

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPLEXO CELULÁSICO POR
DIFERENTES ISOLADOS BACTERIANOS UTILIZANDO BAGAÇO
DE CANA COMO SUBSTRATO INDUTOR**

Luiz Alfredo de Souza Verniz

São Carlos, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPLEXO CELULÁSICO POR
DIFERENTES ISOLADOS BACTERIANOS UTILIZANDO BAGAÇO
DE CANA COMO SUBSTRATO INDUTOR**

Luiz Alfredo de Souza Verniz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Orientador: Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

Agência financiadora: CAPES

São Carlos
Agosto, 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

V538ap

Verniz, Luiz Alfredo de Souza.

Avaliação da produção de complexo celulásico por diferentes isolados bacterianos utilizando bagaço de cana como substrato indutor / Luiz Alfredo de Souza Verniz. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
50 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Bagaço de cana. 3. Farelo de soja. 4. CMCase. 5. Bactérias lignocelulolíticas. I. Título.

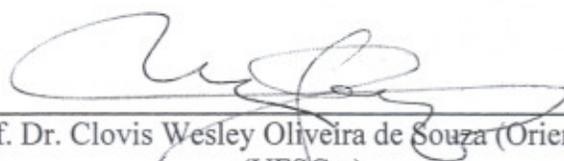
CDD: 660.6 (20ª)

Luiz Alfredo de Souza Verniz

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/08/2011

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza (Orientador)
(UFSCar)



Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira
(UFSCar)



Prof. Dr. Alfredo Colenci Junior
(CEETEPS)

Dedico essa dissertação a Deus, minha
família e amigos e a todas as pessoas
que fazem parte de minha vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Dr. Clovis Wesley e Julio Zukerman pela orientação e por acreditarem e confiarem em mim para desenvolver essa pesquisa. Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram durante esse tempo, de uma maneira especial, às técnicas do laboratório Ivete e Zélia, bem como todos os amigos e amigas que passaram e permanecem lá, em especial agradeço à Lygia pela ajuda e o incentivo na pesquisa.

Ao professor Dr. Kleber Thiago de Oliveira do Departamento de Química da UFSCar que gentilmente nos cedeu alguns reagentes necessários para a pesquisa, e à Professora Dra. Cristiane Sanchez Farinas da EMBRAPA que gentilmente nos cedeu o substrato bagaço de cana.

De uma maneira muito especial, agradeço a Deus por essa oportunidade única em minha vida, bem como a toda a minha família, sobretudo à minha mãe, Dona Maria da Conceição, que desde minha infância me apoiou e incentivou em todas as minhas iniciativas. Agradeço também a minha namorada Gisele Xavier Marques que de uma maneira muito especial, nos momentos em que mais precisei, estava sempre pronta a me ajudar, incentivar e animar.

Manifesto minha gratidão ao programa de Pós-Graduação em biotecnologia, à agencia financiadora CAPES, pelo apoio financeiro durante a pesquisa e por todos os amigos e amigas, o povo do Hesed, do GPP “um grande abraço” e a minha mais sincera gratidão.

RESUMO

A busca por novas fontes de combustíveis tem feito com que diferentes estudos surgissem com o objetivo de produzir etanol de segunda geração, conhecido como etanol 2G. Os custos para se produzir esse combustível ainda são elevados, uma vez que o bagaço de cana não é mais considerado um resíduo, mas sim um subproduto que gera renda para a usina que o detém, seja na forma de energia (vapor) ou na venda de energia elétrica. Para se conseguir utilizar o bagaço de cana a fim de produzir etanol 2G é necessário uma grande quantidade de enzimas lignocelulolíticas. Visando a redução do custo de produção dessas enzimas para que o processo de produção do etanol 2G se torne viável, o presente trabalho tem o objetivo de estudar diferentes isolados bacterianos lignocelulolíticos de larvas de *Stenochironomus*, pretendendo avaliar seu rendimento na produção dessas enzimas. Para se realizar essa avaliação, fermentações submersas foram realizadas utilizando o bagaço de cana e farelo de soja como substrato indutor e diferentes concentrações de meios de cultivo. Um total de 11 isolados foram avaliados inicialmente e selecionados a cada nova etapa. A partir dos resultados dos ensaios enzimáticos, que foi realizado através da quantificação de açúcares redutores, foi demonstrado que as bactérias *Sphingobium* e *Pseudomonas* se destacaram na produção dessas enzimas em relação às demais bactérias inicialmente testadas. Os resultados deste trabalho evidenciou que essas bactérias foram fortemente influenciadas pela adição de diferentes fontes de nitrogênio orgânico em seu meio de cultivo para as fermentações, o que gerou uma maior atividade enzimática obtendo índices de 4,36 U/mg de proteína para Xilanase, 0,12 U/mg de proteína para FPase e 2,31 U/mg de proteína para CMCase, a partir da introdução desses componentes aos meios.

Palavras chave: Bagaço de cana, Farelo de soja, CMCCase, FPase e Xilanase, isolados bacterianos, bactérias lignocelulolíticas.

ABSTRACT

The searching for new fuel sources has motivated new studies which aim to produce the second-generation of ethanol, also called “2G”. However, the costs to produce that fuel are still high because the sugarcane bagasse is not considered a residue any more, but a subproduct that can generate income to the industries that produce it, being a vapor energy form to the company or an electricity source to sell. The use of the sugar cane bagasse to produce 2G ethanol requires a significant amount of lignocellulolytic enzymes. The main aim of this study is to reduce the cost of the production of these enzymes by means of studying isolated lignocellulolytic bacterium from *Stenochironomus* larva. The goal is to evaluate its productivity in several submersed fermentation processes and surface fermentations. Submersed fermentations were conducted using sugar cane bagasse and soy meal as substrates and different concentrations were applied in culture media. A total of 11 isolated enzymes were evaluated initially, and re-selected at each new stage of the process. The enzyme cultures were conducted by the reduction sugars quantification and the results enabled us to demonstrate that the bacteria *Sphingobium* and *Pseudomonas* were the most productive when compared to the others. Our results have highlighted that those bacteria were strongly influenced by the addition of different organic nitrogen sources in the fermentation culture. From the introduction of those components, the enzyme activity became higher and this fact was corroborated by the index of 4.36 U/mg protein for Xylanase, 0.12 U/mg protein for FPase and 2.31 U/mg protein for CMCase

Keywords: sugarcane bagasse, soy meal, CMCase and Xylanase, bacterial isolate, lignocellulolytic bacteria

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	X
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 O SETOR SUCROALCOOLEIRO	4
3.2 ETANOL: FONTE DE ENERGIA RENOVÁVEL	5
3.3 MATERIAIS E RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	8
3.4 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS	12
3.4.1 <i>Celulose</i>	12
3.4.2 <i>Hemiceluloses</i>	13
3.4.3 <i>Lignina</i>	14
3.5 PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS	15
3.5.1 <i>Fermentação em estado submerso (FS)</i>	15
3.6 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS	16
3.6.1 <i>Xilanases</i>	16
3.6.2 <i>Celulases</i>	17
3.7 APLICAÇÕES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO	20
4.2 PREPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	21
4.2.1 <i>Microrganismos utilizados</i>	21
4.2.2 <i>Inóculo</i>	21
4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA	22
4.4 PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	24
4.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	25
4.5.2 <i>Atividade da celulase total através da FPase</i>	26
4.5.3 <i>Atividade enzimática da Xilanase</i>	27
4.6.4 <i>Atividade enzimática da CMCase</i>	27
5 RESULTADOS	28
5.1 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS	28
5.2 RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA	30
5.2.1 <i>Quantificação de endoglucanase, exoglucanase e βglicosidase por FPase</i>	30
5.2.1 <i>Quantificação de CMCase</i>	31
5.2.3 <i>Quantificação de Xilanase</i>	32
5.3 RESULTADOS DA TERCEIRA ETAPA	33
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9 ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3. 1: Composição dos diferentes resíduos agroindustriais.....	10
Tabela 4. 1: Lista de bactérias inicialmente utilizadas isoladas por Koroiva (2011) e seus respectivos substratos de degradação.	21
Tabela 4. 2: Composição 1 do meio de BERG, pH 7,0.....	23
Tabela 4. 3: Composição 2 do meio de BERG, pH 7,0.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3. 1: Diferentes métodos de produção de etanol	6
Figura 3. 2: Consumo comparativo entre Etanol e Gasolina no Brasil, 2000-2009.....	7
Figura 3. 3: Geração de resíduos lignocelulósicos ao longo dos anos	9
Figura 3. 4: Esquema da estrutura da parede celular secundária vegetal	11
Figura 3. 5: Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidade de celobiose	12
Figura 3. 6: Diferentes unidades monossacarídicas das hemiceluloses.....	13
Figura 3. 7: Precursores estruturais e resíduos polimerizados da lignina.....	14
Figura 5. 1: Atividade da CMCase produzidas pelas bactérias testadas utilizando o meio de Berg.....	28
Figura 5. 2: Atividade da CMCase produzidas pelas bactéria <i>Sphingobium</i> e meio de Berg	29
Figura 5. 3: Atividade da CMCase produzidas pelas bactéria <i>Bacillus</i> e meio de Berg	29
Figura 5. 4: Atividade da CMCase produzidas por outras bactérias e meio de Berg.....	30
Figura 5. 5: Avaliação da atividade da FPase	31
Figura 5. 6: Avaliação da atividade da CMCase	32
Figura 5. 7: Avaliação da atividade da Xilanase	33
Figura 5. 8: Avaliação da atividade da Xilanase para a terceira etapa utilizando dois padrões.....	34
Figura 5. 9: Avaliação da atividade da FPase para a terceira etapa utilizando dois padrões.....	34
Figura 5. 10: Avaliação da atividade da CMCase para a terceira etapa utilizando dois padrões.....	35
Figura 5. 11: Comparação entre as atividades da Xilanase em (U/ml)	35
Figura 5. 12: Comparação entre as atividades da FPase em (U/ml).....	36
Figura 5. 13: Comparação entre as atividades da CMCase em (U/ml)	36

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

atm	Atmosfera
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DMP	Departamento de Morfologia e Patologia
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
EC	<i>Enzyme Commission</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
FSS	Fermentação Semi-Sólida
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice Enzimático
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
kg	Quilograma
M	Molar
m³	Metros cúbicos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MW	Megawatt
nm	nanometro
PIB	Produto Interno Bruto
RPM	Rotações por minuto
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UI	Unidade Internacional
UNICA -	União da Indústria de Cana-de-açúcar
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
μmol	Micromol

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma área que se utiliza de processos biológicos para desenvolver produtos e serviços utilizando diversos recursos de diferentes áreas do conhecimento. Um exemplo desses processos biotecnológicos é a obtenção de enzimas.

Complexos celulásicos ou celulasas são uma mistura de enzimas que unidas atuam sobre materiais celulósicos promovendo sua hidrólise (CASTRO, 2010). Esse complexo é capaz de hidrolisar a celulose até moléculas de glicose, que possui um grande interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol.

O bagaço de cana-de-açúcar, subproduto da indústria sucroalcooleira, é um dos materiais lignocelulósicos mais abundantemente produzidos no Brasil e tem em sua composição a celulose, lignina e hemicelulose. Como esse subproduto é gerado em abundância no país, as usinas já possuem uma sistemática de reaproveitamento desses subprodutos; todavia em sua grande parte, eles são utilizados como combustíveis na geração de calor e energia elétrica para as próprias usinas. No entanto, os gases oriundos da queima do bagaço, principal fonte de geração de energia das usinas, geram problemas ambientais, uma vez que são liberados diretamente no ambiente, sem um processo prévio de purificação.

A partir do bagaço de cana, assim como qualquer resíduo lignocelulósico, é possível produzir etanol de segunda geração, também conhecido como etanol 2G, a partir de sua hidrólise, no entanto, seu processo de produção envolve altos custos. Atualmente, o valor elevado das enzimas necessárias para realizar a hidrólise do bagaço aliado à enorme quantidade de enzimas necessárias para estes processos tem inviabilizado a comercialização do etanol 2G. Desta forma, trabalhos que visem

contribuir para aumentar a eficiência da produção das enzimas do complexo celulásico são de grande relevância.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, 11 isolados bacterianos foram selecionados a partir dos dados iniciais de Koroiva (2011), que no seu trabalho intitulado “ENZIMAS E BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS DO TRATO DIGESTIVO DE LARVAS DE *Stenochironomus* (Diptera:Chironomidae), teve o objetivo de analisar as atividades enzimáticas digestivas de celulose e de hemicelulose e de avaliar a comunidade bacteriana cultivável capaz de hidrolisar compostos de madeira do trato digestivo de larvas de *Stenochironomus*.

Koroiva (2011), estudou dois morfotipos larvais e isolou e identificou 31 tipos de colônias, realizando determinações do potencial celulolítico de cada colônia a partir da determinação do seu índice enzimático (IE). A partir desses dados, diferentes fermentações foram realizadas com 11 isolados selecionados tendo como objetivo avaliar a produção de complexo celulásico utilizando bagaço de cana como substrato indutor e assim identificar dois isolados que apresentassem maior produtividade.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de um complexo celulásico em escala laboratorial a partir de isolados bacterianos do trato digestivo de larvas *Stenochironomus* utilizando o bagaço de cana como indutor.

Como objetivos específicos, tem-se:

- padronizar a metodologia para determinação das atividades enzimáticas de CMCase, FPase e Xilanase;
- ensaiar as atividades enzimáticas ao longo da fermentação com diferentes bactérias junto ao bagaço de cana como indutor;
- selecionar os melhores isolados bacterianos;
- testar diferentes condições de produção do complexo enzimático e selecionar as melhores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O SETOR SUCROALCOOLEIRO

Segundo Lins (2007), o setor sucroalcooleiro brasileiro compreende todas as empresas que produzem açúcar ou álcool, ou atuam em algum elo da cadeia produtiva desses elementos.

