to hierarchy view):". The "Hierarchy View:" section displays a taxonomic tree:

- rootrank Root (1) (query sequences) [show printer friendly results](#) [download as text file](#)
- domain Bacteria (1)
- phylum "Proteobacteria" (1)
- class Alphaproteobacteria (1)
- order Rhizobiales (1)
- family Xanthobacteraceae (1)
- genus Xanthobacter (1)
- Consensus [view selectable matches]

**Fonte:** <https://rdp.cme.msu.edu/>

Os resultados do alinhamento da sequência contígua de IM32-90 com os dados cadastrados no RDP sugeriram que se trata de uma espécie bacteriana pertencente ao gênero *Xanthobacter*.

O gênero *Xanthobacter* se refere a bactérias do tipo gram-negativas, podendo ser encontradas em solo úmido e lama contendo material orgânico, em madeira degradada, ao redor das raízes e nas raízes de plantas, sugerindo que é também uma espécie associada à fixação de nitrogênio (CHEN *et al.*, 2016; SAMANTHA *et al.*, 1989; WIEGEL, 2015).

Até 1992, o gênero *Xanthobacter* consistia em três espécies: *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthobacter flavus* e *Xanthobacter agilis*. As estirpes de *X. autotrophicus* e *X. flavus* eram descritas como sendo sem motilidade, enquanto cepas de *X. agilis* eram consideradas móveis. Novos isolados de *Xanthobacter* passaram a ser classificadas em uma das três espécies de *Xanthobacter* com base na motilidade e exigência de biotina. Em geral, o crescimento na presença de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico produzem células sem motilidade, e o crescimento em álcoois ou falta de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico resulta em células móveis. Crescimento em H, -CO, glutamato ou glutamina também produz células sem motilidade (REDING *et al.*, 1992).

Atualmente podem ser encontradas outras de espécies de *Xanthobacter*, como descrito neste trabalho, como *Xanthobacter aminoxidans* e *Xanthobacter tagetidis*. A análise da árvore filogenética sugeriu que existe uma proximidade evolutiva entre estas espécies de *Xanthobacter* com bactérias do gênero *Azorhizobium*

Não é comum encontrar na literatura pesquisas com produção de enzimas celulolíticas utilizando bactérias do gênero *Xanthobacter*. O relato mais remoto de produção de enzimas por este gênero foi relatado por Samanta *et al* (1989), que observou a produção de celulase,  $\alpha$ -amilase, protease, pectinase e lipase por estas bactérias.

### 3.7.2 IM32-91

O alinhamento da sequência contígua do microrganismo IM32-91 apresentou 90% de identidade com genótipos de espécies cadastradas no gênero *Methylobacterium*, conforme Figura 20.



**Figura 20:** Alinhamento da sequência contígua de IM32-91 com genótipos cadastrados no Blast.

Alignments <span>Download</span> <span>GenBank</span> <span>Graphics</span> <span>Distance tree of results</span>							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured Methylobacterium sp. gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: F48</a>	675	675	100%	0.0	90%	<a href="#">LC318175.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium rhodesianum strain SPS-M4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">KY810502.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. strain WJ4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">KX602664.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. Mi1(2015) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">KP714260.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. IARI-THD-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">KF573004.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium rhodesianum strain ATAI15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">KC469899.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium lusitanum strain UP013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">JX993418.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. LC454 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">JQ014567.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. LC349 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">JQ014524.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. LC323 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">JQ014321.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. LC302 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">JQ014497.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium sp. WGM16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">HQ711851.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium lusitanum strain NBCS24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">GQ281076.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Methylobacterium lusitanum strain 13635N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">EU741086.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured bacterium clone nbt188c08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	673	673	100%	0.0	90%	<a href="#">FJ894969.1</a>

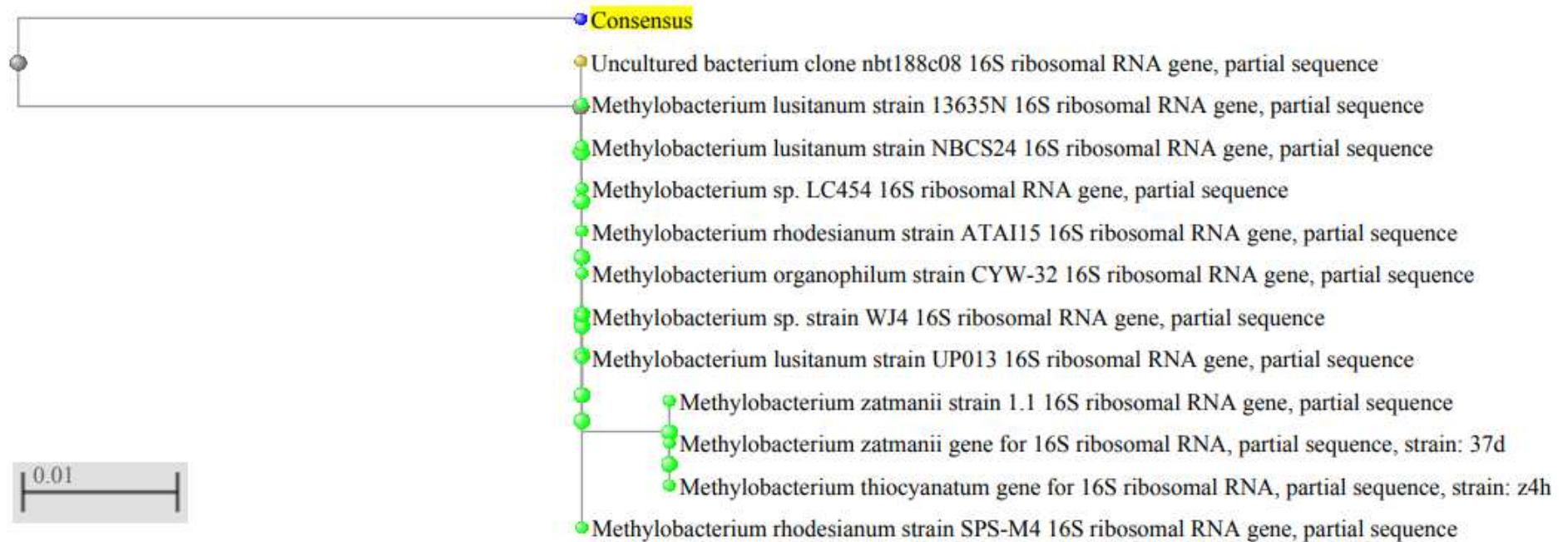
**Fonte:** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Após o alinhamento no Blast, os genótipos foram selecionados conforme na Figura 20 e foi feito *download* das sequências em formato FASTA para montagem da árvore filogenética com utilização do software MEGA6.

As sequências em formato FASTA foram alinhadas pelo software MEGA6, possibilitando verificar similaridade entre os genótipos, conforme a Figura 21.



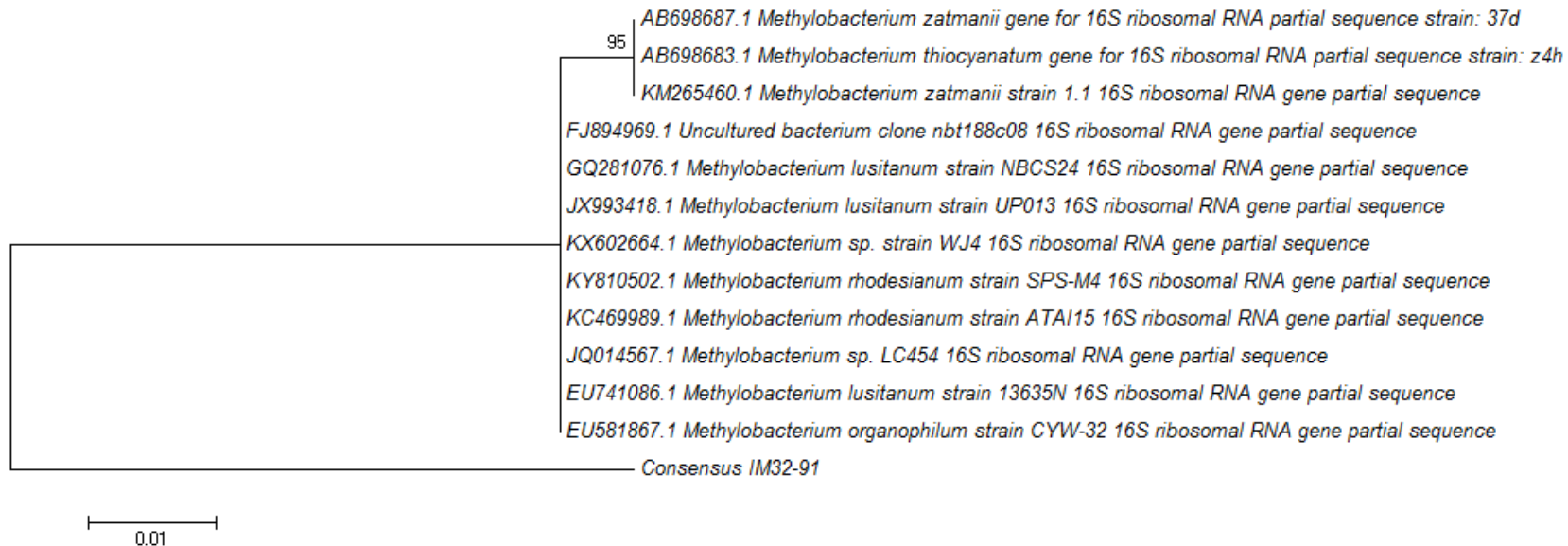
**Figura 22:** Árvore filogenética de IM32-91 confeccionada no Blast.



**Fonte:** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

A árvore filogenética foi construída pelo método de distância, utilizando o algoritmo “Neighbor-Joining”. O software utilizado para a construção das árvores filogenéticas foi o Mega 6.0. A relação filogenética da sequência de nucleotídeos formou um ramo independente do grupo monofilético constituído pelas espécies pertencentes ao gênero *Methylobacterium* (Figura 23), conforme já confirmado pela análise no Blast.

