



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**YAGO QUEIROZ DOS SANTOS**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E MODELAGEM *IN SILICO* DE CELULASE  
DE UMA LINHAGEM MARINHA DE *Bacillus subtilis* HALOTOLERANTE**

**Natal  
2020**

**YAGO QUEIROZ DOS SANTOS**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E MODELAGEM *IN SILICO* DE CELULASE  
DE UMA LINHAGEM MARINHA DE *Bacillus subtilis* HALOTOLERANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

**Orientador:** Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos

**Natal  
2020**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN  
Sistema de Bibliotecas – SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte  
UFRN – Biblioteca Setorial do Centro de Biociências – CB

Santos, Yago Queiroz Dos.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E MODELAGEM IN SILICO DE CELULASE DE UMA LINHAGEM MARINHA DE *Bacillus subtilis* HALOTOLERANTE / Yago Queiroz Dos Santos. - Natal, 2020.

105f.: il.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.  
Orientador: Elizeu Antunes dos Santos.

1. Bioprocessamento. 2. Endoglucanases termostáveis. 3. Microrganismos celulolíticos. I. Santos, Elizeu Antunes dos. II. Título.

RN/UF/

**YAGO QUEIROZ DOS SANTOS**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E MODELAGEM IN SILICO DE CELULASE  
DE UMA LINHAGEM MARINHA DE *Bacillus subtilis* HALOTOLERANTE**

**Aprovado em: 08/05/2020**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos  
Orientador

---

Profa. Dra. Adriana Ferreira Uchôa  
Examinadora Interna ao Programa

---

Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo  
Examinadora Externa ao Programa

---

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos  
Examinador Externo ao Programa

---

Profa. Dra. Luciana Maria Araújo Rabelo  
Examinadora Externa à Instituição

---

Profa. Dra. Paula Ivani Medeiros dos Santos  
Examinadora Externa à Instituição

**Natal  
2020**

A Nosso Senhor sacramentado,  
À Virgem Santíssima, auxílio dos cristãos,  
E ao Papa Francisco

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Deus Uno e Trino, Causa não causada de todas as causas, pela força e capacidade intelectual de meu ser sem a qual me teria sido impossível a execução deste trabalho.

À Edilene Lúcia Tavares de Queiroz e Francisco de Assis dos Santos, meus queridos pais, pelo dom da vida, amor e constância incondicional do apoio que sempre me dedicaram.

À memória dos meus antepassados, cujo exemplo e honradez me serviram de alicerce sólido através do qual pude trilhar rumo ao meu objetivo.

Aos meus Professores de ontem, de hoje e de sempre – na pessoa da Professora Helena: mestra das primeiras letras – sem os quais não me teria sido possível chegar até aqui.

Ao Professor Doutor Elizeu Antunes dos Santos, orientador, pela paciência e proficiência com a qual – imprescindivelmente – me auxiliou neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação.

À Gabi, pela convivência e caminho em comum iniciado a partir da grata e feliz surpresa do destino em nossas vidas.

Aos colegas de laboratório do LQFPB e IMT, pelo agradável convívio e excelente oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

A todos e todas que de alguma forma marcaram, contribuíram e, assim, são também – merecidamente – partícipes neste trabalho.

## RESUMO

A demanda atual por fontes de energias renováveis e ecológicas impulsionou a busca de alternativas capazes de substituir o uso de combustíveis fósseis. Uma das inovações mais promissoras para impactar positivamente o cenário mundial de energia é a produção de bioetanol de segunda geração (2G-etanol) a partir de açúcares redutores derivados da degradação enzimática de material lignocelulósico que normalmente é descartada em processos agroindustriais. A celulose é o homopolissacarídeo linear mais abundante do planeta formado por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1-4). O presente trabalho teve por objetivo a modelagem estrutural e o estabelecimento de bioprocessos enzimáticos otimizados para a conversão do material lignocelulósico processado em açúcares redutores fermentescíveis. Após o processo de otimização, o máximo rendimento prático obtido foi 7,30% superior à condição inicial, atingindo atividade enzimática de  $318,809 \pm 0,784$  U/mL enquanto a modelagem *in silico* evidenciou a presença de estrutura monomérica na principal endoglucanase envolvida no processo. De acordo com os dados obtidos neste trabalho, foi possível concluir a possibilidade aplicação, deste bioprocessos otimizados, nos processos industriais para geração de bioetanol.

**Palavras-chave:** Bioprocessamento, Endoglucanases termostáveis, Microrganismos celulolíticos.

## ABSTRACT

The current demand for renewable and ecological energy sources has boosted the search for alternatives capable of replacing the use of fossil fuels. One of the most promising innovations to positively impact the world energy scenario is the production of second generation bioethanol (2G-ethanol) from reducing sugars derived from the enzymatic degradation of lignocellulosic material that is normally discarded in agro-industrial processes. Cellulose is the most abundant linear homopolysaccharide on the planet formed by glucose units linked by  $\beta$ - (1-4) glycosidic bonds. This work aimed at structural modeling and the establishment of enzymatic bioprocesses optimized for the conversion of processed lignocellulosic material into fermentable reducing sugars. After the optimization process, the maximum practical yield obtained was 7.30% higher than the initial condition, reaching an enzymatic activity of  $318.809 \pm 0.784$  U / mL while in silico modeling showed the presence of a monomeric structure in the main endoglucanase involved in the process. According to the data obtained in this work, it was possible to conclude the possibility of applying this optimized bioprocess in industrial processes for the generation of bioethanol.

**Keywords:** Sugarcane bagasse-degrading bacteria, Thermostable enzymes, Bioprocessing.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estimativas para a produção mundial de bioetanol (A) e consumo (B) até 2024. (Modificado da FAO; OECD, 2015). ..... 19
- Figura 2.** Projeção anual da produção de biocombustível celulósico e outros biocombustíveis no mundo de 2008 a 2022 (obtido de VERENIUM, 2008, com modificações). ..... 24
- Figura 3.** Modelo atual de degradação enzimática da celulose: ataque seqüencial das diferentes exoglucanases (EXO-I e EXO-II) juntamente com as endoglucanases (EG) para desconstruir a celulose, deixando as beta-glicosidases (BG) para degradação final dos resíduos de glucose livre. (Obtido a partir de Bubner, Plank, and Nidetzky 2013, com modificações). ..... 33
- Figura 4.** Um modelo estrutural típico de uma endoglucanase extracelular bacteriana: Estrutura de monômero inteiro em associação com um análogo de polissacarídeo (A) no sítio ativo (B) com interações predominantes de ligações H entre as duas estruturas, como mostrado em detalhes (C). O estudo estrutural foi realizado com base na endoglucanase de *Bacillus subtilis* descrita por Furtado et al. 2011 com Código PDB 3O5S, com modificações. .... 48
- Figura 5.** Árvore filogenética de SR22 isolado e outras espécies relacionadas com base em sequências de 16S rDNA, construídas usando o princípio da máxima verossimilhança. A barra de escala representa 0,01 substituições por site. .... 66
- Figura 6.** Sequência nucleotídica em formato FASTA do gene da subunidade ribossomal 16S da linhagem *Bacillus subtilis* SR22 MH119099. .... 67
- Figura 7.** Aspecto dos três diferentes tipos de processamento do bagaço-de-cana e suas diferentes granulometrias: Bagaço *in natura* (A), triturado (B) e pulverizado (C). A barra das imagens superiores representa 1 cm enquanto as imagens inferiores apresentam barra com escala de 1 mm. .... 70
- Figura 8.** Diagrama de Pareto indicando o efeito estimado dos fatores pH (A), Temperatura (B) e concentração de NaCl (C) na produção de endoglucanases por *Bacillus subtilis* SR22. .... 73
- Figura 9.** Superfícies de resposta para a atividade de endoglucanases produzidas por *Bacillus subtilis* SR22 em função do pH e Temperatura (A), Temperatura e Concentração de NaCl (B) e pH e Concentração de NaCl (C). .... 74

**Figura 10.** Curvas de otimização na produção de endoglucanases para os parâmetros pH, Temperatura e Concentração de NaCl em relação ao isolado marinho *Bacillus subtilis* SR22. Predição máxima de resposta de  $321,809 \pm 0,932$  U/mL. .... 75

**Figura 11.** Gráfico de contorno para a atividade de endoglucanases produzidas por *Bacillus subtilis* SR22 em função do pH e Temperatura (A) e pH e Concentração de NaCl (B). .... 76

**Figura 12.** Alinhamento de sequências para modelagem comparativa (a partir de estruturas de endoglucanases bacterianas) pelo servidor I-TASSER para a Bc22Cel.77

**Figura 13.** Árvore de modelos moleculares possíveis para Bc22Cel. Modelos homotetraméricos, homodiméricos e monoméricos foram gerados a partir de dados gerados a partir dos servidores SWISS-MODEL e I-TASSER. .... 78

**Figura 14.** Gráfico de Ramachandran gerado a partir do modelo tridimensional obtido para a Bc22Cel após modelagem comparativa pelo servidor I-TASSER. .... 79

**Figura 15.** Modelo tridimensional obtido para a Bc22Cel após modelagem comparativa pelo servidor I-TASSER. Aspecto geral da estrutura terciária da proteína (A), localização da região do sítio ativo da enzima (B) e detalhe dos resíduos críticos para formação de pontes de hidrogênio no interior do sítio ativo (C). .... 80

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação de enzimas purificadas e descritas na literatura pertencentes ao complexo celulolítico bacteriano com potencial aplicação industrial..... 46
- Tabela 2.** Aplicação de hidrolases celulolíticas bacterianas em diferentes atividades econômicas ..... 48
- Tabela 3.** Lista de variáveis estudadas para produção de celulase por *Bacillus subtilis* subsp. SR22 utilizando Box Behnken design para 3 fatores em 2 diferentes classes . 64
- Tabela 4.** Zimografia em fase sólida da linhagem *Bacillus subtilis* SR22 em diferentes condições de substrato ..... 68
- Tabela 5.** Matriz de randomização dos ensaios para os parâmetros pH (A), Temperatura (B) e NaCl (C). Valor máximo (1), médio (0) e mínimo (-1) para cada parâmetro é apresentado para cada ensaio..... 71
- Tabela 6.** Matriz de planejamento experimental Box Behnken design para 3 fatores em 2 diferentes classes para otimização da concentração de NaCl, valor de pH e Temperatura para produção de celulases pela linhagem *Bacillus subtilis* SR22 ..... 72
- Tabela 7.** Métodos estatísticos para otimização da produção de celulases microbianas ..... 83