No país, esse setor está estruturado em três estágios: plantação e cultivo da cana-de-açúcar; produção do açúcar ou álcool e comercialização do produto final. Algumas usinas dominam e atuam em todos os estágios da estrutura do setor, porém a grande maioria concentra-se apenas no cultivo da cana-de-açúcar e na produção do açúcar e álcool utilizando-se de parcerias e contratos a longo prazo para a comercialização desses produtos (LINS, 2007).

A maioria das usinas trabalha com os dois tipos de produtos: o açúcar e o álcool, sendo que, em média, 50% da cana-de-açúcar transformam-se em álcool e 50% em açúcar. Porém, suas produções variam de acordo com o cenário econômico e as tendências de mercado, o que causa grandes variações de preços tanto de um produto quanto de outro.

Desta forma, com essa estrutura dual, o setor sucroalcooleiro é capaz de reagir rapidamente às oscilações nos mercados internacionais, o que representa uma vantagem competitiva em relação aos países que produzem apenas o açúcar (RODRIGUES, 2006).

Segundo Albanez e colaboradores (2008), a competitividade do açúcar e do etanol no Brasil não resulta da ação do poder público, mas sim das condições climáticas favoráveis à produção, do nível de organização e da tecnologia desenvolvida no setor. Esses fatores conferem um diferencial ao açúcar e ao etanol produzidos no Brasil.

No entanto, a atividade sucroalcooleira possui aspectos positivos e negativos. Uma vantagem desse segmento está relacionada à diminuição dos fluxos migratórios para os municípios e ao aumento populacional urbano; porém, um aspecto desfavorável desse tipo de atividade de trabalho é o período sujeito às especificidades do ciclo produtivo da cana, que gera uma sazonalidade característica (BRAGATO E COLABORADORES, 2008).

Outro aspecto negativo da atividade sucroalcooleira reside no fato de que esta atividade gera elevados volumes de resíduos, sendo que para cada 1000 toneladas de cana que entram no processo de moagem, são gerados 270 toneladas de bagaço, 35 toneladas de torta de filtro, 360 m³ de vinhaça, além de outras perdas que começam desde a sua colheita e estendem-se ao longo de toda a cadeia produtiva (THEODORO, 2005).

3.2 ETANOL: FONTE DE ENERGIA RENOVÁVEL

Segundo Scandiffio (2005), o álcool combustível é conhecido também como etanol, álcool etílico e álcool de biomassa, podendo ser obtido a partir de qualquer tipo de biomassa que contenha açúcar, amido ou material celulósico.

Para produzir o etanol, o Brasil utiliza a cana-de-açúcar. Nos Estados Unidos, Alemanha e Europa são utilizados milho, beterraba e trigo, respectivamente. Em relação aos países citados, o Brasil apresenta vantagens competitivas, ao se levar em consideração as condições climáticas e os solos férteis, que possibilitam a produção do etanol a partir da cana-de-açúcar, resultando em um produto de menor custo se comparado ao etanol produzido por outros países.

A figura 3.1 ilustra os diferentes métodos para a produção do etanol no Brasil e no mundo, levando em consideração as atuais e as potenciais fontes produtoras.

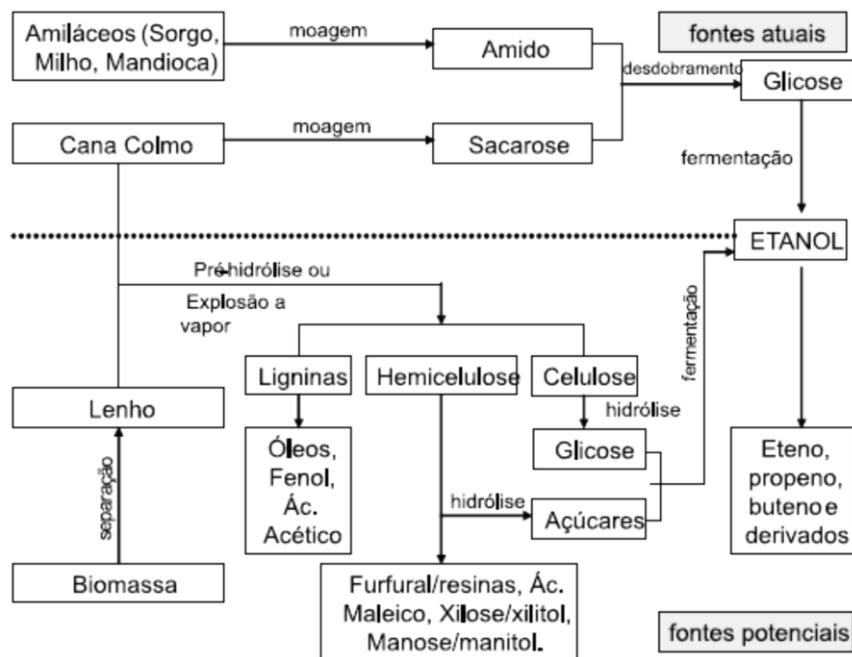


Figura 3. 1: Diferentes processos de produção de etanol

Fonte: Bastos (2007).

Segundo Souza e colaboradores (2010), o processo de produção e o uso do etanol no Brasil são o melhor exemplo no mundo do uso de introdução de energia renovável com uma grande escala de produção. Esse processo exigiu nos últimos 30 anos um extenso desenvolvimento tecnológico (geração, importação, adaptação e transferência de tecnologias) na produção agrícola e industrial, e também na logística.

O etanol possui diferentes finalidades, sendo muito utilizado na indústria farmacêutica e química, porém sua aplicação destaca-se sobremaneira no setor de transportes, em que é utilizado como combustível em substituição ou em utilização conjunta com a gasolina.

A figura 3.2 mostra essa relação entre uso de gasolina e do etanol e como a utilização do etanol como combustível vem crescendo nos últimos anos.

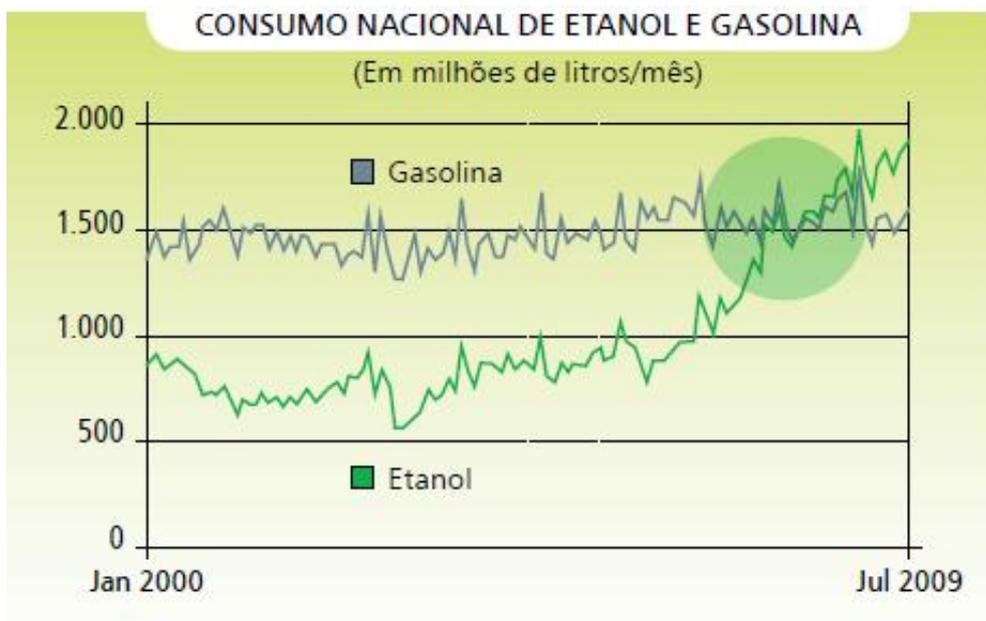


Figura 3. 2: Consumo comparativo entre Etanol e Gasolina no Brasil, 2000-2009.

Fonte: Souza e colaboradores, (2010).

Todavia, em virtude desse crescente consumo de etanol no Brasil e no mundo faz-se necessário pesquisar e introduzir novas tecnologias nesse cenário, tanto para se produzir etanol como para aumentar a produtividade das usinas produtoras.

Uma alternativa para responder ao crescente consumo de etanol de maneira sustentável é a produção de etanol a partir da celulose. Diferentemente do etanol convencional, o etanol celulósico (2G) é produzido com base em materiais da biomassa celulósica ou, mais rigorosamente, lignocelulósica (BASTOS, 2007). Assim sendo, a celulose pode ser encontrada em resíduos agroindustriais como o bagaço de cana, principal sub-produto do setor sucroalcooleiro.

Segundo Santos e colaboradores (2007), grandes investimentos estão sendo efetuados em todo o mundo para viabilizar a produção de etanol a partir de celulose, estimando-se que em 2020, apenas nos EUA, cerca de 30 bilhões de litros de etanol poderão ser obtidos a partir dessa fonte.

Com a utilização da celulose para produção de etanol é possível obter um aumento substancial em produtividade, uma vez que mais combustível será produzido a partir de uma mesma área de terra cultivada.

3.3 MATERIAIS E RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza (SZENGYEL, 2000), sendo compreendidas pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (CASTRO, 2006).

Segundo Demajorovic (1995), resíduos sólidos diferenciam-se do termo lixo porque, enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, os resíduos possuem valor econômico agregado e, uma vez tratado de maneira correta, podem ser reconduzidos a novos processos industriais gerando novos produtos.

Todos os resíduos industriais tornam-se um passivo para a empresa que o produz, já que necessitam de cuidados especiais depois de serem gerados, não podendo ser acumulados indefinidamente. De acordo com sua composição, todo resíduo necessita de um destino específico, necessitando de tratamentos químicos e físicos de purificação antes de serem depositados no meio ambiente, ou lançados na atmosfera, nas águas ou no solo, para assim serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental (AQUARONE E COLABORADORES, 1990).

De acordo com Castro (2010), dentre as diversas fontes de resíduos lignocelulósicos, aqueles originados da cana-de-açúcar são os mais expressivos, sendo que no ano de 2007 houve uma geração de 147 milhões de toneladas. Ainda nesse mesmo ano, a quantidade de resíduos gerados pelas diferentes biomassas lignocelulósicas somaram juntos no país a quantia de 606 milhões de toneladas, das

quais cerca de 105 milhões correspondem à fração celulósica, conforme figura 3.3 (CASTRO, 2010).

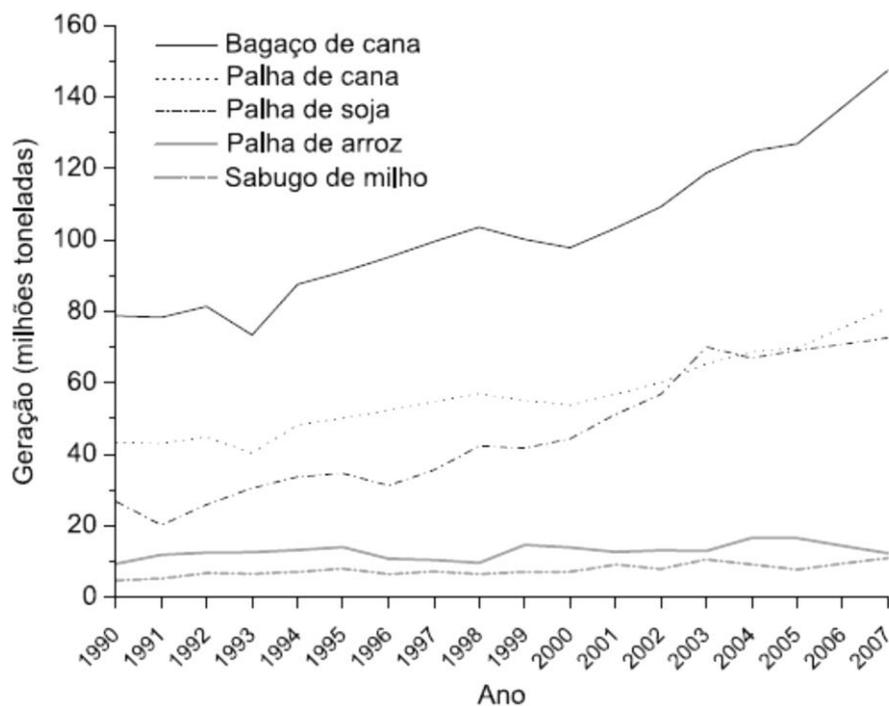


Figura 3. 3: Geração de resíduos lignocelulósicos ao longo dos anos

Fonte: Castro, (2010).

Assim, com a incessante demanda das atividades agrícolas uma grande quantidade de resíduos tem sido gerada pelas agroindústrias nas últimas décadas, o que fez com que surgisse uma crescente busca de sua utilização (MENEZES E COLABORADORES, 2009).

Os maiores usos dos resíduos lignocelulósicos concentram-se nas polpas e indústrias de papéis, proteína para ração e na geração de energia através da produção de etanol (BALLESTEROS, 2001).

Entretanto, existe uma dificuldade em se converter o bagaço de cana e os outros materiais lignocelulósicos, resíduos ou não, em insumos químicos. Essa dificuldade é atribuída às características morfológicas existentes entre os três principais componentes da parede celular desses insumos (PITARELO, 2007).

Segundo Castro (2006), essas biomassas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos.

A tabela 3.1 ilustra os diferentes tipos de componentes em alguns tipos de resíduos agroindustriais.

Tabela 3. 1: Composição percentual dos diferentes resíduos agroindustriais

Componente	Bagaço de cana	Bagaço de laranja	Bagaço de soja	Casca de arroz
<i>Celulose</i>	36	16	3	36
<i>Hemicelulose</i>	28	14	4	20
<i>Lignina</i>	20	1	3	19
<i>Cinzas</i>	5	2	5	20
<i>Proteínas</i>	4	8	43	3

Fonte: Castro (2006).

Esses componentes conferem aos resíduos uma limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material dificultando sua utilização em bioprocessos (CASTRO, 2010).

Segundo Pitarelo (2007), as estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matriz composta por hemicelulose e lignina, cuja função estrutural é agir como barreira natural à degradação enzimática ou microbiana conforme ilustra a figura 3.4, em que é possível ver como os componentes estão arrançados de forma que as cadeias de celulose e hemicelulose fiquem embebidas pela lignina.