**Figura 23:** Análise Filogenética Molecular de IM32-91 pelo Método da Máxima Verossimilhança.



A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura de 2 parâmetros [Kimura, 1980]. A árvore com a maior probabilidade de log (-944.0653) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais a taxa associada agrupada é mostrada ao lado das ramificações. A (s) árvore (s) inicial (is) para a pesquisa heurística foi obtida aplicando o método Neighbor-Joining a uma matriz de distâncias pares estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL). Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre sites (5 categorias (+ G, parâmetro = 200.0000)). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidos no número de substituições por site. A análise envolveu 13 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminados. Havia um total de 520 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA6 [Tamura et al, 2013].

**Fonte:** MEGA6

A sequência contígua de IM32-91 foi alinhada no RDP para análise filogenética em comparação com o Blast (Figura 24).

**Figura 24:** Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM32-91 com sequências cadastradas no RDP.

← → ↻ ⓘ Não seguro | rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\_sum.jsp?qvector=204&depth=0&currentRoot=0&num=20

BROWSERS | CLASSIFIER | LIBCOMPARE | SEQMATCH | PROBE MATCH | FUNGENE | RPIPELINE | SEQCART | TAXOMATIC | TREE BUILDER | ASSIGNGEN

**rdp** **my rdp**  
Login

### SeqMatch :: Summary

[ [new match](#) | [summary](#) | [detail](#) | [help](#) ]

Display depth:  ▾

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Hierarchy View:

rootrank Root (1) (query sequences)   [ options ]

- domain Bacteria (1)
  - phylum "Proteobacteria" (1)
    - class Alphaproteobacteria (1)
      - order Rhizobiales (1)
        - family Methylobacteriaceae (1)
          - genus Methylobacterium (1)
            - Consensus

Fonte: <https://rdp.cme.msu.edu/>

Os resultados do alinhamento da sequência contígua de IM32-91 com os dados cadastrados no RDP sugeriram que se trata de uma espécie bacteriana pertencente ao gênero *Methylobacterium*.

O gênero *Methylobacterium* constitui um grupo de bactérias de coloração rósea metilotróficas (metilotróficas facultativas com pigmento rosado – PPMF) aeróbias, Gram-negativas, capazes de crescer em uma ampla faixa de substratos, ou substratos com apenas um carbono como formaldeído e metanol como única fonte de carbono. Estão presentes em uma variedade de ambientes naturais como solo, ar, poeira, água doce e salgada, sedimentos e ambientes urbanos como banheiros, ar condicionado ou associado a plantas. Possuem efeito estimulador de germinação, produzindo fitormônios e reduzem a toxicidade de metais pesados. São capazes de sintetizar celulasas e pectinases e fixar nitrogênio. Podem estar associados à biodegradação de compostos, uma vez que são capazes de fazer a detoxificação de hidrolisados de lignocelulose para a produção de etanol, como *Methylobacterium extorquens* capazes de degradar compostos derivados de furanos, que são tóxicos e impedem a posterior fermentação por outros microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA, 2008).

### 3.7.3 IM1-74

O alinhamento da sequência contígua do microrganismo IM1-74 apresentou 86% de identidade com genótipos cadastrados dentre espécies pertencentes aos gêneros *Azorhizobium* e *Xanthobacter*, conforme Figura 25.

**Figura 25:** Alinhamento da sequência contígua de IM1-74 com genótipos cadastrados no Blast

<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans strain RT92 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">MK014268.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured bacterium clone 22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">MH938112.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. strain Alpha-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">MH686083.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Azorhizobium caulinodans partial 16S rRNA gene, strain HAMBI 216</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">LT899976.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. strain T2.4D-O1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">MF361896.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. SM-2017 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: SM14A</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">LC218397.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. SM-2017 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: SM53</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">LC218380.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. SM-2017 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: SM31</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">LC218374.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. HU13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">KT354244.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. NCCP-1316 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">LC065343.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter sp. NCCP-1314 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">LC065341.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Xanthobacter tagetidis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	429	429	86%	4e-116	86%	<a href="#">KM083704.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: rS5m_80</a>	429	429	95%	4e-116	84%	<a href="#">AB753913.1</a>

**Fonte:** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

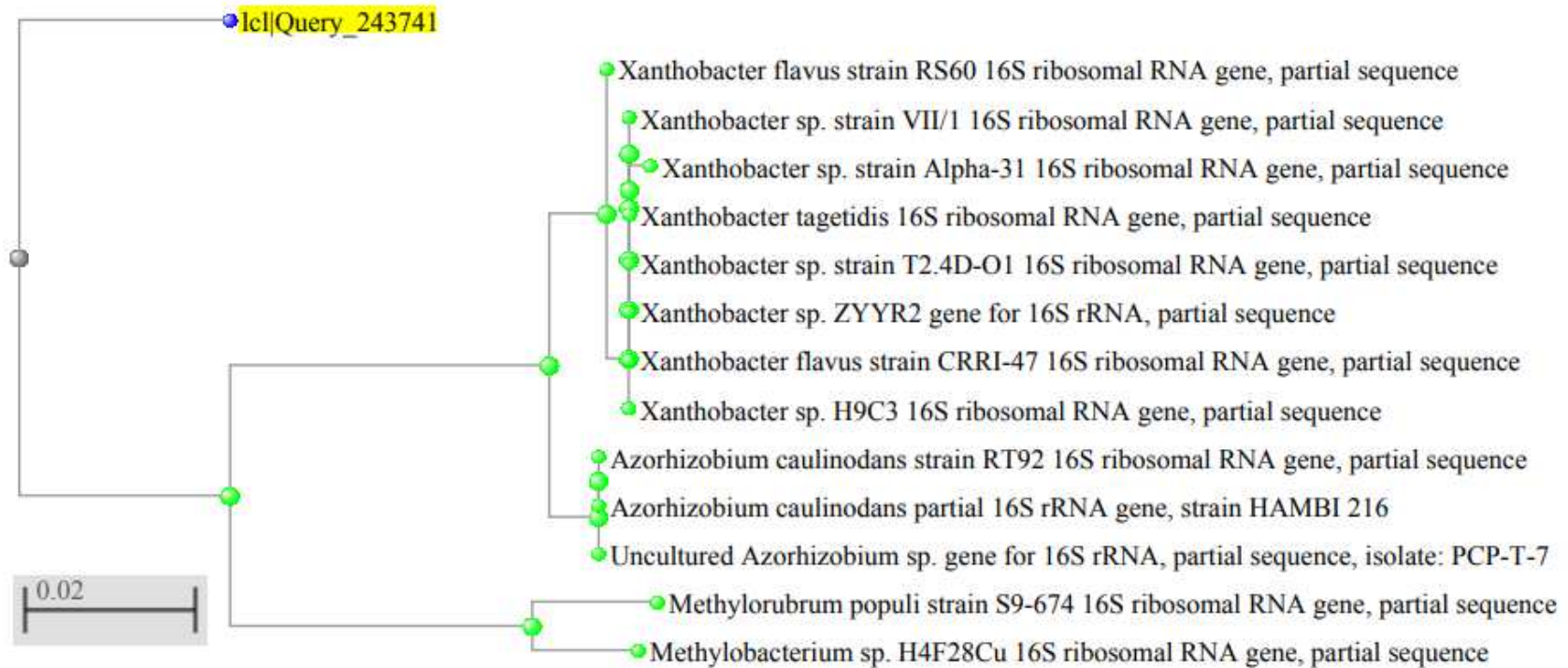
Após o alinhamento no Blast, os genótipos foram selecionados conforme na Figura 25 e foi feito *download* das sequências em formato FASTA para montagem da árvore filogenética com utilização do software MEGA6.

As sequências em formato FASTA foram alinhadas pelo software MEGA6, possibilitando verificar similaridade entre os genótipos, conforme a Figura 26.

**Figura 26:** Alinhamento no software MEGA6 dos genótipos cadastrados no banco de genes com a sequência contígua de IM1-74.