## LISTA DE ABREVIATURAS

rRNA 16S – Subunidade do RNA Ribossomal 16S

µm – Micrômetro

pH - Potencial Hidrogeniônico

°C – Graus Celsius

BPC – Bagaço Processado de Cana-de-Açúcar

CMC – Carboximetilcelulose

CMCase – Carboximetilcelulase

SR - Linhagens bacterianas isoladas do coral *Siderastrea stellata*

mL – Mililitro

µL – Microlitro

h - Hora

g - Grama

rpm – Rotações Por Minuto

DNS - Ácido 3 5-dinitrosalicílico

BSA – Albumina Sérica Bovina

mM - Milimolar

nm - Nanômetro

mg - Miligrama

µg - Micrograma

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

PDB – *Protein Data Bank*

Tris-HCl – Tampão Tris - HCl

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Biorefinarias e o advento das fontes alternativas de energia .....	15
1.2 Reciclagem e biocombustíveis: transformando resíduos agroindustriais em matéria-prima.....	20
1.2.1 Matérias-primas que contêm oligossacarídeos .....	20
1.2.2 Matérias-primas que contêm amido .....	22
1.2.3 Matérias-primas que contêm lignocelulose .....	23
1.2.3.1 Pré-tratamento físico de matérias-primas que contenham lignocelulose .....	26
1.2.3.2 Pré-tratamento químico de matérias-primas que contenham lignocelulose.....	27
1.2.3.3 Pré-tratamento físico-químico de matérias-primas que contenham lignocelulose .....	29
1.2.3.4 Pré-tratamento biológico de matérias-primas que contenham lignocelulose ....	32
1.3 O bioetanol lignocelulósico.....	35
1.4 O Celulossomo microbiano .....	46
1.5 Microrganismos extremófilos marinhos: Fontes promissoras para a biotecnologia de enzimas.....	50
1.6 Otimização fatorial de hidrolases bacterianas.....	52
1.6.1 Metodologia de superfície de resposta .....	54
1.6.2 Planejamento Plackett-Burman.....	54
1.6.3 Planejamento composto central (CCD) .....	55
1.6.4 Planejamento Box-Behnken .....	56
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	58
2.1 Objetivo Geral.....	58
2.2 Objetivos Específicos .....	58
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	59
3.1 Identificação molecular do isolado bacteriano. ....	59
3.1.1 Extração de DNA.....	59
3.1.2 Amplificação do gene rRNA 16S, purificação, sequenciamento dos produtos de PCR e construção de árvore filogenética da linhagem SR22. ....	59
3.2 Avaliação do Crescimento Bacteriano .....	61

3.3 Indução de celulases em meio líquido e avaliação da atividade enzimática frente ao substrato sintético Carboximetilcelulose.....	61
3.4 Indução de celulases em meio líquido e avaliação da atividade enzimática a partir de diferentes pré-tratamentos do material lignocelulolítico obtido da cana-de-açúcar .	62
3.5 Avaliação da atividade celulolítica por zimografia em placa a partir de diferentes pré-tratamentos do material lignocelulolítico obtido da cana-de-açúcar .....	63
3.6 Dosagem de Açúcares Redutores Totais .....	63
3.7 Quantificação de Proteínas Solúveis Totais.....	64
3.8 Otimização da produção de carboximetilcelulases utilizando-se BPCs por metodologia de Superfície de Resposta.....	64
3.9 Modelagem computacional da Bc22Cel.....	65
3.10 Análises Estatísticas .....	65
<b>4 RESULTADOS</b> .....	66
4.1 Identificação e Filogenia do Isolado Bacteriano .....	66
4.2 Detecção de endoglucanases extracelulares por meio de zimografia em meio sólido .....	67
4.3 Indução de endoglucanases em meio sintético e natural obtido da cana-de-açúcar .....	69
4.4 Otimização da indução de endoglucanases partir de diferentes pré-tratamentos de material lignocelulolítico. ....	70
4.5 Modelagem computacional da endoglucanase Bc22Cel.....	76
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	86
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Biorefinarias e o advento das fontes alternativas de energia

Os recursos fósseis ainda constituem a energia primária e importante fonte química para a produção de uma vasta gama de produtos e polímeros: cerca de 75% é usado para produção de calor e energia, cerca de 20% como combustível automotor, e cerca de 5% para a produção de produtos químicos e materiais. A regeneração natural de recursos fósseis através do ciclo do carbono é significativamente mais lenta do que a taxa atual de exploração e apenas um pequeno número de países possui as principais reservas de combustíveis fósseis, o que aumenta e verticaliza a insustentabilidade de sua produção. Além disso, o aumento da emissão de gases de efeito estufa advém da combustão de combustíveis fósseis e da mudança no uso dos solos como resultado das atividades humanas e, conseqüentemente, resulta em uma aceleração da crise do aquecimento global (CHERUBINI; STRØMMAN, 2011).

Na maioria dos países desenvolvidos, os governos estimulam o uso de energias e recursos renováveis com os seguintes objetivos: Segurança energética; Controle dos processos antropogênicos nos eventos climáticos; Segurança alimentar. Além disso, os pilares do desenvolvimento sustentável perpassam pela energia acessível, único caminho capaz de garantir que todas as sociedades não buscarão formas mais invasivas e menos eficientes de energia quando submetidas aos bolsões de hipossuficiência financeira que leva à utilização de materiais de origem fóssil ou vegetal como último recurso capaz de fornecer energia (FAO; OECD, 2015).

A atual situação de aquecimento global e todos os problemas baseados em combustíveis fósseis poderiam ser alterados com sucesso, substituindo os combustíveis até então utilizados por recursos renováveis, que são mais uniformemente distribuídos entre os países (diminuindo as tensões geopolíticas em torno da questão energética e melhorando o acesso das populações economicamente hipossuficientes), causando menores preocupações ambientais e sociais. Durante as últimas décadas do século XX, houve um

enorme interesse no processo de produção e uso de biocombustíveis líquidos (biodiesel ou bioetanol) como substitutos promissores dos combustíveis fósseis (BHASKAR et al., 2011).

Os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa vegetal (dentre os quais desponta o Etanol-2G) representam recursos renováveis e virtualmente inesgotáveis de energia, os processos necessários para a utilização desse novo tipo de matéria-prima para a produção de combustíveis e lubrificantes impulsiona o advento de conceitos emergentes a respeito de novas biorrefinarias que visam cumprir os critérios de sustentabilidade para a produção de biocombustíveis. Biorefinaria é uma integração e um conceito multifuncional de uma planta industrial que utiliza biomassa para a produção sustentável de diferentes intermediários e produtos, bem como o uso completo possível de todos os componentes da matéria-prima (SHAH; RANAWAT; MISHRA, 2019).

A partir da aplicação deste conceito, a noção tradicional de uma indústria montada para a geração de um único gênero de produtos perde a sua aplicabilidade pois no conceito holístico que orienta as biorrefinarias estas devem incluir a transformação seletiva das diferentes moléculas disponíveis na biomassa – de maneira concomitante – em biocombustíveis, produtos farmacêuticos, celulose, papel, polímeros e outros produtos químicos, bem como alimentos ou ração animal. Uma ampla gama de tecnologias é capaz de separar recursos de biomassa em seus componentes fundamentais, como carboidratos, proteínas, lipídeos e metabólitos. As atuais fábricas que produzem gêneros derivados de lignocelulose poderiam exemplificar esta tendência de produção holística que as biorrefinarias pretendem ampliar: A celulose e hemicelulose produzem açúcares (fermentescíveis) simples e a lignina produz compostos alvo (por exemplo, polímeros, resinas, pesticidas, ácido levulínico e outros materiais (HUANG et al., 2018).

Recentemente, consideráveis esforços estão sendo realizados no sentido de aprimorar a capacidade de selecionar processos de despolimerização aplicáveis para cada matéria-prima em particular com o intuito, principalmente, de fracionamento da lignina dos polímeros alvo (celulose e hemicelulose). O processo de hidrodessoxigenação catalítica tem demonstrado ser a metodologia de melhor processamento químico para separação dos polímeros alvos da lignina, remanescendo – contudo – os efeitos adversos de rejeitos químicos



gerados pela técnica, o que contraria o conceito de desenvolvimento sustentável que norteia a atividade das biorrefinarias (BJELIĆ; GRILC; LIKOZAR, 2018).

Em geral, o processo de biorrefinaria compreendem as seguintes etapas: pré-tratamento e preparação da biomassa, separação dos componentes da biomassa e subsequentes etapas de conversão e purificação do produto. Existem duas abordagens básicas para a implementação do conceito de biorrefinaria: *bottom-up* e *top-down*. A abordagem *bottom-up* de biorrefinaria é representada pelo modelo atual e majoritário de refinaria aonde o processamento de matéria-prima inicia focando um único destino produtivo e culmina no objetivo de obter uma gama maior de produtos e/ou um aumento de frações de matérias-primas através da conexão com tecnologias adicionais. Um exemplo de produção *bottom-up* é biorrefinaria de amido de trigo e milho (Lestrem, França) que, apesar de ter começado como uma simples fábrica de amido, gradualmente expandiu o número de produtos, como derivados de amido e modificações de amido, produtos químicos e produtos de fermentação (BUNDESREGIERUNG, 2012).

A nova abordagem *top-down* é um sistema que já nasce altamente integrado estabelecido para o uso de várias frações de biomassa e geração de diferentes produtos para o mercado (geração de “lixo-zero”). O objetivo é obter o uso completo da biomassa (por exemplo, lignocelulose de madeira, grãos e palha de cereais ou gramíneas verdes). Um exemplo de abordagem *top-down* é a Biorefinaria Verde Austríaca que utiliza silagem de capim verde como matéria-prima para a produção de produtos de base biológica, como proteínas, ácido láctico, fibras e biogás a partir da biomassa restante (WBA, 2014).

Além disso, o suco de capim verde e o suco da silagem (fontes complexas de nitrogênio e fosfato) empregados como constituintes do meio de cultivo para o crescimento microbiano e produção de polihidroxialcanoato (PHAs) pela bactéria *Wautersia eutropha*. Biorrefinarias *top-down* ainda estão nas fases de pesquisa e desenvolvimento e suas plantas de demonstração são baseadas principalmente nos EUA, na Europa e em alguns outros países asiáticos industrializados (HUANG et al., 2018).