Para tanto, faz-se necessária a utilização de técnicas de pré-tratamentos do material com o intuito de aumentar sua susceptibilidade à ação das enzimas pela remoção da lignina e redução da cristalinidade da estrutura celulósica (CASTRO, 2010).

Esses tratamentos podem ser definidos como físicos, químicos ou biológicos e podem atuar separadamente ou em conjunto, com o objetivo de fragilizar a estrutura do

material, possibilitando a atuação microbiana, disponibilizando, dessa forma, a celulose ao ataque enzimático.

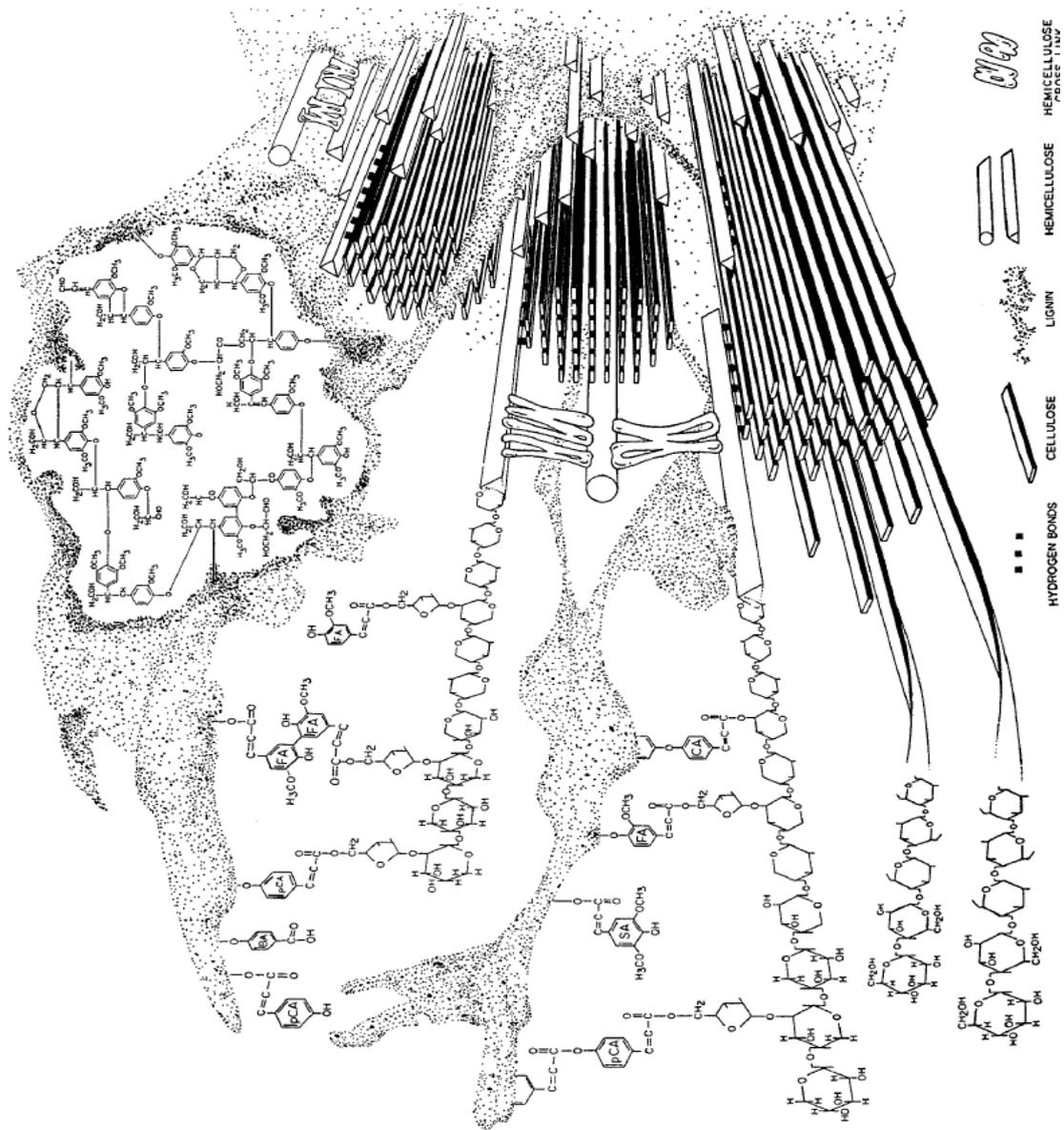


Figura 3. 4: Esquema da estrutura da parede celular secundária vegetal

PCA – ácido *p*-coumárico *FA* – ácido ferúlico *BA* – ácido *p*-hidroxibenzóico *AS* – ácido sinápico *CA* - ácido cinâmico

Fonte: Bidlack et al., 1992

3.4 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS

Conforme anteriormente mencionado, os materiais lignocelulósicos são compostos basicamente por três tipos de componentes que se ligam entre si formando uma rede complexa aos ataques microbianos e enzimáticos.

Abaixo, cada estrutura da parede celular desses subprodutos, constituídos por celulose, hemicelulose e lignina será melhor detalhada.

3.4.1 Celulose

A celulose é um polímero de cadeia longa e classificado como um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-glucose que interagem entre si por ligações β -1,4 mantendo uma estrutura linear e plana, sendo a celobiose, o dissacarídeo 4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranoose, a unidade repetitiva do polímero (NASCIMENTO, 2006).

A celulose é muito rígida e pode ser encontrada em sua estrutura cerca de 4000–8000 moléculas de glicose conectadas por ligações β -1,4 (ARISTIDOU & PENTTILA, 2000).

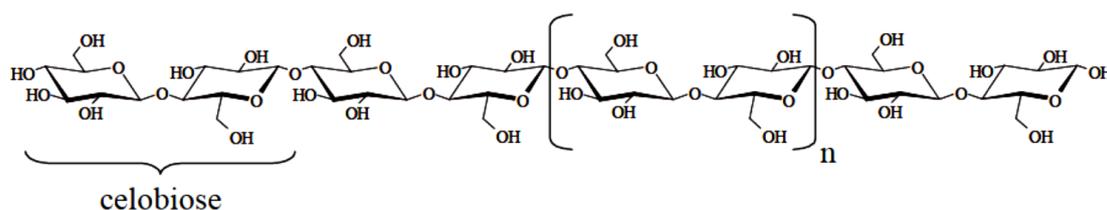


Figura 3. 5: Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades de celobiose

Fonte: Tímar-Balázszy & Eastop, 1998.

Cerca de 1/3 da matéria orgânica vegetal é constituída por celulose, sendo assim o principal componente da parede celular em vegetais (NORKRANS, 1967). Seu papel na parede celular é exclusivamente estrutural, sendo que a alta força de tensão da

celulose permite às células vegetais suportarem a pressão osmótica que é responsável pela resistência da planta ao estresse mecânico (BÉGUIN & AUBERT, 1994).

3.4.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos não amiláceos (PITARELO, 2007), não-celulósicos encontrados em tecidos vegetais. São compostos de polímeros complexos de carboidratos, nos quais as xilanas e as glucomananas são os principais componentes (NASCIMENTO, 2006), sendo insolúveis em água, mas facilmente solubilizados em solução alcalina (AWAFO, 1997).

Segundo Pitarelo (2007), as hemiceluloses são depositadas na parede celular do vegetal em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). São formadas por uma variedade de unidades monossacarídicas, apresentadas na figura 3.6 como pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose, hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglucurônico e ácido galacturônico) (PITARELO, 2007).

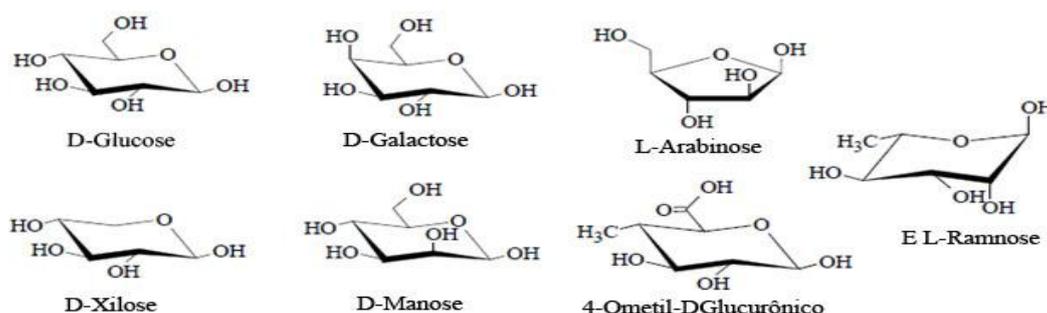


Figura 3. 6: Diferentes unidades monossacarídicas das hemiceluloses

Fonte: Pitarelo 2007

3.4.3 Lignina

Segundo Castro (2006), a lignina é convencionalmente definida como uma rede hidrofóbica complexa de unidades fenilpropanóidicas derivadas da polimerização oxidativa de três álcoois precursores (originados por metoxilação do ácido p-hidroxicinâmico) que dão origem às subunidades p-hidroxifenil, guaiacil e siringil, apresentados na figura 3.7.

A lignina é encontrada na parede celular de vegetais, predominantemente nos tecidos vasculares especializados para o transporte de líquidos em vegetais superiores, como as gimnospermas e as angiospermas, e também em samambaias (NASCIMENTO, 2006).

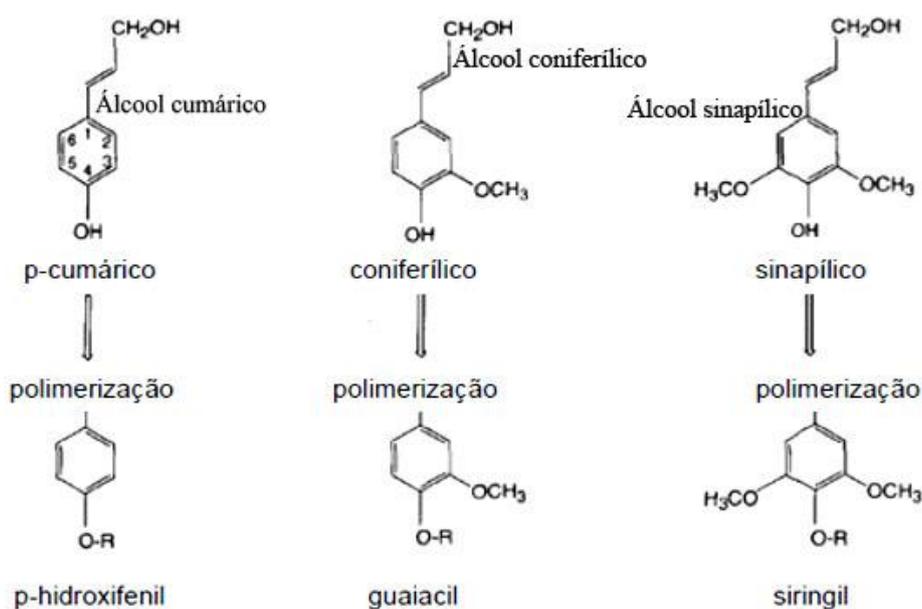


Figura 3. 7: Precursores estruturais e resíduos polimerizados da lignina.

Fonte: Castro (2006).

Pela sua complexidade estrutural, a lignina confere rigidez à parede celular, e nas porções encontradas na madeira, age como um agente permanente de ligação entre as células, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra (D'ALMEIDA, 1988).

3.5 PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES), que também pode ser conhecida como fermentação semissólida (FSS).

Basicamente, o que diferencia esses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional (CASTRO, 2010). Ambos os processos são dotados de características próprias, possuindo vantagens e desvantagens para sua utilização, dependendo do tipo de enzima, do tipo de substrato que deseja trabalhar além dos equipamentos necessários.

Segundo Pinheiro (2006), tanto na FS quanto na FES é possível o aproveitamento de diversos subprodutos agroindustriais como o bagaço de cana, o farelo de soja, entre outros, permitindo o desenvolvimento de um processo ecologicamente correto e atrativo do ponto de vista do custo-benefício, o que reduz consideravelmente os custos de produção de enzimas.

Abaixo serão melhor detalhadas as características da fermentação submersa, fermentação utilizada no decorrer desse trabalho para a obtenção das enzimas lignocelulolíticas.

3.5.1 Fermentação em estado submerso (FS)

A diferença básica entre a fermentação submersa e a fermentação no estado sólido é o teor de água presente no meio reacional. Assim como o próprio nome sugere, a principal característica da fermentação submersa é a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis e insolúveis.

Segundo Pinheiro (2006), esse tipo de fermentação pode ser realizado em frascos agitados (erlenmeyers, por exemplo), fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial.

Segundo Sanromán & Couto (2006), o processo de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle de parâmetros como pH e temperatura, principalmente se monitorados por sensores adequados.

Porém, devido à grande quantidade de água presente no meio, a probabilidade de obter-se uma contaminação é maior (PINHEIRO 2006). Outra desvantagem desse sistema é quando a enzima produzida é extracelular, sendo obtida uma preparação diluída, inserindo uma etapa de concentração mais trabalhosa na purificação, conseqüentemente aumentando o custo da operação (ALONSO, 2001).

3.6 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

3.6.1 Xilanases

Segundo Heck (2005), a xilanase tem sido extensivamente estudada e empregada em vários processos biotecnológicos, podendo ser produzida tanto em FES ou FS, com prevalência desse último.

A heterogeneidade e complexidade estrutural das xilanas resultam em uma abundância de enzimas xilanolíticas (NASCIMENTO, 2006). As enzimas que mais se destacam nesse complexo enzimáticos são as β -1,4-endoxilanases (β -1,4-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) que despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica do esqueleto principal e as β -xilosidases (β -1,4-D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37). Os grupamentos laterais presentes na xilana são liberados pela ação das α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases e acetilxilana esterases. Todas essas enzimas agem, cooperativamente, de modo a converter a xilana em seus açúcares constituintes (NASCIMENTO, 2006).

