

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDAS POR
UM ISOLADO DE *Bacillus* sp.

Évilin Giordana de Marco

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas – UFRGS

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Setembro, 2012.

CIP - Catalogação na Publicação

De Marco, Évilin Giordana
Produção e caracterização de celulases produzidas
por um isolado de Bacillus sp. / Évilin Giordana De
Marco. -- 2012.
97 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. celulase. 2. Bacillus sp.. 3.
carboximetilcelulose. I. Van Der Sand, Sueli
Teresinha, orient. II. Título.

Agradecimentos

A Deus, pela minha vida.

À minha família, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio e amor incondicional. Principalmente a minha mãe, Rosester de Marco, pelo incentivo e dedicação.

Ao Volnei, pela paciência, amor e carinho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Sueli T. Van Der Sand, pelos esclarecimentos, ensinamentos e pela orientação deste trabalho.

Ao professor Dr. Amauri Simonetti pelos conselhos e pelo auxílio.

Ao professor Dr. Adriano Brandelli e a doutoranda Simone Pieniz pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, principalmente a Sayonara e Leila pela presteza em todos os momentos.

Às colegas de mestrado Karina Heck da Silva, Gisele Nachtigall, Mariana Wanderley Duarte e Daniele Vargas de Oliveira pela ajuda e, principalmente, pelas conversas.

Às colegas do laboratório 164 – Ana Bárbara, Ana Paula, Paula, Themis, Tiele e 209 – Cristina, Elisandra, Tiane, Franciele e, em especial, a Michele Mann pela ajuda na finalização deste trabalho.

Às gurias da Bio, em especial à colega de mestrado Tatiana Colla pela amizade.

À banca, Dra. Sabrina Salamoni, Dr. Adriano Brandelli e Dr. Sidnei Mitidieri da Silveira pelas contribuições.

E a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDAS POR UM ISOLADO DE *Bacillus* sp.¹

Autor: Évilin Giordana de Marco

Orientadora: Dr. Sueli T. Van Der Sand

RESUMO

Durante o processo de compostagem, a degradação de resíduos orgânicos é acompanhada e direcionada pela sucessão de populações microbianas que exibem uma ampla variedade de capacidades funcionais. Um total de 183 bactérias isoladas de uma leira de compostagem foram avaliadas quanto a capacidade de produção de celulases. Destas, após os primeiros ensaios, apenas um isolado foi selecionado para a realização dos testes de caracterização. Curvas de crescimento foram realizadas e em intervalos de 2 horas de crescimento foram avaliados a atividade enzimática, o pH, a contagem de células viáveis e endósporos. O isolado foi analisado quanto sua capacidade de produção de carboximetilcelulase em meio de cultivo acrescido de quatro diferentes substratos: carboximetilcelulose, celulose microcristalina, palha de trigo e casca de arroz. O meio de cultivo suplementado com carboximetilcelulose induziu a maior atividade enzimática após 6 horas de incubação ($0,12 \text{ UEA mL}^{-1}\text{min}^{-1}$). A maior atividade CMCase foi observada a 60°C ($0,14 \text{ UEA mL}^{-1}\text{min}^{-1}$) tanto para o extrato bruto quanto para a enzima parcialmente purificada, após 30 e 120 minutos de incubação, respectivamente. A melhor atividade do extrato bruto foi observada em pH 9,0. A exposição da enzima parcialmente purificada ao detergente Triton X-100 (1,0%) induziu uma maior hidrólise do substrato ($0,2 \text{ UEA mL}^{-1}\text{min}^{-1}$). A análise por SDS-page permitiu observar a presença de uma única banda no gel, sugerindo uma celulase com massa molecular de 20 kDa.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (97 p.). Maio, 2012.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASES PRODUCED BY ISOLATED FROM *Bacillus* sp.¹

Author: Évilin Giordana de Marco

Adviser: Dr. Sueli T. Van Der Sand

ABSTRACT

During the composting process, degradation of organic waste is accomplished and driven by a succession of microbial populations exhibiting a broad range of functional capabilities. A total of 183 bacteria isolated from a composting process were evaluated for the capacity for hydrolyze cellulose. Out of that, after the first screening one isolate was selected for the further assays. Growth curves were done and every two hours sample was collected and enzyme activity, pH, viable cell count and endospores were determined. The isolate was evaluated for its ability to produce carboxymethyl cellulase in culture medium supplemented with four different substrates: carboxymethyl cellulose, microcrystalline cellulose, wheat straw and rice husk. The culture medium supplemented with carboxymethyl cellulose induced higher enzyme activity after 6 hours of incubation ($0,12 \text{ UEA mL}^{-1}\text{min}^{-1}$). The highest CMCase activity was observed at 60°C ($0,14 \text{ UEA mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$) for both the crude and partially purified enzyme after 30 and 120 minutes of incubation, respectively. The best activity of the crude extract was observed at pH 9,0. The addition of detergent Triton X-100 (1,0%) to the purified enzyme, induced to a higher hydrolysis of the substrate ($0,2 \text{ UEA mL}^{-1}\text{min}^{-1}$). Analysis by SDS-page allowed the observation of only one band in the gel suggesting one cellulase with a molecular mass of 20 kDa.

¹ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (97 p.).May, 2012.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Polímeros de origem vegetal	3
2.1.1 Celulose	3
2.1.2 Lignina	7
2.1.3 Hemicelulose	8
2.2 Celulase	9
2.3 Microrganismos celulolíticos	14
2.3.1 Fungos	14
2.3.2 Bactérias	16
2.3.2.1 Gênero <i>Bacillus</i>	19
2.4 Aplicações das celulases	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Microrganismos	24
3.2 Atividade celulolítica em meio sólido	24
3.3 Atividade celulolítica em meio líquido	25
3.3.1 Curva de crescimento	25
3.3.2 Atividade enzimática em meio líquido com carboximetilcelulose	26
3.3.3 Atividade enzimática em meio líquido com diferentes substratos	26
3.4 Atividade enzimática	27
3.5 Contagem de células viáveis totais e endósporos	28
3.5.1 Contagem de células viáveis	28
3.5.2 Determinação do número de endósporos	28

3.6 Purificação parcial da enzima	29
3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio	29
3.6.2 Cromatografia de gel filtração	30
3.7 Caracterização do extrato bruto e da enzima parcialmente purificada.....	30
3.7.1 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática	30
3.7.2 Determinação do pH ótimo da atividade enzimática e estabilidade do extrato bruto frente ao pH	31
3.7.3 Estabilidade térmica da enzima parcialmente purificada e do extrato bruto	31
3.7.4 Efeitos de detergentes sobre a atividade da enzima parcialmente purificada	32
3.8 Determinação da massa molecular da celulase.....	32
3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida	32
3.9 Determinação da concentração de proteína solúvel	33
3.10 Identificação do isolado bacteriano	33
3.10.1 Identificação Bioquímica	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Atividade celulolítica em meio sólido.....	34
4.2 Atividade celulolítica em meio líquido	38
4.2.1 Curva de crescimento	38
4.2.2 Atividade enzimática em meio líquido com carboximetilcelulose	40
4.2.3 Atividade enzimática em meio líquido com diferentes substratos	42
4.3 Determinação do pH, contagem de células viáveis e endósporos	47
4.4 Purificação parcial da enzima	51
4.5 Caracterização do extrato bruto e da enzima parcialmente purificada.....	55
4.5.1 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática	55
4.5.2 Termoestabilidade da enzima parcialmente purificada	59

4.5.3 Efeito do pH sobre a atividade de hidrólise e na estabilidade das celulasas do extrato bruto	61
4.5.4 Efeito de detergentes sobre a atividade da enzima parcialmente purificada	63
4.6 Determinação da massa molecular	65
4.7 Identificação bioquímica	67
5 CONCLUSÕES	70
6 PERSPECTIVAS	71
7 REFERÊNCIAS	72
8 ANEXO I	84

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Características morfológicas de bactérias celulolíticas.....	18
Tabela 2. Isolados produtores de CMCase em meio sólido proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com CMC 0,5% (m/v) e seus respectivos halos de hidrólise (mm ± DP).....	36
Tabela 3. Índice de atividade enzimática (IE) em meio sólido proposto por Ramachandra et al., (1987), suplementado com CMC 0,5% (m/v).....	38
Tabela 4. Atividade enzimática de CMCase (UEA mL ⁻¹ min ⁻¹) dos isolados selecionados e cultivados a temperatura de 50°C, em meio proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com CMC 0,5% (m/v) (N = 6).....	41
Tabela 5. Relação de UFC/mL (UFC x 10 ⁶ ± DP) e endósporo/ml (End x 10 ⁴ ± DP) em diferentes substratos e tempo de incubação (N= 6).....	50
Tabela 6. Quadro de purificação da celulase produzida pelo isolado 380, a 50°C.....	55
Tabela 7. Efeito da adição de detergentes na atividade enzimática da enzima parcialmente purificada (N = 3).....	64
Tabela 8. Resultados para os testes bioquímicos realizados com o isolado 380.....	69

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose.....	5
Figura 2. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose (A: celulasas livres; B: celulosomos).....	12
Figura 3. Halo de hidrólise do isolado 380, em meio proposto por Ramachandra et al., (1987), suplementado com 0,5% (m/v) de CMC a 50°C, corado com lugol 1,0% (v/v).....	35
Figura 4. Curva de crescimento para o isolado 380, em meio proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 1,0% (m/v) de glicose, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).....	39
Figura 5. Curva de crescimento para o isolado 380 em meio proposto por Ramachandra et al. (1987) suplementado com 0,5% (m/v) de CMC, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).....	39
Figura 6. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% (m/v) de CMC, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).....	43
Figura 7. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% de casca de arroz, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).....	44
Figura 8. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% de palha de trigo, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).....	44
Figura 9. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% de celulose microcristalina, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).....	45
Figura 10. Atividade enzimática da enzima precipitada em diferentes concentrações de sulfato de amônio (N = 6).....	52
Figura 11. Perfil de atividade enzimática nas frações coletadas a partir da eluição da enzima precipitada em coluna de gel filtração Sephadex G-100 (N = 6).....	54
Figura 12. Efeito da temperatura sobre a atividade de hidrólise da enzima do extrato bruto (EB) e do purificado (PU). A atividade foi determinada com 0,5% CMC nas temperaturas indicadas (N = 6).....	56
Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade de hidrólise a termorresistência do extrato bruto. A atividade CMC _{Case} foi determinada pelo ensaio enzimático nas temperaturas indicadas. A estabilidade foi determinada incubando-se o extrato bruto nas diferentes temperaturas por 30 minutos, seguida do ensaio enzimático (N = 6).....	59

- Figura 14.** Termoestabilidade da enzima parcialmente purificada quando exposta a 60°C por 2 horas, seguida do ensaio enzimático a 60°C (N = 3).....60
- Figura 15.** Efeito do pH sobre a atividade de hidrólise e sobre a estabilidade da enzima no extrato bruto. A atividade CMCase foi determinada nos pHs indicados. A estabilidade foi determinada incubando-se a enzima em diferentes pHs, seguida do ensaio enzimático a 60°C (N = 3)...62
- Figura 16. (A):** Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). M: marcador de peso molecular, EB: extrato bruto, P: enzima parcialmente purificada, Setas brancas: banda de proteína. **(B):** Gel de atividade enzimática da celulase nas três fases do processo de purificação. EB: extrato bruto, PR: precipitado. PU: purificado.....67
- Figura 17.** Coloração de endósporo do isolado 380. Aumento: 100x. Seta: endósporo.....68

1 INTRODUÇÃO

A celulose é o polímero mais abundante da biomassa vegetal e devido a sua composição, a bioconversão exige condições específicas para a completa hidrólise deste composto. Muitos microrganismos estão envolvidos neste processo e, para isso, necessitam produzir uma diversidade de enzimas com diferentes especialidades.

O interesse industrial nestas enzimas vem aumentando gradativamente nos últimos anos, desde que as agências de proteção ambiental têm restringido a liberação de compostos químicos no ambiente. Uma alternativa para este fato foi usar a capacidade que os microrganismos tem para degradarem moléculas de interesse através de seu potencial enzimático. Estudos envolvendo a busca por microrganismos com estas características têm levado a otimização de alguns processos através de enzimas de ação específica sob as diferentes condições necessárias.

O uso destas enzimas têm sido explorado no âmbito da utilização da enzima purificada em produtos comercializados ou com o próprio

microrganismo em sua forma latente – a escolha depende da aplicação. Na indústria de detergentes se emprega a enzima purificada e se busca por aquelas que apresentem grandes potenciais em ambientes principalmente alcalinos. Já no tratamento de efluentes das indústrias de papel, a aplicação direta do microrganismo têm demonstrado resultados satisfatórios, além de um custo menor.

A bioconversão da matéria lignocelulósica pelos microrganismos é de grande importância para o ciclo de carbono. Processos como a compostagem estão entre as melhores formas de reciclagem de moléculas sem agredir o meio ambiente. Analisando estes aspectos se observa a grande importância da presença de microrganismos em processos industriais e ecológicos. Por isso este trabalho teve como objetivos: selecionar microrganismos isolados de uma leira compostagem com potencial celulolítico em temperaturas elevadas; selecionar o melhor produtor e avaliar a produção de carboximetilcelulase em diferentes substratos; caracterizar o extrato bruto e enzima purificada quanto a atividade e estabilidade em diferentes temperaturas e faixas de pH, e determinar sua massa molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polímeros de origem vegetal

A biomassa vegetal consiste quase integralmente de lignocelulose, sendo esta formada por três tipos de polímeros – celulose, hemicelulose e a lignina.

2.1.1 Celulose

A celulose é um polímero linear composto de subunidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4. A ligação beta resulta de uma rotação de 180° do plano de unidades alternadas de glicose, resultando em uma cadeia molecular balanceada que torna possível uma molécula de cadeia linear capaz de se orientar em estruturas fibrosas e cristalinas de alta resistência à tensão. A celulose possui uma extremidade redutora no carbono 1, e outra não redutora no carbono 4 (figura 1) (Sandgren et al., 2005).

Considerado o polímero mais abundante da biomassa vegetal, a celulose corresponde a aproximadamente 45% do peso seco das plantas. Além disso, ela pode aparecer na forma cristalina, paracristalina e amorfa, sendo que esta última apresenta uma conformação que confere maior suscetibilidade à biodegradação (Béguin & Aubert, 1994). A natureza cristalina da celulose implica na estrutura ordenada na qual os átomos são fixados, e neste arranjo as microfibrilas estão suficientemente compactadas para impedir a penetração de qualquer molécula (Lynd et al, 2002).

A celulose é sintetizada na natureza como moléculas individuais (cadeias lineares de resíduos glicosil) que interagem umas com as outras através de ligações de hidrogênio. A estrutura resultante destas interações (fibrila elementar) é insolúvel em água e apresenta alto grau de cristalinidade. Quatro fibrilas elementares são então agrupadas por uma monocamada de hemicelulose, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (associadas entre si por meio de interações físicas e ligações covalentes). O composto natural resultante desta íntima associação é denominado microfibrila celulósica (Fengel & Wegener, 1989; Pizzi & Eaton, 1985; Ramos, 2003). Estas microfibrilas estão presentes na parede celular secundária de todas as plantas.

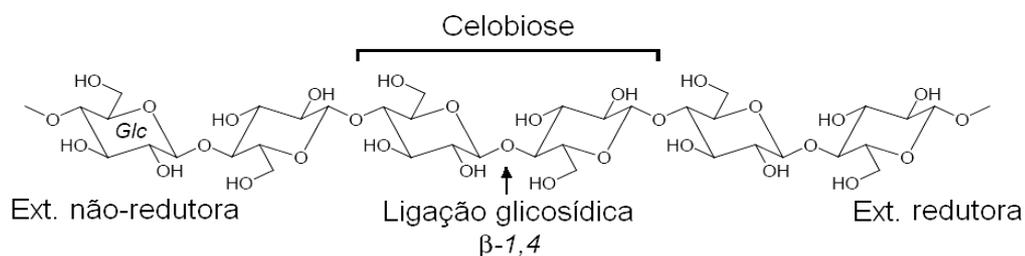


Figura 1. Estrutura da celbiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren, 2005).

O grau de polimerização (DP) da celulose varia amplamente de acordo com a fonte, variando de 300 em fibras de madeira a 15.000 em fibras de plantas e celulose bacteriana (Ishikawa et al., 1997).

A celulose nativa ou celulose I é o tipo mais cristalino no qual há duas formas: I_α e I_β . Enquanto a celulose cristal I_α tem uma unidade celular triclinica, a celulose cristal I_β tem uma unidade celular monoclinica. Ambas, celulose I_α e I_β estão presentes na estrutura da celulose nativa. Outros alomórficos de celulose são possíveis, entre os quais os mais comuns são a celulose II, III e IV. A celulose II pode ser formada por mercerização ou regeneração da celulose I. No processo de regeneração é feita uma solução isotrópica de celulose na forma de um derivado, que é então extrudada através de um orifício giratório após a recristalização da celulose durante a coagulação; na mercerização a celulose é tratada com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) em condições específicas, e dependendo da concentração da solução, da temperatura e da agitação mecânica, é possível converter a celulose I (Huber et al., 2012). Celulose III pode ser formada a partir tanto da celulose I quanto da celulose II por tratamento com amônia líquida. A celulose

IV pode ser preparada por aquecimento em glicerol da celulose III (Zugenmaier, 2001).

A celulose é encontrada na natureza quase que exclusivamente na parede vegetal das plantas, embora ela seja produzida por alguns animais (tunicados) e algumas bactérias. Embora a celulose produzida pelo *Acetobacter xylinum* apresente restrições, ela tem sido usada como modelo para estudos da biossíntese da celulose (Lynd et al., 2002).

A celulose microcristalina é aplicada em estudos envolvendo a caracterização enzimática de microrganismos. Ela é preparada a partir da celulose natural, por hidrólise ácida, a partir da polpa da madeira altamente purificada sob condições controladas. São celuloses quase puras, e o tratamento ácido usado na sua preparação remove tanto hemiceluloses como regiões amorfas das fibras de celulose. Mas a estrutura variável da celulose pura e a sua insolubilidade dificultam os trabalhos e levam ao uso de celuloses altamente solúveis, como a carboximetilcelulose (CMC) (Lynd et al., 2002).