Esta nova prática industrial em refinarias “holísticas” carecem, contudo, de uma adequação de modo a atender aos requisitos de produção com alta qualidade e elevado rendimento de maneira que a atualização de processos de

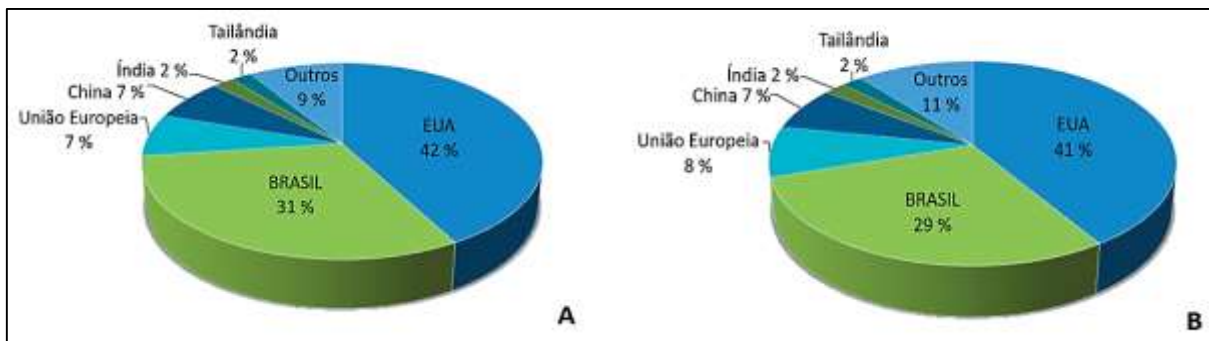
conversão já existentes possuam custos justificados e aumento de escala de produção suficientes ao ponto de possibilitar uma substituição economicamente viável de longas malhas produtivas (BUNDESREGIERUNG, 2012).

De todos os modelos promissores de biorrefinaria *top-down*, a do bioetanol, por ser alternativa aos combustíveis fósseis, se destaca por conta da sua produção a partir da fermentação de leveduras a partir de diferentes matérias-primas. É um combustível de alto índice de octanagem e suas características físico-químicas são consideravelmente diferentes em comparação com a gasolina – um dos principais combustíveis primários de automotores. O bioetanol serve principalmente no setor de transporte, não como combustível primário, mas em composição de misturas com gasolina para potencializar os índices de octanagem na forma de éter-etil-terciário-butílico (ETBE) que é constituído em 45% por volume de bioetanol e 55% por volume de isobutileno. Muitos países empregam o ETBE em vez do metil-éter-terciário-butílico (MTBE) que, apesar de igualmente potencializar os índices de octanagem na gasolina, é proibido nos EUA e Canadá devido à emissões de poluentes cancerígenos (KHUONG et al., 2017; YÜKSEL; YÜKSEL, 2004).

O bioetanol é misturado com gasolina nas frações de volume de 5, 10 e 85% (combustível E5, E10 e E85). Um total de 85% de bioetanol por volume só pode ser usado em veículos de combustível flexível (VCF), enquanto misturas de 5 e 10% em volume podem ser empregadas sem qualquer modificação no motor. No entanto, os problemas relacionados ao uso do bioetanol são: efeito corrosivo no injetor de combustível e na bomba de combustível elétrica (bioetanol é de natureza higroscópica), problema de partida do motor em climas frios (o etanol puro é difícil de vaporizar) e efeito tribológico nas propriedades lubrificantes e desempenho do motor (KHUONG et al., 2017).

A produção anual de bioetanol está aumentando constantemente, e a previsão da produção mundial de bioetanol e seu consumo é um aumento para quase 134,5 bilhões de litros em 2024. Aonde dois terços desse aumento provavelmente originam-se no Brasil principalmente para atender a demanda interna. No Brasil, o aumento da demanda por bioetanol é principalmente devido ao aumento constante no número de VCFs vendidos. Portanto, é provável que os EUA e o Brasil continuem sendo os dois principais produtores de bioetanol, seguidos pela União Europeia e China (figura 1). Cerca de 40% da produção

mundial de bioetanol é proveniente da cana-de-açúcar e da beterraba sacarina e quase 60% é proveniente de matérias-primas que contêm amido (SRIVASTAVA, 2019a).



**Figura 1.** Estimativas para a produção mundial de bioetanol (A) e consumo (B) até 2024. (Modificado da FAO; OECD, 2015).

Na Europa, as matérias-primas renováveis mais convenientes para a produção de bioetanol são os grãos (principalmente trigo) e beterraba sacarina. Na França, a produção em abordagem *top-down* acopla o bioetanol a partir do excedente de vinho. Os preços das matérias-primas representam um impacto considerável nos custos de produção de bioetanol e podem representar de 40% a 75% dos custos totais, dependendo do tipo de matéria. Os custos da produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil estão na faixa de 0,20-0,30 USD/L. Nos EUA e na União Europeia, o bioetanol produzido a partir da beterraba sacarina e do milho atingiu os menores custos de produção de 0,30 e 0,53 USD/L, respectivamente (FESTEL et al., 2013; MUSSATTO et al., 2010).

Os custos na China (trigo, sorgo doce ou mandioca) são de 0,28 até 0,46 USD/L, dependendo dos custos da matéria-prima. O custo da produção de bioetanol a partir das matérias-primas contendo sacarose é de cerca de 0,44 USD/L na Índia, enquanto que de matérias-primas contendo lignocelulose é de 0,80 a 1,20 USD/L dependendo do tipo. No entanto, os custos de produção de gasolina gravitam entre 0,10 até 0,18 USD/L, dependendo do tipo de processo ainda são menores; o que acarreta, de acordo com os os custos de produção de bioetanol, uma única opção de competitividade a partir da planta de produção no Brasil (ZHAO et al., 2015).

## 1.2 Reciclagem e biocombustíveis: transformando resíduos agroindustriais em matéria-prima

Diferentes tipos de biomassa apresentam variáveis potenciais para a produção de bioetanol. Devido à sua composição química, de acordo com a natureza dos carboidratos, eles formam principalmente três grupos: (i) matérias-primas que contêm sacarose: beterraba sacarina, cana-de-açúcar, melão, sorgo, sorgo doce, (ii) matérias-primas que contêm amido: grãos como milho, trigo, tubérculos como a mandioca e (iii) biomassa lignocelulósica: palha, resíduos agrícolas e resíduos de madeira. No entanto, essas matérias-primas contendo sacarose e amido (primeira geração) competem com seu uso como alimento ou ração, influenciando, assim, seu suprimento. Portanto, a biomassa lignocelulósica (segunda geração) representa uma matéria-prima alternativa para a produção de bioetanol devido a seu baixo custo, disponibilidade, ampla distribuição e não é competitiva com alimentos e rações (ALVIRA et al., 2010).

### 1.2.1 Matérias-primas que contêm oligossacarídeos

A cana-de-açúcar e a beterraba são os mais importantes produtores vegetais de açúcar no mundo. Dois terços do açúcar mundial são de produção a partir da cana-de-açúcar e um terço a partir da beterraba sacarina. Esta matéria-prima pode ser facilmente hidrolisada pela enzima invertase (EC 3.2.1.26), que é sintetizada pela maioria das leveduras do gênero *Saccharomyces*. Assim, a quebra da matéria-prima se dá em uma única etapa não sendo necessário nenhum tipo de pré-tratamento, o que torna este bioprocessamento mais viável do que a partir de matérias-primas contendo homopolissacarídeos constituído por ligações alfa como o amido (PAVLEČIĆ et al., 2010).

As culturas de cana-de-açúcar precisam apenas de um processo de moagem para a extração de açúcares para fermentação e o etanol pode ser produzido diretamente a partir do melão. A cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de bioetanol oferece certas vantagens, uma vez que é uma cultura semiperene que não requer muitas operações agrícolas, que normalmente são necessárias para o processamento da colheita, além do fato de que sua biomassa é tradicionalmente usada para calor e eletricidade (na combustão da palha). A cana-de-açúcar é menos dispendiosa do que outras

matérias-primas utilizadas na produção de bioetanol devido ao processamento mais fácil e maior produtividade pela maior adaptação das culturas em nossas lavouras e condições de plantio (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006; XU et al., 2018).

No entanto, muitos esforços ainda visam a melhoria da produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar: Isso inclui o desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar com maior teor de sacarose e resistência às doenças, maior rendimento por hectare e maior longevidade. Na Europa, a produção de açúcar é baseada principalmente no uso de beterraba como matéria-prima. Os extratos formados como intermediários durante o processamento de beterraba sacarina, bem como açúcar cristal de alta pureza, poderiam ser convertidos em bioetanol e/ou produtos de base biológica (como polímeros gelificantes) (PAVLEČIĆ et al., 2017).

O xarope de açúcar e o açúcar granulado podem servir como substratos para a produção de bioetanol durante todo o ano. Além disso, eles também podem servir como precursores para diferentes intermediários químicos ou produtos finais (por exemplo, surfactantes). O melaço, um dos principais subprodutos da indústria açucareira, principalmente como substrato para leveduras, na indústria do bioetanol e na transformação bioquímica, também pode ser adequado para a produção de alimentos. O total de dissacarídeos e oligossacarídeos residuais no melaço pode chegar a 50-60% (m/v), dos quais cerca de 60% é sacarose, o que torna este substrato adequado para a produção de bioetanol em larga escala (DARVISHI; MOGHADDAMI, 2019).

O melaço é também um subproduto na produção de polpa cítrica seca, com não menos que 45% (m/v) de açúcares totais. A produção de glucose a partir do amido (milho ou sorgo granulado; aonde ácidos são usados para a hidrólise) também produz o melaço. O melaço de amido contém cerca de 43% (m/v) de açúcares redutores e 73% (m/v) de sólidos totais (LING, 2010).

Outro material contendo açúcar que pode ser usado para a produção de bioetanol é o soro de leite, um subproduto da fabricação de queijo, contendo cerca de 4,9% (m/v) de lactose. Devido ao teor relativamente baixo de açúcar, uma planta de bioetanol de tamanho modesto requer um considerável volume de soro de leite para ser economicamente viável, sendo necessário o escoamento de toda uma produção de resíduos de laticínios para a planta

industrial. A viabilidade de uma nova usina de bioetanol depende do custo do soro de leite como matéria-prima, bem como do preço final do bioetanol que está intimamente relacionado à tecnologia de produção e ao desempenho dos bioprocessos (XU et al., 2018).