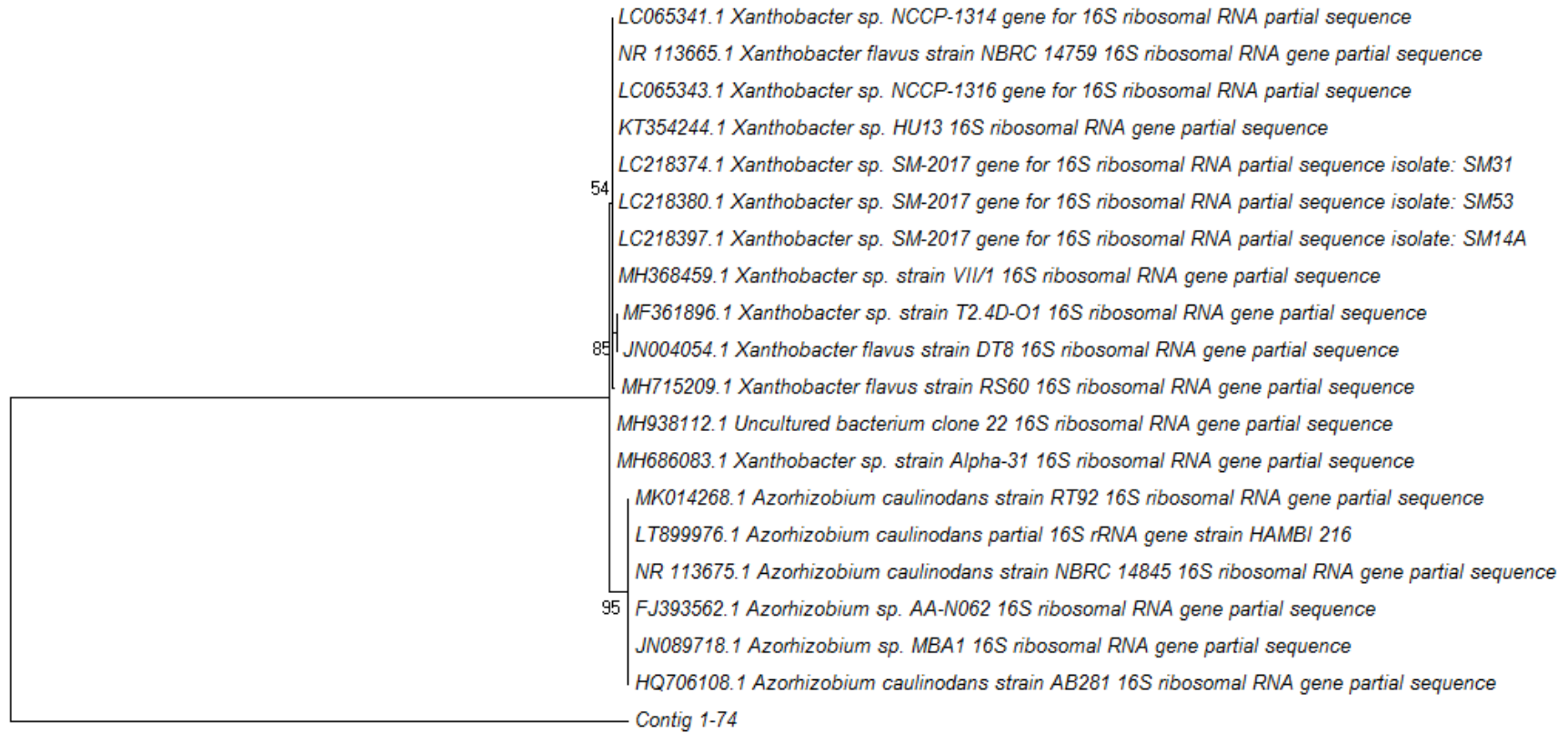




Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

A árvore filogenética foi construída pelo método de distância, utilizando o algoritmo “Neighbor-Joining”. O software utilizado para a construção das árvores filogenéticas foi o Mega 6.0. A relação filogenética da sequência de nucleotídeos formou um ramo independente do grupo monofilético constituído pelas espécies pertencentes ao gênero *Azorhizobium* e *Xanthobacter* (Figura 28), conforme já confirmado pela análise no Blast.

**Figura 28:** Análise Filogenética Molecular de IM1-74 pelo Método da Máxima Verossimilhança.



0.1

A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo Kimura de 2 parâmetros [Kimura, 1980]. A árvore com a maior probabilidade de log (-1384.8604) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais o taxa associado agrupado é mostrada ao lado das ramificações. A (s) árvore (s) inicial (is) para a pesquisa heurística foram obtidas aplicando o método Neighbor-Joining a uma matriz de distâncias pares estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL). Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre sites (5 categorias (+ G, parâmetro = 200.0000)). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidos no número de substituições por site. A análise envolveu 20 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas. Houve um total de 493 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA6 [Tamura et al, 2013].

**Fonte:** MEGA6

A identificação da sequência contígua de IM1-74 não foi possível ser realizada no RDP para análise filogenética em comparação com o Blast devido ao sistema de banco de dados <https://rdp.cme.msu.edu/> não estar acessível para de consulta.

Os resultados do alinhamento da sequência contígua de IM1-74 com os dados cadastrados no RDP sugeriram que se trata de uma espécie bacteriana de uma família provavelmente desconhecida, não constando no banco de dados, apesar de apresentar pouca similaridade com os genomas de bactérias dos gêneros *Methylobacterium* (família *Methylobacteriaceae*) e *Andersenella* (família *Rhodobiaceae*).

#### 3.7.4 IM25-9

O alinhamento da sequência contígua do microrganismo IM25-9 apresentou 95% de identidade com genótipos cadastrados dentre espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*, conforme Figura 29.

**Figura 29:** Alinhamento da sequência contígua de IM25-9 com genótipos cadastrados no Blast.

Sequences producing significant alignments:  
 Select: [All](#) [None](#) Selected: 37

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

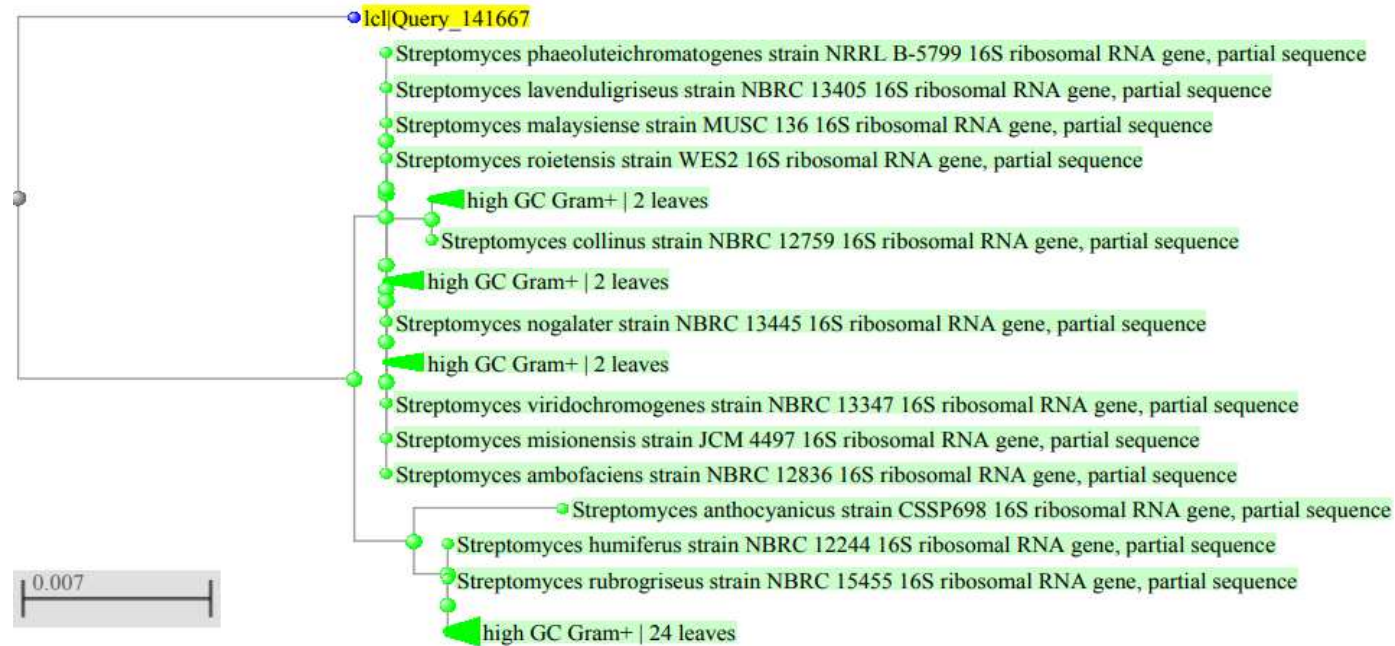
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces eurythermus strain ATCC 14975 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_025869.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces roietensis strain WES2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">KX394336.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces ambofaciens ATCC 23877, complete genome</a>	926	5557	47%	0.0	95%	<a href="#">CP012382.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces malaysiense strain MUSC 136 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">KJ632663.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces flaveolus strain NRRL B-1334 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_116094.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces misionensis strain JCM 4497 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_044138.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces ambofaciens ATCC 23877 left chromosomal arm</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">AM238663.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces viridochromogenes strain NRRL B-1511 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_043843.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces viridochromogenes strain NBRC 13347 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_112526.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces flaveolus strain NBRC 3408 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_041206.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces viridochromogenes strain NBRC 3113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_112482.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces griseoaurantiacus strain NBRC 15440 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_041186.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces nogalater strain NBRC 13445 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_112401.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces lavenduligriseus strain NBRC 13405 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_112391.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces misionensis strain NBRC 13063 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	926	926	47%	0.0	95%	<a href="#">NR_112355.1</a>

**Fonte:** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Após o alinhamento no Blast, os genótipos foram selecionados conforme na Figura 29 e foi feito *download* das sequências em formato FASTA para montagem da árvore filogenética com utilização do software MEGA6.



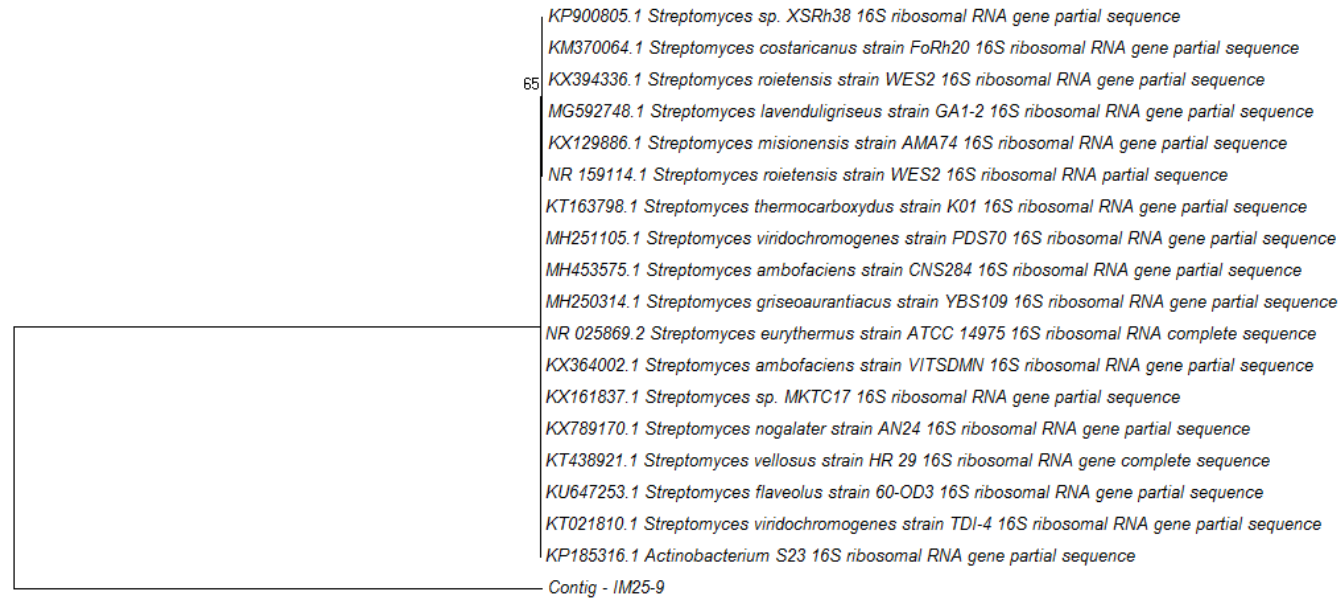
**Figura 31:** Árvore filogenética de IM25-9 confeccionada no Blast.