A carboximetilcelulose, normalmente apresentada na forma sódica, é um polímero aniônico derivado da celulose, muito solúvel em água. Sua estrutura é baseada no polímero de celulose de β -1,4-D-glucopirranose. Apresenta diferentes graus de substituição com grupamentos carboximetil ligados em 2-O e 6-O. Em baixas concentrações, as moléculas de CMC são mais estendidas em ramificações, conforme sua concentração aumenta as moléculas sobrepõem-se, podendo formar um gel termorreversível (Sieger et al., 1995).

Uma variedade de importantes matérias químicas industriais pode ser gerada a partir da celulose, podendo servir como fonte de carbono para a produção de combustível, assim como o petróleo bruto é utilizado para as refinarias petroquímicas (Samayam & Schall, 2010).

Na segunda metade de 2003, Lynd et al. (2009) iniciaram um projeto denominado “A função da biomassa no futuro energético da América: enquadramento da análise (RBAEF)”, tendo como foco a produção e utilização da energia, a partir da biomassa, nos Estados Unidos. Foi considerada uma ampla variedade de materiais lignocelulósicos, incluindo resíduos da agricultura (palha de milho e trigo, casca de arroz), culturas herbáceas e também, celulose presente em resíduos sólidos urbanos, com o objetivo de substituir o petróleo como fonte para inúmeros processos.

2.1.2 Lignina

Lignina é um constituinte integral da parede celular dos vegetais, caracterizando suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra a degradação microbiana (Tuomela et al., 2000). Além de ser um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e óticamente inativa, ela consiste de unidades de fenilpropano unidas por diferentes ligações (Pérez et al., 2002).

As enzimas envolvidas na degradação da lignina podem ser agrupadas em duas classes distintas: fenoloxidasas e, enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. Entre as fenoloxidasas, pode-se ainda identificar dois subgrupos: enzimas dependentes de peróxido (lignina peroxidases e

manganês peroxidases) e, enzimas não-dependentes de peróxido (lacases) (Carvalho et al., 2009).

A degradação deste polímero na natureza é realizada principalmente por fungos, como os fungos da podridão branca (Basidiomicota e Ascomicota) responsável pela maioria da decomposição da lignina. Entre os fungos da podridão branca os mais bem estudados são *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlebia radiata*, que degradam lignina seletivamente, ou seja, a lignina é removida sem qualquer perda de celulose. E a *Trametes versicolor* que degrada lignina não seletivamente, havendo degradação de todos os componentes da parede celular (Tuomela et al., 2000).

2.1.3 Hemicelulose

Polissacarídeo que corresponde a 25-30% do total do peso seco do vegetal. Consiste principalmente de D-xilose e L-arabinose, mas também apresenta D-manose, D-galactose, D-glicose, 4-O-metil-glicurônico, D-galaturônico e ácido D-glicurânico ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4 e, ocasionalmente, β -1,3. A principal diferença com a celulose é a presença de cadeias laterais curtas compostas por diferentes açúcares que variam de acordo com a fonte de xilana, além de ser menos recalcitrante (Pérez et al., 2002).

A xilana é o principal carboidrato encontrado na hemicelulose. Ela pode realizar um papel significativo na integridade da estrutura da parede celular através de associações covalentes e não covalentes. A degradação da xilana envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas, endo-1,4- β -

xilanases (EC 3.2.1.8) e β -D-xilosidades (EC 3.2.1.37) atuando na cadeia principal. Dependendo do tipo de xilana, podem ser também necessárias enzimas auxiliares para a hidrólise das cadeias laterais, como α -D-gluconidases (EC 3.2.1.131) e acetil-xilana-esterases (EC 3.1.1.72) (Aro et al., 2005; Jeffries, 1994; Saha, 2003).

Microrganismos como *Penicillium capsulatum* e *Talaromyces emersonii* possuem sistemas enzimáticos completos para degradar xilana (Filho et al., 1991). Xilanases termofílicas também foram descritas para *Thermomonospora* e *Actinomadura* (George et al., 2001).

2.2 Celulase

A capacidade dos microrganismos de assimilar matéria orgânica depende da sua habilidade em produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (Tuomela et al., 2000).

Microrganismos capazes de degradar celulose produzem uma gama de enzimas com diferentes especificidades, que trabalham em conjunto, conhecidas como celulasas. As celulasas são responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia de celulose. Sistemas enzimáticos envolvidos na degradação da celulose podem compreender tanto celulasas livres e/ou complexos chamados celulosomas, atuando sinergicamente na hidrólise da molécula. Os celulosomas são protuberâncias encontradas fora da célula, na parede celular de algumas bactérias celulolíticas. Esta estrutura é complexa e dinâmica e auxilia a interação sinérgica entre as enzimas. Tipicamente encontrados em ambientes anaeróbios, estes complexos

apresentam algumas vantagens para a bactéria como oferecer uma concentração significativa de enzimas na superfície da molécula de celulose e permitir ao microrganismo o acesso rápido aos produtos da hidrólise (Bayer et al., 1994; Henrissat & Davies, 1998; Schwarz, 2001).

O sistema celulolítico (figura 2) compreende usualmente três enzimas que atuam em conjunto na hidrólise da celulose: endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases ou exoglucanases (EC 3.2.1.91) e celobiase (β -glicosidases) (EC 3.2.1.21). A endoglucanase hidrolisa aleatoriamente sítios internos amorfos na cadeia de celulose, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novas extremidades da cadeia. Celobiohidrolases (CBHI e CBHII) atuam nas extremidades redutoras e não-redutoras da cadeia de celulose, liberando glicose ou celobiose. As exoglucanases também atuam na celulose microcristalina. As β -glicosidases hidrolisam celodextrinas e celobiose solúveis a glicose (Bhat & Bhat, 1997; Cao & Tan, 2004; Gan et al., 2003; Rabinovich et al., 2002a; Rabinovich et al., 2002b).

O sinergismo entre as classes de celulases durante a hidrólise da celulose foi primeiro demonstrado por Giligan & Reese (1954). O grau com que este processo ocorre varia conforme a fonte de celulose. Quatro tipos de sinergismo são citados para celulases de fungos. Eles incluem (a) entre endoglucanase e exoglucanase; (b) entre exoglucanases; (c) entre β -glicosidade e endo- ou exoglucanase; e (d) sinergismo intramolecular entre o domínio catalítico e o módulo de ligação de carboidrato (CBM). Também foi observada a presença de uma proteína não-hidrolítica que pode estar

envolvida no relaxamento das ligações de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose (Bhat & Bhat, 1997; Bhat & Wood, 1992).

As celulasas são enzimas modulares que são compostas de unidades referidas tanto como domínio ou módulos. A atividade celulolítica do domínio catalítico é modificada por módulos acessórios que podem suplementar ou alterar todas as propriedades da enzima. O mais comum destes módulos é o CBD (domínio catalítico) ou CBM (módulo de ligação de carboidrato). Este módulo direciona o seu domínio catalítico ao substrato de celulose (cristalinos ou não-cristalinos). Análise baseada nas sequências de aminoácidos desses domínios mostrou considerável variabilidade entre diferentes celulasas. Diferenças no sítio ativo do CBD suportam a hipótese que a principal diferença entre as endo- e exoglucanases é o grau de acessibilidade do sítio ativo ao substrato. Algumas celulasas livres exibem uma arquitetura complexa com mais de um CBD na mesma proteína. Este arranjo pode indicar algum tipo de cooperação entre os dois domínios catalíticos, o que pode levar à ação sinérgica no substrato (Béguin & Lemaire, 1996; Bhat & Bhat, 1997; Bayer et al., 1998).

O mesmo sinergismo observado entre as enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações na molécula de celulose é observado na hidrólise do O-acetilglucuronoxilana. Neste caso, quatro enzimas estão envolvidas: endo-1,4- β -xilânase (endoxilânase), acetil esterase, α -glucuronidase e β -xilosidase. Há evidências que algumas destas enzimas diferem na especificidade em relação ao tamanho da cadeia de xilana, podendo até envolver além destes quatro tipos, outras isoenzimas múltiplas de todos eles. Algumas endoxilânases de

bactérias possuem um domínio de ligação de celulose, a função ainda não é conhecida, mas se sabe que este domínio não se liga a xilana e nem auxilia na sua hidrólise (Coughlan et al., 1993; Kirk & Cullen, 1998).

Na degradação da lignina, os agentes ligninolíticos podem ser muito menos específicos que os mencionados anteriormente para celulose e xilana, por se tratar de um polímero estereoirregular. As maiores enzimas que atuam direta ou indiretamente na lignina são: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Kirk & Cullen, 1998).

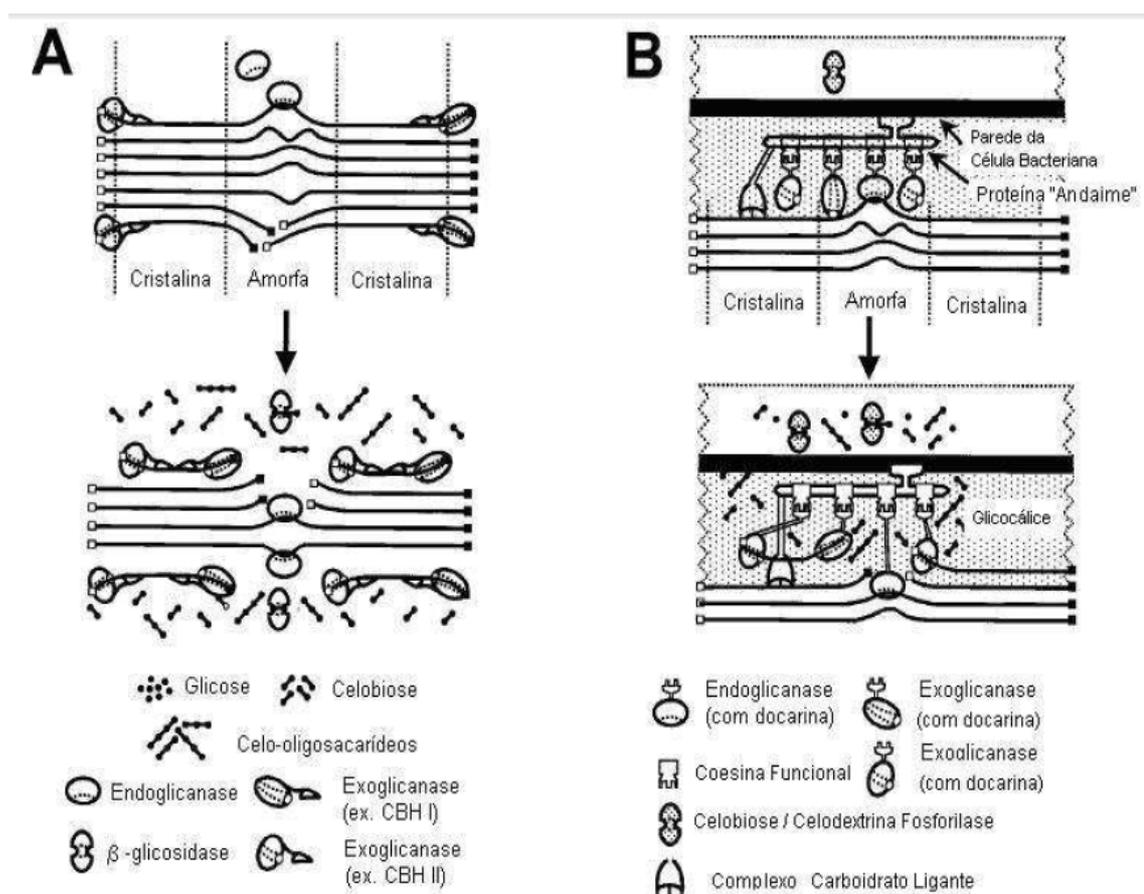


Figura 2. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose (A: celulases livres; B: celulosossomos) (Lynd et al., 2002).

Em relação à regulação e indução da produção de celulases, a visão mais aceita para o processo de indução é que baixos níveis da enzima são produzidos constitutivamente pelo microrganismo. Os açúcares resultantes da hidrólise funcionam como indutores, atuando no sentido de promover a expressão gênica. A celobiose é um indutor natural do sistema de celulase em alguns microrganismos, podendo induzir a produção de celulase, endoglucanase e CMCase. O sistema de celulases de *Trichoderma reesei* é induzido, ao nível transcricional, em pelo menos 1000 vezes por celulose. Nisizawa et al. (1972) afirmam que uma forma de controle da expressão das celulases varia em nível de transcrição, sofrendo repressão catabólica pelo carbono. Neste caso, o produto final da hidrólise da celulose interage com a proteína celular formando um complexo, este atua no gene reprimindo a síntese da enzima. Este processo já foi observado em *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Clostridium thermocellum* (Bhat & Bhat, 1997).

A maioria das celulases existe em múltiplas formas, podendo diferir umas das outras no que se refere à composição dos carboidratos ligados covalentemente, na extensão da glicosilação ou na sequência de aminoácidos. Um total de 482 sequências de aminoácidos de glicosil hidrolases foram analisadas e puderam agrupar as enzimas (EC) em 45 famílias, observando uma grande diversidade dentro deste grupo de celulases (Bhat & Bhat, 1997; Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993).

2.3 Microrganismos celulolíticos

Em um ecossistema típico de degradação de celulose, uma variedade de bactérias e fungos trabalha em conjunto com outros microrganismos para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis que são então assimilados pelas células. A capacidade de degradar a celulose é amplamente distribuída entre muitos gêneros do domínio Bacteria e em grupos de fungos dentro do domínio Eukarya (Lynd et al., 2002).

2.3.1 Fungos

Fungos são os microrganismos, mais bem conhecidos, capazes de decompor a matéria orgânica em geral e, em particular, os substratos de celulose. Fungos filamentosos estão entre os organismos mais empregados em processos biotecnológicos em geral (Grimm et al., 2005).

Celulases e hemicelulases de *Trichoderma* e *Aspergillus* são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado de enzimas no mundo. Fungos aeróbios e filamentosos, como espécies destes gêneros em particular, são bem conhecidos e eficientes produtores de enzimas. As β -glucanases mais comumente usadas no mercado são de *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. Este último produz até duas exoglucanases, cinco endoglucanases e duas β -glucosidades (Bhat, 2000; Lynd et al., 2002).

Dentro de centenas de espécies de Zygomycetos, apenas certos membros do gênero *Mucor* tem mostrado possuir uma atividade celulolítica significativa. Em contraste, gêneros pertencentes às subdivisões Ascomycetos (*Bulgaria Chaetomium* e *Helotium*), Basidiomicetos (*Coriolus*, *Phanerichaete*,

Poria, *Schizophyllum* e *Serpula*) e Deuteromicetos (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*) contêm um grande número de espécies celulolíticas (Carlile & Watkinson, 1998).

Enzimas termoestáveis e resistentes a pH extremo são o foco do mercado industrial, levando ao aumento de pesquisas nesta área. A busca por organismos extremófilos é um dos meios para a obtenção de propriedades enzimáticas apropriadas para as aplicações industriais. Qin et al. (2010) relataram a atividade enzimática de *Fusarium chlamydosporum*, apresentando atividade CMCase e β -glicosidade, ambas estáveis em pHs variáveis e em temperaturas mais altas (60°C e 70°C), sendo consideradas termoestáveis. Outra espécie, *F. oxysporum* produz múltiplas enzimas celulolíticas como CMCase e xilanase, a ação conjunta destas enzimas pode converter celulose em etanol (Gómez-Gómez et al., 2001; Ibrahim & El-diwany, 2008; Kumar et al., 1991).

Fungos anaeróbicos também apresentam atividade celulolítica como *Neocallimastix frontalis*. Outras espécies pertencentes ao grupo mais primitivo dos fungos, o anaeróbio *Chytridomycetes*, são reconhecidos por sua capacidade de degradar celulose no trato gastrointestinal de animais ruminantes. A eficiente hidrólise da celulose requer a presença das três classes de enzimas, endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases. Todas tem sido bem descritas em *Phanerochaete chrysosporium*, o fungo da podridão branca, estudado extensivamente em relação ao seu sistema enzimático (Kirk & Cullen, 1998; Singh & Hayashi, 1995; Van Soest, 1994).

A massa molecular das celulasas dos fungos pode variar muito. A maioria das endoglucanases tem peso molecular entre 25 a 50 kDa. Já as β -glucosidases são maiores, variando entre 165 e 182 kDa. Estudos envolvendo *Phanerochaete chrysosporium* mostraram que a variação para esta espécie pode apresentar entre 28 e 37 kDa (endoglucanases) e 114 kDa (β -glucosidase) (Eriksson et al., 1990).

Outros fungos também com potencial celulolítico são: *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani*, *Humicola insolens*, *Melanocarpus albomyces*, *Penicillium brasilianum*, *Chaetomium cellulyticum*, *Neurospora crassa*, *Thermoascus aurantiacus*, *Paecilomyces inflatus* (Maheshwari et al., 2002).

2.3.2 Bactérias

Entre as eubactérias há uma considerável produção de enzimas envolvidas na degradação de celulose. Entre os aeróbios predominam a ordem Actinomycetales e entre os anaeróbios a ordem Clostridiales (Lynd et al., 2002).

Há uma distinta diferença entre estratégia celulolítica de bactérias aeróbias e anaeróbias (tabela 1). Com algumas exceções, anaeróbios como *Clostridium thermocellum* apresentam um sistema complexo de celulasas, policelulossomo, que pode tanto ficar aderido à superfície das células quanto distribuído no meio, quando este for aquoso (Rainey et al., 1994; Rogers & Gottschalk, 1993; Schwarz, 2001).

As espécies de bactérias aeróbias celulolíticas melhor estudadas pertencem aos gêneros *Cellulomonas* e *Thermobifida*. As *Cellulomonas*

produzem até seis endoglucanases e uma exoglucanase. Suas celulases se assemelham ao sistema de celulases dos fungos, contudo estrutura semelhante à celulosomas tem sido observada neste gênero. A bactéria filamentosa termofílica *Thermobifida fusca* é a mais eficiente degradadora de celulose no solo. Seis celulases – três endoglucanases, duas exoglucanases e uma celulase com função de endo- e exoglucanase foram isoladas desta espécie (Bagnara et al., 1988; Bagnara et al., 1985; Clemmer & Tseng, 1986; Irwin et al., 1993).