### 1.2.2 Matérias-primas que contêm amido

A cultura de grãos (por exemplo, milho, cevada, trigo ou sorgo) e raízes (por exemplo, mandioca, batata, batata doce, alcachofra) contêm grandes quantidades de amido. O amido nativo isolado de diferentes fontes pode ser usado para posterior conversão em produtos poliméricos ou na produção de bioetanol. O resíduo do amido isolado contém proteínas e fibras, com grande potencial para aplicação na produção de alimentos e rações (JOBBLING, 2004).

A maior produção de amido de milho é nos EUA e representa mais de 80% do mercado mundial. Nos EUA, o milho é uma fonte de mais de 95% da produção de bioetanol e o restante é produzido a partir de resíduos de cevada, trigo, soro de leite e bebidas. As regiões de cultivo de sorgo granífero nos EUA mostram um crescente interesse na produção de bioetanol a partir desta fonte. Além disso, a viabilidade econômica da produção a partir de mandioca na Tailândia tem suscitado crescente interesse por parte dos pesquisadores. Os tubérculos mandioca (*Manihot esculenta*) contêm cerca de 80% de amido de massa e menos de 1,5% de proteínas de massa (SOLOMON; BARNES; HALVORSEN, 2007).

O pré-tratamento dos tubérculos para a produção de bioetanol inclui as seguintes operações: limpeza, descascamento, “lascamento” e secagem. Depois disso, os *chips* secos de mandioca são usados para a produção de combustível. O amido é uma mistura linear (amilose) e ramificada (amilopectina) e poliglicanos. A enzima crucial para a hidrólise do amido é a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1), ativa em ligações glicosídicas entre resíduos de glucose do tipo  $\alpha$ -1,4, mas não nas ligações  $\alpha$ -1,6 na amilopectina (a qual é substrato para as enzimas desramificadoras). Para a produção de bioetanol a partir de matérias-primas contendo amido, é necessário realizar a hidrólise do amido (principalmente pelo grupo enzimático EC 3.2.1.1 e EC 3.2.1.41) em xarope de glucose, que pode ser convertido em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta etapa é um

custo adicional em comparação com a produção de bioetanol a partir de matérias primas contendo sacarose ou monossacarídeos (SCHWEINBERGER; TRIERWEILER; TRIERWEILER, 2019).

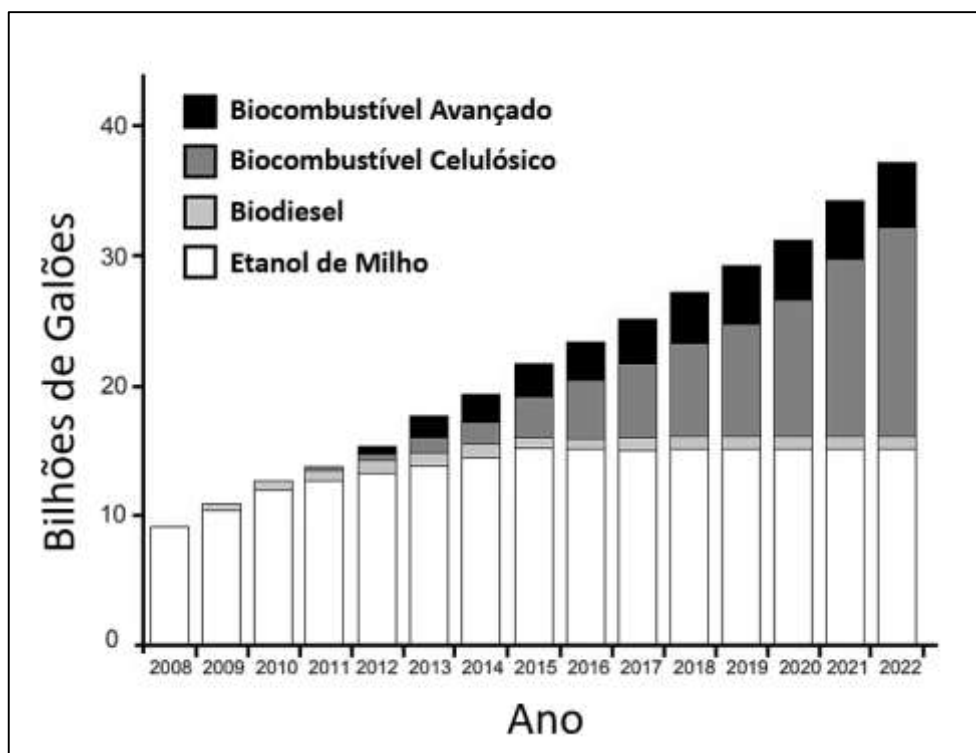
Alguns microrganismos como a bactéria *Bacillus licheniformis* e linhagens geneticamente modificadas da bactéria *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* produzem  $\alpha$ -amilase, enquanto os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* produzem alfa-glicosidase (EC 3.2.1.20). Em condições anaeróbicas, a levedura *S. cerevisiae* metaboliza glucose em etanol com eficiência teórica de conversão aproximada de 51% em massa de álcool para 1 grama de carboidrato. No entanto, a levedura também utiliza glucose para o crescimento celular e a síntese de outros produtos metabólicos, reduzindo assim a eficiência máxima de conversão: na prática, 40 a 48% em massa do monossacarídeo são convertidos em etanol (SCHWEINBERGER; TRIERWEILER; TRIERWEILER, 2019).

Em comparação com a produção de etanol a partir das demais matérias-primas, o etanol obtido a partir do amido possui a vantagem de já possuir um coquetel enzimático de origem fúngica adaptado às atuais plantas industriais (portanto, extremamente resilientes as condições de pH, temperatura e saturação de etanol existentes durante os bioprocessos a partir deste polissacarídeo). Neste contexto, as microalgas são uma potencial fonte renovável de biomassa para a produção de bioetanol amilósico pois são capazes de converter CO<sub>2</sub> em lípidos e polissacarídeos – como o amido. Assim, o CO<sub>2</sub> industrial poderia ser coletado e usado para o cultivo de microalgas como parte da estratégia de redução de CO<sub>2</sub> emissão na atmosfera (SRIVASTAVA, 2019b).

As microalgas podem acumular amido como um polissacarídeo de reserva, que pode ser usado para a produção de bioetanol (terceira geração) após o processo de pré-tratamento. Além disso, a biomassa residual (contendo matéria orgânica e minerais) após a produção de bioetanol pode servir como biofertilizante. Assim, o uso do conceito de biorrefinaria holística (ou *top-down*) se aplica de maneira extremamente adequada para esta proposta de produção (LI; LIU; LIU, 2014).

### 1.2.3 Matérias-primas que contêm lignocelulose

A produção de Etanol-2G a partir das matérias-primas constituintes de lignocelulose é uma das estratégias mais atraentes e sustentáveis pois a biomassa lignocelulósica é renovável e não competitiva com as culturas alimentares, características responsáveis por impulsionar a produção deste biocombustível nos últimos anos (figura 2). Além disso, o uso de bioetanol obtido a partir desta biomassa está relacionado à considerável redução da emissão de gases de efeito estufa. A biomassa lignocelulósica é distribuída quase igualmente na Terra, em contraste aos recursos fósseis, o que garante a segurança do abastecimento por meio de fontes de energia domésticas (XU et al., 2018).



**Figura 2.** Projeção anual da produção de biocombustível celulósico e outros biocombustíveis no mundo de 2008 a 2022 (obtido de VERENIUM, 2008, com modificações).

Esta matéria-prima pode ser obtida a partir de diferentes resíduos ou colhidos diretamente dos ambientes naturais e seu preço é geralmente menor do que o das matérias-primas que contêm açúcares simples ou amido. Matérias-primas que contêm lignocelulose para produção de bioetanol formam seis grupos principais: resíduos de colheita (bagaço de cana, palha de milho, tipos diferentes



de palha, cascas de arroz); resíduos de madeira de lei (resíduos de álamo, pinheiro); resíduos de madeira macia (resíduos de pinho, abeto); resíduos de celulose (resíduos de papel e lodo de papel reciclado); biomassa herbácea (feno de alfafa e outros tipos de gramíneas) e resíduos sólidos urbanos (CORRÊA; BADINO; CRUZ, 2016).

A biomassa lignocelulósica média contém 43% de celulose, 27% de lignina, 20% de hemicelulose e 10% de outros componentes. A variedade da composição de biomassa lignocelulósica poderia ser uma vantagem (pois as abordagens *top-down* permitiriam maior diversidade de produtos do que os obtidos em refinarias de petróleo), mas também uma desvantagem (necessidade de uma grande variedade de tecnologias integradas). Essa estrutura heterogênea da biomassa lignocelulósica requer processos químicos mais complexos do que as matérias-primas uniformes e consistentes que já possuem protocolos de utilização bem definidos na indústria química (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

Além da integração de tecnologias capazes de processar os diferentes componentes desta biomassa complexa, a matéria-prima lignocelulósica implica ainda no impacto logístico de transporte até as biorrefinarias *top-down* de processamento e refino, por ser este material – o lignocelulósico – em sua maioria proveniente de rejeitos de outras malhas industriais (sendo portanto gerados à uma considerável distância do destino final), este problema há de ser resolvido pela estabilização da biomassa, a fim de estar disponível para armazenamento a longo prazo, e para garantir o trabalho contínuo da biorrefinaria ao longo do ano (HUANG et al., 2018).

A hidrólise da biomassa lignocelulósica em monômeros se faz necessária antes que os microrganismos possam metabolizá-los. Ácidos, bases ou enzimas geralmente realizam esse processo. Fatores físico-químicos, estruturais e composicionais, contudo, podem retardar consideravelmente este mecanismo. Portanto, a etapa de pré-tratamento bem realizada é geralmente necessária para obter condições para uma hidrólise enzimática eficiente. No pré-tratamento, há a redução do grau de polimerização e índice de cristalinidade do beta-homopolissacarídeo, ruptura das ligações lignina-carboidrato, remoção de lignina e hemicelulose e aumento da porosidade do material devem ocorrer a fim

de assegurar a hidrólise enzimática eficiente da biomassa lignocelulósica (SAINI et al., 2015).