**Fonte:** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

A árvore filogenética foi construída pelo método de distância, utilizando o algoritmo “Neighbor-Joining”. O software utilizado para a construção das árvores filogenéticas foi o MEGA 6.0. A relação filogenética da sequência de nucleotídeos formou um ramo independente do grupo monofilético constituído pelas espécies pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Actinobacterium* (Figura 32), conforme já confirmado pela análise no Blast.

**Figura 32:** Análise Filogenética Molecular de IM25-9 pelo Método da Máxima Verossimilhança.



A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura de 2 parâmetros (Kimura, 1980). A árvore com a maior probabilidade de log (-1907.4410) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais o taxa associado agrupado é mostrada ao lado das ramificações. A (s) árvore (s) inicial (is) para a pesquisa heurística foram obtidas aplicando o método Neighbor-Joining a uma matriz de distâncias pares estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL). Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+ G, parâmetro = 0,6794)). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidos no número de substituições por site. A análise envolveu 19 seqüências de nucleotídeos. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas. Havia um total de 1019 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA6 (Tamura et al, 2013).

**Fonte:** MEGA6

A seqüência contígua de IM25-9 foi alinhada no RDP para análise filogenética em comparação com o Blast (Figura 33).



**Figura 33:** Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM25-9 com sequências cadastradas no RDP.

The screenshot shows the RDP SeqMatch web interface. The browser address bar displays the URL: `rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_sum.jsp?qvector=204&depth=0&currentRoot=0&num=20#`. The page title is "SeqMatch :: Summary".

Navigation links at the top include: BROWSERS | CLASSIFIER | LIBCOMPARE | SEQMATCH | PROBE MATCH | FUNGENE | RPIPELINE | SEQCART | TAXOMATIC | TREE BUILDER | ASSIGNGEN.

The main content area is titled "SeqMatch :: Summary" and includes a "Select All Match Hits to seqCART" button and a "Display depth: Auto" dropdown menu.

Below the "Display depth" menu, there are two sections:

- Lineage (click node to return it to hierarchy view):** This section is currently empty.
- Hierarchy View:** This section displays a taxonomic hierarchy for the sequence match:
  - rootrank Root (1) (query sequences) [show printer friendly results](#) [download as text file](#) [\[ options \]](#)
  - domain Bacteria (1)
  - phylum "Actinobacteria" (1)
  - class Actinobacteria (1)
  - subclass Actinobacteridae (1)
  - order Actinomycetales (1)
  - suborder Streptomycineae (1)
  - family Streptomycetaceae (1)
  - genus Streptomyces (1)
  - Consensus [\[view selectable matches\]](#)

**Fonte:** <https://rdp.cme.msu.edu/>

Os resultados do alinhamento da sequência contígua de IM25-9 com os dados cadastrados no RDP sugeriram que se trata de uma espécie bacteriana pertencente ao gênero *Streptomyces*.

O gênero *Streptomyces*, abundante no solo, surgiu no período Devoniano, quando a Terra ainda estava sendo colonizada pelas plantas verdes, há cerca de 400 milhões de anos. São bactérias capazes de solubilizar a parede celular ou componentes de superfície de plantas, o que sugere que elas participam da compostagem de plantas. Espécies como *Streptomyces reticuli* são particularmente ativas na degradação da celulose, com uma estimativa de 456 genes para proteínas envolvidas na ligação, degradação e utilização de celulose e outros carboidratos complexos e simples. *S. coelicolor* também tem oito genes para proteínas semelhantes a celulase, apesar de não poder crescer com celulose como sua única fonte de carbono. As *Streptomyces* têm papéis fundamentais na reciclagem natural das paredes celulares globalmente abundantes de fungos e plantas. Algumas delas crescem como hifas ramificadas em filamentos para formar um tapete de micélio do tipo fungo, de onde emergem ramos aéreos que suportam cadeias de esporos. Podem estimular o crescimento das plantas, às vezes produzindo fitormônios. São capazes de viver em associações com diversos artrópodes que se alimentam de biomassa vegetal potencializando a capacidade de degradar completamente a celulose e possuem grande importância na medicina por sua capacidade de produção de antibióticos (CHATER, 2016).

### 3.7.5 IM1-5

O alinhamento da sequência contígua do microrganismo IM1-5 apresentou 94% de identidade com genótipos cadastrados dentre espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Paenibacillus*, conforme Figura 34.

**Figura 34:** Alinhamento da sequência contígua de IM1-5 com genótipos cadastrados no Blast.

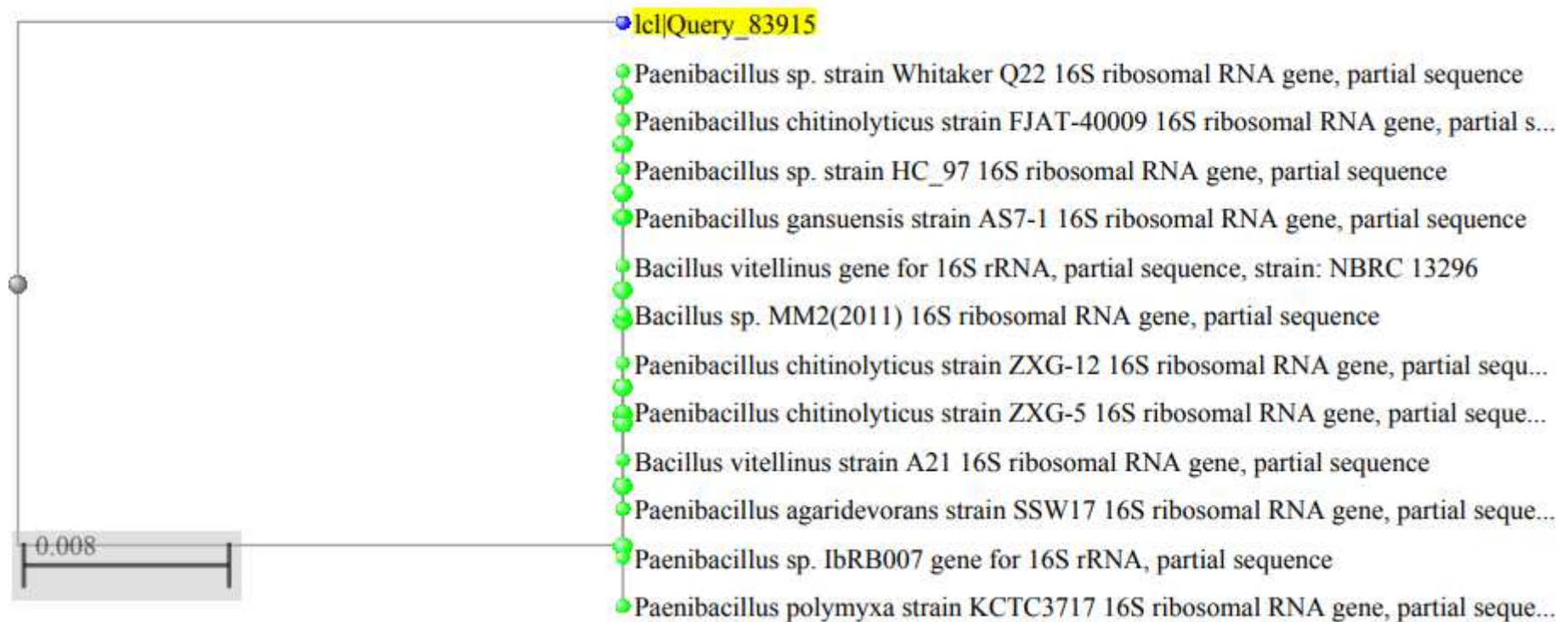
Alignments <span>Download</span> <span>GenBank</span> <span>Graphics</span> <span>Distance tree of results</span>						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. strain Whitaker Q22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">MK111044.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain FJAT-40009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">MG905881.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain FJAT-46002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KY038705.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. strain HC 97 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">MF672583.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain ZYG-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">MF101210.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain ZYG-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">MF101205.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain ZYG-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">MF101204.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus agaridevorans strain SSW17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KU922519.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. strain A1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KU662375.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. 4cultural 164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005773.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain 4cultural 148 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005759.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. 4cultural 141 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005752.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. 4cultural 83 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005698.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. 4cultural 48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005665.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain 4cultural 44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005661.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. 4cultural 43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005660.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. 4cultural 32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005649.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain 4cultural 31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005648.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus chitinolyticus strain 4cultural 20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	909	909	99%	0.0	94%	<a href="#">KT005637.1</a>

**Fonte:** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>



Embora a sequência de nucleotídeos analisada possua 94% de identidade com bactérias do gênero *Paenibacillus* e *Bacillus*, a relação filogenética da sequência de nucleotídeos analisada no Blast agregou IM1-5 fora destes gêneros (Figura 36).