Estudos envolvendo condições extremas de hidrólise também são observados em bactérias. Espécies do gênero *Thermotoga* produzem celulases termoestáveis (*Thermotoga marítima* e *T. neapolitana*) e sua temperatura ótima é de 95°C até 106°C. *Anaerocellum thermophilum*, uma bactéria extremamente termofílica produz uma enzima celulolítica de massa molecular 230 kDa e que hidrolisa celulose microcristalina, CMC e β -glucano. Muitos genes destas espécies têm sido clonados e superexpressados em *Escherichia coli* (Niehaus et al., 1999).

Além da temperatura, a variação de pH também influencia na atividade das celulases produzidas pelos microrganismos. de forma geral, as celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6 – 5,0). *Aspergillus nidulans* há a presença de duas endoglicanases, uma com pH ótimo em 5,0 e outra em 6,0, resultado semelhantes ao termófilo *Melanocarpus*, que apresentou duas endoglicanases com pH ótimos em 5,0 e 6,0 (Bagga et al., 1990; Kaur et al., 2007).

Além dos fungos, bactérias celulolíticas também são encontradas no rúmen de animais, como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *R. albus* que são os primeiros envolvidos na digestão deste polímero neste ambiente (Weimer et al, 1991) .

Tabela 1. Características morfológicas de bactérias celulolíticas (Lynd et al., 2002).

Relação oxigênio	Espécie	Temperatura crescimento	Característica Celulases
Aeróbios	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Termófilo	Livres
	<i>Bacillus pumilis</i>	Mesófilo	Livres
	<i>Caldibacillus cellovorans</i>	Termófilo	Livres
	<i>Cellulomonas flavigena</i>	Termófilo	Livres
	<i>Cellvibrio fulvus</i>	Mesófilo	Livres
	<i>Micromonospora chalcae</i>	Mesófilo	Livres
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>	Mesófilo	Livres
	<i>Streptomyces reticuli</i>	Mesófilo	Livres
Anaeróbios	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Mesófilo	Complexos
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Mesófilo	Complexos
	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Mesófilo	Complexos
	<i>Ruminococcus albus</i> , <i>R. flavefaciens</i>	Mesófilo	Complexos
	<i>Spirochaeta thermophila</i>	Termófilo	Livres

Organismos que têm como sua principal fonte de alimentos a biomassa celulósica (herbívoros) apresentam um sistema microbiano encontrado em seu intestino que auxiliam na degradação destes polímeros. É o caso de muitos invertebrados como cupins, lagartas, traças entre outros, que apresentam associação com bactérias como *Trichonympha*, *Clostridium*, *Actinomyces*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albuns* e *Methanobrevibacter ruminantium* (Gupta et al., 2011).

2.3.2.1 Gênero *Bacillus*

Atualmente, na “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature” há citação de 254 espécies e de 7 subespécies no gênero *Bacillus* sp. (Euzéby, 2012).

As espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas, de tamanhos variáveis, esporulados, Gram positivos ou Gram variáveis. São geralmente saprófitos e não patogênicos para os animais. O gênero é composto de microrganismos ambientais cujo habitat principal é o solo onde possuem um papel importante no ciclo do carbono e do nitrogênio (Holt et al., 1994).

O gênero *Bacillus* tem merecido destaque em muitos estudos envolvendo biodegradação. Suas características como tolerância a altas temperaturas, crescimento rápido e ótima atividade enzimática faz com que espécies deste gênero tenham alcançado espaço no mercado, principalmente nos processos de biorremediação e uso em detergentes. Entre algumas

espécies com potencial celulolítico estão *Bacillus brevis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* e *B. cereus* (Shabeb et al., 2010; Singh & Kumar, 1998).

O grande potencial celulolítico do gênero *Bacillus* têm levado muitos pesquisadores a clonar e superexpressar os genes envolvidos na síntese de enzimas celulolíticas, usando microrganismos como leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e bactérias *Zymomonas anaerobia* neste processo (Lynd et al., 2002).

A grande maioria das espécies deste gênero não tem um sistema de celulase completo, sendo a principal atividade de CMCase (endoglucanase) que não hidrolisa celulose cristalina, restringindo a aplicação de suas enzimas. Um estudo realizado com *Bacillus circulans* observou a presença de duas distintas Avicelases (exoglucanase). Os celulosomos de *B. circulans* existem como dois complexos multicomponentes (CI= 669 kDa e CII= 443 kDa) com uma capacidade extraordinária de degradar celulose cristalina, produzindo celobiose como produto (Kim, 1995).

O gênero *Bacillus* tem sido muito bem caracterizado quanto à produção de celulases alcalinas, com grande interesse na indústria de detergentes, devido as suas. Hakamada et al. (1998) e Kim et al. (2005) reportaram atividade celulolítica com pHs ótimos entre 8,6 a 10,0. Aygan et al., (2011) também constataram para *Bacillus licheniformis* uma endoglucanase termoestável e halofílica, com maior atividade em pH alcalino (pH = 10,0). propriedades (Khyami-Horani, 1996; Singh et al., 2004)

Devido à restrição da grande maioria das espécies deste gênero em produzir as três classes de celulases, os estudos envolvendo caracterização enzimática de *Bacillus* envolvem principalmente CMC como substrato (Kim et al., 2009; Kotchoni et al., 2006; Shabeb et al., 2010).

Resíduos de plantas apresentam alto conteúdo de celulose, o que leva a proliferação de microrganismos especializados na degradação destes polímeros. O gênero *Bacillus* está entre os mais representativos neste aspecto. É o que mostra o estudo de Baharuddin et al. (2010) que selecionaram bactérias de compostagem com potencial celulolítico, onde houve a predominância de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* (60%). Outros dados como os citados por Chang et al. (2009) e Mayende et al. (2006) vêm somar a isso mais exemplos de cepas de *Bacillus* oriundos de compostagem, com potencial celulolítico.

2.4 Aplicações das celulases

Considerando que a biomassa vegetal é a mais importante fonte sustentável de combustíveis e materiais disponíveis para a humanidade, materiais celulósicos são, particularmente, atraentes neste contexto. Uma promissora estratégia para isto envolve a produção de enzimas celulolíticas, hidrólise da biomassa e fermentação de açúcares para desenvolver produtos em um único processo através da utilização de microrganismos. A utilização da celulose pelos microrganismos é o mecanismo da degradação de processos assim como digestão anaeróbia e a compostagem (Lynd et al., 2002).

Na indústria de sucos, as celulases auxiliam no processo de extração do suco da fruta e na sua clarificação, alterando sua viscosidade e aumentando a taxa de filtração e estabilidade do produto final (Bhat, 2000). A adição de glucanases exógenas e polissacarídeos no processo de fabricação de bebidas como a cerveja e o vinho não só tem aumentado a qualidade destes, mas, sobretudo, tem gerado uma produção mais eficiente (Galante et al., 1998).

Na indústria de polpa e papel, as celulases são usadas misturadas com hemicelulase para melhorar a drenagem e execução de máquinas de papel, e também o destino de fibras recicladas (Cao & Tan, 2002). Desta forma quanto mais estável, maior atividade e especificidade que a enzima tiver, maior o interesse comercial nesta molécula.

Outro grande interesse no uso de preparações enzimáticas contendo altos níveis de atividade de celulase e hemicelulase está voltado para a dieta de animais (como ruminantes). Uma hidrólise mais eficiente dos polissacarídeos usados na alimentação destes animais resultaria num aumento da produção de leite e ganho de peso (Bhat, 2000).

As celulases têm conseguido sua ampla empregabilidade na indústria têxtil devido a sua capacidade de modificar fibras de celulose de uma maneira controlada e desejada pelo mercado. Nos anos 2000, as celulases se tornaram o terceiro maior grupo de enzimas usadas para este propósito. A ascensão de peças em jeans com a lavagem destonada tem sido o foco deste crescimento (Kumar et al., 1998; Tyndall, 1992).

Além da aplicação da enzima, propriamente dita, muitos processos também empregam os microrganismos com potencial celulolítico, num processo chamado de biorremediação, como no tratamento de águas residuais, lodo e efluentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Os microrganismos estudados no presente trabalho são provenientes de uma leira de compostagem montada na Estação de Transbordo da Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, composta de resíduo doméstico, lodo ativado e poda de árvores (Silva, 2011). Os isolados encontravam-se armazenados em glicerol 20% (v/v) a -20°C.

Foram selecionados para os testes deste trabalho apenas os isolados oriundos da fase termofílica do processo de compostagem, equivalendo a temperaturas acima de 45°C, totalizando 183 isolados bacterianos.

3.2 Atividade celulolítica em meio sólido

A atividade celulolítica dos isolados foi realizada em placas de Petri contendo o meio de cultura descrito por Ramachandra et al. (1987) (Anexo I, item 8.1) suplementado com carboximetilcelulose (CMC) 0,5% (m/v). Com o

auxílio de uma agulha, os isolados foram inoculados, em picada, nas placas e incubados a temperatura de 37°C, 50°C e 60°C por 4 dias e 70°C por 3 dias.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Após o crescimento, as placas foram coradas com lugol 1% (v/v) por 3 a 5 minutos possibilitando a visualização dos halos de hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) (Kasana et al., 2008). Os halos foram medidos para posterior seleção dos microrganismos com maior potencial celulolítico. O diâmetro da zona de hidrólise geralmente é proporcional a atividade da carboximetilcelulase (CMCase) (Jang & Chen, 2003). O índice de atividade enzimática (IE) foi calculado através do diâmetro total da colônia mais a zona de hidrólise dividido pelo diâmetro da colônia conforme proposto por Hankin & Anagnostakis (1975).

3.3 Atividade celulolítica em meio líquido

Os isolados com maior potencial celulolítico em meio sólido foram selecionados para os ensaios em meio líquido.

3.3.1 Curva de crescimento

A curva padrão foi realizada para determinar quais os parâmetros a serem utilizados nos ensaios em meio líquido tais como: tempo total de crescimento dos isolados e o intervalo de coleta das amostras para avaliação da atividade enzimática. Dois Enrlenmeyers para cada isolado, com 50 mL de meio de cultivo (Ramachandra et al., 1987) acrescido de 1% (m/v) de glicose foram inoculados com 5mL de um cultivo de 16-18h (D.O.= 0,5; 570 nm). Os

frascos foram incubados a 50°C, por 6 horas, em intervalos de uma hora foi determinado o número de células viáveis. Também foi realizada uma curva de crescimento utilizando carboximetilcelulose 0,5% (m/v) como substrato a 50°C, por 12 horas, em intervalos de duas horas foi determinado o número de células viáveis.

3.3.2 Atividade enzimática em meio líquido com carboximetilcelulose

Para os testes em meio líquido Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo (Ramachandra et al., 1987) acrescido de 0,5% (m/v) de CMC foram inoculados com 5 mL de pré-inóculo (crescimento de 16-18h, D.O.= 0,5), sob agitação de 150 r.p.m. Estes frascos foram incubados a 50, 60 e 70°C, por 12 horas, sendo determinada a atividade enzimática a cada 2 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.3 Atividade enzimática em meio líquido com diferentes substratos

Diferentes fontes de celulose (carboximetilcelulose - CMC, celulose microcristalina - MCC, casca de arroz e casca de trigo - triturados) foram usadas para avaliar atividade enzimática no isolado selecionado na etapa anterior (Item 3.3.2). Nesta etapa, Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo (Ramachandra et al., 1987) suplementado com 0,5% (m/v) de uma das fontes de celulose foram inoculados e incubados a 50°C, sob agitação de

150 r.p.m. por 12 horas e a cada 2 horas foi determinado o número de células viáveis, contagem de endósporo, pH e atividade enzimática.

3.4 Atividade enzimática

Para determinar a atividade enzimática foi realizado o ensaio para dosagem de açúcares redutores, método de Somogy e Nelson (Nelson, 1944; Somogy, 1952). Para isto, 1,5 mL da cultura foi centrifugada a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos e 400 µL do sobrenadante foram coletados para o ensaio. O ensaio foi realizado em tubos Falcon, adicionando-se aos 400 µL do sobrenadante 1,5 mL do meio de cultivo com CMC 0,5% (m/v) e 100 µL de acetato de sódio (pH 7,0). Os tubos Falcon foram incubados a 50°C (temperatura do ensaio) durante 30 minutos. Após adicionou-se 1 mL do reativo de Somogy (25:1 reativo A: reativo B) (Anexo I, itens 8.2.1.1 e 8.2.1.2), e os tubos foram incubados em banho de água fervente durante 10 minutos, sendo resfriados em banho frio e adicionando 1 mL do reativo de Nelson (Anexo I, item 8.2.2). Em cada tubo foram acrescentados 6 mL de água destilada, os mesmos foram homogeneizados e centrifugados a 13.000 r.p.m. por 10 minutos. Após foi determinada a absorvância em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) com comprimento de onda de 570 nm. Glicose foi utilizada como padrão para a determinação de açúcares redutores na amostra. Uma unidade de atividade enzimática (UAE) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose mL⁻¹min⁻¹.

3.5 Contagem de células viáveis totais e endósporos

3.5.1 Contagem de células viáveis

A determinação de células viáveis totais foi realizada através da diluição em série e posterior plaqueamento em gota em placas com meio nutritivo (Miles & Mirsa, 1938), através da divisão de cada placa em 12 campos e inoculação de 25 μ L em cada campo. Para a diluição em série, um mililitro da cultura sobrenadante foi diluído em 9 mL de água destilada, e assim sucessivamente, em diluições decimais. Após a diluição e plaqueamento, incubou-se em estufa 37°C, realizando-se a contagem após 12 horas incubação.

3.5.2 Determinação do número de endósporos

A partir das diluições decimais realizadas para determinação de células viáveis totais foram retiradas alíquotas de um mililitro e transferidas para frascos de Eppendorf. As amostras foram imediatamente colocadas em aquecimento a 70°C durante 10 minutos. Após este período foram retiradas do aquecimento e homogeneizadas em agitador por 10 segundos, sendo então submetidas a plaqueamento em gota (25 μ L) em placas com meio nutritivo (Miles & Mirsa, 1938) e incubadas a 37°C. A contagem das colônias foi realizada após 12 horas de incubação.

3.6 Purificação parcial da enzima

Para a obtenção da enzima parcialmente purificada, dois passos foram executados: a precipitação com sulfato de amônio e a cromatografia de gel filtração.

3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio

O isolado selecionado foi cultivado em condições ótimas de produção da enzima, sendo o volume do cultivo de 100 mL. A precipitação foi realizada com o sobrenadante do cultivo, obtido através da centrifugação deste durante 15 minutos a 13.000 x g. Para a averiguação da melhor faixa de saturação de sulfato de amônio para precipitação da enzima foram testados os seguintes intervalos de saturação: 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80% e 80-100%. A quantidade de sulfato de amônio para cada faixa de saturação foi calculada segundo Scopes (1994). Considerando cada intervalo uma fração.

Esta etapa de precipitação foi realizada em banho de gelo, sob agitação e adição lenta de sulfato de amônio ao extrato bruto, até atingir as saturações citadas anteriormente. Após 12 horas de refrigeração do precipitado, realizou-se a centrifugação (4°C – Sigma Laborzentrifugen 2K15) a 10.000 g. durante 10 minutos. O precipitado foi separado do sobrenadante e ressuspendido com tampão PBS pH 7,2 (Anexo I, item 8.4). A fim de averiguar qual fração apresentou maior atividade enzimática, em cada uma delas foi quantificada a atividade e determinada a faixa de saturação ótima.

3.6.2 Cromatografia de gel filtração

Após determinar o melhor intervalo de saturação para a precipitação com sulfato de amônio, precipitou-se neste intervalo 100 mL do extrato bruto como descrito anteriormente, sendo o precipitado ressuspendido em 4 mL de tampão PBS pH 7,2.

Uma alíquota de 1,0 mL do precipitado ressuspendido foi aplicado numa coluna de gel filtração Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão PBS pH 7,2. O fluxo utilizado foi de aproximadamente 20 mL/h. Foram coletadas 20 frações de 1,0 mL cada, estas foram testadas quando a atividade enzimática conforme item 3.4. Após análise das frações com maiores atividades, estas foram reunidas, e analisadas conforme item 3.8.

3.7 Caracterização do extrato bruto e da enzima parcialmente purificada

3.7.1 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática

Para determinação da temperatura ótima, foi utilizada a metodologia já descrita no item 3.4, empregando-se o extrato bruto e a enzima parcialmente purificada, variando-se apenas as temperaturas de incubação (em banho de água). As temperaturas utilizadas foram 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80°C.

3.7.2 Determinação do pH ótimo da atividade enzimática e estabilidade do extrato bruto frente ao pH

O extrato bruto foi submetido ao ensaio para pH ótimo da atividade enzimática. O mesmo foi realizado conforme descrito no item 3.4, onde foram empregadas soluções tampão com pH de 4,0 a 10,0. A solução tampão McIlvaine (fosfato dissódico e ácido cítrico) foi empregada para os valores de pH 4,0 a 8,0 (Anexo I, item 8.3.1). Para os valores de pH 9,0 (Tris 0,1M e HCl 0,1M) e 10,0 (NaHCO₃ 0,05M e NaOH 0,1M) foram empregadas outras duas soluções (Anexo I, item 8.3.2).

A estabilidade frente a diferentes pHs foi avaliada incubando-se 2 mL da amostra a 60°C por 30 minutos na presença dos diferentes pHs.

3.7.3 Estabilidade térmica da enzima parcialmente purificada e do extrato bruto

Para avaliação da estabilidade da enzima parcialmente purificada, dois mililitros do purificado foram incubados a 60°C por duas horas. A cada 30 minutos, uma alíquota foi amostrada para a realização do ensaio enzimático, totalizando quatro amostragens. Como controle foi utilizado meio não inoculado.

A estabilidade térmica da enzima no extrato bruto foi avaliada incubando-se 2 mL do extrato em banho de água nas temperaturas de 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80°C durante 30 minutos. Após o período de pré-incubação, foi realizado o ensaio enzimático conforme item 3.4.

3.7.4 Efeitos de detergentes sobre a atividade da enzima parcialmente purificada

Para avaliar o efeito de detergentes foi testado SDS e Triton X-100, nas concentrações de 0,5% (m/v) e 1% (v/v). A enzima foi incubada com o respectivo detergente por um período de 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi realizado o ensaio enzimático.

3.8 Determinação da massa molecular da celulase

3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para determinar a massa molecular da celulase produzida pelo isolado, amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Alíquotas do extrato bruto, do precipitado e do material purificado foram adicionadas de tampão de amostra (Anexo I, item 8.5.2) na proporção 6:1 e colocados em banho de água a 100°C por 5 minutos.