A escolha do pré-tratamento depende da natureza do material bruto e da formação de subprodutos durante o pré-tratamento selecionado, e sua escolha tem um grande impacto em todos os estágios subsequentes da produção de bioetanol. Condições adversas usadas durante os pré-tratamentos levam à síntese de compostos tóxicos, como furanos [2-furaldeído (fural) e 5-hidroximetilfurfural (HMF)], ácidos carboxílicos (ácidos acético, fórmico e levulínico) e compostos fenólicos (aldeídos, cetonas, ácidos p-cumáricos e ferúlicos) (SINGH et al., 2018).

Pelo fato de esses compostos serem potenciais inibidores de microrganismos, algumas estratégias (para reduzir seu impacto no desempenho dos bioprocessos) foram desenvolvidas: Remoção de inibidores por extração com solvente, troca iônica, ou utilizando a enzima lacase (EC 1.10.3.2); uso de cepas de microrganismos fermentadores muito tolerantes aos inibidores, e seleção de pré-tratamento efetivo que causa degradação mínima de açúcar e formação de inibidores. A maioria dos métodos de mitigação removem apenas parcialmente estes inibidores, mas também contribuem para uma queda no rendimento da sacarificação da celulose, o que conseqüentemente aumenta os custos finais do processo. Os métodos de pré-tratamento podem ser basicamente divididos em quatro grupos principais (físico, químico, físico-químico e biológico), onde nem todos os métodos são plenamente viáveis para aplicação em escala industrial (RODRÍGUEZ-COUTO, 2019).

#### 1.2.3.1 Pré-tratamento físico de matérias-primas que contenham lignocelulose

Dentre as principais abordagens de pré-tratamento classificadas nesta metodologia, o processamento físico (mecânico) inclui moagem (moagem de dois cilindros, moagem de bolas ou martelos e moagem coloidal ou moagem de vibroenergia); métodos de irradiação (raios gama, feixe de elétrons, micro-ondas) e outros (por exemplo, hidrotérmicos, expansão, extrusão ou pirólise). Após os pré-tratamentos físicos, a consequência é a redução no tamanho das partículas e diminuição da cristalinidade da biomassa lignocelulósica tendo um

impacto no aumento da área superficial específica e na redução do grau de polimerização (SINGHANIA et al., 2014).

No entanto, o tamanho das partículas tem que ser otimizado (partículas muito pequenas não são desejáveis pela dificuldade de estocagem e manipulação) por causa do alto consumo de energia durante a moagem e impacto negativo no pré-tratamento. Muitos dos métodos físicos de redução de tamanho mencionados não são economicamente viáveis devido às demandas de energia muito altas. A extrusão é um novo e prospectivo pré-tratamento físico para conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis. A capacidade de garantir alta taxa de cisalhamento, rápida transferência de calor e mistura efetiva são as principais vantagens da metodologia extrusora. Alguns estudos descreveram a utilização de utilizaram extrusão como pré-tratamento para conversão de casca de soja em açúcares fermentescíveis e compararam com duas tradicionais estratégias que empregam ácido diluído (1% massa/volume de  $H_2SO_4$ ) e álcalis (1% massa/volume de NaOH). Em condições ótimas, a extrusão obteve valores consideráveis de conversão da celulose em glicose num rendimento de 95% em massa (YOO et al., 2011).

#### 1.2.3.2 Pré-tratamento químico de matérias-primas que contenham lignocelulose

Os pré-tratamentos químicos incluem a administração de ácidos (ácido sulfúrico, ácido nítrico, fosfórico ou clorídrico), álcalis (hidróxido de sódio ou potássio, amônia ou sulfito de amônio), tratamento de gás (dióxido de cloro, dióxido de nitrogênio ou dióxido de enxofre), adição de agentes oxidantes (oxigênio, ozônio ou óxidos), líquidos iônicos (líquidos iônicos baseados em imidazol) e organosolv (metanol, etanol, acetona, glicerol, etilenoglicol, etc.). O principal objetivo do emprego do pré-tratamento ácido é a remoção da hemicelulose, tornando a celulose mais acessível às enzimas (PORZIO et al., 2012).

A principal desvantagem da hidrólise ácida é a formação de inibidores, uma vez que os açúcares fermentescíveis liberados podem ser decompostos em furfural (a partir de pentoses) e hidroximetilfurfural (HMF, a partir de hexoses). Estes compostos são inibidores do crescimento de células de levedura que têm um impacto negativo na eficiência de produção de bioetanol. Para pré-

tratamento alcalino de matérias-primas lignocelulósicas, NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub> e NH<sub>4</sub>OH são usados com mais frequência. Neste tipo de abordagem, a temperatura e pressão são mais baixas do que nos outros métodos de pré-tratamento aplicados. O método alcalino aumenta a digestibilidade da celulose e é mais eficaz para a solubilização da lignina, no entanto, o alto custo dos álcalis constitui principal inconveniente (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

A ozonólise reduz consideravelmente o teor de lignina (a hemicelulose é levemente afetada, enquanto a celulose permanece intacta) e não produz resíduos tóxicos, mas demanda altas concentrações de ozônio o que torna esse método muito dispendioso. Vários trabalhos despontam na literatura indicando o uso exitoso de material lignocelulósico da palha de trigo e centeio, palha de algodão, e palha do bagaço de cana (DE BARROS et al., 2013).

Os líquidos iônicos (LIs), compostos formados por soluções salinas constituídas de grandes cátions orgânicos e pequenos ânions inorgânicos, são importantes solventes empregados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Os LIs têm a capacidade de quebrar as extensivas ligações de hidrogênio nos polissacarídeos e estimular sua solubilização, eles são caracterizados por estabilidade térmica e química, não-inflamabilidade, ampla faixa de temperatura no estado líquido e boas características de solvatação para vários materiais. Os LIs são conhecidos como solventes “verdes” devido ao fato de que durante seu uso gases tóxicos ou explosivos não são formados: Alguns estudos demonstram que durante o pré-tratamento com a utilização de LIs em palha, foi observado aumento significativo da sacarificação enzimática de xilana (63% de conversão em xilose) em 24 h e celulose (96% de conversão em glicose) (OLIVIER-BOURBIGOU; MAGNA; MORVAN, 2010).

O método combinado que usa LIs e amônia foi examinado para o pré-tratamento da palha de arroz. Os resultados obtidos demonstram que 82% (m/v) da celulose da palha de arroz foi utilizada no processo com 97% (m/v) convertidos em glucose – significativamente maior do que os tratamentos individuais de amônia ou LIs. Para além do uso de bases, a estratégia de utilização de LIs associada a ácidos resultou em celulose de alta pureza e

frações de hemicelulose, bem como 87% de lignina pura separada do material original (JIA et al., 2015).

O organosolv destaca-se como técnica eficiente e ecologicamente correta pelo fato de ser baseado no uso de solventes orgânicos (por exemplo, etanol, metanol, acetona e etilenoglicol) para extrair a lignina e assegurar uma celulose mais acessível. Nesta estratégia acoplada, os solventes são misturados com água em várias porções, adicionadas à biomassa e aquecidas (100–250 °C). No entanto, os solventes precisam ser drenados do reator, evaporados, condensados e reciclados, o que torna os custos de pré-tratamento relativamente altos. A extração do bagaço de cana-de-açúcar em condições otimizadas (30% em etanol volumétrico a 195 °C por 60 min) resulta na produção de 29,1% em massa de açúcares fermentescíveis. Alguns estudos recentes descrevem este pré-tratamento à base de organosolv (com o uso de glicerol) destinada à palha de trigo. Sob condições otimizadas (razão líquido-sólido de 20 g/g a 220 °C por 3 h), um total de 70% em massa de hemicelulose e 65%-70% de lignina em massa foram removidas das matérias-primas contendo lignocelulose (DA SILVA; ERRICO; RONG, 2018).

#### 1.2.3.3 Pré-tratamento físico-químico de matérias-primas que contenham lignocelulose

Pré-tratamentos físico-químicos incluem oxidação úmida, explosão (explosão a vapor, explosão de fibra de amônia, explosão de CO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>), microondas, ultrassom e pré-tratamento de água quente. A explosão a vapor consiste no tratamento da biomassa com vapor saturado de alta pressão e, em seguida, a pressão é liberada rapidamente, o que provoca uma descompressão explosiva da biomassa, este processo se inicia geralmente entre 160 a 260 °C (pressão correspondente de 0,69 a 4,83 MPa) por um curto período de tempo (vários segundos até alguns minutos) antes que a massa esteja exposta à pressão atmosférica. Durante este pré-tratamento, a hemicelulose e a lignina são degradadas. Esse pré-tratamento é econômico, mas também destrói uma parte da fração xilana. Durante a explosão a vapor, a ruptura incompleta da matriz de lignina e carboidratos e a geração de inibidores microbianos também restou descrita (LIU et al., 2014).

Alguns trabalhos utilizando esta metodologia em relação ao bagaço de cana-de-açúcar com vapor variando a 200, 215 e 230 °C por 5 min no processo simultâneo de sacarificação e fermentação da produção de bioetanol. As condições ótimas de pré-tratamento (215 °C por 5 min) resultaram em um rendimento total de glucose de 86,8% em massa (MANZANARES; ISIS, AMORES; IGNACIO; BALLESTEROS, GEORGINA, 2013).

A explosão de fibras de amônia (*Ammonia Fiber Expansion – AFEX*) é um pré-tratamento importante que utiliza processos físicos (alta temperatura e pressão) e químicos (amônia) para obter hidrólise efetiva das matérias-primas. O AFEX aumenta a acessibilidade da superfície para a hidrólise, promove a descristalização da celulose e a despolimerização parcial da hemicelulose e reduz a calcinabilidade da lignina na matéria-prima tratada. No entanto, este processo não é eficiente para biomassa com alto teor de lignina (LAU et al., 2010).

Estudos recentes descreveram o pré-tratamento e a hidrólise enzimática por meio do método AFEX aplicado à fibra de cacho de palmeira, obtida a partir da indústria de processamento de palmito (*Bactris gasipaes*). As condições ótimas foram atingidas a 135 °C com tempo de permanência de 45 minutos, carga de água para biomassa seca de 1:1 (g/g) e amônia para carga de biomassa seca de 1:1 (g/g), resultando em um rendimento de 90% por massa do total de açúcares redutores após 72 h de hidrólise enzimática (BEAUCHEMIN et al., 2019).