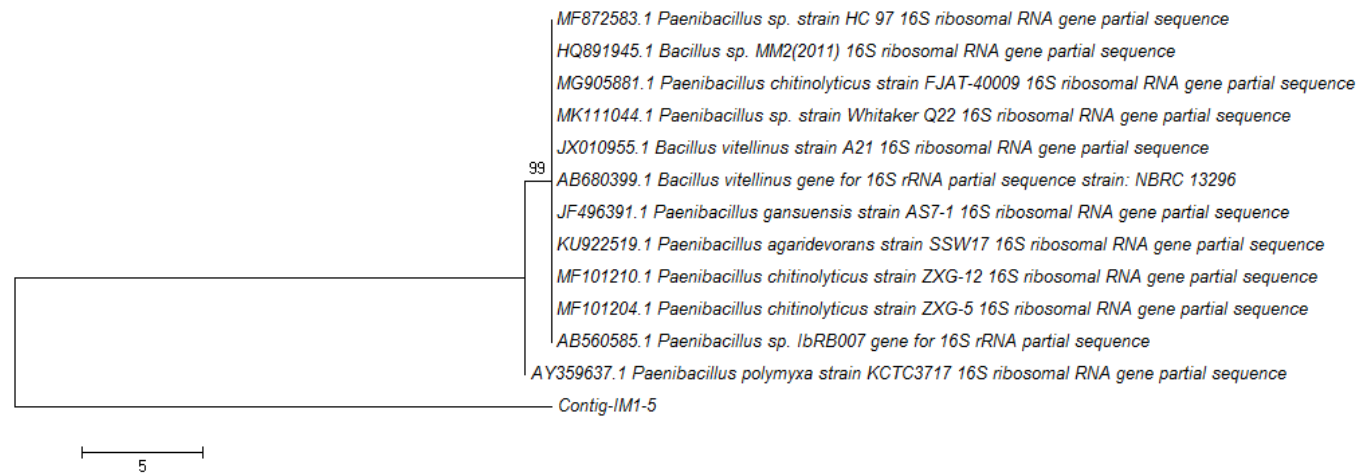
**Figura 36:** Árvore filogenética de IM25-9 confeccionada no Blast.



**Fonte:** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

A árvore filogenética foi construída pelo método de distância, utilizando o algoritmo “Neighbor-Joining”. O software utilizado para a construção das árvores filogenéticas foi o MEGA 6.0. A relação filogenética da sequência de nucleotídeos formou um ramo independente do grupo monofilético constituído pelas espécies pertencentes ao gênero *Paenibacillus* e *Bacillus* (Figura 37), conforme já confirmado pela análise no Blast.

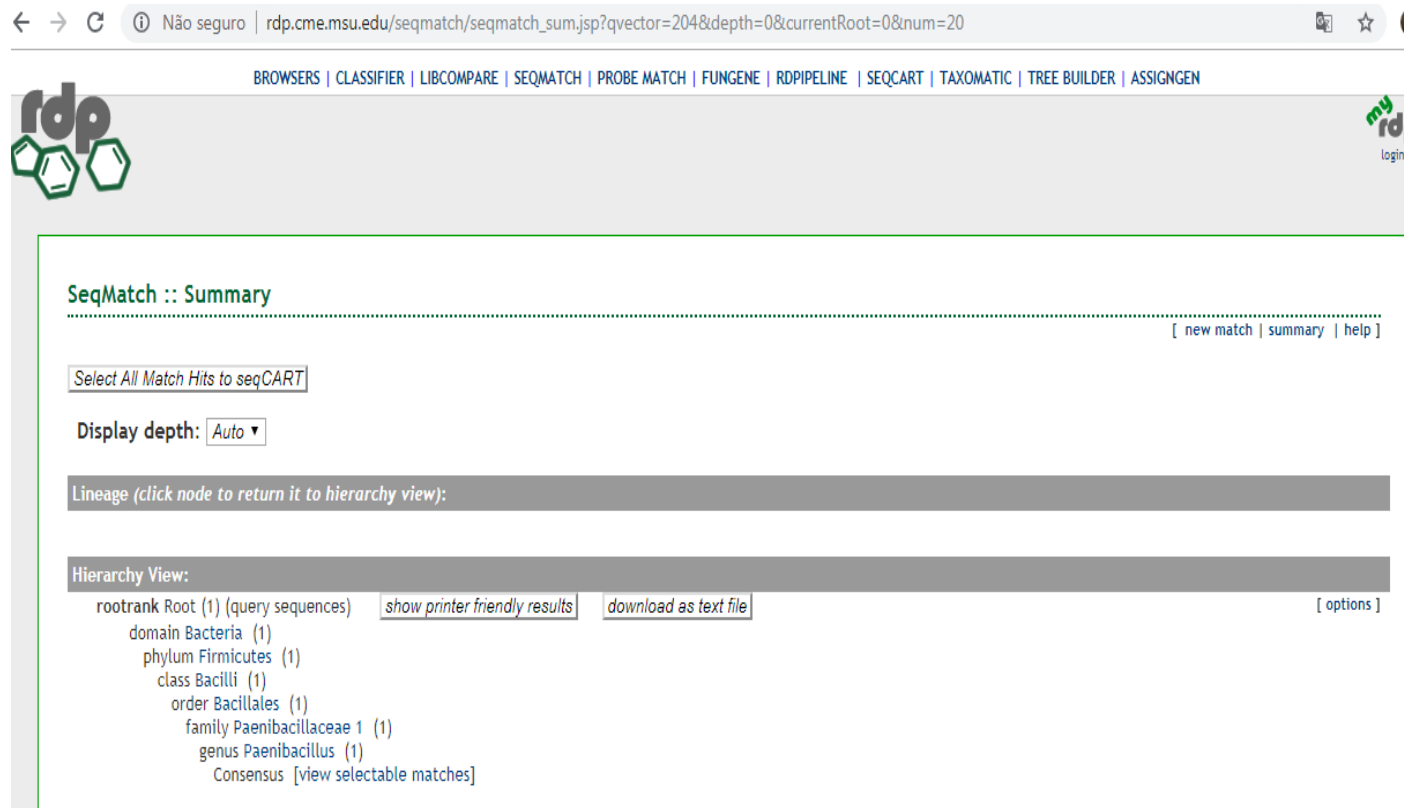
**Figura 37:** Análise Filogenética Molecular de IM1-5 pelo Método da Máxima Verossimilhança.



A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo Kimura de 2 parâmetros [Kimura, 1980]. A árvore com a maior probabilidade de log (-2221.6214) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais o taxa associado agrupado é mostrada ao lado das ramificações. A (s) árvore (s) inicial (is) para a pesquisa heurística foram obtidas aplicando o método Neighbor-Joining a uma matriz de distâncias pares estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL). Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+ G, parâmetro = 15.8891)). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidos no número de substituições por site. A análise envolveu 13 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas. Havia um total de 532 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA6 [Tamura et al, 2013]. **Fonte:** MEGA6

A sequência contígua de IM1-5 foi alinhada no RDP para análise filogenética em comparação com o Blast (Figura 38).

**Figura 38:** Resultado do alinhamento da sequência contígua de IM1-5 com sequências cadastradas no RDP.



The screenshot shows the RDP SeqMatch web interface. The browser address bar displays the URL: [rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_sum.jsp?qvector=204&depth=0&currentRoot=0&num=20](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_sum.jsp?qvector=204&depth=0&currentRoot=0&num=20). The page title is "SeqMatch :: Summary". Below the title, there are navigation links: [ new match | summary | help ]. A button labeled "Select All Match Hits to seqCART" is visible. The "Display depth" is set to "Auto". The "Lineage (click node to return it to hierarchy view):" section is currently empty. The "Hierarchy View:" section shows a taxonomic tree with the following structure:

- rootrank Root (1) (query sequences) [ show printer friendly results ] [ download as text file ] [ options ]
- domain Bacteria (1)
- phylum Firmicutes (1)
- class Bacilli (1)
- order Bacillales (1)
- family Paenibacillaceae 1 (1)
- genus Paenibacillus (1)
- Consensus [ view selectable matches ]

**Fonte:** <https://rdp.cme.msu.edu/>

Dentre as 5 estirpes avaliadas, IM32-90, IM32-91 e IM1-74 pertencem ao filo das Proteobactérias; IM25-9, filo Actinobactérias e IM1-5 ao filo Firmicutes.

O filo Proteobacteria tem a maior composição filogenética, compreendendo 116 famílias de bactérias, com uma grande variedade de morfologia e fisiologia, o que lhes dá uma vantagem competitiva de sobreviver em vários nichos ecológicos. Habitam locais como o solo, plantas, água do mar, água doce, atmosfera e sítios corporais de mamíferos, compreendendo seis classes bacterianas: Alfa, Beta-, Gama, Delta, Epsilon e Zeta proteobactérias (SHIN *et al.*, 2015)

As Actinobactérias são gram positivas, múltiplas ramificações, bactérias não-móveis, não formadoras de esporos e anaeróbicas, que incluem três famílias anaeróbicas principais (*Bifidobacteria*, *Propionibacteria* e *Corynebacteria*) e uma família de aeróbios (*Streptomyces*). Actinobactérias, através das glicosil hidrolases (GHs) hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais açúcares e decompõem amido e polissacarídeos de carboidratos derivados de plantas (BINDA *et al.*, 2018).

Na classificação atual, o filo Firmicutes contém três classes, “Bacilli”, “Clostridia” e “Erysipelotrichia”. A classe Bacilli se é subdividida nas ordens Bacillales e “Lactobacillales. Os membros da família “*Paenibacillaceae*” são distribuídos entre dois grupos filogenéticos: o primeiro grupo composto por *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella* e *Thermobacillus*, que possuem uma origem comum. Algumas das espécies *Bacillus* são encontradas entre as espécies *Paenibacillus*: *Bacillus chitinolyticus*, *edaphicus*, *ehimensis*, e *mucilaginosus*; e o segundo grupo formado pelos gêneros *Aneurinibacillus*, *Ammoniphilus* e *Oxalophagus*. Apesar de não serem claramente monofiléticos, esses dois grupos são frequentemente associados juntos em vários tipos de análises (LUDWIG *et al.*, 2009).

#### 4- CONCLUSÃO

As técnicas de identificação molecular utilizando de ferramentas como o BLASTn, RDP e softwares como o MEGA6 para estudo filogenético de microrganismos se mostraram eficientes neste trabalho.