Uma alíquota de 35 µL das amostras foi aplicada no gel. O marcador de massa molecular utilizado foi BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen), que apresenta proteínas na faixa de 10 a 220 kDa. A migração eletroforética foi realizada em tampão Tris-glicina (Anexo I, item 756.3) a 50 mA por 2 horas. Após, o gel foi corado com Comassie Blue (Anexo I, item 8.5.4) durante 30 minutos, sendo posteriormente descorado (Anexo I, item 8.5.5) com sucessivas lavagens, para visualização das bandas de proteína.

Para visualização da atividade enzimática foi realizado zimograma em gel de poliacrilamida 12% contendo 0,2% (m/v) de CMC, sem adição de

SDS. As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra (Anexo I, item 8.5.2) e as condições de migração foram aquelas mencionadas anteriormente, em tampão de migração (Anexo I, item 8.5.7). O gel foi corado com vermelho congo 0,1% (m/v) por 30 minutos, e posteriormente descorado com NaCl (1M) para visualização das zonas de hidrólise.

3.9 Determinação da concentração de proteína solúvel

Para determinar a concentração de proteína solúvel em cada uma das frações, obtidas nas etapas de purificação, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Adicionou-se 100 µL de amostra (extrato bruto, precipitado ou purificado) a 2,5 mL de reagente de Bradford, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

3.10 Identificação do isolado bacteriano

3.10.1 Identificação Bioquímica

O isolado 380 foi submetido a testes bioquímicos para sua identificação segundo Holt et al. (1994) e MacFaddin (2000). Os testes bioquímicos empregados foram: catalase, Voges Proskauer, caseína, gelatina, amido, citrato, lecitina, nitrato, SIM (produção de ácido sulfídrico, indol e motilidade), crescimento em NaCl (2%, 5%, 7% e 10%), crescimento em ágar Mac Conkey, urease, açúcares (glicose, manitol, xilose e arabinose), oxidação e fermentação de glicose, e tioglicolato, além da coloração de Gram e endósporo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade celulolítica em meio sólido

Os isolados foram inoculados em meio sólido foram avaliadas quanto à produção de carboximetilcelulase na temperatura de crescimento a 37°C. A coloração destas placas com lugol permitiu visualizar e medir os halos de hidrólise daqueles isolados com potencial celulolítico. Ensaio nas temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C também foram avaliadas e procedeu-se da mesma forma a medição dos halos de hidrólise. Muitos estudos empregam CMC como fonte de celulose para selecionar microrganismos celulolíticos devido a sua capacidade de induzir a uma maior produção de celulases. Membros do gênero *Bacillus* tendem a produzir celulases na presença de CMC, mas isso nem sempre ocorre quando expostos a outros substratos (Ito, 1998; Rastogi et al., 2010). Na figura 3 é possível observar o halo de hidrólise do isolado 380.

Na temperatura de 37°C, 22 (12%) isolados hidrolisaram o substrato, com halos variando entre 6,2 a 54 mm de diâmetro. A 50°C, 15 (8,0%) isolados apresentaram halos entre 4,0 e 60 mm. Apenas 7 (3,8%) ainda apresentaram

atividade celulolítica a 60°C, com halos de 10 a 26 mm e a 70°C, somente 3 (1,6%) mantiveram sua atividade, com halos entre 6,0 e 20 mm (Tabela 2). Estudos com *Bacillus coagulans* mostram halos com 33 mm de diâmetro na temperatura de 30°C (Odeniyi et al., 2009). Chang et al. (2009) isolaram 2 cepas de *Bacillus* sp. de composto de *Brassica* e avaliaram sua atividade CMCase em placas a 50°C, onde obtiveram diâmetros de 19 e 21mm, após três dias de incubação.

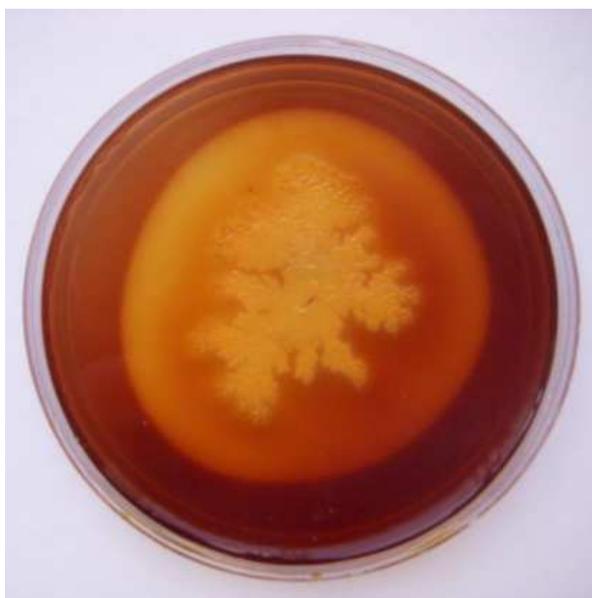


Figura 3. Halo de hidrólise do isolado 380, em meio proposto por Ramachandra et al., (1987), suplementado com 0,5% (m/v) CMC a 50°C, corado com lugol 1,0% (v/v).

Tabela 2. Isolados produtores de CMCase em meio sólido proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com CMC 0,5% (m/v) e seus respectivos halos de hidrólise (mm \pm DP).

AMOSTRA	Temperaturas (halo mm \pm DP)			
	37°	50°	60°	70°
71	40 \pm 2,8	35 \pm 3,5	-	-
72	35 \pm 3,5	12,5 \pm 3,5	-	-
75	21 \pm 7,0	-	-	-
92	47 \pm 4,2	39 \pm 6,3	10 \pm 2,8	-
103	35 \pm 0	20 \pm 1,4	-	-
104	35 \pm 5,6	15 \pm 4,2	-	-
106	28 \pm 11,3	4,0 \pm 0	-	-
135	28 \pm 2,8	-	-	-
148	52 \pm 2,8	44,5 \pm 0,7	-	-
269	22 \pm 3,5	-	-	-
273	20 \pm 5,6	-	-	-
274	6,5 \pm 2,1	-	-	-
291	48 \pm 11,3	12 \pm 2,8	-	-
297	19 \pm 6,3	-	-	-
302	46 \pm 0	31 \pm 4,2	15 \pm 5,0	-
347	45 \pm 2,1	-	-	-
351	30 \pm 5,6	25 \pm 7,0	-	-
379	46 \pm 3,5	59 \pm 5,0	10 \pm 7,0	-
380	54 \pm 4,2	60 \pm 2,8	23,5 \pm 2,1	20 \pm 2,8
381	47 \pm 2,8	59 \pm 1,4	26 \pm 1,4	6,0 \pm 2,8
382	46 \pm 8,4	37,5 \pm 2,1	22 \pm 0	14 \pm 3,5
387	52 \pm 4,2	52 \pm 2,8	26 \pm 1,4	-

Dos isolados testados, apenas três – 380, 381 e 382 – apresentaram atividade celulolítica em todas as temperaturas (37°C, 50°C, 60°C e 70°C). Além disso, seus halos de hidrólise apresentaram valores superiores ao restante do grupo, sendo estes selecionados para o experimento que segue (Item 4.2).

Durante a coleta dos três isolados selecionados, a temperatura média da leira foi de 46°C, temperatura inferior às demais, o que representa o final da fase termofílica e início da fase de maturação. Segundo Fernandes & Da Silva (1999), os microrganismos termófilos proliferam com muita intensidade, sendo um grupo extremamente ativo, provocando intensa e rápida degradação da matéria orgânica e maior elevação da temperatura, o que elimina microrganismos patogênicos.

Na tabela 3 são apresentados os diâmetros dos halos de hidrólise, o diâmetro das colônias e os índices de atividade dos isolados. O isolado 382 apresentou índice de atividade, em placa, de 2,4 U ($U = U \text{ mL}^{-1}$ enzima). O gênero *Bacillus* têm se destacado em estudos envolvendo atividade enzimática em temperaturas elevadas (50°C a 70°C), onde seu potencial hidrolítico aumenta consideravelmente. Chang et al. (2009) mostraram atividade de dois isolados de *Bacillus* sp. em meio sólido na presença de CMC, com índices de 1,9 U e 2,33 U.

Tabela 3. Índice de atividade enzimática (IE) em meio sólido proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com CMC 0,5% (m/v).

Isolado	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	IE* (37°C)
380	54 ± 1,4	47 ± 4,2	1,58
381	47 ± 4,2	35 ± 2,8	1,33
382	46 ± 5,6	19 ± 3,5	2,4

*IE= $\frac{\emptyset C + \emptyset H}{\emptyset C}$ (C: colônia; H: halo; \emptyset : diâmetro)

4.2 Atividade celulolítica em meio líquido

4.2.1 Curva de crescimento

Foram realizadas curvas padrão para cada um dos três isolados selecionados, 380, 381 e 382. Nesta etapa procurou-se determinar o tempo de incubação e o intervalo de amostragem para determinação da atividade celulolítica em meio líquido. Para tanto as amostras foram inoculadas em meio de cultivo proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com glicose 1% (m/v) e incubadas à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. Procedeu-se a contagem de células viáveis (UFC/mL) em intervalos de uma hora (Figura 4). Também foi realizada a contagem em meio suplementado com carboximetilcelulose (0,5% m/v) (Figura 5) em intervalos de duas horas. A partir destas informações definiu-se o tempo total de incubação (12 horas), e em intervalos de duas horas seriam realizadas a retirada de amostragens para determinação da atividade celulolítica em meio aquoso.

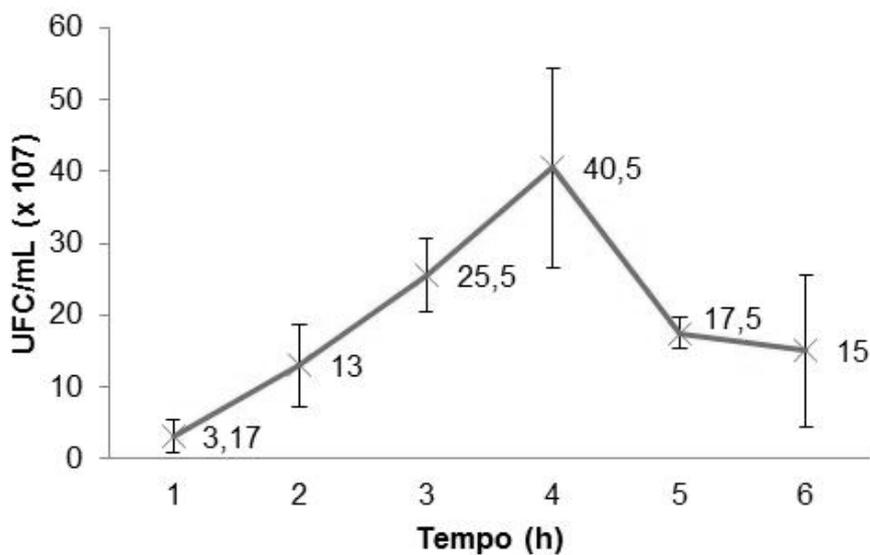


Figura 4. Curva de crescimento para o isolado 380, em meio proposto por Ramachandra et al. (1987) suplementado com 1,0% (m/v) de glicose, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).

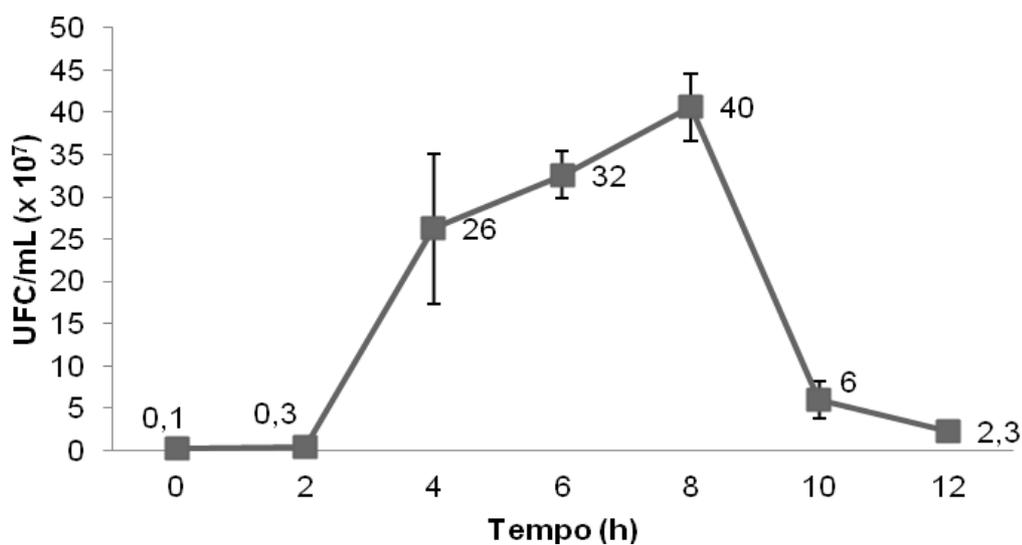


Figura 5. Curva de crescimento para o isolado 380, em meio proposto por Ramachandra et al. (1987) suplementado com 0,5% (m/v) de CMC, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).

4.2.2 Atividade enzimática em meio líquido com carboximetilcelulose

Para a realização do ensaio enzimático, os isolados 380, 381 e 382 foram inoculados em meio de cultivo proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com carboximetilcelulose 0,5% (m/v), e incubados a 50°C, por 12 horas sob agitação de 150 r.p.m. O cultivo obtido foi centrifugado para separação das células, e o sobrenadante foi considerado como extrato bruto da enzima. Para cada amostragem determinou-se a atividade enzimática (Item 3.4). Curva padrão de glicose foi empregada para determinação da concentração de açúcares redutores, considerando, 1UEA (unidade de atividade enzimática) equivalente a liberação de 1 μmol glicose $\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$.

Os três isolados apresentaram atividades em meio líquido que variaram de 0,04 a 0,12 UEA $\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Tabela 4). Em destaque o isolado 380, que obteve a maior atividade (0,12 UEA $\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$) após 6 horas de incubação a 50°C, sendo este então selecionado para os demais testes do trabalho. A maior atividade enzimática, caracterizada pelo isolado 380, equivale a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima. Shabeb et al., (2010) detectaram a produção de celulase por *Bacillus subtilis*, onde a mudança de temperatura teve uma grande influência nestes resultados. A 50°C, a produção de celulase foi 0,001 $\mu\text{g}/\text{mL}$, já a 45°C este valor passou para 344 $\mu\text{g}/\text{mL}$, constatando a importância da temperatura para a produtividade enzimática. Em nosso estudo o objetivo foi avaliar a produção em temperaturas superiores a 50°C, havendo possibilidade de temperaturas inferiores apresentarem resultados mais satisfatórios, embora não tenham sido testadas.

Tabela 4. Atividade enzimática de CMCase (UEA mL⁻¹min⁻¹) dos isolados selecionados e cultivados a temperatura de 50°C, em meio proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com CMC 0,5% (m/v) (N = 6).

Isolado	380	381	382
2 h	0,04 ± 0,008	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,04
4 h	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,01
6 h	0,12 ± 0,008	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
8 h	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,008
10 h	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01
12 h	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01
24 h	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,009

As temperaturas de 60°C e 70°C foram testadas para comparação da atividade enzimática, mas o pré-inóculo não apresentou um crescimento significativo nestas temperaturas, desta forma, todos os experimentos que seguem foram realizados a 50°C.

Para que os microrganismos suportem temperaturas elevadas, eles necessitam de algumas adaptações a sua estrutura, afim de suportar essa condição, como: DNA estabilizado por histonas; membranas contendo lipídeos de elevada massa molecular, mais saturados e ramificados, portanto mais estáveis; e proteínas altamente estáveis (mais densas em termos de estrutura, menos água em sua constituição) (www.dms.ufsc.br).

4.2.3 Atividade enzimática em meio líquido com diferentes substratos

A avaliação do potencial celulolítico do isolado 380 foi realizada empregando-se quatro diferentes fontes de celulose: carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (MCC), casca de arroz e palha de trigo. O tempo total de incubação foi de 12 horas, com amostragem a cada duas horas. A cada amostragem foram avaliados a atividade enzimática, pH, contagem de células viáveis e contagem de endósporos.

As atividades enzimáticas foram avaliadas a 50°C. Podemos observar nas figuras 6 a 9 que todos os substratos induziram a produção de endoglucanases (CMCase). O substrato CMC foi o melhor indutor na produção enzimática, comparado com os demais. Às 6 horas de incubação sua atividade teve o pico de 0,12 UEA mL⁻¹min⁻¹ (0,02 mg glicose mL⁻¹min⁻¹), seguido pela palha de trigo e casca de arroz com valores de 0,06 UEA mL⁻¹min⁻¹ (0,01 mg glicose mL⁻¹min⁻¹), às 8 e 10 horas, respectivamente, e pela celulose microcristalina (0,04 UEA mL⁻¹min⁻¹).

A carboximetilcelulose é uma molécula solúvel, ao contrário dos demais substratos, o que favorece a sua biodegradação, conseqüentemente, aumenta o crescimento bacteriano e a produção enzimática. A atividade observada nos substratos casca de arroz, palha de trigo e celulose microcristalina pode estar relacionada a dois motivos: à estrutura altamente cristalina da celulose (dificulta o acesso aos sítios ativos) ou a presença de lignina que adsorve a celulase, restringindo a hidrólise (Ogeda & Petri, 2010).

A carboximetilcelulose é um substrato amplamente empregado para a produção e estudo de celulases. A produção de endoglucanases por espécies de *Bacillus* têm sido reportada na literatura por muitos autores. Mayende et al. (2006) isolaram microrganismos termofílicos de um sistema de compostagem, e avaliaram quanto a produção de celulases. Uma cepa de *Bacillus* sp. apresentou máxima atividade de celulase a 70°C, correspondendo a valores entre 1.215 – 1.333 mg glicose mL⁻¹min⁻¹. *Bacillus brevis*, *B. firmus*, *B. polymyxa*, *B. pumilus* e *B. subtilis* também já foram caracterizados quanto a hidrólise de carboximetilcelulose a celobiose (Priest, 1978).