Uma outra estratégia que merece registro é o emprego de fluidos supercríticos que se caracterizam como substâncias gasosas comprimidas a temperaturas acima de seu ponto crítico para uma densidade semelhante ao ocorre em sua fase líquida. A água, dióxido de carbono e amônia são as substâncias mais usadas na forma supercrítica. O CO<sub>2</sub> supercrítico atua como um solvente de extração porque é não tóxico, não inflamável, barato e prontamente disponível, além de não causar a formação de compostos inibitórios para os processos enzimáticos subsequentes. A liberação explosiva de pressão de CO<sub>2</sub> perturba as frações de celulose e hemicelulose e, conseqüentemente, aumenta a área de superfície acessível do substrato para enzimas (GAO et al., 2010).

Para o pré-tratamento do bagaço de cana, o CO<sub>2</sub> supercrítico e ultrassom serviu para melhorar a eficiência de hidrólise enzimática. No pré-tratamento com apenas CO<sub>2</sub> supercrítico a quantidade de açúcar fermentável aumentou 2,8 vezes em relação ao bagaço de cana-de-açúcar não tratado e, conseqüentemente, a eficiência da hidrólise enzimática foi de 74,2% maior. O ultrassom combinado ao CO<sub>2</sub> supercrítico aumentou a quantidade de açúcares fermentescíveis após hidrólise enzimática em 16% em massa, em comparação com o pré-tratamento apenas com ultrassom. Estes resultados levam a concluir que o ultrassom combinado ao CO<sub>2</sub> supercrítico é uma alternativa eficiente e prospectiva para o pré-tratamento de matérias-primas contendo lignocelulose em temperaturas relativamente baixas, sem o uso de solventes nocivos (BENAZZI et al., 2013).

O pré-tratamento com sulfitos para superar a recalcitrância da lignocelulose (*Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose* - SPORL) é uma abordagem eficiente no pré-tratamento da biomassa lenhosa. O SPORL é eficiente a 160–190 °C por 10–30 minutos e a adição de sulfito aumenta o valor do pH do meio o que conseqüentemente resulta na síntese de menores quantidades de inibidores de fermentação. A sulfonação parcial da lignina pelo sulfito garante o amaciamento da madeira, o que reduz consideravelmente a demanda de energia pelo pré-tratamento. A comparação entre a explosão de vapor catalisada por ácido e o SPORL demonstra que a eficiência energética do SPORL é cerca de 30 vezes maior de maneira que a hidrólise enzimática de substratos de madeira pré-tratada por SPORL com carga enzimática de 15 FPU/g de celulose foi de aproximadamente 95% em massa em apenas 48 horas (MORENO et al., 2019; ZHANG et al., 2019b).

As microondas também têm aplicação no pré-tratamento de matérias-primas contendo lignocelulose. Muitas investigações apontaram que as microondas causam o aquecimento localizado da matéria-prima, levando à ruptura da estrutura da lignocelulose, tornando a celulose e a hemicelulose mais acessíveis para a hidrólise enzimática. Alguns autores descreveram os efeitos do tratamento com microondas nos resíduos de sorgo (*Sorghum* sp.) aonde foi registrado um rendimento de açúcar consideravelmente maior do que a dos resíduos não tratados. Há também o tratamento ultrassônico de soluções tem

um uso potencial como tecnologia alternativa e tem sido utilizado para a extração de celulose, hemicelulose e lignina. As ondas ultrassônicas criam diferenças de pressão (cavitação) dentro de uma solução que influenciam de maneira diferenciada cada um dos componentes moleculares (no caso, lignina, hemicelulose e celulose) presentes na mistura (BENAZZI et al., 2013; SUBHEDAR; RAY; GOGATE, 2018).

#### 1.2.3.4 Pré-tratamento biológico de matérias-primas que contenham lignocelulose

Em comparação com a maioria dos outros pré-tratamentos já mencionados, os métodos biológicos são considerados como ambientalmente corretos uma vez que não empregam produtos químicos e a entrada de energia é relativamente baixa logo, não há problemas relacionados à corrosão, nenhum fluxo de resíduos tóxicos e a produção de inibidores de fermentação se dá em níveis muito mais baixos. Nos pré-tratamentos biológicos, são empregados microrganismos como fungos e bactérias que degradam a lignina e a hemicelulose, mas não são eficazes na ruptura da celulose (GARCIA-GALINDO et al., 2019; HUANG et al., 2018).

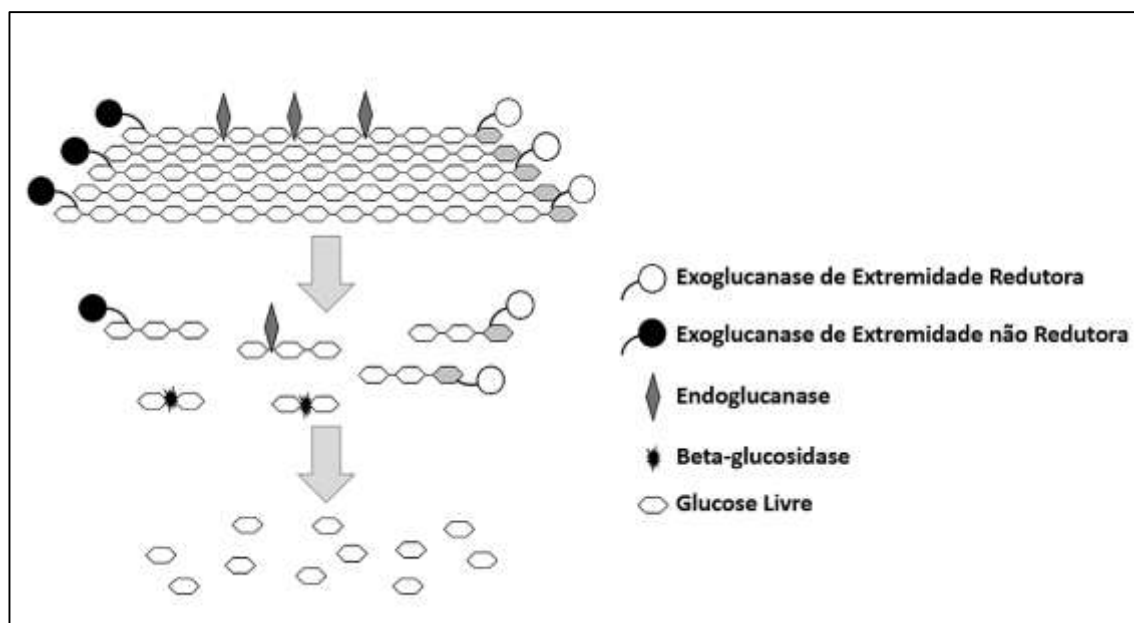
O pré-tratamento biológico de palha de milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum spp.*) e palha de soja (*Glycine max*), pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispota* foi descrito por alguns autores numa estratégia de processamento médio de 18 dias, capaz de deslignificar milho e palha de soja usando enzimas como peroxidase (EC 1.11.1.9) e lacase (EC 1.10.3.2). Nesta hidrólise enzimática, os rendimentos médios de glucose aumentaram em 56,50% em massa do que aqueles observados com as matérias-primas não tratadas. Um aumento adicional do rendimento de glucose (de 10 a 30% em massa) foi obtido quando o tempo de pré-tratamento enzimático foi prolongado para 35 dias. Porém, o pré-tratamento com enzimas de origem fúngica não aumentou a digestibilidade da celulose do trigo (WAN; LI, 2011).

O pré-tratamento biológico também inclui o uso de enzimas para hidrólise de materiais lignocelulósicos crus (para fins de biorremediação) que podem ser remanejados para as indústrias de etanol de segunda geração. A eficiência global do bioprocessamento depende da taxa de hidrólise da matéria-prima



lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. As celulases (EC 3.2.1.4) realizam a hidrólise enzimática da celulose, para que as leveduras ou bactérias possam fermentar os açúcares redutores obtidos em etanol. Na hidrólise da celulose, participam pelo menos três grupos principais de celulases: endoglucanases (EC 3.2.1.4 ) que atuam em regiões de ataque de baixa cristalinidade na fibra de celulose que criam extremidades de cadeia livre, exoglucanases (EC 3.2.1.91) ou celobiohidrolases que degradam ainda mais a molécula removendo as unidades de celobiose nas extremidades da cadeia livre geradas pelas endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) que realiza a hidrólise da celobiose para produzir glucose livre (BEHERA et al., 2017).

A hidrólise enzimática pode ser dividida em duas etapas: primária e secundária. O estágio de hidrólise primária envolve a ação de endoglucanases e exoglucanases na superfície do substrato sólido, resultando na liberação de oligossacarídeos (até 6 unidades de glucose na cadeia) em fase líquida. O estágio de hidrólise secundária inclui hidrólise adicional de oligossacarídeos a celobiose (por celobiohidrolases) e glucose (por  $\beta$ -glicosidases) (BAYER et al., 2008), conforme ilustrado na figura 3.



**Figura 3.** Modelo atual de degradação enzimática da celulose: ataque seqüencial das diferentes exoglucanases (EXO-I e EXO-II) juntamente com as endoglucanases (EG) para desconstruir a celulose, deixando as beta-glicosidases (BG) para degradação final dos resíduos de glucose livre. (Obtido a partir de Bubner, Plank, and Nidetzky 2013, com modificações).

A acessibilidade da celulose à hidrólise enzimática depende da remoção do xilano e da lignina pelo uso de lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) e lacases (EC 1.10.3.2). O xilano não possui a estrutura cristalina compacta como a celulose e, portanto, é mais suscetível à hidrólise enzimática. A hidrólise completa do xilano requer a ação cooperativa das seguintes enzimas endo-1,4- $\beta$ -xilânase (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37),  $\alpha$ -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139). As esterases (EC 3.1.1.1) atuam sobre as ligações éster entre unidades de xilose do xilano e do ácido acético ou entre resíduos da cadeia lateral da arabinose e ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico (ácido ferúlico esterase) e o ácido p-cumárico (BERLIN et al., 2007; BISWAS et al., 2019).

A lignina está intimamente ligada à celulose e, portanto, não é acessível para celulasas. A principal característica da degradação da lignina é a ação das peroxidases, onde a lignina peroxidase (também chamada ligninase) e a peroxidase de manganês (também chamada peroxidase dependente de Mn) são as duas principais enzimas. Estas enzimas foram descobertas no fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* e são chamadas verdadeiras ligninases devido ao seu alto potencial redox. A lignina peroxidase oxida subestruturas de lignina não-fenólicas (retirando um elétron) e produz radicais cátions, que são ainda quimicamente degradados. A Lacase (já mencionada) também constitui parte na degradação da lignina que é sintetizada pela ampla variedade de fungos e bactérias (BJELIĆ; GRILC; LIKOZAR, 2018; DETNS et al., 2002).