3.6.2 Celulases

As celulases são enzimas classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, em que o valor de x varia com a enzima celulásica avaliada (HENRISSAT, 1991).

Esse complexo é capaz de hidrolisar a celulose até moléculas de glicose e pequenos oligossacarídeos (KUBICEK et al., 1993). Atuam quebrando a celulose em celobiose, que é subsequentemente clivada a glicose pela ação da β -glicosidase (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Os três maiores grupos de celulases que estão envolvidos no processo de hidrólise são: endoglucanases; exoglucanases e β -glicosidase (SUN & CHENG, 2002). As enzimas celulolíticas são classificadas nos respectivos grupos de acordo com o local em que atuam no substrato.

As endoglucanases clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases (celobiohidrolases) atuam na região externa da celulose removendo as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose; e as β -glicosidases hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose quebrando a celobiose em duas unidades de glicose (LYND E COLABORADORES, 2002; SANTOS E COLABORADORES, 2009).

3.6.2.1 Endoglucanases

Segundo Castro (2006), as endoglucanases (EnG) são classificadas segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, com o nome de 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases, porém, também são conhecidas na literatura como endo-1,4- β -D-glucanases, β -1,4-glucanases, β -1,4-endoglucana hidrolases, alcali celulases, celodextrinases e avicelases

Elas são responsáveis por iniciar o processo de hidrólise, hidrolisando randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização alterando rapidamente o grau de polimerização da celulose (CASTRO; NASCIMENTO, 2006).

3.6.2.2 Exoglucanases

Segundo Castro (2006), o grupo das exoglucanases (ExG) é constituído pelas celobiohidrolases (CBH) e pelas glucanohidrolases (GH). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4-b-D-glucana-glucano-hidrolase, possui uma estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (CASTRO, 2010).

A CBH (EC 3.2.1.91), cujo nome sistemático 1,4-b-D-glucana-celobiohidrolase, é responsável por participar da hidrólise primária da fibra em que promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto a ação das celulasas (CASTRO, 2010). A CBH pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores, e a do tipo II (CBH II) que hidrolisa terminais não redutores (CASTRO, 2010).

3.6.2.3 β -glicosidases

As β -glicosidases são classificadas com o nome de β -glicosidásicas, ou β -glicosídeo glucohidrolases, porém são conhecidas também pelos nomes de gentiobiase, celobiase, emulsina, elaterase, aril- β -glicosidase, β -D-glicosidase, β -glicosídeo glicohidrolase, arbutinase, amigdalinaase, p-nitrophenil β -glicosidase, primeverosidase, amigdalase, limarase e salicilinaase (CASTRO, 2006). Essas enzimas são responsáveis pela clivagem de pequenas cadeias de celo-oligossacarídeos e celobiose a glicose, a qual é utilizada nas vias metabólicas do microrganismo (NASCIMENTO, 2006).

3.7 APLICAÇÕES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Segundo Nascimento (2006), pela grande capacidade dos microrganismos de realizarem transformações químicas, uma crescente necessidade de preparos enzimáticos, a partir de fontes diferentes das clássicas, vem estimulando a busca no universo microbiano.

Tais enzimas celulolíticas possuem um amplo potencial de aplicações nas diversas áreas industriais. Segundo Kubicek e colaboradores (1993), as celulases são muito utilizadas em formulações de detergentes domésticos e industriais, na extração de óleos, pigmentos, essências, alcalóides e amido; na produção de sucos; preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimulantes de digestão, produtos estimuladores no tratamento de lixo orgânico ração animal, entre outros.

Atualmente, as enzimas do complexo celulolítico têm sido muito utilizadas na degradação de matérias lignocelulósicas, com o objetivo de destinar esses subprodutos para a produção do etanol de segunda geração, o que agrega um valor econômico ainda mais substancial para essas enzimas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A partir dos resultados iniciais de Koroiva (2011), 11 isolados bacterianos de larvas de *Stenochironomus* foram selecionados por sua atividade enzimática satisfatória. Esses isolados foram obtidos da coleção de culturas do laboratório de Microbiologia e Parasitologia da UFSCar.

Durante a primeira etapa, 11 isolados bacterianos foram submetidos à fermentação em estado submerso sob a mesma condição de cultivo. Após os primeiros testes e análises cinco isolados foram selecionados e submetidos a novas fermentações (segunda etapa).

Durante a segunda etapa, dois isolados foram selecionados e destinados à terceira etapa na qual foram submetidos à novas fermentações com novas proporções de substratos.

4.1 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Os substratos utilizados nesses experimentos foram: o bagaço de cana *in natura* proveniente da empresa EDRA ecossistemas e farelo de soja, obtido comercialmente.

Esses substratos foram lavados em água corrente e água destilada, secados em estufa de secagem e esterilização a 90° C até que sua massa se tornasse constante. Logo após, foram passados em peneira de 25 mesh para obtenção de um pó homogêneo para composição do meio de inoculação dos microrganismos. Os substratos foram armazenados em potes plásticos à temperatura ambiente.

4.2 PREPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

4.2.1 Microrganismos utilizados

Baseado nos resultados de degradação e índices enzimáticos de diferentes substratos obtidos por Koroiva (2011), foi realizada uma triagem e 11 isolados bacterianos selecionados conforme tabela 4.1.

Tabela 4. 1: Lista de bactérias inicialmente utilizadas isoladas por Koroiva (2011) e seus respectivos índices enzimáticos em relação a diferentes substratos de degradação.

Numero da Bactéria	Nº de acesso do GenBank	Gêneros das bactérias	Identificação (%)	Atividade enzimática		
				CMC	Xilano	Celobiose
1	HM484307	<i>Sphingobium</i>	99.00	1,14	1,33	0,67
2	HM484309	<i>Sphingobium</i>	100.00	2,30	0,81	1,00
3	HM484311	<i>Sphingobium</i>	98.00	2,74	0,75	1,02
4		Não Identificada 01		+	+	+
5	HM484308	<i>Bacillus</i>	98.00	3,85	3,88	-
6	HM484328	<i>Bacillus</i>	98.00	-	-	1,00
7	HM484315	<i>Bacillus</i>	100.00	-	-	1,13
8	HM484318	<i>Variovorax</i>	98.00	1,78	-	3,87
9	HM484316	<i>Rhodococcus</i>	99.00	1,00	0,81	1,,58
10		Não Identificada 02		+	+	+
11	HM484313	<i>Pseudomonas</i>	98.00	2,14	0,97	1,07

4.2.2 Inóculo

Para a produção do inóculo, o trabalho foi dividido em duas etapas. Durante a primeira etapa do projeto, os isolados selecionados foram mantidos em Agar Soja Triptona (*Tryptic Soy Agar - TSA*), posteriormente semeadas em tubos com 10 mL de Caldo Soja Triptona (*Tryptic Soy Broth - TSB*) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este processo, os inóculos foram centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos; o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso novamente em 3 ml de meio de Berg (1972) modificado (item 4.3).

Após a nova suspensão em 3 mL de meio de Berg, os tubos foram agitados em vortex para homogeneização e a suspensão foi gotejada em 10 mL do mesmo meio até

0,5 na escala de McFarland, que corresponde aproximadamente 10^8 UFC/ml. Essa nova suspensão foi utilizada para inocular os Erlenmeyers para posterior fermentação submersa (FS).

Durante a segunda etapa dos experimentos, dois melhores isolados foram selecionados e cultivados em tubos com 10 ml de meio de Berg modificado acrescido de 1% de carboximetilcelulose (CMC). Posteriormente, os novos tubos com o meio foram inoculados e incubados a 37°C por 24h.

Após o tempo de incubação, os tubos foram agitados em vortex para homogeneização e a suspensão foi ajustada com meio de Berg até 0,5 na escala de McFarland. Dois e meio mL dessa suspensão foi utilizada para posterior FS.

4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a produção das enzimas celulolíticas foi utilizado o meio de Berg (1972), modificado duas vezes: primeiro pelo acréscimo de extrato de levedura e fosfato monobásico de potássio; segundo, pelo acréscimo de extrato de levedura, peptona e fosfato monobásico de potássio conforme tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente.

Tabela 4. 2: Composição 1 do meio de Berg (1972) modificado, pH 7,0

Reagentes	Quantidade
Solução A	
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	2 g
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,10 g
Fosfato dibásico de potássio (K ₂ HPO ₄)	0,50 g
Extrato de levedura	0,20 g
Água	990 ml
Solução B	
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0,20 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ . 2 H ₂ O)	0,02 g
Sulfato de ferro (FeSO ₄ . 7H ₂ O)	0,02 g
Sulfato de manganês (MnSO ₄ . H ₂ O)	0,02 g
Água	10 ml

Na tabela 4.3 se pode observar que além do acréscimo de peptona, as quantidades de nutrientes fornecidas ao meio, como fonte de nitrogênio orgânico, foram alteradas.

Tabela 4. 3: Composição 2 do meio de Berg (1972) modificado, pH 7,0

Reagentes	Quantidade
Solução A	
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	2 g
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,10 g
Fosfato dibásico de potássio (K ₂ HPO ₄)	0,50 g
Extrato de levedura	0,50 g
Peptona	1 g
Água	990 ml
Solução B	
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0,20 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ . 2 H ₂ O)	0,02 g
Sulfato de ferro (FeSO ₄ . 7H ₂ O)	0,02 g
Sulfato de manganês (MnSO ₄ . H ₂ O)	0,02 g
Água	10 ml

Os meios de Berg 1 e 2 foram preparados em duas etapas separadamente. Na primeira (Solução A) os reagentes foram pesados em balança analítica e acrescentados, um a um, até completa dissolução em frasco de vidro com capacidade de 1000 ml, contendo 990 ml de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos. Na Solução B os sais foram dissolvidos, um a um, em 10 ml de água e a solução esterilizada por filtração em membrana de poro de 0,22 µm.

Após a esterilização, as soluções A e B foram misturadas e armazenadas sob refrigeração.

4.4 PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a produção dos extratos enzimáticos em cultivo submerso o trabalho foi dividido em três etapas, e as quantidades dos substratos indutores e os meios utilizados estão apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Quantidades de substratos e meios utilizados nas etapas dos experimentos.

	Meio de Berg	Bagaço-de-cana (%)	Farelo de soja (%)
Etapa 1	Meio 1	0,5	0,5
Etapa 2	Meio 1	1	0,05
Etapa 3			
Padrão 1	Meio 2	1	0,5
Padrão 2	Meio 2	5	0,5

% em relação ao volume final de líquido (meio).

Na primeira etapa, realizada em duplicata, 11 Erlenmeyers de 125 mL contendo 45 ml de meio foram inoculados com a suspensão bacteriana padronizada (item 4.2.2) e cultivadas a 37°C em incubadora tipo Shaker a 150 rpm por dois dias.

Nos tempos de 24 e 48h, alíquotas de 5 ml foram transferidas para tubos tipo Falcon, centrifugados a 3000 rpm por 15 min e o sobrenadante coletado em Eppendorfs e congelados a -22°C para análises posteriores.

Na segunda etapa utilizou-se cinco isolados bacterianos, selecionados da etapa anterior, que foram cultivados em Erlenmeyers de 250ml com 90ml do meio, os quais foram inoculados com 10mL de suspensão bacteriana (item 4.2.2) e incubados a 37°C sob agitação por 72h.

Durante essa etapa, realizada em duplicata, em três momentos de 24, 48 e 72h uma alíquota de 7 ml foi transferida para tubos tipo Falcon, centrifugados a 3000 rpm por 15min e o sobrenadante coletado em Eppendorfs e congelados a -22°C para análises posteriores.

Na terceira etapa, realizada em triplicata, dois isolados, selecionados da etapa 2, foram cultivados em frascos Erlenmeyers de 125mL por 12, 24, 48 e 72h, contendo 22,5 ml meio sendo inoculados com 2,5 ml de suspensão bacteriana padronizada a 10^8 UFC/ml e incubados a 37°C a 150 rpm. Após o tempo de incubação o conteúdo dos Erlenmeyers foram vertidos em tubos tipo Falcon, centrifugados a 3000 rpm por 20 min e o sobrenadante coletado em Eppendorfs e congelados a -22°C para análises posteriores.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As soluções utilizadas nas determinações enzimáticas estão descritas no anexo I.

As atividades enzimáticas celulolíticas e hemicelulolíticas foram avaliadas através da quantificação de açúcares redutores determinados pelo método de DNS

(ácido-3,5-dinitrosalicílico) conforme MILLER *et al.* (1959), utilizando-se um padrão de glicose e leitura óptica realizada em 540 nm. Para todos os ensaios foram realizados os brancos de enzima e da reação. Aos brancos da reação, o sobrenadante era adicionado imediatamente após o DNS. Aos brancos da enzima não foi adicionado o sobrenadante ao substrato e DNS. Os tubos de reação dos diferentes substratos e os brancos de enzima e de reação após a adição de 1 ml de DNS foram submetidos à fervura por cinco minutos, resfriados imediatamente em banho de gelo e o seu volume completado para 10 ml. A absorbância era lida em espectrofotômetro da marca Fento, modelo 600 a 540nm.

As atividades enzimáticas de FPase, CMCase, Xilanase dos extratos obtidos a partir das diferentes fermentações foram quantificadas e os resultados das análises foram expressos em U/ml e U/mg de proteína (terceira etapa). A determinação da proteína nos sobrenadantes foram estimadas segundo Bradford (1976). Uma unidade de atividade FPásica corresponde a 1 μ mol de glicose liberado por minuto de reação em pH 4,8 a 50°C. Uma unidade de atividade CMCase corresponde a 1 μ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação em pH 4,8 a 50°C. Uma unidade de atividade Xilanase corresponde a 1 μ mol de xilose liberado por minuto em pH 4,8 a 50°C.

4.5.2 Atividade da celulase total através da FPase

As atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase foram avaliadas segundo metodologia proposta por Ghose (1987) modificada, baseada na capacidade das enzimas em degradar o papel de filtro Whatman nº 1 (FPase) acondicionado em um tubo de ensaio.