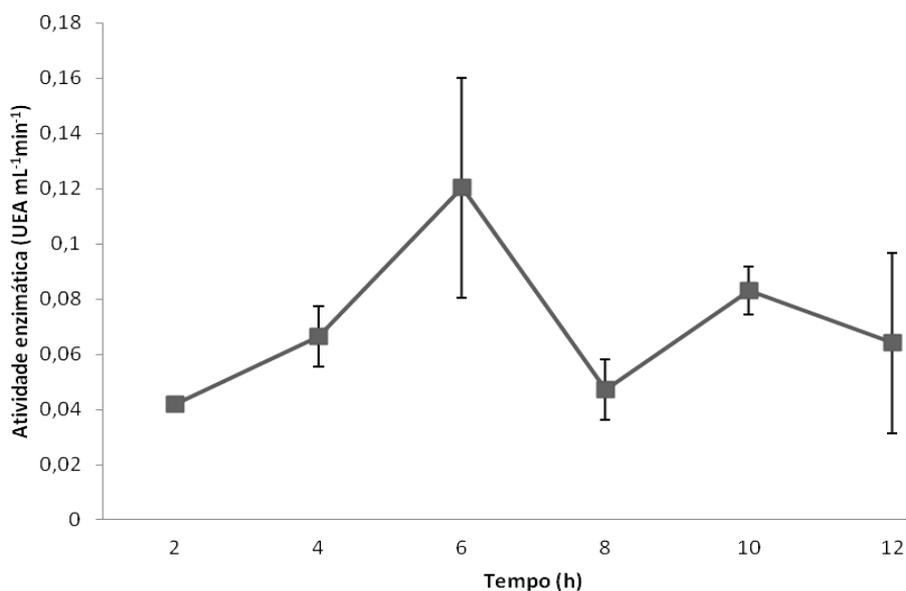


Figura 6. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% (m/v) de CMC, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).

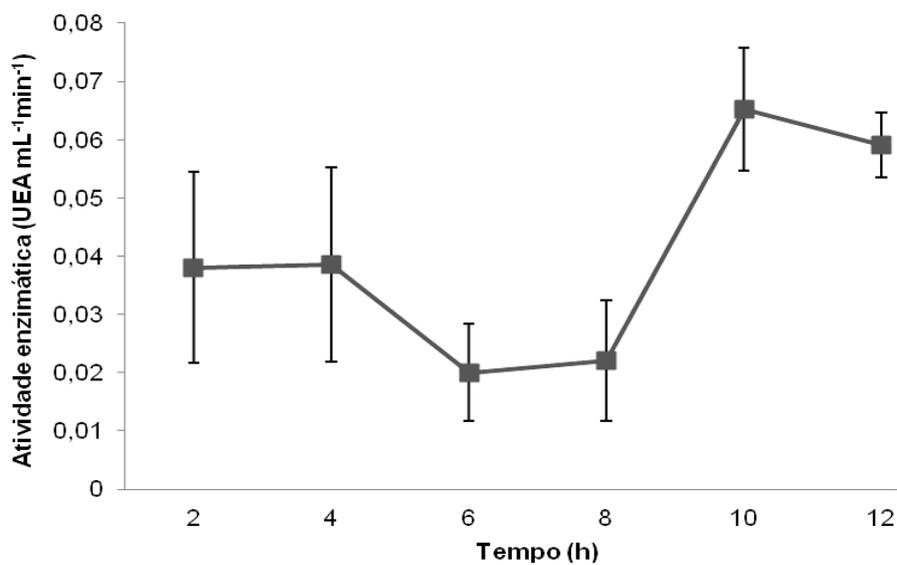


Figura 7. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% de casca de arroz, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).

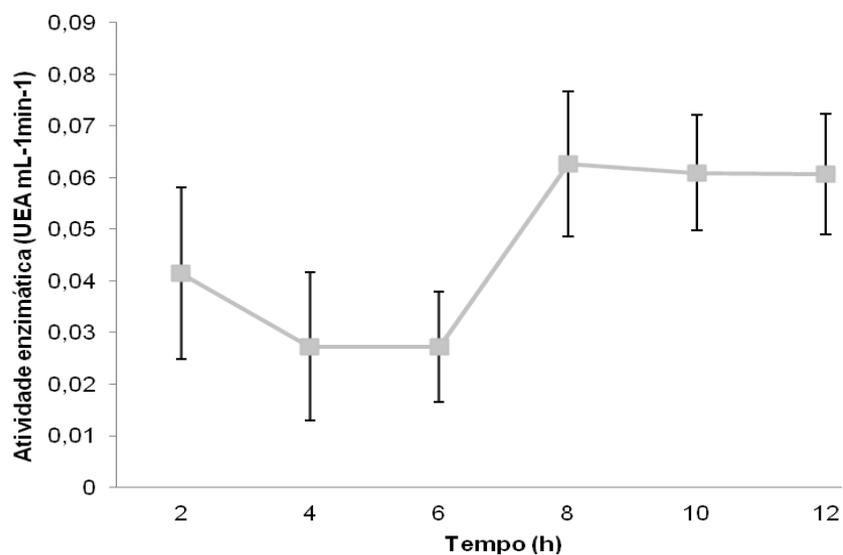


Figura 8. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% de palha de trigo, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).

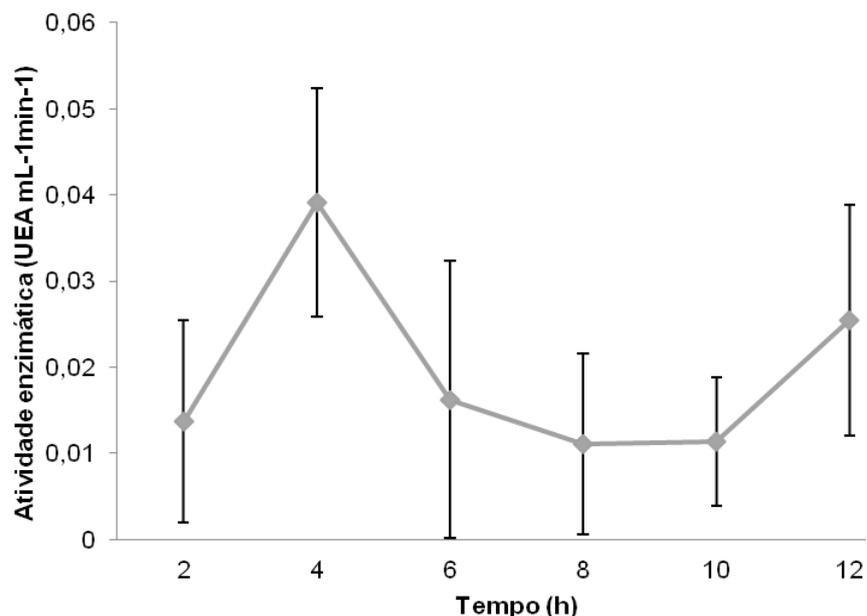


Figura 9. Atividade enzimática do isolado 380 em meio de cultura proposto por Ramachandra et al., (1987) suplementado com 0,5% de celulose microcristalina, à 50°C sob agitação de 150 r.p.m. (N = 6).

Duas cepas de *Bacillus subtilis* isoladas do solo foram avaliadas quanto a atividade CMCase, tendo sua máxima atividade após 72 horas de cultivo, com 0,9 e 0,8 U/mL (Kim et al., 2012). Se compararmos com o tempo de crescimento que apresentou máxima atividade e o valor da atividade enzimática, nossos resultados podem ser considerados satisfatórios, já que a razão entre a atividade enzimática e o tempo de produção se mostra superior aos apresentados no estudo citado anteriormente.

Poucos estudos reportam a produção de celulasas por *Bacillus* na presença de celulose microcristalina (Kim & Kim, 1995; Waeonukul & Ratanakhanokchai, 2007). A hidrólise desta molécula requer a ação sinérgica de diferentes classes de celulasas (endo e exoglucanases) (Bhat & Bhat, 1997;

Lynd et al., 2002). Assim, a pouca atividade de celulases na presença de MCC poderia estar associada ao difícil acesso da enzima ao substrato, devido ao seu alto grau de cristalinidade. No presente estudo este substrato foi o que teve menor indução na produção de endoglucanases (CMCase). Um estudo envolvendo a adsorção de celulases ao substrato (celulose microcristalina) mostrou que, quando comparadas as atividades CMCase e Avicelase, a hidrólise do substrato foi superior na presença das duas enzimas quando comparada a atividade separadamente. Esta interação entre as classes enzimáticas pode resultar em uma maior taxa de hidrólise e explica o sinergismo que ocorre entre elas, e que é necessário na presença de alguns substratos (Kim & Kim, 1992).

Alguns estudos mostram que resíduos agro-industriais como farelo de arroz, palha de arroz, bagasso de cana e farelo de trigo são usados como substratos para produção de celulases em *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* (Heck et al., 2002; Shabeb et al., 2010).

Embora a casca de arroz e a palha de trigo sejam substratos lignificados, por isso, mais recalcitrantes, neste estudo foram obtidos valores consideráveis de hidrólise enzimática, se comparados com o substrato CMC. Reyes et al. (1998) avaliaram o efeito de vários tipos de pré-tratamento, químicos (ozônio, clorito de sódio e peróxido de hidrogênio) e fotoquímicos, sobre a composição química da casca de arroz e sua subsequente susceptibilidade a hidrólise enzimática. Observavam que este processo não é favorecido pelos tratamentos, já que não é possível atingir a organização celular da casca de arroz, salientando a eficiência dos microrganismos neste

processo. *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 isolado de solo foi inoculado em meio contendo casca de arroz como fonte de celulose, e sua atividade enzimática foi avaliada para diversos substratos – avicel, CMC, celobiose, β -glucano, PNPG (*p*-nitrofenil- β -D-glucopironosídeo) – e a maior atividade relativa foi sobre CMC (Lee et al., 2008).

Resíduos como a palha de trigo costumam ser hidrolisados por fungos, devido a sua recalcitrância, porém mesmo com o auxílio desses microrganismos algumas vezes é necessário empregar tratamentos térmicos ou mecânicos para facilitar o processo (Gyalai-Korpos et al., 2010; Pierre et al., 2011). Gessesse & Mamo (1999) avaliaram a produção, por fermentação, de xilanase, celulase e protease por *Bacillus* sp. na presença de farelo de trigo, obtendo 621, 12 e 53 U de atividade por grama de farelo, respectivamente. Concluindo que este substrato (farelo de trigo) induziu a produção de outras enzimas além de celulases, que apresentam potencial hidrolítico maior.

Todos os demais testes envolvendo a caracterização enzimática foram realizados considerando as condições ideais de produção, onde houve a maior atividade enzimática - substrato CMC (0,5% m/v), tempo de incubação de 6 horas a 50°C, sob agitação de 150 r.p.m.

4.3 Determinação do pH, contagem de células viáveis e endósporos

Os valores de pH, assim como as outras variáveis, foram avaliados a cada 2 horas (Tabela 5). O meio de cultivo inicia com pH neutro (7,0) e, conforme o tempo de crescimento, o pH tornou-se alcalino em todos os

substratos, atingindo valores máximos entre 8,5 (palha de trigo) e 9,0 (CMC, casca de arroz e celulose microcristalina) após 12 horas de crescimento, não ultrapassando estes valores mesmo após 24 horas. No momento em que se determinou a maior atividade enzimática para cada substrato, o pH do meio já havia sofrido alteração (CMC = 8,0; Arroz = 8,5; Trigo = 8,0; MCC = 7,5).

A contagem de células viáveis variou de acordo com cada fonte de celulose. No meio suplementado com CMC a maior contagem foi observada às 8 horas, correspondendo a $4,0 \times 10^8$ UFC/mL, duas horas após seu pico de atividade enzimática. No caso do substrato palha de trigo e arroz, as maiores atividades corresponderam a fase estacionária de crescimento do isolado 380. A hidrólise de compostos lignocelulósicos como a palha de trigo e a casca de arroz, exige um conjunto de enzimas além de endoglucanases (CMCase), como as xilanases ou fenoxidases, por exemplo (Eriksson et al., 1990). Além disso, estas enzimas não conseguem hidrolisar carboximetilcelulose, pois os domínios catalíticos diferem. A presença destas enzimas no meio de cultivo resulta na hidrólise do substrato e crescimento bacteriano, o que pode ter influenciado esta contagem alta mesmo com baixa produção enzimática (CMCase). Na presença de celulose microcristalina, a contagem foi a menor observada entre os quatro substratos, e a maior atividade registrada (às 4 horas) correspondeu à $8,5 \times 10^6$, fase exponencial de crescimento bacteriano. Quando realizamos uma comparação entre substratos fica mais evidente a diferença na regulação da síntese de endoglucanases, como foi apresentado nestes resultados, onde os substratos CMC, casca de arroz e palha de trigo apresentaram maior atividade durante a fase de maior contagem de células.

Isto é possível comparando o tempo de síntese e o ciclo de vida da cultura. Alguns autores relatam a síntese celulolítica durante o crescimento exponencial (Sashihara et al., 1984) e outros durante a fase estacionária (Robson & Chambliss, 1984).

Durante o cultivo do isolado em meio contendo palha de trigo ou casca de arroz foi observado um aumento na consistência do substrato, como uma elasticidade semelhante a géis. Analisando a constituição destes compostos é possível observar a presença de extrativos (terpenos, óleos, graxas e corantes), os quais podem incluir sacarose – um precursor para a formação de dextrano pelos microrganismos, e este último confere propriedades semelhantes às descritas anteriormente (Salazar et al., 2005). Esse aumento na consistência do meio pode, de alguma forma, ter interferido na atividade CMC_{case}, pois juntamente com a precipitação celular, pode ter ocorrido perda de proteínas que estariam retidas neste complexo formado.

Na contagem de endósporos podemos constatar a presença desta estrutura durante todo o experimento, com uma maior evidência ao final. O endósporo é uma célula de resistência, geralmente formada pelo microrganismo quando há um estresse ambiental como, por exemplo, a ausência de condições ideais para o desenvolvimento da bactéria. Podemos atribuir a este resultado, a diminuição de fontes de nutrientes para a bactéria ao final do processo – podendo levar a uma maior formação destas células de resistência.

Tabela 5. Relação de UFC/mL ($\text{UFC} \times 10^6 \pm \text{DP}$) e endósporo/ml ($\text{End} \times 10^4 \pm \text{DP}$) em diferentes substratos e tempo de incubação (N= 6).

Substrato	Tempo (h)	0	2	4	6	8	10	12
CMC	UFC/mL	2,1 \pm 0,42	3,8 \pm 0,28	263 \pm 22	320 \pm 48	400 \pm 61	61 \pm 2,5	23 \pm 11
	End/mL	1,2 \pm 0,2	7,3 \pm 3,2	35 \pm 13	13 \pm 2,6	50 \pm 10	60 \pm 5	320 \pm 80
Arroz	UFC/mL	15 \pm 4,2	370 \pm 50	570 \pm 75	540 \pm 20	420 \pm 70	280 \pm 92	380 \pm 23
	End/mL	12,5 \pm 3,5	92 \pm 24	96 \pm 25	98 \pm 19	160 \pm 28	200 \pm 14	280 \pm 17
Trigo	UFC/mL	1,75 \pm 0,35	7,0 \pm 1,4	12 \pm 4,2	160 \pm 14	120 \pm 56	480 \pm 84	160 \pm 35
	End/mL	14 \pm 4	90 \pm 26	130 \pm 10	160 \pm 30	360 \pm 40	220 \pm 34	470 \pm 26
MCC	UFC/mL	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 1,6	8,5 \pm 3,5	0,7 \pm 0,2	0,19 \pm 0,4	0,11 \pm 0,1	8,0 \pm 2,8
	End/mL	1,2 \pm 0,1	4,5 \pm 3,4	30 \pm 8	17 \pm 6	22 \pm 6	60 \pm 7,8	37 \pm 9,8

4.4 Purificação parcial da enzima

A purificação de uma enzima oferece a possibilidade de estudar mais detalhadamente as características desta proteína. Este processo além de remover as impurezas indesejadas, concentra a proteína e possibilita torná-la menos vulnerável, já que ela acaba sendo transferida para um ambiente mais estável. Assim é possível avaliar a sua especificidade de substrato, reações com outros ligantes e atividades específicas (Queiroz et al., 2001).

O grau de purificação depende da finalidade do uso da proteína. Para algumas aplicações, o extrato bruto é suficiente. Contudo, para outros, assim como alimentos e produtos farmacêuticos, algumas vezes é necessário um alto nível de purificação. Somente com a enzima purificada é possível estimar seu real potencial biotecnológico, sendo possível inclusive sua clonagem e expressão heteróloga em organismos já utilizados em processos industriais.

Para a realização da purificação enzimática, foram realizadas duas etapas. A primeira etapa consistiu da precipitação, com sulfato de amônio em diferentes concentrações, das proteínas, a partir do extrato bruto obtido com o cultivo do isolado 380. Após a precipitação, calculou-se a atividade enzimática em cada faixa de concentração do sal. Na figura 10 estão representadas as faixas de saturação com suas respectivas atividades enzimáticas (CMCase), onde as faixas entre 60- 80% apresentaram as maiores atividades específicas. Desta forma, a faixa de 60-80% de sulfato de amônio foi escolhida para as demais etapas deste trabalho.

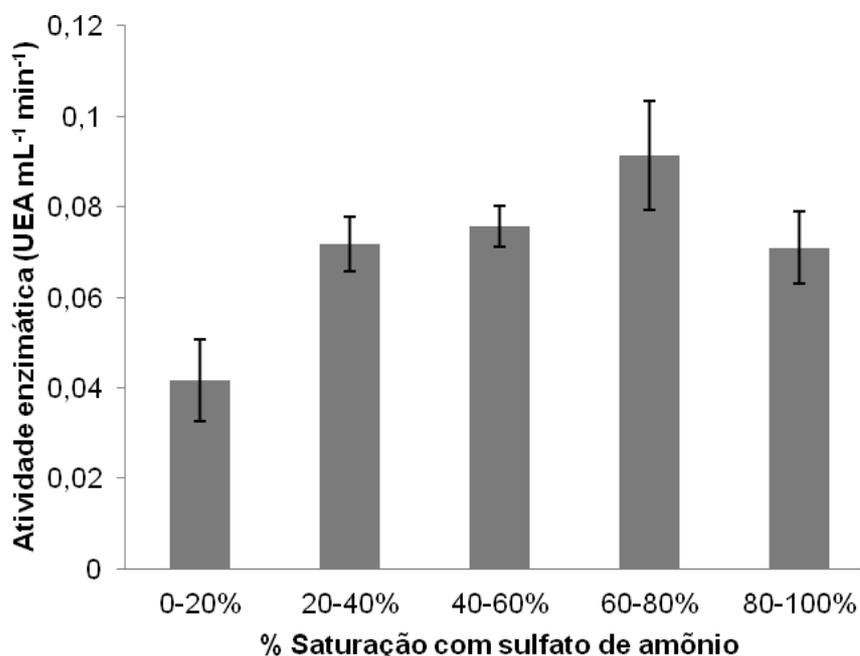


Figura 10. Atividade enzimática da enzima precipitada em diferentes concentrações de sulfato de amônio (N = 6).