As lacases microbianas (EC 1.10.3.2) tem capacidade para hidrólise completa de lignina sozinha ou em combinação com outras peroxidases. Lacases catalisam a oxidação de unidades fenólicas na lignina (consequentemente o oxigênio molecular é reduzido a água), bem como substâncias fenólicas e aminas aromáticas a radicais. Substâncias fenólicas (estritamente relacionadas à lignina ou derivados de lignina), substâncias sem lignina e extratos de diferentes recursos estimulam a síntese de lacase. A hidrólise enzimática é altamente específica e ocorre em condições de reação (por exemplo, pH = 5 e temperatura ótima abaixo de 50 °C) com menor consumo

de energia e impacto ambiental do que a hidrólise ácida de lignocelulose (LOPES et al., 2019; RODRÍGUEZ-COUTO, 2019).

O pré-tratamento biológico (ou enzimático) também proporciona alto rendimento de glucose com baixa formação de subprodutos tóxicos ou inibidores de fermentação, o que é favorável para o uso adicional do hidrolisado nos processos de síntese de Etanol-2G. O produto final da hidrólise enzimática (glucose) inibe a atividade da maioria das supracitadas enzimas (como celulasas) e, portanto, deve ser removido imediatamente após a formação para reduzir seu impacto na cinética da hidrólise. Diferentes abordagens foram examinadas para reduzir a inibição da glucose por hidrólise, como o uso de altas concentrações de enzimas, a adição de  $\beta$ -glicosidases durante a hidrólise e a remoção de açúcar durante a hidrólise por ultrafiltração ou simultânea sacarificação e fermentação (MICHLMAYR et al., 2010).

A concentração de substrato tem um impacto crucial na taxa inicial e no rendimento da hidrólise enzimática da celulose. O aumento da baixa concentração de substrato aumenta o rendimento e a taxa de hidrólise. Embora o preço das celulasas tenha sido reduzido em mais de 10 vezes nas últimas décadas, ele ainda representa mais de 20% dos custos de produção de bioetanol a partir de matérias primas lignocelulósicas. Como as celulasas permanecem ativas após a hidrólise, sua reciclagem pode ser uma abordagem útil e economicamente viável. Portanto, vários métodos para a reciclagem de enzimas (por exemplo, sedimentação seguida por ultrafiltração ou microcentrifugação, cromatografia de troca catiônica, reação de adsorção e imobilização) têm sido estudados (SARATALE; SARATALE; OH, 2012).

### 1.3 O bioetanol lignocelulósico

Uma vez realizada a etapa de sacarificação, o microrganismo mais empregado para a etapa de fermentação e produção propriamente dita do bioetanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua capacidade de degradar a sacarose em hexoses (glucose e frutose). As células de *S. cerevisiae* requerem pequenas quantidades de oxigênio para a síntese de ácidos graxos e esterol durante a produção de bioetanol, de modo que a aeração é um importante

parâmetro para esta etapa. Uma das condições limitantes para a ação desta levedura são as concentrações de açúcar (resultante das etapas de sacarificação) e sal (geradas pelos pré-tratamentos químicos) além das altas temperaturas (MUSSATTO et al., 2010).

Devido à alta concentração de glicídios, o meio aquoso resultante dos processos de sacarificação – também denominado melaço de cana – possui alta osmolaridade o que afeta negativamente a síntese de etanol. Numerosos estudos têm se debruçado no desenvolvimento de cepas de *S. cerevisiae* com maior tolerância a sal e temperatura. A levedura *Schizosaccharomyces pombe* também é utilizada na produção de bioetanol, uma vez que tolera pressões osmóticas elevadas (altas concentrações salinas) e alto teor de glicídios nos melaços. Para a produção de bioetanol também foi investigada a possibilidade de utilização de outros microrganismos, como *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Mucor indicus* etc. No entanto, a alternativa adequada à *S. cerevisiae* ainda não foi encontrada (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

O processo Melle-Boinot é o processo típico de produção de bioetanol fermentação descontínua (aonde as etapas de sacarificação e fermentação ocorrem separadas espacial e temporalmente). Consiste na preparação do caldo rico em açúcares simples e esterilização seguida por fermentação de levedura. O caldo fermentado passa pela separação centrífuga, enquanto a parte líquida do caldo se desloca para o estágio de separação do etanol e a levedura é reciclada para a próxima fermentação, a fim de alcançar concentrações celulares mais altas capazes de degradar até a menor concentração possível dos açúcares disponíveis. Essa abordagem é a tecnologia industrial mais comum no Brasil para produção de bioetanol, pois pode alcançar a maior produtividade volumétrica de bioprocessos (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Neste modo operacional, a otimização do processo de alimentação (renovação de monossacarídeos no caldo) desempenha um papel crítico no aumento do rendimento e da produtividade do etanol. Na fermentação descontínua repetida, o uso da cepa de levedura flocculante se faz fundamental dado a possibilidade de ser removida após os processos de geração do etanol por estratégias simples de filtragem. Após o término do processo fermentativo inicial, as células de levedura se depositam no fundo do biorreator e o caldo

clarificado é removido. Subsequentemente, uma quantidade igual de caldo fresco é adicionada ao biorreator para o próximo lote, resultando em altas concentrações de células e redução da inibição da produção do etanol. Estes lotes podem ser repetidos até que a atividade e a viabilidade de células de levedura sejam perdidas (devido ao acúmulo de compostos inibidores de levedura em caldo) e, conseqüentemente, o inóculo fresco tenha que ser preparado para a reinoculação do sistema (BHATIA; JOHRI; AHMAD, 2012).

Os sistemas contínuos de produção de bioetanol, por sua vez, consistem em uma cascata de biorreatores acoplados em que a inibição do etanol é reduzida. Esta hipótese baseia-se no fato de que o etanol sintetizado no primeiro biorreator é facilmente transportado para os próximos biorreatores e, conseqüentemente, a inibição do etanol é diminuída. Outra possibilidade para aumentar a produtividade dos bioprocessos é a remoção contínua de etanol a partir do caldo rico em monossacarídeos, usando sistemas de vácuo ou membranas, mas isso aumenta os custos globais do processo. Em sistemas contínuos de produção de bioetanol, o aumento do suprimento de ar pode melhorar a viabilidade, rendimento e concentração celular das leveduras. A comparação entre bioprocessos contínuos e descontínuos para produção de bioetanol mostra as seguintes vantagens do modo contínuo: redução de custos de construções de biorreatores, menores custos de manutenção e operação da planta industrial, melhor controle de bioprocessos e maior produtividade (KANG et al., 2014).

A maioria das plantas de produção de bioetanol no Brasil se baseiam no modo operacional denominado *fed-batch* por causa de suas vantagens práticas em escala industrial. A imobilização, a recuperação e a reciclagem de células de levedura ou o controle do crescimento de leveduras podem aumentar a densidade das células viáveis e bioquimicamente ativas. A concentração de células imobilizadas nos processos de geração de bioetanol são relativamente altas e, em taxas de maior diluição, o bioprocessos pode ser facilmente controlado, o que, conseqüentemente, resulta em maior produtividade (HAQ et al., 2016).

A imobilização de células de levedura por adsorção de superfície é mais eficiente do que armadilhas ou métodos de separação mecânica. Estudos de imobilização de células de levedura pela adsorção de superfície demonstraram que o crescimento de células não é significativamente afetado, embora algumas

células de levedura possam ser removidas do sistema. As células de levedura auto-floculantes apresentaram eficiência de produção de bioetanol semelhante à observada pelas células de levedura imobilizadas em materiais de suporte. Além disso, o material de suporte não é utilizado nem danificado pela fermentação e, conseqüentemente, o bioprocesso é mais simples e economicamente competitivo. Os flocos de levedura podem ser lavados do biorreator sob condições controladas, a fim de manter a concentração de levedura dentro do biorreator a um nível constante. A sedimentação ou centrifugação pode ser usada para a recuperação de levedura após a lavagem do biorreator muito embora o uso da centrifugação exija maior investimento de capital e maiores custos de consumo (CHU; LEE, 2007).

Uma especialização recente nos sistemas de biorreatores contínuos denominada de “*air-lift*”, utilizam colunas com um ou dois estágios, acoplados com ou sem decantadores, um fluxo de CO<sub>2</sub> acoplado ao fermentador no interior do sistema de tanques facilitando dos produtos suspensos no caldo e capaz de realizar a reciclagem das leveduras ao suspender os flocos de organismos de uma maneira padronizada. Nas últimas décadas, a tecnologia de produção do bioetanol de altas concentrações de açúcar (ACA-Etanol) tornou-se atraente devido à considerável economia de energia deste processo. A tecnologia precisa de uma concentração de substrato relativamente alto (270 g/L de sólidos dissolvidos ou mais) e concentração final de bioetanol (15% em volume ou mais) no caldo. O aumento da concentração de caldo resulta em redução significativa do consumo de energia para a destilação e a quantidade de resíduos. Portanto, esta tecnologia de produção é promissora para a produção industrial de bioetanol (BRETHAUER; WYMAN, 2010).

Para além das tecnologias de geração de bioetanol a partir de caldo derivado do melaço de cana, existem dois principais processos para a produção de bioetanol a partir do amido de milho: moagem a seco que representa a maior parte da produção (67%) e moagem úmida (33%), ambos utilizando leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cesianus*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces* sp.) que são capazes de metabolizar os hidrolisados de amido. A moagem a seco é frequentemente usada para a produção de bioetanol nos EUA, devido ao seu menor custo de capital e operação. Neste processo, todo o milho é moído e misturado com água para obter um

homogenato (mosto). O mosto é cozido em um forno a 80–90 °C por 15–20 min. Durante o cozimento,  $\alpha$ -amilase (em quantidades relativamente pequenas) são adicionadas impulsionando a liquefação (PHILIPPIDIS; SMITH, 1995).