Os microrganismos identificados foram condizentes com os abordados na literatura quanto à produção de celulases para decomposição da parede celular de compostos orgânicos como plantas em decomposição.

Foi possível identificar uma provável *Xanthobacter flavus* (IM32-90) e outros quatro microrganismos ainda não descritos nas ferramentas BLASTn e RDP, provavelmente



pertencentes às famílias *Methylobacteriaceae* (IM32-91), *Xanthobacteriaceae* (IM1-74), *Streptomycetaceae* (IM25-9) e *Paenibacilaceae* (IM1-5).

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHI, K. Current protocols in molecular biology. Vol I. New York: **Greene Publishing Association**; Wiley- Interscience, 1992.

BINDA, C.; LOPETUSO, L. R.; RIZZATTI, G.; GIBIINO, G.; CENNAMO, V.; GASBARRINI, A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, p. 421–428, 2018.

CHATER, K. F. Recent advances in understanding Streptomyces [version 1; referees: 4 approved]. **F1000Research**, v. 5, n. 2795, p. 1-16. 2016,

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; McGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, 2014. Database issue D633–D642 doi:10.1093/nar/gkt1244.

EL-SAYED, A.; AWAD, W.; ABDOU, N.; VÁSQUEZ, H. C. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 5, p. 89–97, 2017.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

LEE, K-B.; BACKER, P. D.; AONO, T.; LIU, C. T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, T.; KANEKO, T.; YAMADA, M.; TABATA, S.; KUPFER, D. M.; NAJAR, F. Z.; WILEY, G. B.; ROE, B.; BINNEWIES, T. T.; USSERY, D. W.; D'AEZE, W.; HERDER, J. D.; GEVERS, D.; VEREECKE, D.; HOLSTERS, M.; OYAIZU, H. The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **BMC Genomics**, v. 9, p.271, 2008

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H.; WHITMAN, W. B. Revised road map to the phylum Firmicutes. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 2009.

MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops & Products**, v. 122, p. 66–75, 2018.

MOHAPATRA, S.; PADHY, S.; DAS MOHAPATRA, P. K.; THATOI, H. N. Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, Pennisetum species through cellulase from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*, **Bioresource Technology**, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.023>.

PASSOS, D. F.; PEREIRA JR., N.; DE CASTRO A. M. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60–66, 2018.

RAMOS, C. G.; GRILO, A. M.; SOUSA, S. A.; BARBOSA, M. L.; NADAIS, H.; LEITÃO, J. G. A new methodology combining PCR, cloning, and sequencing of clones discriminated by RFLP for the study of microbial populations: application to an UASB reactor sample. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 801–806, 2010. DOI 10.1007/s00253-009-2268-1.

REDING, H. K.; CROES, G. L. M.; DIJKHUIZEN, L.; WIEGEL, J. Emendation of *Xanthobacter flavus* as a Motile SPecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 309-311, 1992.

SAMANTA, R; PAL, D.; SEN, S. P. Production of Hydrolases by Nrfixing Microorganisms. **Biochem. Physiol**, v. 185, p. 75-81, 1989.

SHIN, N-R.; WHON, T. W.; BAE, J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**. v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

SILVA, M. C. P. **Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum sp*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Usp. Piracicaba-SP. 2008.

SREENA, C. P.; SEBASTIAN. D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs *Bacillus subtilis*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.12.005>.

TAMURA K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; AND KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

WIEGEL, J. K. W. Xanthobacter. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 1–22, 2015.

## **CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO DE CELULASES PELA BACTÉRIA IM32-91 ISOLADA SOB PLANTAÇÕES DE EUCALIPTO NO CERRADO MINEIRO UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS**

### **1. INTRODUÇÃO**

O esgotamento das fontes de combustíveis fósseis agravado pela preocupação com a segurança energética futura, a necessidade de redução das emissões de gases de efeito estufa para mitigar as mudanças climáticas, o alívio da pobreza através do aumento da atividade econômica, geração de renda e diversificação de investimentos em sistemas de produção agrícola tem potencializado o interesse em produzir combustíveis sustentáveis a partir da biomassa renovável. Dentre os combustíveis renováveis, o bioetanol assume a liderança do mercado, sendo gerado a partir da cana-de-açúcar ou do amido do milho. Este biocombustível pode ser gerado pela fermentação sustentável a partir de plantas e resíduos por microorganismos, oferecendo uma alternativa atrativa e renovável (RENZAHO *et al.*, 2017; TOOGOOD e SCRUTTON, 2018).

A biomassa lignocelulósica tem sido utilizada como um recurso alternativo e sustentável para a produção de biocombustíveis. Materiais de biomassa lignocelulósica existentes na natureza como palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, farinha de milho, resíduos florestais (madeira e casca) são produzidos e descartados como resíduos após a época de colheita. Estes resíduos agrícolas tem potencial para produção de biocombustíveis, tornando interessante promover o uso da biomassa lignocelulósica na produção. Para que a biomassa seja utilizada, é necessário um pré-tratamento antes da hidrólise enzimática, com intuito de promover a desestruturação da parede celular, permitindo o acesso das enzimas hidrolíticas á celulose, gerando açúcares monoméricos fermentescíveis. Este é considerado um fator essencial á viabilidade econômica de produção do bioetanol (TANTAYOTAI *et al.*, 2017, PATEL *et al.*, 2017).

Celulases são enzimas importantes utilizadas na produção de bioenergia a partir da biomassa lignocelulósica, desempenhando também um papel importante no aumento do rendimento de sucos de frutas, filtração de cerveja, extração de óleo, produtos de padaria e alimentos para animais. Dentre as celulases, a endoglucanase é um tipo geralmente envolvido nos estágios iniciais de degradação de celulose, atuando sinergicamente com exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase durante a solubilização da celulose. Produzida por várias cepas de fungos e bactérias, a endoglucanase é principalmente responsável por hidrolisar a ligação glicosídica

interna para diminuir o comprimento das cadeias de celulose, disponibilizando os produtos da hidrólise como fontes de carbono no ambiente, um passo essencial do bioprocessamento de materiais lignocelulósicos vegetais em açúcares (GUAN *et al.*, 2017; BEHERA *et al.*, 2017).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de enzimas celulolíticas pelo micro-organismo IM32-91 isolado sob plantações de eucalipto no cerrado mineiro. Foram utilizados diferentes substratos, incluindo celulose microcristalina comercial, carboximetilcelulose e pó da casca de eucalipto pré-tratado por moagem. Também foram avaliadas diferentes condições para a produção de celulase por IM32-91.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismo

A bactéria IM32-91 foi selecionada do banco de micro-organismos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal - UFVJM por seu potencial produtor de celulases previamente estudado.

### 2.2 Fermentação submersa

Para preparo do inóculo, a bactéria IM32-91 foi cultivada em tubo Falcon<sup>®</sup> de 15 mL contendo 10 mL de meio líquido seletivo (carboximetilcelulose (CMC) 10 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 g/L, NaCl 0,1 g/L, extrato de levedura 0,4 g/L, pH 6,0) a 30°C por 96 horas. Em seguida, foram realizadas fermentações utilizando os substratos comerciais carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (CM), ambos da marca Synth<sup>®</sup>, e casca de eucalipto (CE) pré-tratada por moagem em moinho de facas como principal fonte de carbono. Os meios de cultura tiveram em sua composição, em g.L<sup>-1</sup>: fontes de carbono relacionadas acima, 20; extrato de levedura, 0,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,15; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01; e KCl, 0,5; e o pH foi ajustado para 6,0 (Peixoto, 2006; modificado). Cada inóculo foi vertido em Erlenmeyer de 500 mL contendo 190 mL do meio de cultura (contendo as diferentes fontes de carbono) para início da fermentação (Figura 39).

**Figura 39:** Meios de cultura contendo os três substratos diferentes como principal fonte de carbono: Celulose Microcristalina (CM), Casca de Eucalipto em pó (CE) e Carboximetilcelulose (CMC).



Fonte: Autor.

As fermentações ocorreram em SHAKER a 150 rpm, 28°C por 168 horas. As amostras foram retiradas a cada 24 horas e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C e 10.000 rpm. O sobrenadante contendo o extrato enzimático bruto foi coletado e submetido a análises de atividades enzimáticas.

## 2.3 Atividade enzimática

### 2.3.1 Avaliação da produção de endoglucanase (CMCase)

A análise da atividade de endo-1,4-p-glucanase foi realizada de acordo com o método descrito por Ghose (1987). Este método consiste na hidrólise de uma solução de 1% de CMC (Synth), seguida da quantificação da redução solúvel. A concentração de açúcares redutores foi determinada de acordo com o método descrito por Miller (1959) utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A reação foi realizada em tubo Eppendorff contendo 1000  $\mu\text{L}$  de solução CMC a 1% (p / v) em tampão acetato 100  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 4,8 e 1000  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e incubada a 50 ° C. Foram retiradas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  a intervalos de 0, 15 e 30 minutos e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de DNS. Foi preparada uma reação sem a presença do extrato enzimático (referência) pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de DNS a 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. As amostras e a referência foram aquecidos em banho-maria em ebulição ( $95 \pm 1$  ° C) durante 5 minutos, seguido de resfriamento em banho gelado ( $0 \pm 1$  ° C) e adição de 2 mL e 1 mL de água destilada para a amostra e a referência, respectivamente. A absorvância foi medida a 540 nm utilizando uma curva analítica de glicose em concentrações de 0 a 1,6  $\text{mg.mL}^{-1}$  em intervalos de 0,2  $\text{mg.mL}^{-1}$  como referência (vide Figura 5). Uma unidade de endoglucanase foi determinada como a quantidade de enzima capaz de libertar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores,

expressos como glicose, por minuto por unidade de volume de extrato enzimático. Os dados foram submetidos à análise de variância considerando um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05.