A determinação da atividade da celulase total foi realizada em tubos de ensaio, contendo: uma tira de 1x6 cm de papel de filtro Whatman nº1 (50 mg), 1 ml do

sobrenadante obtido das fermentações e 2 ml de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4.8 e incubados em banho-maria a 50°C por duas horas

4.5.3 Atividade enzimática da Xilanase

As atividades enzimáticas da Xilanase foram determinadas segundo a metodologia proposta por Gomes (1992). Esse método baseia-se na determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação da xilana.

Em tubos de ensaio foram adicionados 1 ml do sobrenadante obtido pelas fermentações e 2 ml de solução de xilana 1% em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8. Os tubos foram levados a banho-maria a 50°C por 30 minutos e a reação interrompida pela retirada de 1 ml da mistura reacional imediatamente transferida a outros tubos de ensaio contendo 1 ml de DNS.

4.6.4 Atividade enzimática da CMCCase

As atividades enzimáticas da CMCCase foram determinadas segundo a metodologia proposta por Novo Industri S.A. (1978). Esse método determina a atividade conhecida como CMCCase nos extratos enzimáticos das culturas, através da determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação da carboximetilcelulose (CMC).

A determinação da atividade da CMCCase foi realizada em tubos de ensaio, contendo: 0,5 ml de CMC 4% em tampão citrato de sódio 50Mm pH 4,8, aclimatado por um minuto a 50°C e 0,5 ml do sobrenadante obtido nas fermentações.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C por 30 minutos e 1 ml de DNS foi acrescentado.

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS

Conforme apresentado anteriormente, os microrganismos utilizados nesse trabalho para a produção de celulases e xilanases são bactérias celulolíticas isoladas do trato digestório de larvas de *Stenochironomus* (KOROIVA, 2011).

Ao longo dos experimentos, conforme os resultados analisados, as bactérias que obtiveram melhores resultados de atividade enzimática foram selecionadas para as etapas posteriores.

Os resultados da atividade da CMCase, obtidos da primeira etapa de seleção de bactérias, são apresentados na figura 5.1 e agrupados pelos diferentes gêneros nas figuras 5.2 a 5.8.

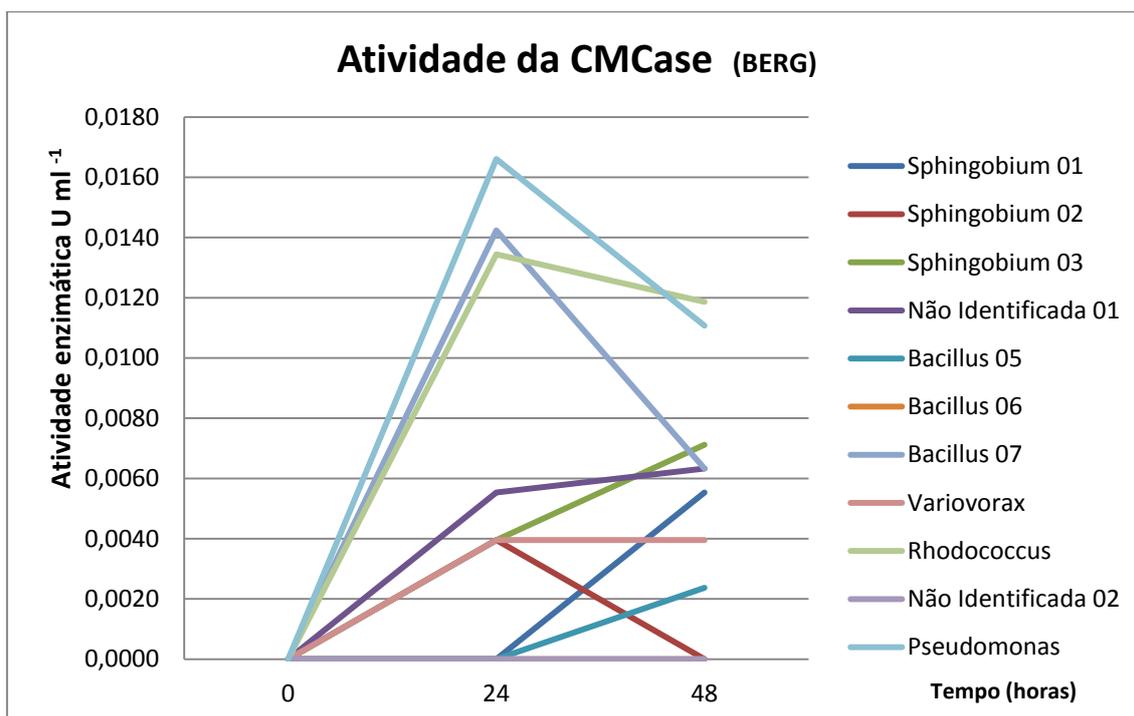


Figura 5. 1: Atividade da CMCase produzidas pelas bactérias testadas utilizando o meio de Berg.

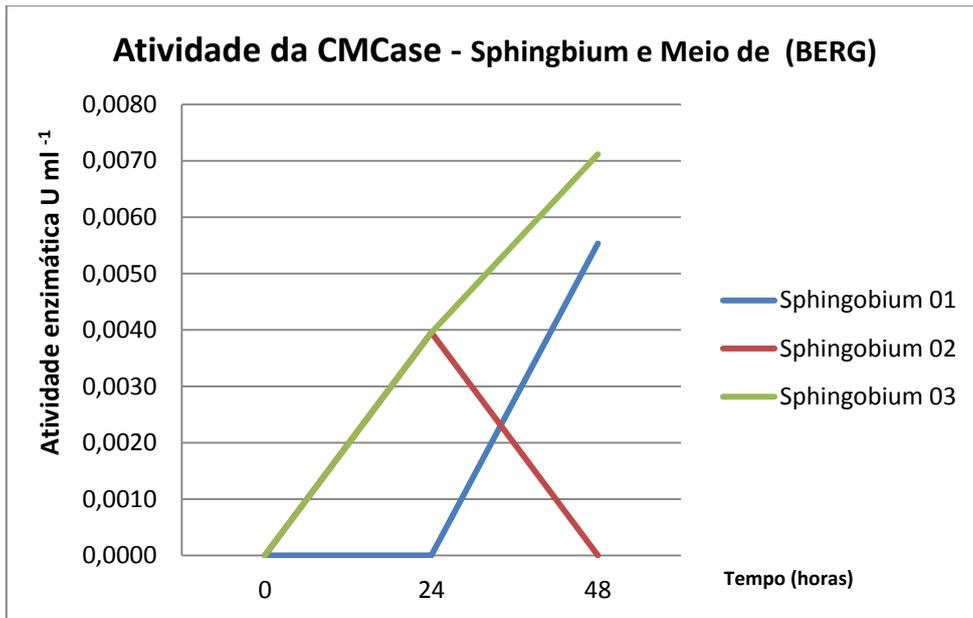


Figura 5. 2: Atividade da CMCCase produzidas pelas bactéria *Sphingobium* e meio de Berg

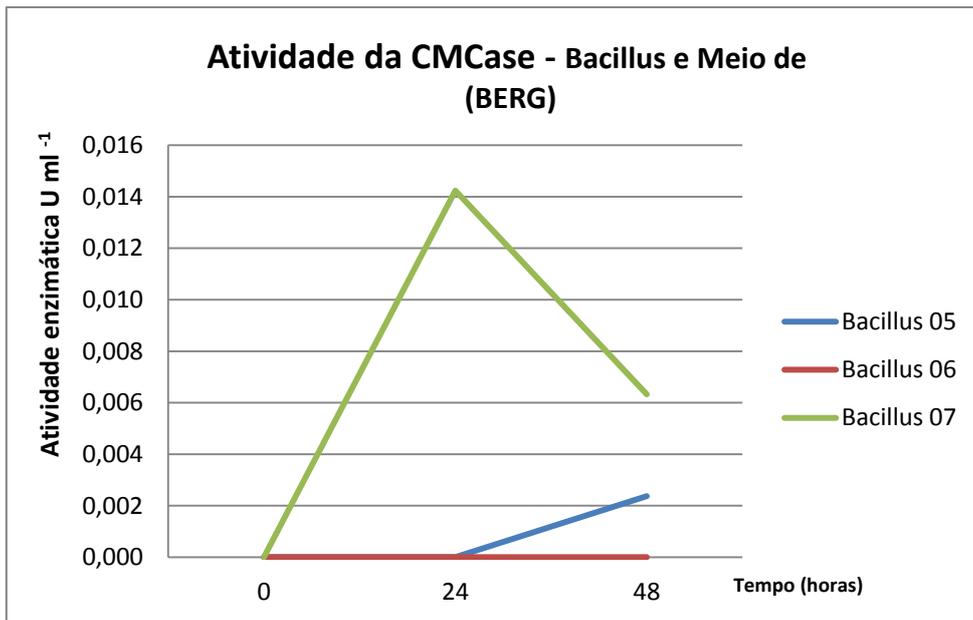


Figura 5. 3: Atividade da CMCCase produzidas pelas bactéria *Bacillus* e meio de Berg

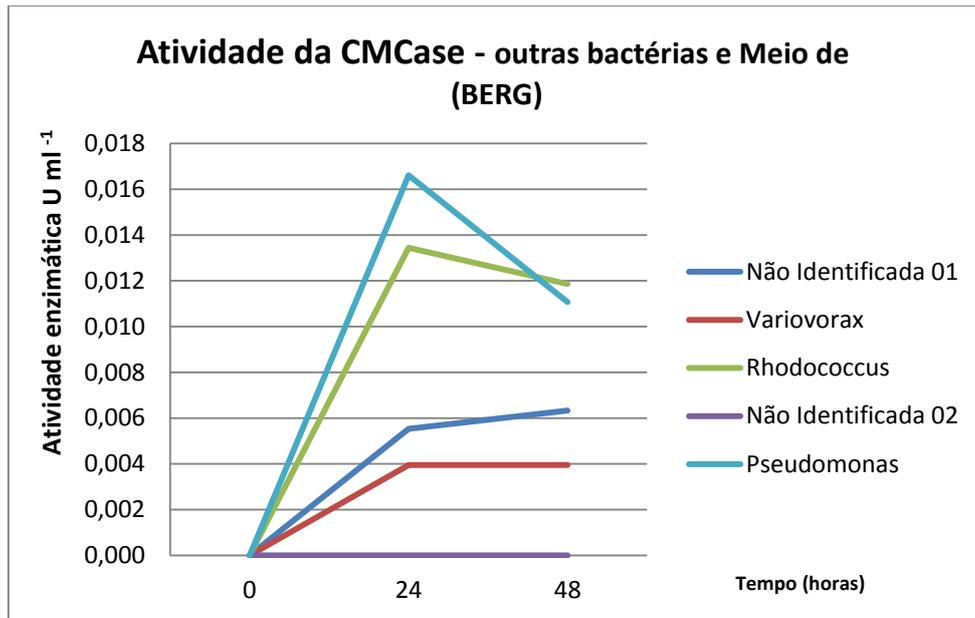


Figura 5. 4: Atividade da CMCCase produzidas por outras bactérias e meio de Berg

Dessa forma, ao se compararem os dados obtidos com os testes iniciais do halo Koroiva (2011), optou-se por escolher cinco isolados pertencentes a diferentes gêneros, a saber: *Sphingobium* (3), *Bacillus* (5), *Variovorax*, *Rhodococcus* e *Pseudomonas*, possibilitando-se estudar mais detalhadamente e realizar outros testes de CMCCase e testes de FPase e Xilanase.

5.2 RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

5.2.1 Quantificação de endoglucanase, exoglucanase e β glicosidase por FPase

Os resultados da FPase das diferentes bactérias analisadas são apresentados na figura 5.5.

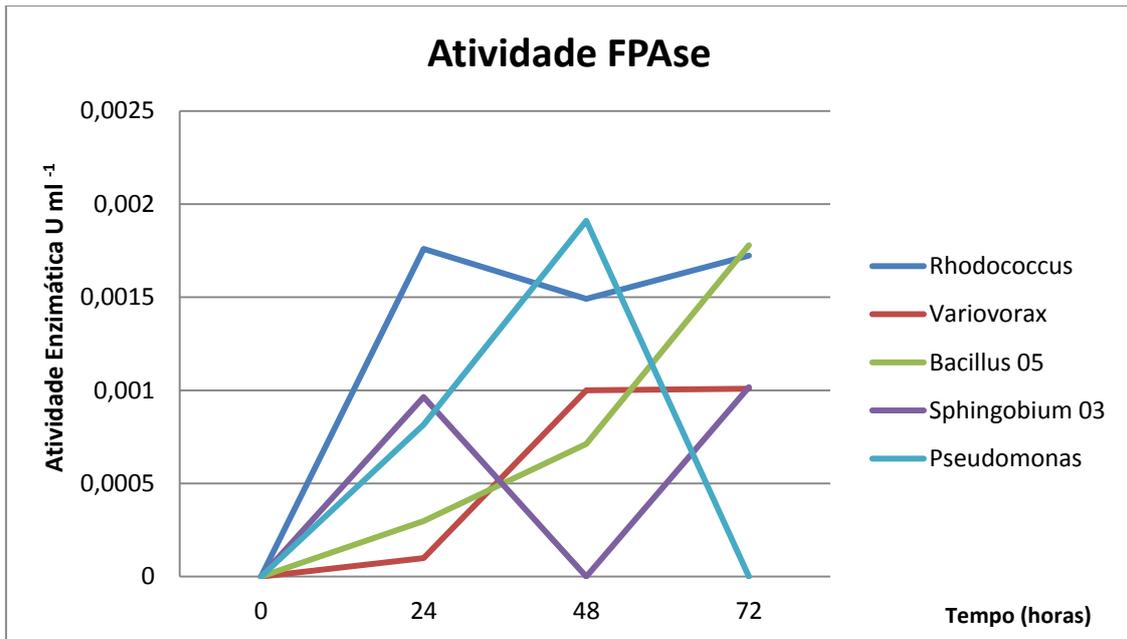


Figura 5. 5: Avaliação da atividade da FPase

O que se pode observar é que para cada bactéria estudada, o pico de atividade da FPase ocorreu em diferentes tempos. Todavia, a bactéria *Pseudomonas* destacou-se dentre as outras apresentando maior atividade em 48 horas e após esse tempo, uma redução da atividade de FPase.