Na segunda etapa, o precipitado obtido anteriormente foi aplicado em uma coluna de cromatografia líquida de gel-filtração Sephadex G-100, equilibrada com tampão PBS (pH 7,2) e eluída com o mesmo tampão. Nesta etapa foram coletadas 20 frações de 1 mL cada. Na figura 11 é possível observar a faixa de maior atividade das frações coletadas (frações 9-11), estas foram unidas para a realização dos demais testes enzimáticos.

Na tabela 6 estão representados os valores de atividade, a quantidade de proteína e o grau de purificação de cada etapa do processo. Observa-se que a atividade enzimática do purificado teve um aumento quando comparado com o extrato bruto. Em muitos estudos envolvendo purificação

enzimática é possível observar que ocorre o inverso, há uma diminuição desta atividade (Shafique & Shafique, 2011; Singh & Kumar, 1998). A quantificação de proteínas totais foi realizada em cada etapa do processo pelo método de Bradford (1976). Foram analisados o extrato bruto, o precipitado e o purificado da amostra. Os valores encontrados representam baixa quantidade de proteínas, conseqüentemente, pouca produção de enzima pelo microrganismo. Resultados envolvendo purificação de celulasas geralmente apresentam valores de proteínas superiores a 0,1 mg/mL (Heck et al., 2002), podendo chegar a mais de 6000 mg/mL (Yin et al., 2010). Apesar de serem valores muito superiores, deve-se considerar a quantidade de proteínas presentes no próprio meio de cultivo antes da inoculação, o que tem grande influência nesta quantificação, que nem sempre está relacionada com as proteínas produzidas durante o crescimento.

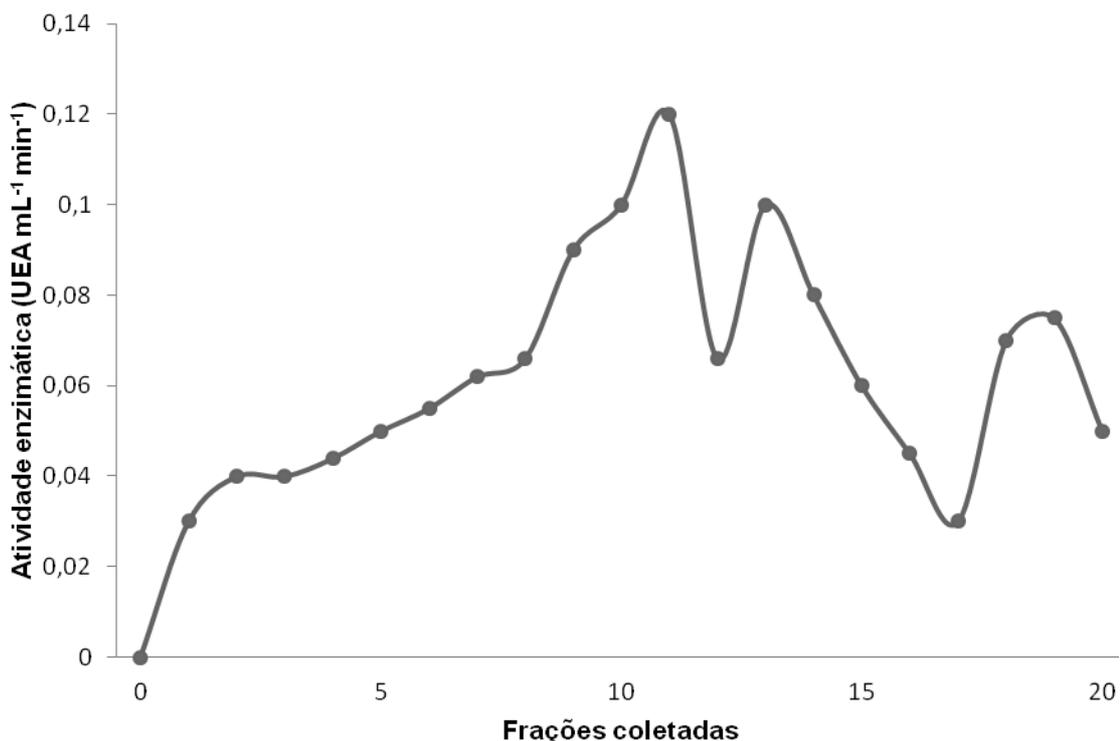


Figura 11. Perfil de atividade enzimática nas frações coletadas a partir da eluição da enzima precipitada em coluna de gel filtração Sephadex G-100 (N = 6).

Neste trabalho empregou-se apenas a cromatografia de gel filtração, mas ainda outras cromatografias são utilizadas na fase de purificação, como de troca iônica, por exemplo. O objetivo da cromatografia de gel filtração é efetuar a separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. A velocidade de deslocamento das moléculas pequenas é menor, pois estas precisam passar através do gel. As moléculas grandes apresentam uma maior velocidade de deslocamento dentro da coluna, eluindo mais rapidamente, promovendo a separação dos componentes de acordo com a massa molecular (Ó'Fágáin et al., 2011).

Tabela 6. Quadro de purificação da celulase produzida pelo isolado 380 a 50°C.

Etapa de purificação	Atividade Celulase (UEA mL⁻¹ min⁻¹)	Proteína (µg/mL)*	Fator de purificação
Extrato bruto	0,12	34	1,0
Precipitação (60- 80% saturação)	0,125	26	1,04
Sephadex G-100	0,13	20	1,08

* Bradford, 1976.

4.5 Caracterização do extrato bruto e da enzima parcialmente purificada

4.5.1 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática

Para a caracterização térmica das amostras (extrato bruto e enzima purificada) foi empregado o ensaio enzimático (Item 3.4) variando as temperaturas de incubação em banho de água. Foram testadas temperaturas entre 30°C e 80°C.

A comparação entre os resultados obtidos para o extrato bruto e o purificado pode ser observada na figura 12. As atividades enzimáticas foram maiores acima de 50°C para as duas amostras, sendo ótima a 60°C, onde

apresentaram $0,14 \text{ UAE mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para o extrato bruto e $0,12 \text{ UEA mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para o purificado.

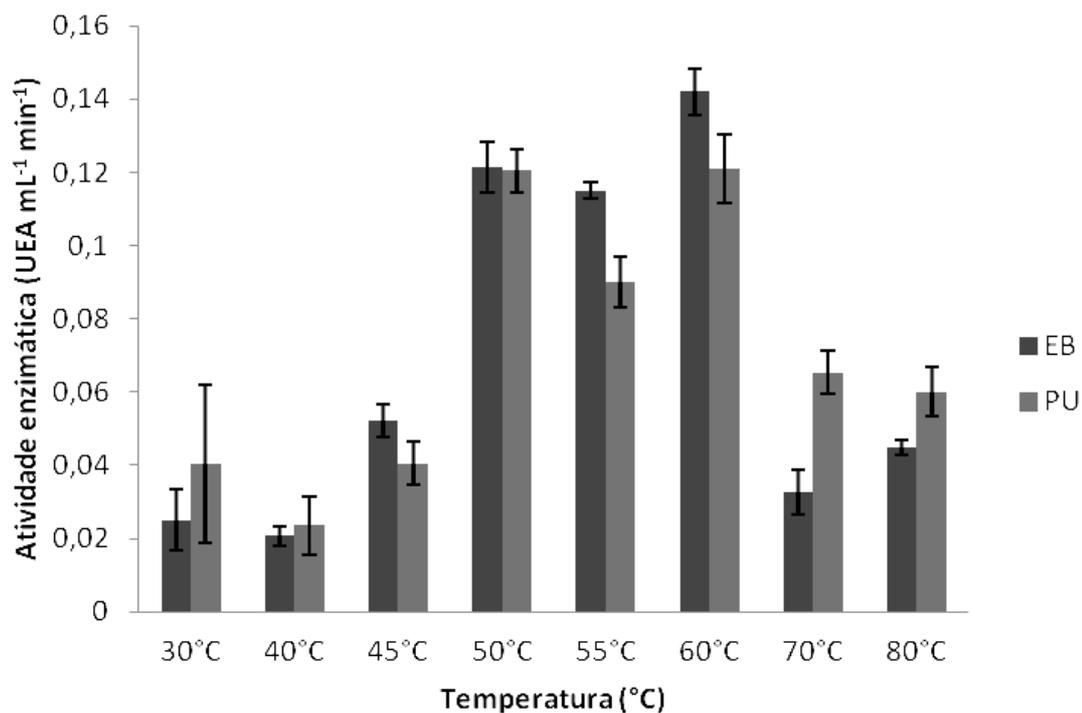


Figura 12. Efeito da temperatura sobre a atividade de hidrólise da enzima do extrato bruto (EB) e do extrato purificado (PU). A atividade foi determinada com 0,5% CMC nas temperaturas indicadas (N=6).

Kim et al., (2012) estudando a atividade CMCase do extrato bruto de quatro cepas de *Bacillus*, isoladas de ambientes agrícolas, obtiveram, após 72 horas de cultivo, $0,9 \text{ UAE mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para duas cepas, sendo que as demais apresentaram valores inferiores ($0,3 \text{ UAE mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Resultados similares foram relatados por Chang et al., (2009), com atividade de entre 1,0 e 1,2 U/mL entre 50°C e 60°C, para CMCase em duas cepas de *Bacillus* isolados de

resíduos vegetais. As enzimas advindas de bactérias termofílicas têm apresentado grande interesse no mercado industrial devido a sua alta atividade e estabilidade em temperaturas elevadas. Atividade enzimática similar aos resultados do presente trabalho foi descrita por Rastogi et al. (2010), a partir de isolados de compostagem, onde uma cepa de *Bacillus*, a 60°C obteve 0,12 U/mL de atividade CMCase para o extrato bruto.

Análises envolvendo a celulose purificada também têm apresentado valores similares aos nossos. Li et al., (2008) descreveram uma endoglucanase de *Bacillus subtilis* como termoestável. Eles testaram temperaturas entre 35°C e 80°C, sendo que ela apresentou temperatura ótima aos 50°C, correspondendo a 0,3 U/mL de atividade. Sua estabilidade se manteve em 80% para esta temperatura após 30 minutos de incubação na mesma. Korpole et al., (2011) reportaram um celulase com maior atividade a 50°C, correspondendo a 4,8 U/mL CMCase. Bischoff et al., (2006) numa comparação entre a atividade do extrato bruto e da enzima purificada de *B. licheniformis*, mostraram que para atividade CMCase com 12 horas de incubação, o extrato bruto teve atividade ótima de 0,045 U/mg a 55°C, enquanto o purificado teve sua atividade ótima a 65°C. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que tanto o extrato bruto quanto a enzima parcialmente purificada tiveram a mesma temperatura ótima para atividade enzimática (60°C). Desta forma, observamos que mesmo que o substrato tenha induzido a produção de apenas uma enzima específica, após a remoção de impurezas pela purificação, esta proteína poderá ou não manter suas características do extrato bruto. Singh et al., (2004) em seu trabalho com *B. sphaericus* citam que entre os substratos testados para

a atividade CMCase (12 horas de incubação), CMC foi o que apresentou melhores resultados, sendo que sua enzima purificada teve atividade máxima de 1,7 U/mL a 60°C e pH 8,0.

Na figura 13 estão representados os valores de atividade enzimática para o extrato bruto, comparando sua taxa de hidrólise e sua termorresistência (após 30 minutos de incubação do extrato bruto na respectiva temperatura, seguido da realização do ensaio enzimático nas condições ótimas). Nas temperaturas de 30°, 60° e 70°C as atividades foram mantidas após este período de pré-incubação, já nas demais temperaturas testadas, foi perdida atividade endoglucanase. Mayende et al., (2006) também relataram dados que mostraram a termorresistência da celulase estudada de *Bacillus*, sendo que após 60 minutos, mantida a 60°C, houve uma indução na taxa de hidrólise, variando de 0,6 aos 5 minutos para 0,9 mg mL⁻¹min⁻¹ de glicose liberada aos 60 minutos de incubação.

É importante salientar que muitos resultados envolvendo atividade enzimática variam em relação à unidade e também em relação ao tempo de incubação para produção da enzima, desta forma a comparação entre os valores apresentados neste trabalho e os obtidos na literatura nem sempre é possível, devido à existência destas variáveis.

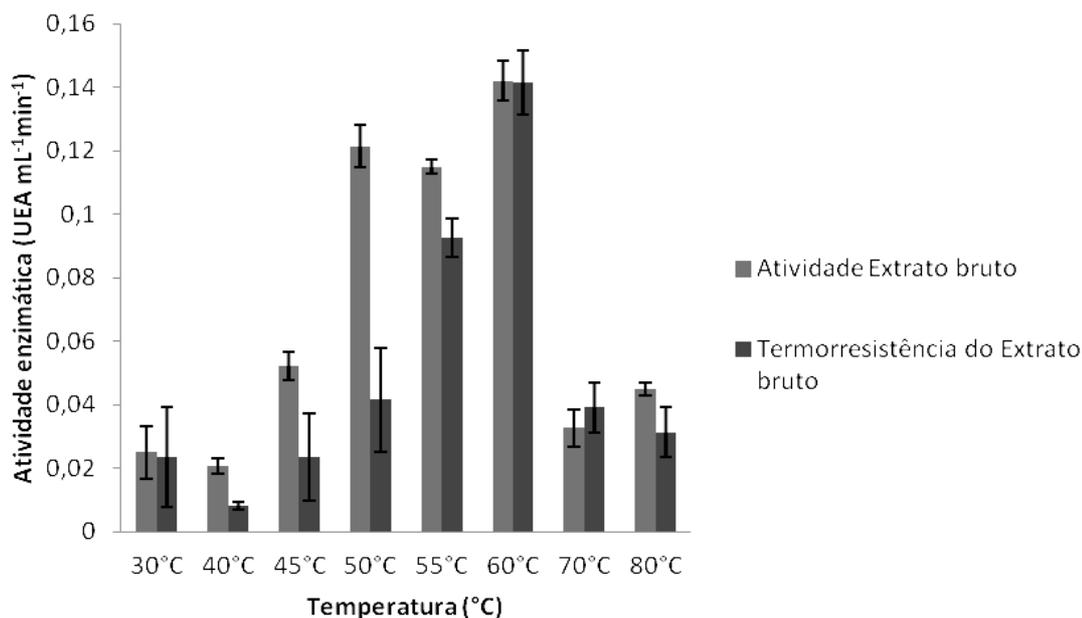


Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade de hidrólise e a termorresistência do extrato bruto. A atividade CMC_{Case} foi determinada pelo ensaio enzimático nas temperaturas indicadas. A estabilidade foi determinada incubando-se o extrato bruto nas diferentes temperaturas por 30 minutos, seguida do ensaio enzimático (N=6).

4.5.2 Termoestabilidade da enzima parcialmente purificada

A enzima foi incubada a 60°C por 2 horas, sendo que a atividade enzimática foi avaliada a cada 30 minutos. A atividade foi mínima aos 30 minutos de incubação, e teve um aumento nas demais amostragens, apresentando valor semelhante ao purificado sem tratamento (t=0) aos 120 minutos (Figura 14). Estes dados demonstram a termoestabilidade da enzima parcialmente purificada. Muitos estudos relatam que as enzimas mantêm sua atividade em 100% após algumas horas de incubação, e também alguns

demonstram um aumento desta atividade pela exposição à determinada temperatura por algumas horas.

Christakopoulos et al., (1999) caracterizaram uma endoglucanase purificada de *Bacillus pumilus* que, após uma hora de incubação, manteve 100% de sua atividade entre 30°C e 50°C, e 90% a 60 °C. Resultados semelhantes foram observados em *Bacillus* sp., quando a enzima purificada foi incubada por 15 minutos nas diferentes temperaturas. Sua estabilidade foi de 100% entre 30°C e 55°C, já aos 60°C ela passou para 50% (Hakamada et al., 2002).

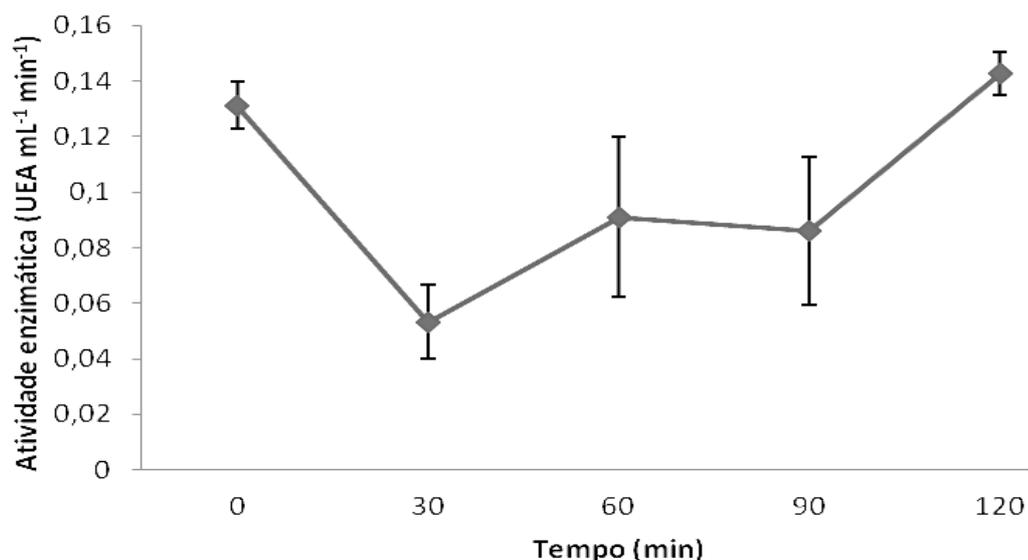


Figura 14. Termoestabilidade da enzima parcialmente purificada quando exposta a 60°C por 2 horas, seguida do ensaio enzimático a 60°C (N = 3).