### **2.3.2 Avaliação da atividade de $\beta$ -glicosidase (Celobiase)**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi quantificada segundo método descrito por Ghose (1987) a qual consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de celobiose a 1% em tampão citrato  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  e pH 4,8, na presença do extrato enzimático. O meio reacional foi composto por  $100 \mu\text{L}$  da solução de substrato e  $100 \mu\text{L}$  do extrato enzimático acondicionados em tubos tipo Eppendorf incubados em banho-maria a  $50^\circ\text{C}$  por 30 minutos, seguido de banho fervente ( $95 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 1 min e resfriamento em banho de gelo. Alíquotas de  $15 \mu\text{L}$  foram retiradas para quantificação do teor de glicose, utilizando procedimento padrão enzimático Glicose-oxidase/Peroxidase - GOD-POD (LLOYD, 1969) com leitura espectrofotométrica a 510 nm. Para cada reação enzimática foi preparada uma sem a presença do extrato enzimático (branco), seguindo o mesmo procedimento acima descrito para a amostra.

A unidade de atividade  $\beta$ -glicosidase foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar  $1 \mu\text{mol}$  de glicose por minuto de reação, por volume de extrato enzimático. Os dados foram submetidos à análise de variância considerando um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05 utilizando o software ORIGIN PRO 8.

### **2.4. Otimização do processo de produção de celulase**

Para otimizar o processo de produção de celulase, fermentações foram feitas com alterações nas variáveis pH, temperatura. O meio de cultura possuiu a mesma composição do meio utilizado para produção de celulasas descrito anteriormente. Os cultivos, amostragens e análises enzimáticas foram realizados conforme descrito anteriormente. Foram realizados cinco experimentos com as variáveis temperatura  $30^\circ\text{C}$  em pH = 5,0 e 5,5 e temperatura  $28^\circ\text{C}$  em pH = 5,0; 6,0 e 7,0.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Produção de endoglucanase e $\beta$ -glicosidase utilizando diferentes fontes de carbono**

Foram avaliadas três fontes de carbono para produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase: carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina e pó da casca de eucalipto pré-tratada apenas por moagem. Dentre estas, o CMC promoveu a maior produção de endoglucanase (CMCase) e  $\beta$ -glicosidase, como é possível observar nas figuras 40A a D.



**Figura 40:** Avaliação da produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase utilizando CMC, celulose microcristalina e casca de eucalipto em pó como principais fontes de carbono.





A: Atividade de endoglucanase em U.mL<sup>-1</sup>; B: Atividade de endoglucanase por grama de substrato (U.g<sup>-1</sup>); C: Atividade de β-glicosidase em U.mL<sup>-1</sup>; Atividade de β-glicosidase por grama de substrato (U.g<sup>-1</sup>).

**Fonte:** Autor

De acordo com a Figura 40 (A e B), é possível observar que a atividade de endoglucanase foi significativamente maior no cultivo em que foi utilizado CMC como principal fonte de carbono, apresentando valor de 0,250 U.mL<sup>-1</sup> em 144 horas de cultivo, o que corresponde a 12,489 U.g<sup>-1</sup> (unidades por grama de substrato utilizado). A análise de variância a nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05 demonstrou que a produção de endoglucanase utilizando CMC apresentou diferença significativa quando comparado aos outros dois substratos (Tabela 10).

**Tabela 10:** Análise de variância ANOVA da produção de endoglucanase.

One Way ANOVA  
Overall ANOVA

	DF	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F Value	Prob>F
Model	2	0.09593	0.04796	939.87603	3.22107E-8
Error	6	3.06198E-4	5.1033E-5		
Total	8	0.09624			

Hipótese Nula: A significância de todos os níveis são iguais.

Hipótese Alternativa: A significância de um ou mais níveis são diferentes.

**Em nível de significância de 0.05, as médias das populações foram significativamente diferentes.**

Foi possível observar na Figura 40 (C e D) que a atividade de  $\beta$ -glicosidase foi também significativamente maior no cultivo em que foi utilizado CMC como principal fonte de carbono, apresentando valor de  $0,016 \text{ U.mL}^{-1}$  em 96 horas de cultivo, o que corresponde a  $0,804 \text{ U.g}^{-1}$  (unidades por grama de substrato utilizado). A análise de variância a nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05 demonstrou que a produção de  $\beta$ -glicosidase utilizando CMC apresentou diferença significativa quando comparado aos outros dois substratos (Tabela 11).

**Tabela 11:** Análise de variância ANOVA da produção de  $\beta$ -glicosidase.

One Way ANOVA  
Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean square	F Value	Prob>F
Model	2	6.28451E-5	3.14225E-5	8.68571	0.01692
Error	6	2.17064E-5	3.61773E-6		
Total	8	8.45514E-5			

Hipótese Nula: A significância de todos os níveis são iguais.

Hipótese Alternativa: A significância de um ou mais níveis são diferentes.

**Em nível de significância de 0.05, as médias das populações foram significativamente diferentes.**

De Marco (2012) avaliou a produção de celulase por *Bacillus sp.* com CMC, celulose microcristalina (MCC), casca de arroz e palha de trigo e observou que todos os substratos induziram a produção de endoglucanases (CMCase), porém o CMC foi o melhor indutor na produção enzimática, comparado com os demais. Obteve pico de  $0,12 \text{ UI.mL}^{-1}$  (CMC),  $0,06 \text{ UI.mL}^{-1}$  com casca de arroz e palha de trigo, e  $0,04 \text{ UI.mL}^{-1}$  com Celulose Microcristalina.

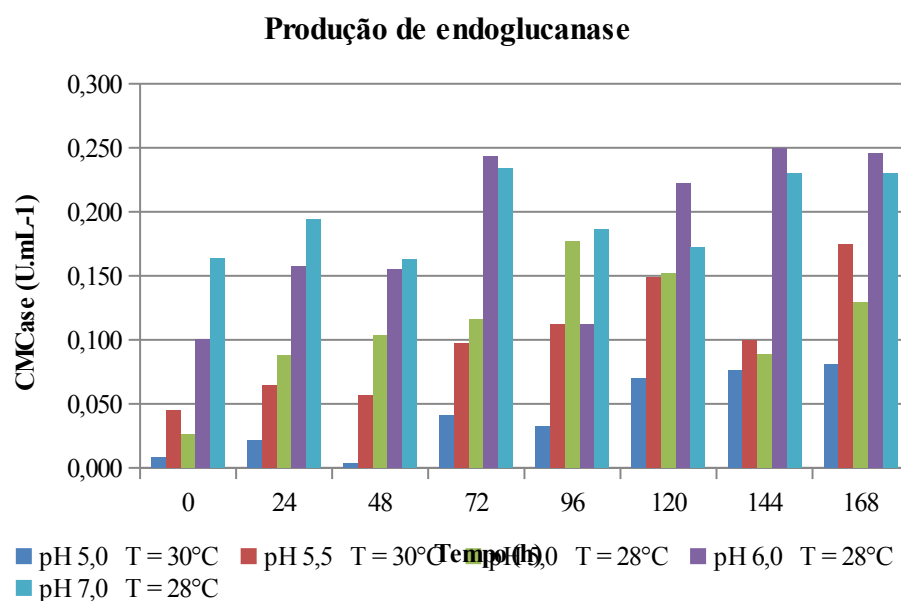
Várias pesquisas utilizando diferentes tipos de biomassa lignocelulósica tem sido desenvolvidas para produção de enzimas celulolíticas. Xu *et al* (2018) utilizaram resíduos como farelo de trigo, palha de trigo, palha de arroz, casca de amendoim, bagaço de cana-de-açúcar e casca de mandioca para produzir coquetéis enzimáticos celulolíticos. Hu *et al* (2018) produziram celulases a partir de algodão presente em resíduos têxteis.

A carboximetilcelulose é uma molécula solúvel, ao contrário dos demais substratos, o que favorece a sua biodegradação e, conseqüentemente, aumenta o crescimento bacteriano e a produção enzimática. É relatado como melhor fonte de carbono para produção de celulasas quando comparada com a celulose (SREENA & SEBASTIAN, 2018). A atividade observada nos substratos celulose microcristalina e casca de eucalipto em pó podem estar relacionadas a dois motivos: à estrutura altamente cristalina da celulose, que dificulta o acesso aos sítios ativos pelas enzimas, ou à presença de lignina que dificulta a hidrólise do pó da casca. A atividade enzimática utilizando a casca de eucalipto em pó possivelmente poderia ser maximizada pela utilização de outros tipos de pré-tratamento além da moagem.

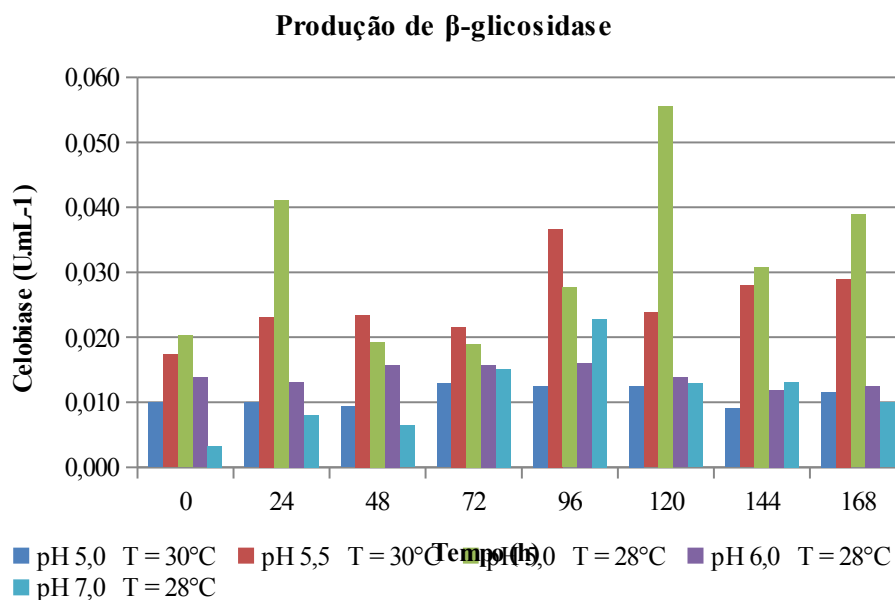
Apesar de ter apresentado um melhor desempenho entre os substratos avaliados neste trabalho, a adição de CMC ao meio de cultura aumenta consideravelmente a viscosidade do meio. Hu *et al* (2018) relataram que este aumento da viscosidade possivelmente inibe as condições aeróbicas do meio e o crescimento do microrganismo.