5.2.1 Quantificação de CMCase

A figura 5.6 mostra detalhadamente as influências do tempo de incubação na atividade da enzima CMCase.

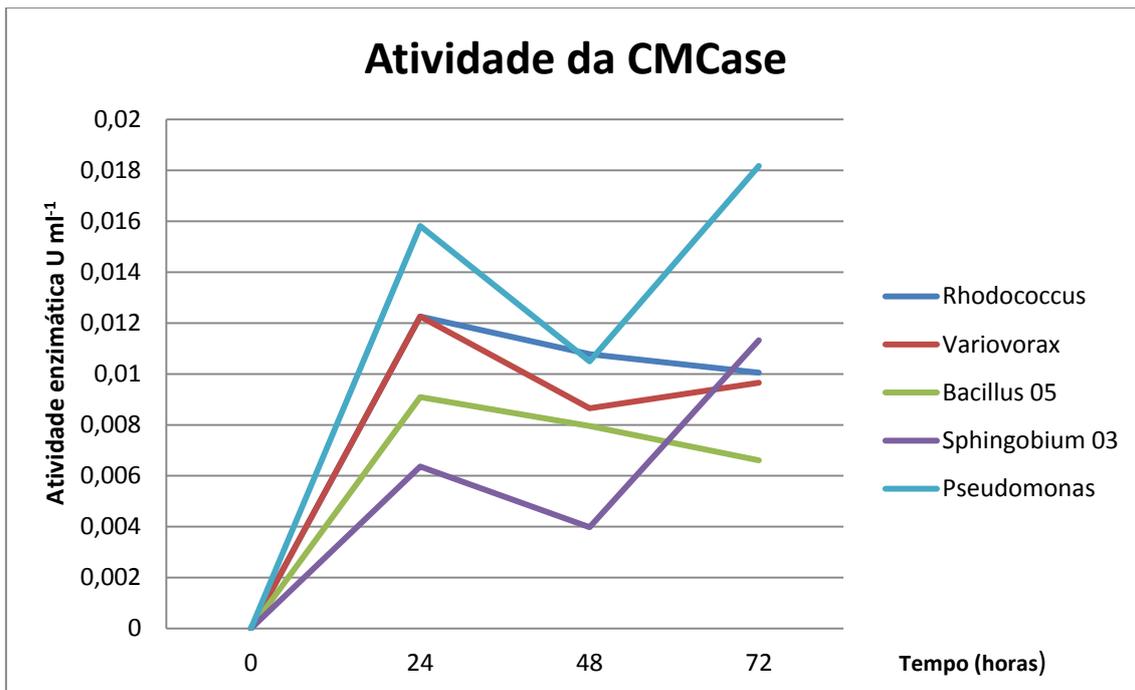


Figura 5. 6: Avaliação da atividade da CMCase

O que se pôde observar durante esse experimento é que todas as bactérias tiveram um pico de atividade em 24 horas e uma atividade enzimática reduzida em 48 horas, sendo que algumas continuaram a diminuir sua atividade no tempo de 72 horas. Outras, como as bactéria *Pseudomonas*, *Sphingobium* (3) e a *Variovorax*, após o tempo de 48 horas tiveram um acréscimo na atividade das enzimas, alcançando o seu pico máximo, com exceção da *Rhodococcus* que teve seu pico em 24 horas.

Novamente, a bactéria *Pseudomonas* destacou-se frente às demais bactérias na produção de CMCase.

5.2.3 Quantificação de Xilanase

A figura 5.7 mostra a influência do tempo de incubação na atividade das enzimas.

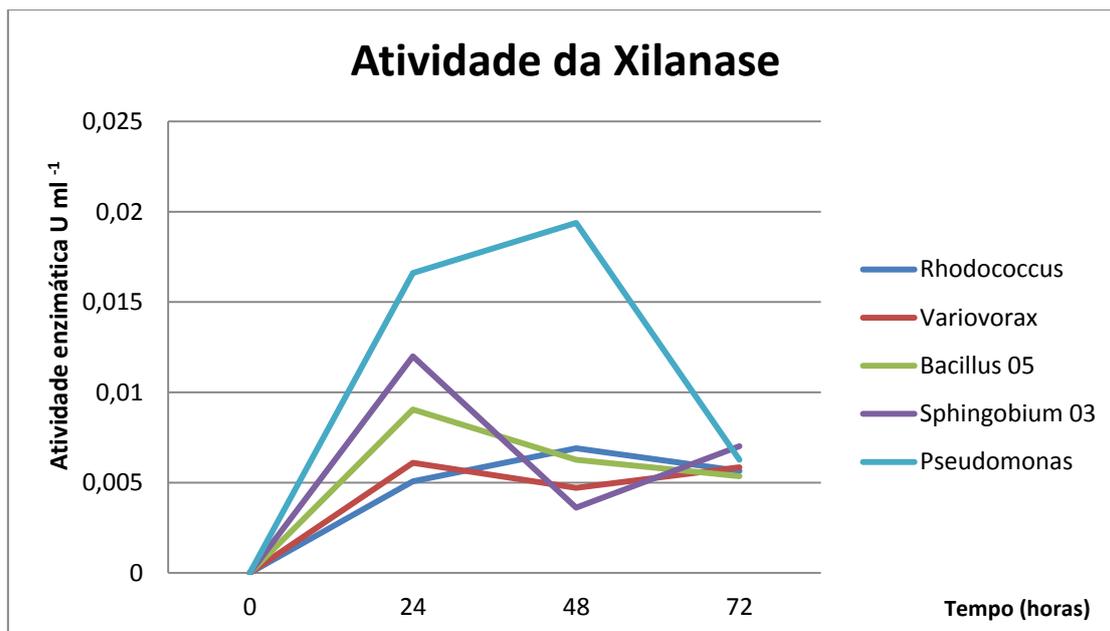


Figura 5. 7: Avaliação da atividade da Xilanase

Observou-se pelo gráfico que as maiores atividades foram apresentadas pelas bactérias *Pseudomonas* e *Sphingobium* (3), mais uma vez bactéria *Pseudomonas* obteve maiores índices de atividade da Xilanase, sendo que *Pseudomonas* e *Rhodococcus* tiveram sua atividade reduzida após 48 horas. As demais bactérias tiveram seu pico de atividade enzimática em 24 horas.

5.3 RESULTADOS DA TERCEIRA ETAPA

Para a realização da terceira etapa estabeleceram-se dois padrões de bagaço de cana (Padrão 1 e Padrão 2) e o aumento da disponibilidade de nitrogênio orgânico. Os resultados da avaliação enzimática dos sobrenadantes para o padrão 1 e 2 indicaram uma melhora significativa em relação aos resultados anteriores.

Os resultados dessa etapa estão expressos nas figuras 5.8 a 5.13, as figuras 5.8 a 5.13 apresentam uma comparação dos resultados dessa etapa com os da etapa 2.

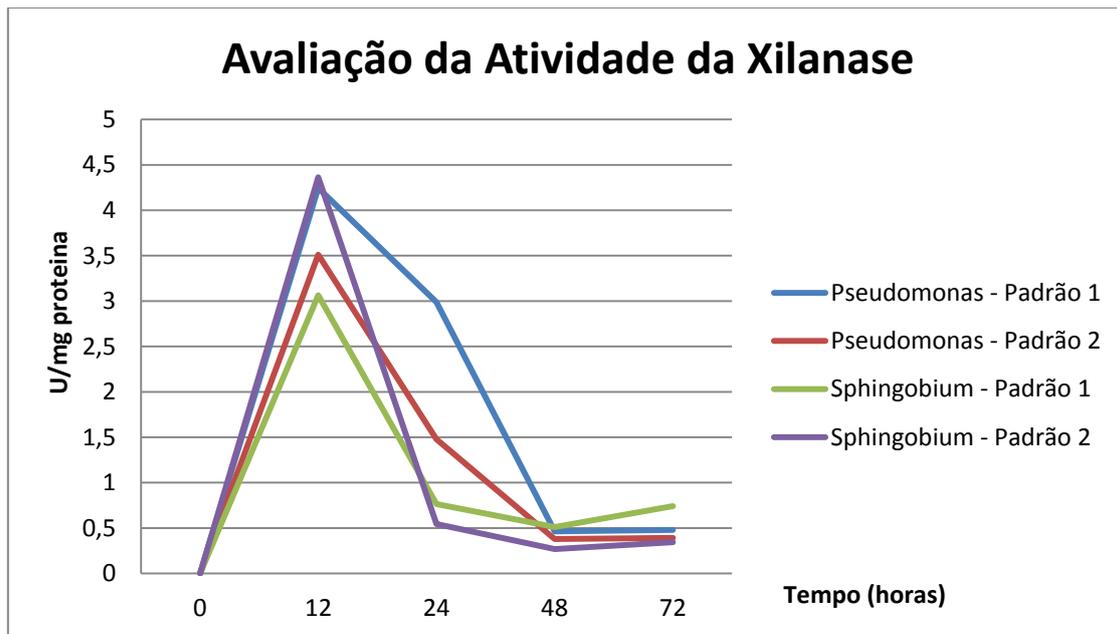


Figura 5. 8: Avaliação da atividade da Xilanase para a terceira etapa utilizando dois padrões

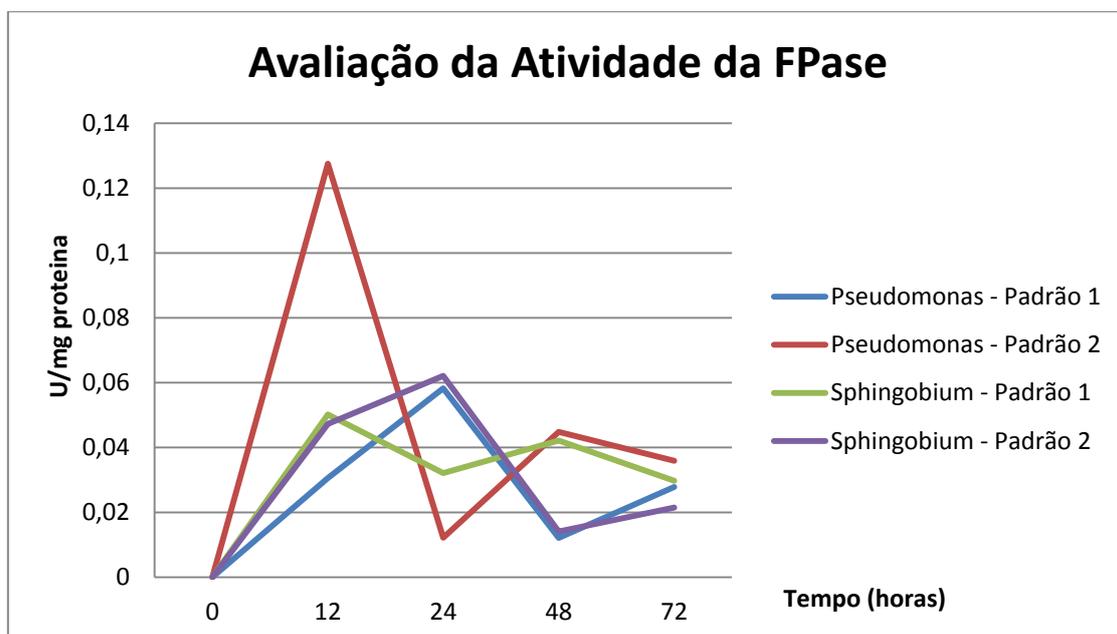


Figura 5. 9: Avaliação da atividade da FPase para a terceira etapa utilizando dois padrões

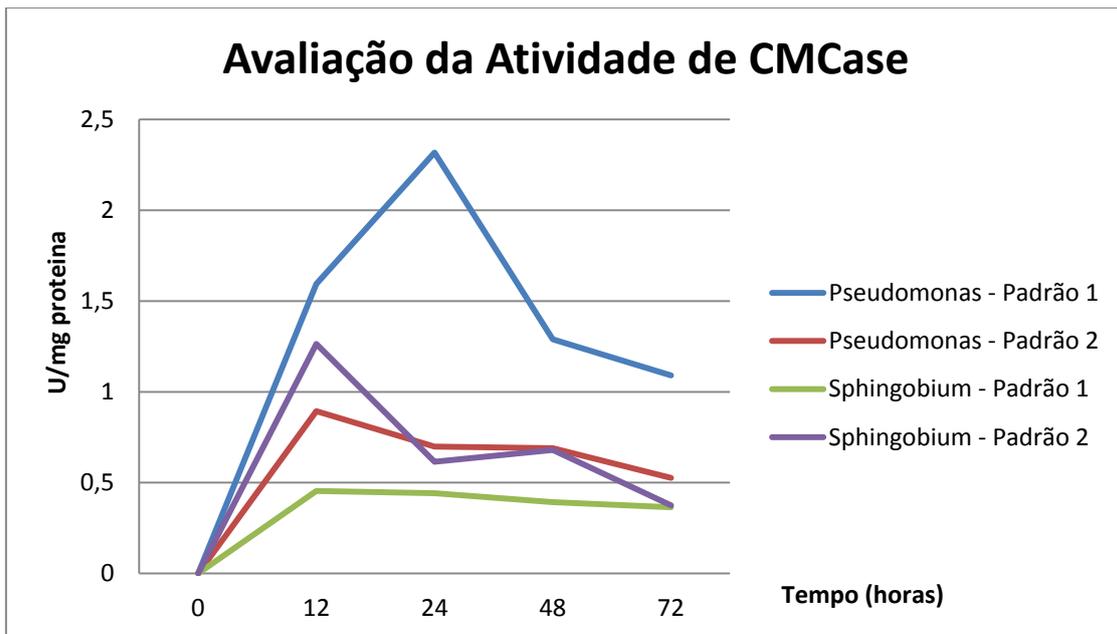


Figura 5. 10: Avaliação da atividade da CMCase para a terceira etapa utilizando dois padrões