4.5.3 Efeito do pH sobre a atividade de hidrólise e na estabilidade das celulases do extrato bruto

Mudanças extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas. Já, mudanças mais brandas podem induzir a uma dissociação da enzima, e algumas vezes podendo levar a formas mais ativas, ou também a sua completa inativação (Nelson & Cox, 2011).

Os resultados deste estudo com o extrato bruto mostram que a faixa de pH com a maior atividade enzimática foi de 7,0 a 9,0 (Figura 15). Para analisar a estabilidade enzimática frente aos diferentes pHs, incubou-se o extrato bruto juntamente com as respectivas soluções, por 30 minutos, e posteriormente determinada a atividade em cada uma e comparado este resultado com aquele obtido sem a exposição prévia da enzima aos diferentes pHs. A partir disso, observou-se que a atividade enzimática manteve mais de 60% de seu valor na faixa de pH considerada ótima (pH de 7,0 a 9,0). Sendo que para o pH 9,0, 87% da atividade foi mantida após o tempo de incubação testado (30 minutos). Considerando 100% sua atividade antes da exposição, por 30 minutos, às soluções de pH.

Horikoshi et al., (1984) analisaram o a atividade CMCase do extrato bruto produzido por *Bacillus* sp. N-4 isolado do solo. Sua atividade foi detectada em uma ampla faixa de pH (5,0–10,0), sendo pH 10,0 ótimo para ação enzimática. Outra bactéria, *Bacillus* sp. 1139, produziu uma CMCase, que foi purificada e mostrou ter atividade ótima em pH 9,0. Além disso, a enzima se manteve estável em pH de 6,0 a 11,0 por 10 minutos (a 40°C) (Fukumori et al., 1985). *Bacillus licheniformis*, isolado de solo, também foi

reportado expressando uma endoglucanase alcalina, com atividade ótima em pH 10,0 (Aygan et al., 2011). Hakamada et al., (1997) e Endo et al., (2001) analisaram endoglucanases purificadas produzidas por *Bacillus* sp. e observaram a faixa de maior atividade para pH entre 8,6 e 10,0.

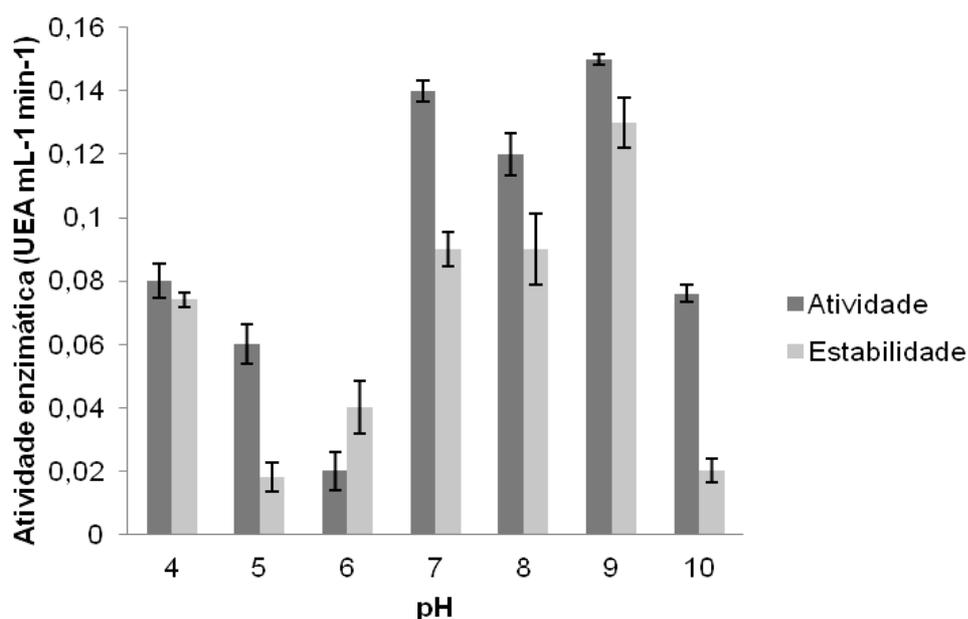


Figura 15. Efeito do pH sobre a atividade de hidrólise e sobre a estabilidade da enzima no extrato bruto. A atividade CMCase foi determinada nos pHs indicados. A estabilidade foi determinada incubando-se a enzima em diferentes pHs, seguida do ensaio enzimático (N = 3).

Valores extremos de pH podem causar desnaturação protéica considerável e conseqüente inativação enzimática. Por isso, é muito útil saber em que faixa de pH a enzima é mais estável, já que o pH de máxima estabilidade nem sempre coincide com o de máxima atividade.

Alguns microrganismos apresentam melhor atividade hidrolítica em pH ácido, é o caso da maioria dos fungos celulolíticos. Este fato também foi discutido por Ozaki & Ito (1991), para a atividade endoglucanase purificada produzida por *Bacillus* sp., com atividade entre pH 4,2 e 6,9, e maior hidrólise a 5,2. A curva de estabilidade foi muito abrangente, pois manteve 100% de atividade para pH entre 3,2 e 9,5.

Enzimas alcalinas tem aplicabilidade na indústria de detergentes, pois melhoram a ação de sabões detergentes. Já as enzimas neutras e ácidas, por sua vez, são empregadas no acabamento de tecidos, como na lavagem de jeans.

4.5.4 Efeito de detergentes sobre a atividade da enzima parcialmente purificada

Neste trabalho foram testados os detergentes SDS e Triton X-100 nas concentrações 0,5 e 1,0% (v/v), e os resultados estão ilustrados na tabela 7. Para avaliar a influência do detergente na atividade da enzima, incubou-se a amostra purificada com estes produtos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Detergentes são considerados inibidores enzimáticos, e geralmente causam diminuição da atividade enzimática. A adição destes produtos levou a uma diminuição na atividade enzimática, com exceção do Triton X-100 1,0% (v/v), um detergente não-aniônico que induziu a atividade de endoglucanase.

Tabela 7. Efeito da adição de detergentes na atividade enzimática da enzima parcialmente purificada (N = 3).

Detergente	Concentração	Atividade enzimática (UAE mL/min)
Controle	0%	0,13 ± 0,005
SDS	0,5%	0,1 ± 0,01
	1,0%	0,072 ± 0,002
Triton X-100	0,5%	0,025 ± 0,008
	1,0%	0,2 ± 0,01

Analisando o efeito de aditivos na atividade endoglucanase de *B. licheniformes*, Aygan et al., (2011) adicionaram SDS e Triton X-100, na concentração de 1%, incubando a 30°C por 15 e 60 minutos. Aos 15 minutos, a atividade relativa foi de 20% para SDS, chegando a apenas 11% aos 60 minutos de incubação. Para o Triton X-100 a atividade residual foi de 29% aos 15 minutos, e 14% aos 60 minutos. Também houve uma inibição da atividade, porém menor, em uma endoglucanase de *B. pumilus*, onde a atividade relativa foi de 88%, com a adição de SDS (0,1%) e de 94% para Triton X-100 (0,05%) (Lima et al., 2005).

O aumento da eficiência de hidrólise com a adição de surfactantes à reação vem sendo reportado por alguns autores. O intuito é promover maior adsorção das celulasas ao polímero celulósico. Alkasrawi et al., (2003) suplementaram o meio hidrolítico com tween-20 (2,5 g/L), o que proporcionou

um aumento de 10% na conversão de celulose em glicose. Uma hipótese é que a presença destes compostos possam tornar a celulose mais acessível a enzima, facilitando sua hidrólise.

4.6 Determinação da massa molecular

A análise de proteínas foi realizada através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Conforme observado na figura 16, a coloração do gel revelou a presença de apenas uma banda, tanto no extrato bruto quanto na enzima purificada, com peso molecular de 20 kDa.

Muitos microrganismos quando induzidos a produzir celulasas, acabam apresentando enzimas de pesos moleculares e atividades distintas, por isso que se torna difícil sua purificação. Samuel et al., (2010) verificaram uma celulase produzida por *Bacillus* isolado de resíduos, a qual apresentou massa molecular entre 6 e 20 kDa. A massa molecular das celulasas pode variar bastante como podemos observar nos estudos envolvendo esta caracterização. Li et al., (2008) também verificou uma endoglucanase produzida por *B. pumilus*, que foi purificada e apresentou massa molecular de 74,98 kDa. Uma celulase de 72 kDa também foi reportada por Kim et al. (1995), que apresentava atividade CMCase e Avicelase e foi obtida de *B. circulans*. Para *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53, uma CMCase purificada apresentou massa molecular estimado em 56 kDa (Kim et al., 2009). Uma xilanase de mesma massa molecular também foi observada por Shrinivas et al., (2010), em *Bacillus* isolado da indústria de papel e polpa. Apesar desta variedade encontrada entre as massas moleculares, ainda não foi estabelecida uma correlação entre a

atividade enzimática e o tamanho da enzima, mas sabe-se que enzimas de baixo peso molecular, compostas de uma única cadeia polipeptídica e que possuam pontos dissulfetos são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alta massa molecular (Furigo & Pereira, 2012).

As amostras obtidas durante as fases de purificação foram submetidas à eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (PAGE) e CMC 0,2%. Após a migração eletroforética a atividade foi visualizada através da coloração com vermelho Congo (0,1%). Na figura 11 é possível observar que houve hidrólise de CMC no gel para as três amostras, embora não se possa relacionar esta hidrólise a banda de 20 kDa presente no gel SDS-PAGE.

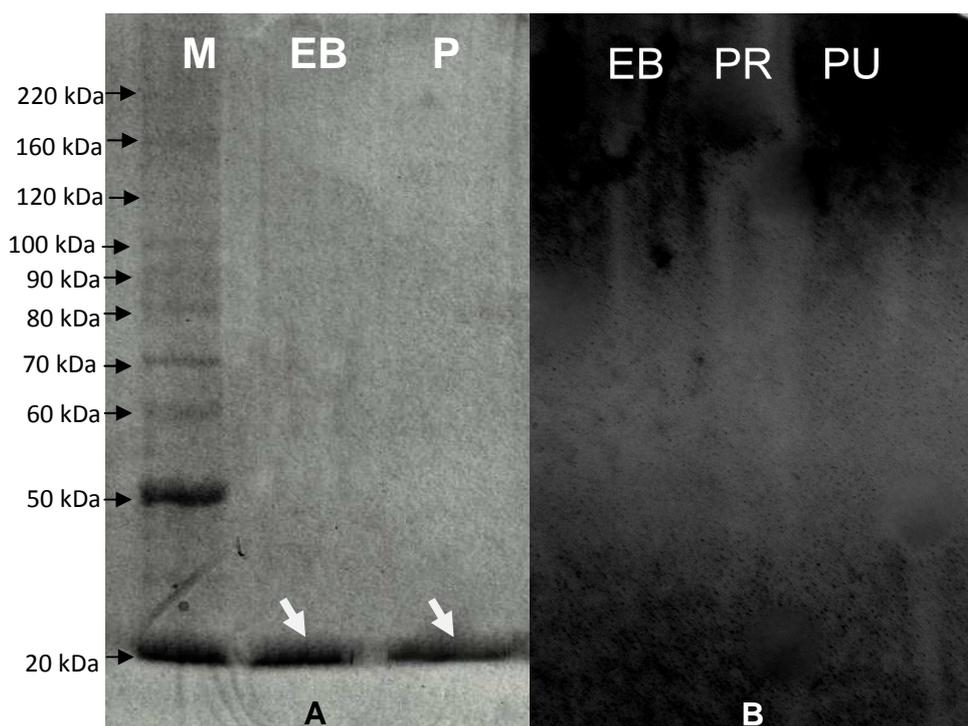


Figura 16. **(A)**: Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). M: marcador de massa molecular, EB: extrato bruto, P: enzima parcialmente purificada, Setas brancas: banda de proteína. **(B)**: Gel de atividade enzimática da celulase nas três fases do processo de purificação. EB: extrato bruto, PR: precipitado. PU: purificado.

4.7 Identificação bioquímica

A partir da coloração de Gram e de endósporo, foi possível observar que as três bactérias apresentadas nos testes deste trabalho – 380, 381 e 382, são bastonetes gram-positivos formadores de endósporo (Figura 17).

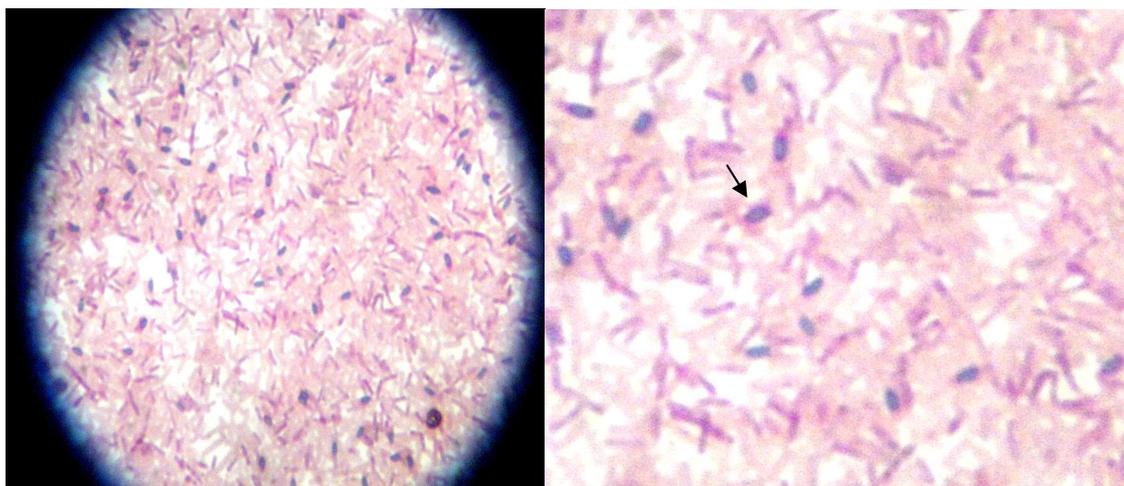


Figura 17. Coloração de endósporo do isolado 380. Aumento: 1000x. Seta: endósporo.

Os resultados bioquímicos obtidos para o isolado 380 (tabela 8) mostram que o mesmo pertence ao gênero *Bacillus*. No entanto os mesmos não permitiram a identificação em nível de espécie. Desta forma para a identificação do isolado será realizado o sequenciamento do rRNA 16S.

Tabela 8. Resultados para os testes bioquímicos realizados com o isolado 380.

Teste	Resultado	Teste	Resultado
Catalase	+	Nitrato	+
VP	-	SIM (H ₂ S)	-
Caseína	+	SIM (indol)	-
Gelatina	-	SIM (motilidade)	-
Amido	+	NaCl 2%	+
Citrato	-	NaCl 5%	+
Lecitina	-	NaCl 7%	+
Mac Conkey	-	NaCl 10%	-
Urease	+	Glicose	+
OF	F	Manitol	+
Tioglicolato	anaeróbio facultativo	Xilose	-
Arabinose	-		

5 CONCLUSÕES

1. Das 183 bactérias isoladas, 22 produziram celulases em meio sólido na presença de carboximetilcelulose (CMC), a 37°C.
2. O isolado 380 apresentou a maior atividade de celulase em meio líquido com carboximetilcelulose (0,5%);
3. A maior produção enzimática foi constatada quando na presença de carboximetilcelulose, incubadas na temperatura de 50°C, após 6 horas de crescimento;
4. A temperatura ótima da atividade enzimática, tanto no extrato bruto quanto no purificado, foi atingida a 60°C;
5. A estabilidade térmica foi observada a 60°C;
6. O pH ótimo para a atividade enzimática do extrato bruto foi de 9,0;
7. De acordo com o SDS-PAGE, observou-se a presença de uma celulase produzida pelo isolado 380 que apresentou massa molecular de aproximadamente 20 kDa.
8. De acordo com os testes bioquímicos, o isolado 380 pertence ao gênero *Bacillus*.

6 PERSPECTIVAS

1. Realizar a amplificação de fragmentos da região 16S do rDNA, para os três isolados selecionados: 380, 381 e 382, afim de identificá-los a nível de gênero e espécie.
2. Avaliar a produção de carboximetilcelulase para os isolados 381 e 382, na presença dos quatro substratos testados.
3. Avaliar o efeito do pH sobre a atividade da enzima parcialmente purificada;
4. Avaliar a produção de celulase em temperaturas inferiores a 50°C;

7 REFERÊNCIAS

ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BORJESSON, J.; WINGREN, A.; GALBE, M.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 71 – 78, 2003.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology reviews**, v. 29, p. 719 – 739, 2005.

AYGAN, A.; KARCIOGLU, L.; ARIKAN, B. Alkaline Thermostable and halophilic andoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. **African Journal of Biotechnology**, v. 10 (5), p. 789 – 796, 2011.

BAGGA, P. S.; SANDHU, D. K.; SHARMA, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 61 – 68, 1990.

BAGNARA, C.; GAUDIN, C.; BÉLAÏCH, J. P. Physiological properties of *Cellulomoma fermentans*, a mesophilic cellulolytic bacterium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.170–176, 1988.

BAGNARA, C.; TOCI, R.; GAUDIN, C.; BÉLAÏCH, J. P. Isolation and characterization of a cellulolytic microorganism, *Cellulomonas fermentans*, sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 502–507, 1985.

BAHARUDDIN, A. S.; RAZAK, M. N. A.; HOCK, L. S.; AHMAD, M. N.; ABD-AZIZ, S.; RAHMAN, N. A. A.; SHAH, U. K. M.; HASSAN, M. A.; SAKAI, K.; SHIRAI, Y. Isolation and characterization of thermophilic cellulose-producing

bacteria from empty fruit bunches-palm oil mill effluent compost. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, p. 56 – 62, 2010.

BAYER, E. A.; CHANZY, H.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 548 – 557, 1998.

BAYER, E. A.; MORAG, E.; LAMED, R. The cellulosome – a treasure-trove for biotechnology. **Trend in Biotechnology**, v. 12, p. 379 – 386, 1994.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 25 – 58, 1994.

BÉGUIN, P.; LEMAIRE, M. The cellulosome; an exocellular, multiprotein complex specializes in cellulose degradation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 201 – 236, 1996.

BHAT, M. K.; WOOD, T. M. The cellulose of the anaerobic bacterium *Clostridium thermocellum* – isolation, dissociation and reassociation of the cellulosome. **Carbohydrate Research**, v. 227, p. 293 – 300, 1992.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, p. 583 – 620, 1997.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355 – 383, 2000.