### **3.2. Otimização do processo de produção de celulasas**

Para tentar aperfeiçoar o processo de produção das enzimas endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, o meio de cultura utilizado foi preparado utilizando CMC como principal fonte de carbono, pois no estudo anterior ficou confirmada sua superioridade em relação aos outros substratos (CM e CE). Os resultados desta avaliação estão dispostos nas Figuras 41 e 42.

**Figura 41:** Produção de endoglucanase em diferentes condições de pH e temperatura.

Fonte: Autor

**Figura 42:** Produção de  $\beta$ -glicosidase em diferentes condições de pH e temperatura.

Fonte: Autor

Analisando a Figura 41, foi possível notar que o maior desempenho de IM32-91 para produção de endoglucanase ocorreu em pH 6,0 temperatura 28°C, com pico máximo de produção em 144 horas de cultivo (0,250 U.mL<sup>-1</sup>), seguido por pH 7,0 temperatura 28°C em 72 horas de cultivo (0,234). Neste caso, similaridade destes resultados revela uma questão

importante quando se trata de produção a nível industrial em se tratando de custos, pois seria interessante encerrar a produção de endoglucanase em 72 horas.

Com relação à produção de  $\beta$ -glicosidase, conforme a Figura 42, o ponto de maior produção ocorreu em pH 5,0 temperatura 28°C após 120 horas de cultivo (0,056 U.mL<sup>-1</sup>), seguido de pH 5,5 temperatura 30°C) em 96 horas.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 12 confirmam a importância de analisar os parâmetros pH e temperatura em conjunto, visto que a interação entre as duas variáveis têm influência direta (DE OLIVEIRA, 2014).

**Tabela 12:** Picos de produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase nas diferentes condições de pH e temperatura avaliados.

Ensaio		Endoglucanase máx. (U.mL <sup>-1</sup> )	$\beta$ -glicosidase máx. (U.mL <sup>-1</sup> )
1	pH 5,0 Temp. 30°C	0,081	0,013
2	pH 5,5 Temp. 30°C	0,174	0,037
3	pH 5,0 Temp. 28°C	0,177	0,056
4	pH 6,0 Temp. 28°C	0,250	0,016
5	pH 7,0 Temp. 28°C	0,234	0,023

Segundo Raghuwanshi *et al.* (2014), o pH inicial é o principal fator do processo de produção de enzimas celulolíticas, podendo ser determinante no desempenho do processo de produção. Mudanças no pH podem alterar a estrutura da enzima ou formar estruturas mais ativas, ou até mesmo provocar uma inativação completa. Essas alterações podem causar diminuição seguida de aumento na atividade enzimática devido à alteração da estrutura terciária, requerendo um tempo para se estabilizar (NELSON e COX, 2011). Além disso, alterações no pH provocam mudanças na carga da membrana celular, afetando a permeabilidade da membrana e consequentemente a liberação das enzimas para o espaço extracelular (CHEN e LIANG, 2015).

Foi possível observar nos ensaios 1 e 2 a influência direta do pH. Ao variar o pH inicial, na mesma temperatura, houve um aumento considerável na atividade de endoglucanase após 72 horas (Figura 41). Estes resultados permitem inferir que em processos fermentativos cada variável avaliada pode influenciar no efeito de outras variáveis, apresentando um ponto ótimo para o processo.

Apesar da variação das quantidades de enzimas, foi possível observar que a bactéria IM32-91, pertencente à família *Methylobacteriaceae*, como descrito no capítulo anterior, foi capaz de produzir enzimas celulolíticas nas condições de pH e temperatura



avaliadas. Dentre as variáveis testadas, o pH ótimo para produção de endoglucanase foi pH 6,0 (0,250 U.mL<sup>-1</sup>), e para β-glicosidase pH 5,0 (0,056 U.mL<sup>-1</sup>) (Tabela 12).

A influência da temperatura nas enzimas envolve a energia cinética das moléculas componentes do sistema, de modo que temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, alterando as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional (BORZANI *et al.*, 2001). A tolerância de celulasas a altas temperaturas não é uma característica comum. Vários estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a estabilidade a alterações de temperatura de produção e de atividades de enzimas celulolíticas pela vasta gama de microrganismos da microbiota, uma vez que é interessante para a indústria a utilização de moléculas resistentes a variações de temperatura.

A temperatura ideal para a produção de endoglucanase por IM32-91 avaliada neste trabalho foi 28°C (Tabela 12). Analisando os ensaios 1 e 3, onde manteve-se o pH 5,0 e variou-se a temperatura de 30°C para 28°C, foi possível observar que a quantidade de endoglucanase produzida passou de 0,081 U.mL<sup>-1</sup> (30°C) para 0,177 (28°C). Pode-se inferir deste resultado que a temperatura de crescimento e produção de enzimas ideal para o microrganismo IM32-91 (de acordo com os ensaios realizados) é de 28°C.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização do carboximetilcelulose como principal fonte de carbono em meio de cultura para produção das enzimas celulolíticas analisadas se mostrou significativamente mais eficiente em relação à celulose microcristalina e casca de eucalipto em pó pré-tratada por moagem. A casca de eucalipto em pó utilizada apenas com moagem como pré-tratamento não apresentou desempenho satisfatório na produção de enzimas celulolíticas.

Dentre os parâmetros avaliados neste estudo, as atividades enzimáticas de endoglucanase tiveram como ótimo o pH 6,0 e temperatura 28°C, e para β-glicosidase pH 5,0 e temperatura 28°C.

Futuros estudos com outras faixas de temperatura e pH são necessários para melhoria do processo de produção destas enzimas por IM32-91.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H.N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 197–210, 2017.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, 2001.

CHEN, L.; LIANG, J. F. The potential roles of cell surface pHs in bioactive peptide activation. **Chem. Biol. Drug Des**, v. 85, n. 2, p. 208–215, 2015.

DE MARCO, E. G. **Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de Bacillus sp.** 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – RS.

DE OLIVEIRA, S. L. R. **Otimização da produção de celulases de *Melanoporia sp.* por fermentação submersa.** 2014. 111f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará – CE.

GUAN, X.; CHEN, P.; XU, Q.; QIAN, L.; HUANG, J.; LIN, B. Expression, purification and molecular characterization of a novel endoglucanase protein from *Bacillus subtilis* SB13. **Protein Expression and Purification**, v. 134, p. 125-131, 2017.

HU, Y.; DU, C.; PENSUPA, N.; LIN, C. S. K. **Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design.** *Process Safety and Environmental Protection* 118 (2018) 133–142.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger **Principles of Biochemistry**, 5nd, Artmed, 1273p, 2011.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática da biomassa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PATEL, H.; CHAPLA, D.; SHAH, A. Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. *Renewable Energy*, v. 109, p. 323-331, 2017.

PEIXOTO, A. B., 2006. **Study of the production of enzymes and gums by wild yeasts collected in various regions of Brazil**. Tese. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil, pp. 84.

RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel*, v. 124, p. 183–189, 2014.

RENZHO, A. M. N.; KAMARA, J. K.; TOOLE, M. Biofuel production and its impact on food security in low and middle income countries: Implications for the post-2015 sustainable development goals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 78, p. 503–516, 2017.

SREENA, C. P; SEBASTIAN D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs *Bacillus subtilis*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.12.005>

TANTAYOTAI, P.; PORNWONGTHONG, P.; MUENMUANG, C.; PHUSANTISAMPAN, T.; SRIARIYANUM, M. Effect of cellulase-producing microbial consortium on biogas production from lignocellulosic biomass. *Energy Procedia*, v. 141, p. 180-183, 2017.

TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. Retooling microorganisms for the fermentative production of alcohols. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 50, p. 1–10, 2018.

XU, X.; LIN, M; ZANG, Q; SHI, S. Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 88–95, 2018.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES FINAIS

O estudo realizado permitiu concluir que:

1- Os cinco microrganismos avaliados (IM32-90, IM32-91, IM1-74, IM25-9 e IM1-5) foram capazes de produzir enzimas celulolíticas em meio de cultura contendo CMC como principal fonte de carbono, podendo ser utilizadas em outros trabalhos de produção de enzimas.

2- O microrganismo IM32-91 se destacou das demais avaliadas quanto à produção de enzimas celulolíticas, sendo identificada como pertencente à família *Methylobacteriaceae*.

3- O processo de identificação de sequências codificadoras da região 16S de RNAr utilizando ferramentas como PCR, BLASTn, RDP e softwares como o MEGA6 se mostraram eficientes na identificação de uma provável *Xanthobacter flavus* (IM32-90) e famílias como *Methylobacteriaceae*, *Streptomicetaceae* e *Paenibacilaceae*.

4- O CMC é capaz de induzir atividades enzimáticas significativamente superiores quando comparado à utilização de Celulose Microcristalina e Casca de Eucalipto em pó para produção de enzimas celulolíticas pela bactéria IM32-91 da família das *Methylobacteriaceae*.

5- Nas condições que foram avaliadas, a bactéria IM32-91 foi eficiente na produção de enzimas celulolíticas em meio de cultura líquido contendo CMC como fonte de carbono em temperatura 28°C e pH 6,0, condições que podem ser utilizadas em trabalhos posteriores.

6- Trabalhos futuros podem ser desenvolvidos visando avaliar a temperatura ideal para atividade enzimática destas celulases produzidas pelas bactérias avaliadas neste estudo, como avaliação de estabilidade da enzima a diferentes temperaturas de armazenamento, análises de cristalografia destas enzimas, purificação da enzima, sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas e estudos de outras faixas de temperatura e pH que não foram avaliados neste trabalho.