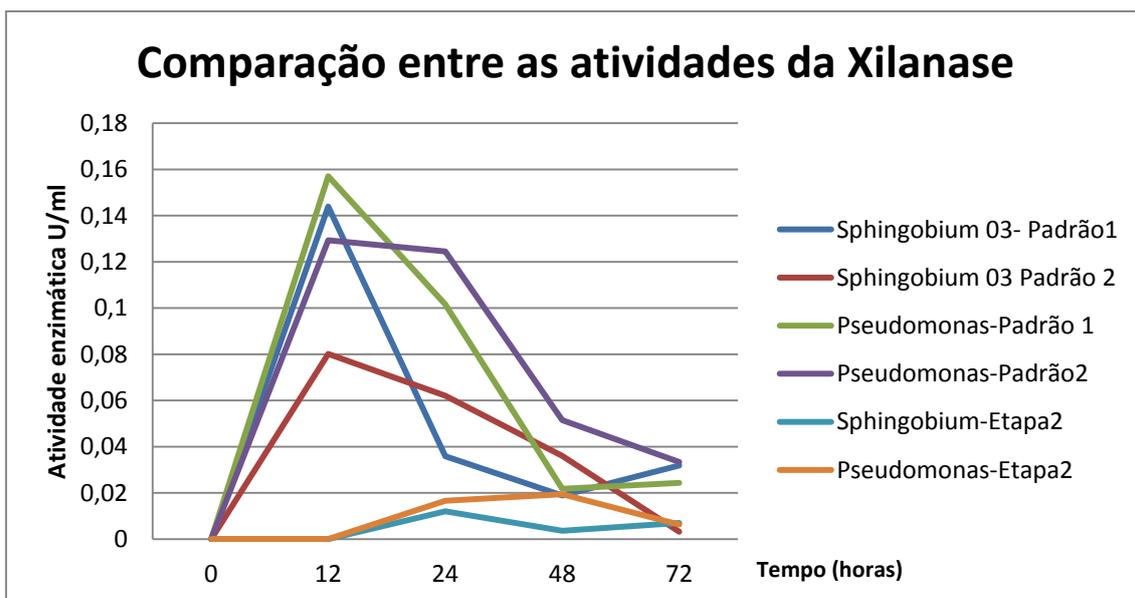


Figura 5. 11: Comparação entre as atividades da Xilanase em (U/ml)

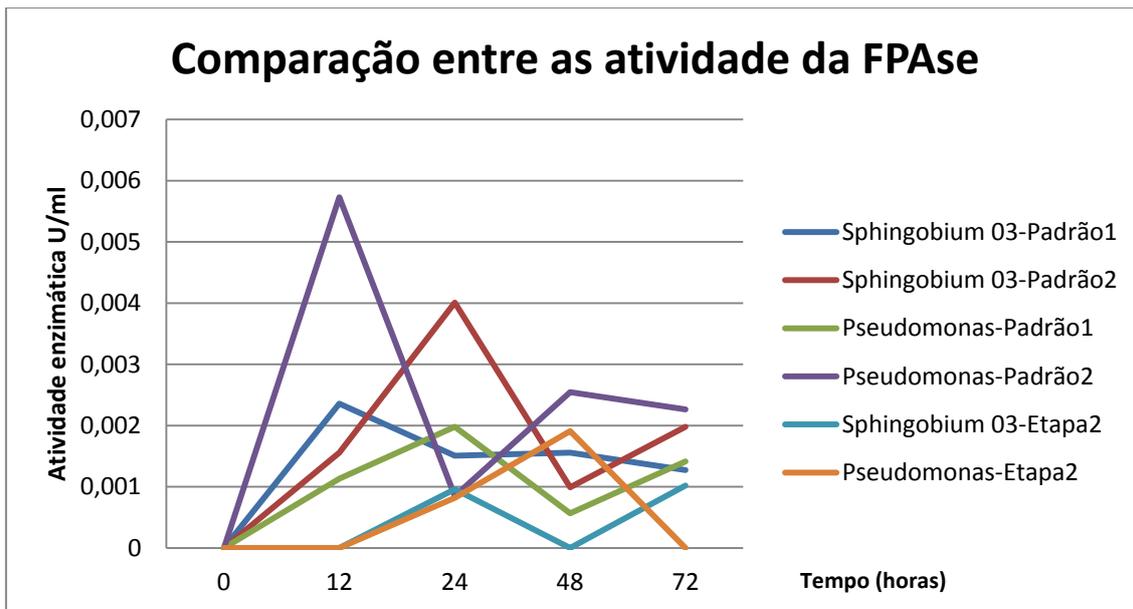


Figura 5. 12: Comparação entre as atividades da FPase em (U/ml)

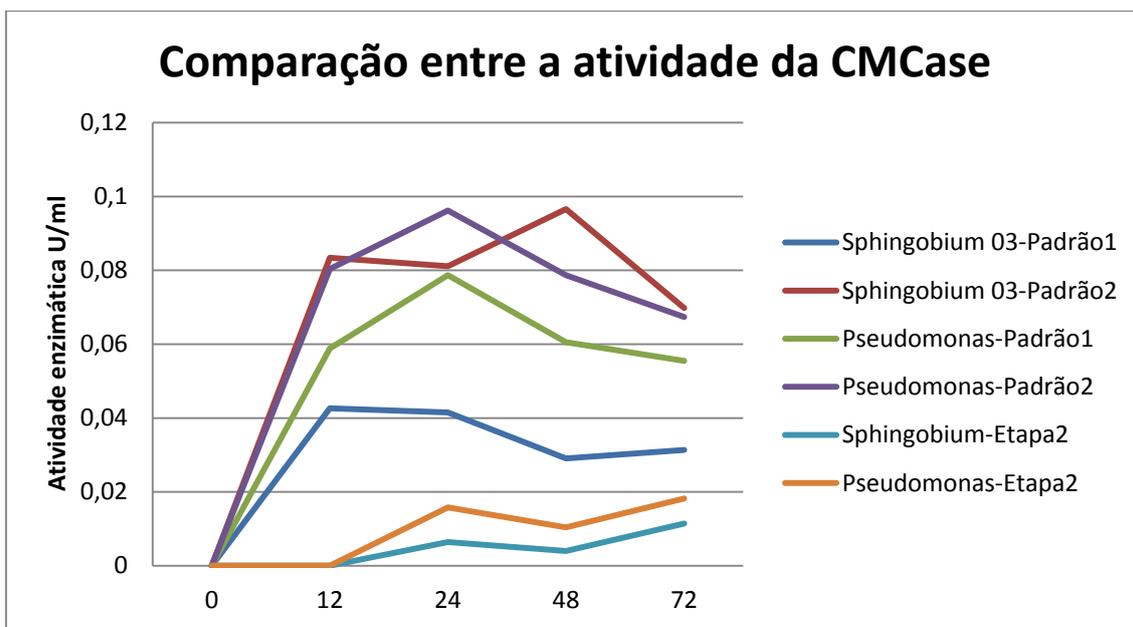


Figura 5. 13: Comparação entre as atividades da CMCase em (U/ml)

6 DISCUSSÃO

Comparações entre as diferentes análises

Dos 11 isolados bacterianos estudados apenas dois (18,2%) não apresentaram atividade enzimática de CMCase (Figuras 5.1 a 5.4). Resultados semelhantes foram obtidos por Anand et al. (2010), que isolou bactérias do trato intestinal do inseto *Bombix mori*, onde 22,2% dos isolados desse inseto não apresentaram atividades enzimáticas para essa mesma enzima.

A partir das análises das atividades enzimáticas de CMCase os microrganismos estudados apresentaram a seguinte classificação: *Pseudomonas*, *Bacillus* (7), *Rhodococcus*, *Sphingobium* (3), Não identificada (1), *Sphingobium* (1), *Variovorax*, *Sphingobium* (2), *Bacillus* (5), Não identificado (2) e *Bacillus* 6, sendo que os três primeiros microrganismos apresentaram o dobro de atividade, se comparados com os demais isolados. Pôde-se verificar também que as bactérias *Sphingobium* (1) e (3) e *Bacillus* (5) somente apresentaram o pico de produção enzimática em 48 horas.

Estes resultados quando comparados com a classificação realizada a partir dos índices enzimáticos obtidos por Koroiva (2011), não apresentaram a mesma classificação, sendo discordante para algumas bactérias. Ao se comparar essas classificações, observou-se que a bactéria *Bacillus* (5) apresentou maior IE (3,85) para o CMC e obteve o pior índice enzimático a partir das fermentações, atingindo o pico de produção em 48h com atividade enzimática de 0,0024 U/ml.

Segundo Hankin (1975) quanto maior a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro da colônia, maior é a atividade enzimática no substrato avaliado. Todavia, a bactéria *Bacillus* (7) que não degradou o CMC (IE igual a zero) obteve o segundo maior índice enzimático quando se realizou o ensaio enzimático a partir das fermentações, atingindo um pico de 0,014 U/ml. A partir dos resultados

apresentados, observa-se que a obtenção do índice enzimático pela relação halo/colônia, embora indique possibilidades de potenciais microrganismos degradadores de celulose, não poderia ser utilizado como único teste para seleção de microrganismos, sendo recomendado que para esta seleção sejam utilizados outros métodos além dessa relação.

Na etapa 2, cinco isolados foram selecionados a partir da etapa 1, levando em consideração seu rendimento nas fermentações para a produção de CMCase e também os IE obtidos de Koroiva (2011). Durante esta etapa, as bactérias *Sphingobium* (3) e *Pseudomonas* se destacaram na capacidade de produzir um complexo celulolítico e xilanolítico a partir de bagaço de cana como fonte de carbono e, por este motivo, foram selecionadas para as etapas posteriores.

Para a atividade de FPase (figura 5.5) todas as bactérias, utilizadas na etapa 2, foram capazes de degradar o papel de filtro, apresentando a ação de um complexo enzimático. Entretanto, essa atividade foi inferior a 0,002 U/ml para todas as bactérias avaliadas.

Utilizando bactérias celulolíticas do trato digestivo, Anand et al (2010) obteve índices máximos de 0,45 U/ml de FPase utilizando o CMC como substrato indutor, e Aguiar et al (2000) utilizando o fungo *Aspergillus niger* obteve índices de 0,1 U/ml e 0,20 U/ml, utilizando bagaço de cana *in natura* e tratado com NaOH, respectivamente.

A utilização de técnicas de pré-tratamentos do bagaço de cana tem como objetivo aumentar sua susceptibilidade à ação das enzimas pela remoção da lignina e redução da cristalinidade da estrutura celulósica (CASTRO, 2010).

Durante este trabalho nenhum tipo de pré-tratamento químico ou térmico foi realizado nos substratos utilizados, uma vez que a introdução dessa etapa na produção de enzimas poderia aumentar seu custo de produção.

Para a produção de CMCase (figura 5.6), a bactéria *Pseudomonas* destacou-se em relação às outras obtendo o pico máximo de atividade de 0,018 U/ml. Em relação à literatura, esse resultado assim como apresentado para FPase, é inferior. Da Vinha et al (2010) utilizando bactéria celulolítica e bagaço de cana como indutor obteve índices de 0,45 U/ml após 48 horas de incubação.

A atividade da Xilanase foi a melhor de todas as três atividades apresentadas pelos microrganismos selecionados. A bactéria *Pseudomonas*, mais uma vez se destacou, obtendo índices de 0,019 U/ml; Anand e colaboradores (2010), por sua vez, obteve índices de atividade de Xilanase 0,15 U/ml.

Durante a segunda etapa, observou-se que para todas as atividades avaliadas os resultados foram inferiores aos de Weber & Agblevor (2005); Heck et al (2002); Nagar e colaboradores (2010), mantendo a condições semelhantes durante os experimentos.

Na terceira etapa, as bactérias *Pseudomonas* e *Sphingobium* (3) foram cultivadas em FS com modificações no meio de cultivo (Berg 2), com maior quantidade de nitrogênio orgânico disponível para o crescimento bacteriano e duas concentrações de substrato indutor.

As atividades enzimáticas para esta terceira etapa foram expressas em atividade específica em relação ao conteúdo de proteínas nos extratos enzimáticos (U/mg de proteína e para efeito comparativo com as etapas anteriores foram também expressa em U/ml.

Observou-se que, ao suplementar o meio com mais nutrientes (Item 4.3), as bactérias obtiveram melhores índices enzimáticos em relação às etapas anteriores (figuras 5.8 a 5.13).

Os resultados que se destacaram nesta etapa foram:

Para a atividade de FPase, a bactéria *Pseudomonas*, utilizando o padrão 2, apresentou índice superior a 0,12 U/mg de proteína; para a atividade da Xilanase as bactérias *Sphingobium*, utilizando o padrão 2, e *Pseudomonas*, utilizando o padrão 1, apresentaram índices superiores a 4,2 U/mg de proteína e para a atividade de CMCase a bactéria *Pseudomonas*, utilizando o padrão 1, apresentou índice superior a 2,3 U/mg de proteína.

Waeonukul e colaboradores (2008), utilizaram a bactéria *Paenibacillus curdlanolyticus* e diferentes substratos indutores para a produção e avaliação da atividade enzimática. Utilizando o bagaço de cana como substrato indutor, obtiveram índices de 0,03 U/mg de proteína para FPase, 0,17 U/mg de proteína para a CMCase e 0,48 U/mg de proteína para Xilanase.

Kusuma e colaboradores (2006), reportam valores de atividade de CMCase superiores a 2 U/mg de proteína, utilizando diferentes resíduos agrícolas como substrato indutor e o microrganismo *Bacillus sp.* Esses resultados são inferiores aos obtidos neste trabalho.

Porém, Basso e colaboradores (2010), utilizando bagaço de cana e linhagens de fungos *T. reesei* obtiveram índices de atividade superiores aos encontrados neste trabalho (FPase de superior a 0,6 U/mg de proteína e acima de 3 U/mg de proteína para a CMCase).