BISCHOFF, K. M.; ROONEY, A. P.; LI, X.; LIU, S.; HUGHES, S. R. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letter**, v. 28, p. 1761 – 1765, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291 – 1296, 2002.

CAO, Y.; TAN, H. Structural characterization of cellulose with enzymatic treatment, **Journal of Molecular Structure**, v. 705, p. 189 – 193, 2004.

CARLILE, M.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, p. 460, 1998.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 2191 – 2195, 2009.

CHANG, C.; NG, C.; WANG, C.; SHYU, Y. Activity of cellulose from *Thermoactinomyces* and *Bacillus* spp. isolated from *Brassica* waste compost. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 304 – 308, 2009.

CHRISTAKOPOULOS, P.; HATZINIKOLAOU, D. G.; FOUNTOUKIDIS, G.; KEKOS, D.; CLAEYSSSENS, M.; MACRIS, B. J. Purification and mode of action of an alkali-resistant endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus pumilus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 361, p. 61–66, 1999.

CLEMMER, J. E.; TSENG, C. L. Identification of the major anaerobic end products of *Cellulomonas* sp. (ATCC 21399). **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 823– 826, 1986.

COUGHLAN, M. M.; TUOHY, E. F.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKA, M.; HUGHES, M. **Hemicellulose and hemicellulases** (Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. P., eds) p. 53–84, 1993.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO – UFSC. Disponível em: www.dms.ufsc.br. Acessado em: 04 de abril de 2012.

ENDO, K.; HAKAMADA, Y.; TAKIZAWA, S.; KUBOTA, H.; SUMITOMO, N.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. A novel alkaline endoglucanase from a alkaliphilic *Bacillus* isolated: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 109 – 116, 2001.

ERIKSSON, K-E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer Series in Contemporary Bioscience, 408p., 1990.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. 2012. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso em: 18 fev. 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions**, 1ªed., Walter de Gruyter, 600p, 1989.

FERNANDES, F.; DA SILVA, S. M. C. P. **Manual prático para a compostagem de biossólidos**. Universidade Estadual de Londrina, 191pp., 1999.

FILHO, E. X. F.; TUOHY, M. G.; PULLS, J.; COUGHLAN, M. P. The xylan-degrading enzyme systems of *Penicillium capsulatum* and *Talaromyces emersonii*. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 25S, 1991.

FURIGO, A. J.; PEREIRA, E. B. **Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática**. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/cinetica_enzimatic_a.pdf. Acessado em: Março de 2012.

FUKUMORI, F.; SASHIHARA, N.; KUDO, T.; HORIKOSHI, K. Purification and properties of cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. no. 1139. **J Gen Microbiol**, v. 131, p. 3339 – 3345, 1985.

GALANTE, Y., DE CONTI, A. AND MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry. In Harman, G. and Kubicek, C. (eds.) *Trichoderma and Gliocladium*. **Enzymes, biological control and commercial applications**, v. 2, p. 311–326, 1998.

GAN, Q.; ALLEN, S.J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental study and mathematical modelling. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1003–1018, 2003.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 221- 224 , 2001.

GESSESSE, A.; MAMO, G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. **Enzyme and microbial technology**, v. 25, p. 68 – 72, 1999.

GILIGAN, W.; REESE, E. T. Evidence for multiple components in microbial cellulases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 90 – 107, 1954.

GÓMEZ-GÓMEZ, E.; ISABEL, M.; RONCERO, G.; DI PIETRO, A.; HERA, C. Molecular characterization of a novel endo-beta-1, 4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, v. 40, p 268–275, 2001.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375 – 384, 2005.

GUPTA, P.; SAMANT, K.; SAHU, A. isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International Journal of Microbiology**, V. 2012, p. 1 – 5, 2011.

GYALAI-KORPOS, M.; NAGY, G.; MARECZKY, Z.; SCHUSTER, A.; RECZEY, K.; SCHMOLL, M. Relevance of the light signaling machinery for cellulase expression in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). **BMC Research Notes**, v. 3, p. 330, 2010.

HAKAMADA, Y.; KOIKE, K.; YOSHIMATSU, T.; MORI, H.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Thermostable alkaline cellulose from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp., KSM-S238. **Extremophiles**, v. 1, p. 151 – 156, 1997.

HAKAMADA, Y.; ENDO, K.; TAKIZAWA, S.; KOBAYASHI, T.; SHIRAI, T.; YAMANE, T.; ITO, S. Enzymatic properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1570, p. 174 – 180, 2002.

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

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

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry**, v. 293, p. 781–788, 1993.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p. 637 – 644, 1998.

HOLT, J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, 787 p.

HORIKOSHI, K.; NAKAO, M.; KURONO, Y.; SASHIHARA, N. Cellulases of an alkaliphilic *Bacillus* strain isolated from soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30 (6), p. 774 – 779, 1984.

HUBER, T.; MÜSSIG, J.; CURNOW, O.; PANG, S.; BICKERTON, S.; STAIGER, M. P. A critical review of all-cellulose composites. **Journal of Materials Science**, v. 47, p. 1171 – 1186, 2012.

IBRAHIM, A. S. S.; EL-DIWANY, A. I. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, p. 473 – 478, 2008.

IRWIN, D. C.; SPEZIO, M.; WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 1002–1013, 1993.

ISHIKAWA, A.; OKANO, T.; SUGIYAMA, J. Fine structure and tensile properties of ramie fibres in the crystalline form of cellulose I, II, III and IV. **Polymer**, v. 38, p. 463 – 468, 1997.

ITO, S. Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. **Extremophiles**, v. 1, p. 61 – 66, 1998.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 263 – 268, 2003.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. **Biochemistry of microbial degradation**, p. 233–277, 1994.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503 – 507, 2008.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Biosource Technology**, v. 98, p. 74-81, 2007.

KIM, B.; LEE, B.; LEE, Y.; JIN, I.; CHUNG, C.; LEE, J. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 411 – 416, 2009.

KIM, C. Characterization and substrate specificity of an endo- β -1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 959 – 965, 1995.

KIM, C.; KIM, D. Purification and specificity of a specific endo- β -1,4-D-glucanase (Avicelase II) resembling exo-cellobiohydrolase from *Bacillus circulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 248 – 254, 1995.

KIM, C. H.; KIM, D. S. Production and characterization of crystalline cellulose-degrading cellulase components from a thermophilic and moderately alkaliphilic bacterium. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.2, p. 7–13. 1992.

KIM, J.; HUR, S.; HONG, J. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. HSH-810. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 313 – 316, 2005.

KIM, Y-K; LEE, S-C; CHO, Y-Y; OH, H-J; KO, Y-H. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. **International Scholarly Research Network Microbiology**, p. 1 – 9, 2012.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**, p. 273 – 307, 1998.

KORPOLE, S.; SHARMA, R.; VERMA, D. Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulase producing *Bacillus* species from a landfill ecosystem. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 531 – 535, 2011.

KOTCHONI, S.; GACHOMO, E. W.; OMAFUVBE, B. O.; SHONUKAN, O. O. Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 8, n. 2, p. 286 – 292, 2006.

KUMAR, A.; YOON, M-Y.; PURTELL, C. Optimizing the use of cellulase enzymes in finishing cellulosic fabrics. **Textile Chemist and Colorist**, v.29, p. 37–42, 1998.

KUMAR, P. K. R.; SINGH, A.; SCHUEGERL, K. Fed-batch culture for the direct conversion of cellulosic substrates to acetic acid/ethanol by *Fusarium oxysporum*. **Process Biochemistry**, v. 26, p 209–216, 1991.

KHYAMI-HORANI, H. Partial purification and some properties of an alkaline cellulase from an alkalophilic *Bacillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**.v. 12, p. 525-529,1996.

LEE, Y.; KIM, B.; LEE, B.; JO, K.; LEE, N.; CHUNG, C.; LEE, Y.; LEE, J. Purification and characterization of cellulose produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 378 – 386, 2008.

LI, W.; ZHANG, W.; YANG, M.; CHEN, Y. Cloning of the thermostable cellulose gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 40, p. 195 – 201, 2008.

LIMA, A. O. S.; QUECINE, M. C.; FUNGARO, M. H. P.; ANDREOTE, F. D.; MACCHERONI, W. JR.; ARAUJO, W. L.; SILVA-FILHO, M. C.; PIZZIRANI-KLEINERM, A. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of a beta-1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 57 – 65, 2005.

LYND, L. R.; LARSON, E.; GREENE, N.; LASER, M.; SHEEHAN, J.; DALE, B. E.; MCLAUGHLIN, S.; WANG, M. The role of biomass in America's energy future: framing the analysis. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 3, p. 113 – 123, 2009.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506 – 577, 2002.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Baltimore: Lippincott William & Wilkins, 2000, 912p.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, K. M. Thermophilic Fungi: Their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66 (3), p. 506 – 577, 2002.

MAYENDE, L.; WILHELMI, B. S.; PLETSCHKE, B. I. Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 2963 – 2966, 2006.

MILES, A. A.; MIRSA, S. S. The estimation of bacterial power of the blood. **Journal of Higiene**, v. 38, p. 732 – 749, 1938.

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

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375 – 380, 1944.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KÄHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 711 – 729, 1999.

NISIZAWA, T.; SUZUKI, H.; NISIZAWA, K. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. **Journal of Biochemistry**, V 71, 0. 999 – 1007, 1972.

ODENIYI, O. A.; ONILUDE, A. A.; AYODELE, M. A. Production characteristics and properties of cellulose/polygalacturonase by a *Bacillus coagulans* strain from a fermenting palm-fruit industrial residue. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 407 – 417, 2009.

Ó'FÁGÁIN, C.; CUMMINS, P.; O'CONNOR, B. F. Gel-filtration chromatography. **Protein Chromatography**, Methods in molecular medicine, v. 681, p 25 – 33, 2011.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33 (7), p. 1549 – 1558, 2010.

OZAKI, K.; ITO, S. Purification and properties of an acid endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 41 – 48, 1991.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: na overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53 – 63, 2002.

PIERRE, G.; MAACHE-REZZOUG, Z.; SANNIER, F.; REZZOUG, S. A. High-performance hydrolysis of wheat straw using cellulose and thermomechanical pretreatment. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2194 – 2200, 2011.

PIZZI, A.; EATON, N. The structure of cellulose by conformational analysis. **Journal Macromolecular Sciences**, v. 22, p. 105 – 137, 1985.

PRIEST, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological Reviews**, v. 41 (3), p. 711 – 753, 1978.

QIN, Y.; HE, H.; LI, N.; LING, M.; LIANG, Z. Isolation and characterization of a thermostable cellulose-producing *Fusarium chlamyosporum*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 1991 – 1997, 2010.

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interactions chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 143 – 159, 2001.

RABINOVICH, M. L.; MELNIK, M. S.; BOLOBOBA, A. V. Microbial Cellulases (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, p. 305 - 322, 2002a.

RABINOVICH, M. L.; MELNIK, M. S.; BOLOBOBA, A. V. The structure and mechanism of action cellulolytic enzymes. **Biochemistry**, v. 67, p. 850 – 871, 2002b.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D. L.; POMETTO, A. L. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* sp. a comparative study of wild-type and genetically manipulated strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. -2754 – 2760, 1987.

RAINEY, F. A.; DONNISON, A. M.; JANSSEN, P. H.; SAUL, D.; RODRIGO, A.; BERGQUIST, P. L.; DANIEL, R. M.; STACKEBRANDT, E.; MORGAN, H. W. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 120, p. 263–266, 1994.

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

RASTOGI, G.; BHALLA, A.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K. M.; HUGHES, S. R.; CHRISTOPHER, L. P.; SANI, R. K. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8798 – 8806, 2010.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeitos de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21 (2), p. 140 – 143, 1998.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47 (5), p. 1039 – 1046, 1984.

ROGERS, P.; GOTTSCHALK, G. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in clostridia. *In* **D. R. Woods (ed.)**, The clostridia and biotechnology. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass. p. 25–50, 1993.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279 – 291, 2003.

SALAZAR, R. F. S.; SILVA, G. L. P.; SILVA, M. L. C. P. Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Lorena, São Paulo, 2005.

SAMAYAM, I. P.; SCHALL, C. A. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3561- 3566, 2010.

SAMUEL, S. MUTHUKKARUPPAN, S. M.; GAYATHRI, S. N.; SENTHIL, K. P. K. Cellulase production by *Bacillus* spp. and *Aspergillus niger* using coir waste and saw dust and partial purification. **International Journal of Current Research**, v. x, p. 31 – 34, 2010.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246 – 291, 2005.

SASHIHARA, N.; KUDO, T.; HORIKOSHI, K. Molecular cloning and expression. Of cellulose genes of alkalophilic *Bacillus* sp. strais N-4 in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 158 (2), p. 503 – 506, 1984.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 634 – 649, 2001.

SCOPES, R.K. **Protein purification: Principles and practice**. 3ed. Hardcover, Revised. Springer, 380p. 1994.

SHABEB, M. S. A.; YOUNIS, M. A. M.; HEZAYEN, F. F.; NOUR-ELDEIN, M. A. Production of cellulose in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, 0. 35 – 42, 2010.

SHAFIQUE, S.; SHAFIQUE, S. Kinetic study of partially purified cellulose enzyme produced by *Trichoderma viride* FCBP-142 and its hyperactive mutants. **Microbiology**, v. 80, p. 363 – 371, 2011.

SHRINIVAS, D.; SAVITHA, G.; RAVIRANJAN, K.; NAIK, G. R. A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2049 – 2057, 2010.

SIEGER, C. H. N.; KROON, A. G. M.; BATELAAN, J. G.; VAN GINKEL, C. G. Biodegradation of carboxymethyl celluloses by *Agrobacterium* CM-1. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p. 137-143, 1995.

SILVA, K. H. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem**. Dissertação de mestrado. 109p, 2010.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulase, protein architecture, molecular properties and biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 40, p. 1-44, 1995.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolated, *Bacillus sphaericus* JS1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p.51 - 56, 2004.

SINGH, V. K.; KUMAR, A. Production and purification of an extracellular cellulose from *Bacillus brevis* vs-1. **IUBMB Life**, v. 45, p. 443 – 452, 1998.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19 – 23, 1952.

TYNDALL, R. M. Application of cellulase enzymes to cotton fabrics and garments. **Textile Chemist and Colorist**, v. 24, p. 23., 1992.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 169 – 183, 2000.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2nd Edition. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

WAEONUKUL, R.; RATANAKHANOKCHAI, K. Multiple cellulases and cyanoses from *Bacillus circulans* and B6 during growth on avicel under an aerobic condition. **ThaiJournal of Biotechnology**, v. 131, p. 362-369, 2008.

WEIMER, P. J.; FRECH, A. D.; CALAMARI, A. JR. Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 3101 – 3106, 1991.

YIN, L-J.; LIN, H-H.; XIAO, Z-R. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 18 (3), p. 466 – 471, 2010.

ZUGENMAIER, P. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1341 – 1417, 2001.

8 ANEXO I

8.1 Meio para avaliação da atividade celulolítica

Extrato de levedura	6g
NH ₃ SO ₄	0,1g
NaCl	0,3g
MgSO ₄	0,1g
CaCO ₃	0,02g
Água	1000,0 mL
Solução traço	1,0mL

Solução traço

FeSO ₄	0,1%
ZnSO ₄	0,09%
MnSO ₄	0,02%

8.2 Reativos para determinação de açúcares redutores

8.2.1 Reativo de Somogy (A)

8.2.1.1.Reativo A

Na ₂ CO ₃	25 g
Bitartarato de sódio e potássio	25 g
NaHCO ₃	20 g

Na ₂ SO ₄	200 g
Água	1000,0 mL

8.2.1.2 Reativo B

CuSO ₄	15 g
H ₂ SO ₄	1 gota
Água	100,0 mL

8.2.2 Reativo de Nelson

Molibdato de amônio	50g
H ₂ SO ₄	50,0 mL
Arseniato de sódio	6,0 g
Água	950,0 mL

8.3 Soluções tampão

8.3.1 Soluções McIlvaine

8.3.1.1 Solução tampão pH 4,0

Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	7,71 mL
Ácido cítrico (0,1M)	12,29 mL

8.3.1.2 Solução tampão pH 5,0

Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	10,3 mL
Ácido cítrico (0,1M)	9,7 mL

8.3.1.3 Solução tampão pH 6,0

Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	12,63 mL
Ácido cítrico (0,1M)	7,37 mL

8.3.1.4 Solução tampão pH 7,0

Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	16,47 mL
Ácido cítrico (0,1M)	3,53 mL

8.3.1.5 Solução tampão pH 8,0

Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	19,45 mL
Ácido cítrico (0,1M)	0,55 mL

8.3.2 Soluções tampão pH 9,0 e 10,0

8.3.2.1 Solução tampão pH 9,0

Tris aminometano 0,1 M	100,0 mL
Ácido clorídrico 0,1 M	11,4 mL

8.3.2.2 Solução tampão pH 10,0

NaHCO ₃ 0,05M	100,0 mL
NaOH 0,1M	10,0 mL

8.4 Tampão PBS (pH 7,0)

NaCl	9,0 g
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	9,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Água	1000,0 mL

8.5 Soluções para a caracterização enzimimática

8.5.1 Gel de poliacrilamida 12% (20 mL)

Água	6,6 mL
Solução acrilamida 30%	8,0 mL
Tris 1,5 M (pH 8,8)	5,0 mL
SDS (10%)	0,2 mL
Persulfato de amônio (10%)	0,2 mL
TEMED	0,008 mL

8.5.2 Solução tampão para amostras

Tris HCl pH 6,8	100mM
SDS	4,0%
Azul de bromofenol	0,2%
Glicerol	20,0%

8.5.3 Tampão de corrida (pH 8,75)

Tris base	3,0 g
SDS	1,0 g
Glicina	14,4 g
Água	1000,0 mL

8.5.4 Corante Comassie Blue

Comassie blue	1,0 g
Metanol	450,0 mL
Ácido acético glacial	100,0 mL
Água	450,0 mL

8.5.5 Descorante de Comassie Blue

Metanol	50,0 mL
Ácido Acético glacial	70,0 mL
Água	880,0 mL

8.5.6 Tampão de amostra

Glicerol	5 mL
Tris-HCl pH 6,8 0,6M	2,5 mL
Azul de Bromofenol	2,5 mL
Água	15,0 mL

8.5.7 Tampão para migração das amostras

Tris-HCl pH 8,9	63,2 g
Glicina	39,9 g
Água	1000,0 mL