A fim de comparar os resultados da terceira com a etapa anterior e outros trabalhos, também foi expressa a atividade enzimática utilizando a unidade U/ml. Todavia, observou-se que para todas as atividades avaliadas a suplementação do meio e a disponibilidade de maior quantidade de substrato aos microrganismos ocasionou uma melhora significativa nos resultados apresentados (figuras 5.8 a 5.13).

Segundo Palma (2003), para melhor produção de Xilanases, a utilização de extrato de levedura e peptona na composição dos meios de cultivo obtém-se melhores resultados. Os resultados desta pesquisa evidenciaram que o aumento de extrato de levedura e peptona nos meios de cultivo, possibilitou às bactérias melhores condições de produção enzimática, não apenas de Xilanase, como de CMCase e FPAse (figuras 5.8 a 5.13).

Segundo Lynd et al. (2002), as necessidades nutricionais para o crescimento de espécies celulolíticas incluem nitrogênio, fósforo e enxofre, além de outros macro e micronutrientes e vitaminas. De acordo com os resultados observados nas figuras 5.8 a 5.13, a utilização de um meio pobre em nutrientes limitou a produção das enzimas pelos microrganismos estudados, provavelmente por não estarem presentes no substrato indutor utilizado.

Além disso, segundo Castro (2006), o bagaço de cana contém em sua composição uma grande quantidade de lignina e hemicelulose o que dificulta a atuação microbiana sobre o substrato, fator que também pode justificar a baixa produção enzimática.

Outro fator que pode ter influenciado nos baixos valores de atividade enzimática, na etapa 1 e 2, foi o tipo de fermentação escolhida. Segundo Alonso, (2001), na fermentação submersa, devido à grande quantidade de água presente no meio, aliada ao fato das celulases serem enzimas extracelulares, o sobrenadante bruto obtido contém em sua composição uma quantidade de enzimas diluída.

O bagaço de cana, embora apresentando uma grande quantidade de lignina e hemicelulose presentes em sua estrutura, pode ser utilizado para produzir enzimas celulolíticas e xilanolíticas, utilizando isolados do trato digestivo de larvas de *Stenochironomus*. Em virtude do potencial biotecnológico apresentado pelos

microrganismos estudados no presente trabalho, novos estudos devem ser executados com o objetivo de otimizar os métodos de cultivo utilizando diferentes resíduos agrícolas como substrato indutores, além do bagaço de cana, otimizar a composição do meio de cultura e o cultivo em outras condições que podem interferir na produção de Xilanases e Celulases. Além disso, as enzimas produzidas pelas bactérias devem ser melhor caracterizadas para compreensão dos seus mecanismos de atuação.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os isolados do trato digestivo de larvas de *Stenochironomus* foram capazes de produzir um complexo enzimático celulolítico, utilizando-se do bagaço de cana como indutor, sendo influenciados pela adição de fontes de nitrogênio orgânico, apresentando melhores resultados para as atividades enzimáticas a partir de sua inclusão no meio de cultivo.
- A metodologia utilizada para as determinações das atividades enzimáticas mostrou-se eficaz para a triagem e seleção das bactérias estudadas.
- Dentre as bactérias avaliadas, as que apresentaram maior potencial biotecnológico, para a produção das enzimas estudadas foram a *Pseudomonas* e *Sphingobium* (3).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANEZ, T; BONIZIO, R.C; RIBEIRO, E.M.S. Uma análise da estrutura de custos do setor sucroalcooleiro brasileiro Custos e @gronegocio on line - v. 4, n. 1 - Jan/Abr - 2008. <http://www.custoseagronegocioonline.com.br/numero1v4/Sucroalcooleiro.pdf>. Acesso em: Dez 2010.
- AGUIAR; C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção De Celulases E Xilanase Por *Aspergillus Niger* Iz9 Usando Fermentação Submersa Sobre Bagaço De Cana-de-açúcar, B.CEPPA, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 5770, jan./jun.2000
- ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- ANAND, A.A.P.; VENNISON, S.J.; SANKAR, S.G.; PRABHU, D.I.G.; VASAN, P.T.; RAGHURAMAN, T, GEOFFREY, C.J.; VENDAN S.E. 2010. Isolation And Characterization Of Bacteria From The Gut Of *Bombyx Mori* That Degrade Cellulose, Xylan, Pectin And Starch And Their Impact On Digestion. *Journal Of Insect Science* 10:107 Available Online: Insectscience.Org/10.107, 2010
- AQUARONE, E, BORZANI, W., LIMA, U.A., 1990. *Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial*. v. 2. São Paulo: E. Blücher.
- ARISTIDOU, A. & PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 11, pp. 187-198, 2000.
- AWAFO, V.A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. 1997. 255 f.Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.
- BALLESTEROS, M.. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*,161(1):29-34, 2001

- BASTOS, V. D. Etanol Alcoolquímica e biorefinarias. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.
- BASSO, T. P.; GALO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-acucar e madeira em decomposição, *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010
- BERG, B., B. V. HOFSTAN, AND B. PETTERSON. Growth and cellulase formation by *Cellvibrio fulvus*. *J. Appl. Bacteriol.* 35: 201-214, 1972.
- BÉGUIN, P. & AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 13, pp. 25-58, 1994.
- BIDLACK, J., MALONE, M. & BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* v. 72, pp. 51-56, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAGATO, I. R., SIQUEIRA, E. S., GRAZIANO, G. O., SPERS, E. E.. Produção de açúcar e álcool vs. responsabilidade social corporativa: as ações desenvolvidas pelas usinas de cana-de-açúcar frente às externalidades negativas, *Gest. Prod.*, São Carlos, v. 15, n. 1, p. 89-100, jan.-abr. 2008.
- CASTRO, A. M. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*); Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2006.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA. N. J.; Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais; *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

- D'ALMEIDA, M. L. O. Celulose e Papel: Tecnologia de fabricação do papel. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT. 2v 2a ed (ISBN: 85-09-00039-5 – obra completa), 1988.
- DA VINHA, F. N. M.; OLIVEIRA, M. P. G.; FRANCO, M.N.F.; MACRAE, A. BOM, E. P. S.; NASCIMENTO, R.P. COELHO, R. R. R; 2, Cellulase Production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 Using Lignocellulosic Biomass as Inducer Substrate; *Appl Biochem Biotechnol*, DOI 10.1007/s12010-010-9132-8, 2010
- DEMAJORIVIC, J., 1995. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. *Revista de Adm. De Empresas*, 35 (3), pp. 88-93.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v.59, p.257-268, 1987.
- GOMES, I., GOMES, J., STEINER, W. & ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 701-707, 1992.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The Use Of Solid Media For Detection Of Enzymes Production By Fungi. *Mycologia*, V. 67, P. 597-607, 1975.
- HECK JX, HERTZ PF, AYUB MAZ. Cellulase and xylanase production by isolated Amazon bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Braz J Microbiol*;33:213–8. 2002
- HECK, J. X. Produção, purificação e caracterização de Xilanasas (EC 3.2.13) excretadas por isolados amazônicos de Bacillos em cultivo semi solido. 158 p. Tese (Doutorado em biologia celular e molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. v. 280, p. 309-316. 1991.

International Union of Biochemistry. Enzyme nomenclature. Academic Press, Inc., Orlando, Florida. 1992.

KOROIVA,R; SILVA, F.H.; FONSECA–GESSNER, A.A.; SOUZA, C.W.O. Lignocellulolytic bacteria associated in larval gut of the *Stenochironomus* and *Xestochironomus* (Diptera: Chironomidae). Trabalho em redação do projeto de mestrado do primeiro autor.

KUBICEK, C.P. et al. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 15, p.90-99. 1993.

KUSUMA, K., CHON, G. H., LEE. J. S., KONGKIATTIKAJORN, J., RATANAKHANOKCHAI, K., KYU, K. L. LEE, J. H., ROH, M. S. CHOI, Y. Y., PARK, H, LEE, Y. S. Hydrolysis of Agricultural Residues and Kraft Pulps by Xylanolytic Enzymes from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain BK, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2006), 16(8), 1255–1261

LINS, C. SAAVEDRA, R. Sustentabilidade corporativa no Setor Sucroalcooleiro Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável, Rio de Janeiro, 2007. 54p

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

MENEZES, C. R., SILVA, I. S., DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas *Estudos Tecnológicos* - Vol. 5, nº 1:68-78, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NAGAR, S.; GUPTA, V. K.; KUMAR, D.; KUMAR, L. KUHAD, R. C.; Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in

submerged fermentation; *Ind Microbiol Biotechnol* 37:71–83 DOI 10.1007/s10295-009-0650-8, 2010

NASCIMENTO, R. P. Otimização da produção de endoxolanases por *Streptomyces malaysiensis* AMT utilizado resíduos agro-industriais; 159p Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro 2006.

NOVO INDUSTRI S.A.(Dinamarca), Celulase determination: Division Enzymes,N. AF 149/5 GB,1978.

NORKRANS, B. Cellulose and cellulolysis. *Appl. Microbiol.* v. 9, pp. 91-130, 1967.

PALMA, M.B. Produção de xilanases por *thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis, 2003. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17-24, 2000.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim. da URI, 2006.

PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, 2003, p.863-871.

- RODRIGUES, D.ORTIZ, L. Em direção à sustentabilidade da produção de etanol de cana de açúcar no Brasil. Brasil, 2006. 37p
- SANROMAN, M.A.; COUTO, S.R. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering* 76, 291–302, 2006.
- SANTOS, O. I. B.; PASQUALI STEINHORST G; RODRIGUES, F. C.; PADULA, A D; BORBA, R. O. Análise preliminar da produção de etanol a partir de celulose no Brasil: Caminhos e desafios para a produção de álcool no Rio grande do sul. XLV congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. UFRGS, Porto Alegre Brasil. 2007.
- SANTOS, J. R. A., GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.11, n.1, p.27-33, 2009.
- SCANDIFFIO, M. I. G. Análise prospectiva do álcool combustível no Brasil – cenários 2004-2024. 201p Tese doutorado em Planejamento de Sistemas Energéticos. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas. 2005.
- SOUZA, E. L. L.; MACEDO, I. C. Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v.83, p.1-11, 2002.
- SZENGYEL, Z. Ethanol from wood: Cellulase enzyme production. 2000. 61 f. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.
- THEODORO, J. M. Considerações sobre os custos ambientais decorrentes do gerenciamento dos resíduos sólidos e dos efluentes industriais gerados no setor sucroalcooleiro: Um estudo de caso, Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.) – Centro Universitário de Araraquara – 2005.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation
Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

WAEONUKUL, R.; Kyu, K. L.; Sakka, K.,RATANAKHANOKCHAI, K. Effect of Carbon
Sources on the Induction of Xylanolytic-Cellulolytic Multienzyme Complexes in
Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6, Biosci. Biotechnol. Biochem., 72 (2), 321–
328, 2008

WEBER J, AGBLEVOR FA. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase
production. Process Biochem 2005;40:669–76.

ANEXOS

ANEXO I – COMPOSIÇÃO DE SOLUÇÕES UTILIZADAS

As soluções preparadas com exceção da solução de DNS foram armazenadas sob refrigeração.

Tampão Acetato de Sódio 0,2 M, pH 4,8

Para o preparo do tampão Acetato de Sódio, foi preparado duas solução em separado.

Solução A: Solução de Ácido Acético 0,2M (11,55g em 1000 mL de água destilada).

Solução B: Solução de Acetato de Sódio 0,2M (27,2 g de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ em 1000 mL de água destilada).

Para se obter 100mL de tampão, foi misturado em um frasco tipo âmbar 29,6 mL da solução A com 70,4 mL da solução B.

Tampão Citrato de Sódio 50 mM, pH 4,8

Para o preparo do tampão Citrato de Sódio, foi preparado duas solução em separado.

Solução A: Solução de Ácido Cítrico 0,1M (19,21g em 1000 mL de água destilada).

Solução B: Solução de Citrato de Sódio 0,1M (29,41 g de $C_6H_6O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ em 1000 mL de água destilada).

Para se obter o tampão com o pH 4,8 foi misturado em um fraco âmbar 17,5 mL da solução A com 32,5 mL da solução B e adicionado 50 ml de água destilada.

Solução de Carboximetilcelulose (CMC) 4%

Para o preparo da solução de CMC 4%, foi pesado 4 g de Carboximetilcelulase de baixa viscosidade em balança analítica e dissolvido em 100 ml de tampão citrato, 50mM, pH 4,8, com o auxílio de um bastão magnético e placa de agitação.

Solução Xilana 1%

Para o preparo de 100mL de solução xilana 1%, foi pesado 1g de Xilana que foi dissolvido em 50 ml de tampão acetato de sódio 0,2 M e 50 ml de água destilada. Após a dissolução, a solução foi aquecida em microondas até a solução se tornar límpida.

Ácido Dinitrosalicílico (DNS)

Para o preparo da solução DNS, 10g de DNS foi dissolvido em 200 mL de NaOH 2N (16g em 200 ml de água). Após a dissolução total, foi adicionado 500 ml de solução de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio) (300g de sal de Rochelle em 500 ml de água destilada).

A solução foi aquecida em banho de 40°C até a completa dissolução do DNS. Após a solução foi avolumada em balão volumétrico, para 1000 mL com água destilada e armazenada em frasco escuro protegido da luz com papel de alumínio.

A cada preparo da solução de DNS, a mesma foi padronizada conforme descrito no anexo II

ANEXO II – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLICOSE E TUBO PADRÃO

Para realizar a curva de calibração de glicose, duas curvas foram realizadas uma curva padrão de 1 a 10 $\mu\text{Mol/ml}$ com intervalos de 1 $\mu\text{Mol/ml}$ e outra com as seguintes concentrações de glicose: 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1; 1,5 e 2 $\mu\text{Mol/ml}$.

Para avaliar a confiabilidade do DNS utilizado nas análises, diferentes tubos, utilizado como padrão de glicose de (1 e 2 $\mu\text{Mol/ml}$) foram preparados e armazenados em diferentes eppendorfs congelados a -22°C .

A cada nova análise um tubo padrão de glicose foi descongelado, realizado a reação de açúcares redutores, com o objetivo de verificar a confiabilidade do DNS, comparando com os dados iniciais.