Uma porção de  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) adicional é adicionada durante a liquefação secundária, que ocorre por 90 min a 95 °C. Depois disso, o mosto é resfriado a 60 °C e misturado com a maltohidrolase (EC 3.2.1.2) para hidrolisar oligossacarídeos em açúcares que podem ser ainda metabolizados em etanol por leveduras. A sacarificação e a fermentação ocorrem frequentemente de maneira simultânea, reduzindo assim os níveis de enzima e a inibição de células de levedura por etanol ou substratos ao mínimo. O processo biológico geralmente ocorre em pH = 4,8 a 5,0 e 30 °C por 48 horas. O caldo fermentado é então destilado para produzir um etanol a 95% em volume. A desidratação do etanol a 95% em volume requer peneiras moleculares para se obter 99,5% em volume de etanol (AGGARWAL; DUTTA; SHEIKH, 2019).

Algumas modificações do processo de moagem a seco foram introduzidas para recuperar componentes fibrosos antes da fermentação. O processo de moagem a úmido produz vários subprodutos de valor agregado (por exemplo, fibra, amido e glúten) antes da fermentação, o que torna este processo mais diversificado economicamente. O processo de moagem úmida precisa ser bastante asséptico de modo a evitar a contaminação da matéria-prima por microrganismos, depois disso o material é desfibrado para obter fibras, e o glúten e o amido também são separados. Os passos seguintes na produção de bioetanol são os mesmos que no processo de moagem a seco: sacarificação (por ação coordenada de amilases e maltohidrolase), fermentação, destilação e enriquecimento das frações de etanol. O rendimento de etanol por quilograma de milho no processo de moagem a seco é de 32,2% e no processo de moagem úmida de 29,1% (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006).

Não importando o tipo de matéria-prima, mas unicamente o método de obtenção do bioetanol, a literatura distingue dos métodos básicos denominados de SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation* - Fermentação e Hidrólise Separadas) e SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* - Fermentação e Hidrólise Simultâneas), usualmente utilizados para a produção de bioetanol a partir de matérias-primas contendo polissacarídeos complexos. Tanto nos sistemas SHF e SSF, ainda é possível a inclusão de leveduras

modificadas (*Simultaneous Saccharification, Yeast Propagation and Fermentation* - SSYPF) no biorreator durante a sacarificação inicial o que impulsiona, em ambas as metodologias, a produção do combustível (SINGHANIA et al., 2014).

Na SHF, tanto a hidrólise como a fermentação ocorrem nas suas temperaturas ideais (50 °C para hidrólise e 28–32 °C para fermentação de levedura) aonde microrganismos adequados realizam a fermentação de hexoses e pentoses separadamente. A necessidade de fermentações separadas é porque os microrganismos que utilizam a pentose metabolizam as pentoses e as hexoses mais lentamente do que os microrganismos que apenas assimilam as hexoses, além disso, esses microrganismos também são mais sensíveis ao etanol e aos inibidores (BURMAN; SHERIDAN; HARDING, 2019).

O acúmulo de açúcares liberados (principalmente glucose e celobiose) durante a hidrólise enzimática inibe a atividade da celulase. O efeito inibitório da celobiose na celulase é consideravelmente maior que o da glucose. Em concentrações relativamente baixas de celobiose (até 6 g/L), a atividade de celulase é reduzida em 60% em comparação com a produção sem celobiose. As contaminações microbianas também são um problema na SHF devido ao período de incubação relativamente longo durante a hidrólise: As principais fontes de contaminação são as enzimas hidrolíticas, podendo ser contornada por esterilizações em escala industrial – responsáveis por encarecer exponencialmente o processo (MASLOVA et al., 2019).

Durante a SSF, a hidrólise e a fermentação ocorrem, concomitantemente, em biorreator. Portanto, os açúcares liberados da hidrólise enzimática são imediatamente utilizados pelo microrganismo. Sob essas condições, concentrações relativamente baixas de açúcar estão presentes no caldo e, conseqüentemente, a inibição da celulase pelos açúcares liberados é reduzida. A temperatura ideal para SSF (em torno de 38 °C) é um valor intermediário entre as temperaturas ideais de hidrólise (45–50 °C) e fermentação (30 °C). Melhoria adicional do SSF pode ser alcançada através da seleção de enzimas resistentes e linhagens modificadas de levedura (BALLESTEROS et al., 1991).

A abordagem SSF mais frequentemente utiliza *T. reesei* e *S. cerevisiae*. Para usar a temperatura de fermentação mais próxima da temperatura ótima de hidrólise, leveduras termotolerantes e bactérias foram estudadas. De acordo



com a literatura, *Kluyveromyces marxianus* e *K. fragilis* têm a maior produtividade de etanol a 42 °C, quando *K. marxianus* tem um rendimento de etanol de 0,5 g/g de celulose em 78 h. As principais vantagens da SSF são: (1) aumento da taxa de hidrólise através da redução da inibição da celulase por açúcares liberados; (2) menor demanda de enzimas; (3) maior rendimento de bioetanol; (4) menor necessidade de condições estéreis; (5) menor tempo de bioprocesso e (6) redução de custos por eliminação de dispendiosos processos e equipamentos de separação (YÁÑEZ-S et al., 2013).

As principais desvantagens da SSF são temperaturas incompatíveis para hidrólise e fermentação, tolerância microbiana ao etanol e inibição das enzimas pelo etanol. A hidrólise incompleta do substrato provoca estreita associação de leveduras e celulases adsorvidas com resíduos de fermentação, o que impede a recirculação de altas concentrações de células de levedura necessárias para a produção bem-sucedida de bioetanol na próxima etapa de fermentação. Sob essas condições, as células de levedura utilizam principalmente açúcares liberados da hidrólise da celulose para o crescimento, mas não para a síntese do etanol (SURIYACHAI et al., 2013).

Houve uma enorme pesquisa na área de biorefinarias com modelos SHF e SSF para converter matérias-primas recalcitrantes (como as de origem lignocelulósica) em açúcares fermentescíveis. Apesar do enorme interesse e do progresso adequado na pesquisa e desenvolvimento do bioetanol lignocelulósico, muitos desafios ainda precisam ser resolvidos. Etapas mais utilizadas na produção de bioetanol a partir de matérias-primas contendo lignocelulose são: (1) o pré-tratamento de celulose e hemicelulose para se tornar mais acessível nas etapas subsequentes; (2) hidrólise ácida ou enzimática de polissacarídeos em açúcares simples; (3) fermentação microbiana do simples açúcares (hexoses e pentoses) a etanol; e (4) separação e concentração de etanol (MITHRA; SAJEEV; PADMAJA, 2019).

É nesse cenário de esforços para obter um microrganismo ideal que seja capaz de produzir etanol diretamente a partir de qualquer carboidrato, diminuindo a importância das supramencionadas etapas 1 e 2, que as bactérias recebem cada vez mais atenção por conta da versatilidade fisiológica e maior taxa de crescimento quando comparado à levedura *S. cerevisiae*. A bactéria gram-negativa *Zymomonas mobilis* produz etanol a partir da glucose através da

via *Entner-Doudoroff* em conjunto com as enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase. Apesar da relativa eficiência na produção (com rendimentos máximos teóricos de até 97%), o uso de *Z. mobilis* em processos industriais ainda não se dá de maneira viável pelo fato de que suas rotas de fermentação são orientadas apenas para glucose, frutose e sacarose – necessitando de um aprimoramento genético de maneira a elevar a sua capacidade de reconhecer substratos fermentescíveis (XIA et al., 2019).

Um outro potencial candidato à substituição dos sistemas baseados em leveduras é o bacilo Gram-negativo anaeróbico *Zymobacter palmae* com potencial para metabolizar hexoses, di-e-trissacarídeos  $\alpha$ -ligados e álcoois de açúcares (frutose, galactose, glucose, manose, maltose, melibiose, sacarose, rafinose, manitol e sorbitol). *Z. palmae* produz aproximadamente 2 mols de etanol por mol de glucose sem acumulação de subprodutos, e também mostra produtividade semelhante à de *Z. mobilis*, com a vantagem de reconhecer uma variedade superior de substratos (QUINN et al., 2019).

Para além das bactérias, ainda surge a possibilidade de substituição das leveduras por classes macroscópicas de fungos como o caso do ascomiceto *Fusarium oxysporum* que é conhecido por sua capacidade de produzir etanol, muito embora sua taxa de conversão seja baixa além de produzir quantidades significativas de ácido acético como subproduto – necessitando aprimoramento genético para fins de otimização de produção. Outros gêneros, como *Neurospora*, *Monilia*, *Paecilomyces* e *Neocallimastix*, também foram relatadas como fungos produtores de etanol (TIAN et al., 2015).

Na medida que novos organismos são empregados na industrial do bioetanol, novos bioprocessos integrados, como a sacarificação e a cofermentação simultâneas (SSCF) e o bioprocessamento consolidado (CBP) se consolidam na literatura, como alternativas aos tradicionais métodos SHF e SSF. A SHF hidrolisa a matéria-prima lignocelulósica pré-tratada para só depois fermentá-la em etanol em biorreatores separados. Após o pré-tratamento de matérias-primas lignocelulósicas, a fase sólida é separada da fase líquida, que contém principalmente açúcares pentoses e algumas hexoses. Após o pré-tratamento com ácido diluído, a fase sólida residual contém principalmente lignina e celulose. A celulose é então hidrolisada pela adição de enzimas celulolíticas (HEMANSI et al., 2019).

A inclusão da fermentação da pentose no SSF é outra alternativa de integração promissora, e esse processo é chamado de sacarificação e cofermentação simultânea (SSCF). Neste modo, ambos os microrganismos produtores têm que ser compatíveis em termos de pH e temperatura ideais. Além disso, o desenvolvimento de cepas microbianas capazes de crescer a temperaturas elevadas pode melhorar significativamente os indicadores de produção (DU et al., 2019).

O SSCF é mais rentável do ponto de vista econômico e possui diversas diferenças do ponto de vista técnico pelo fato de reduzir a possibilidade de contaminação pelo fato de funcionar em uma abordagem que permite a cofermentação de pentoses e hexoses. Em estratégias já descritas na literatura, a cultura-binária de *S. cerevisiae* e *Pichia stipitis* resultou na conversão de ambas as hexoses e pentoses do hidrolisado com maior rendimento de etanol do que o bioprocessamento com monocultura de *S. cerevisiae* (em sistema SSF). Outros autores também relataram que a cultura-binária de *S. cerevisiae* e *Candida tropicalis* produziu maiores quantidades de etanol que a monocultura de *S. cerevisiae* em hidrolisado ácido de cascas de *Manihot esculenta* (WANG et al., 2019).

Em uma recente otimização desta configuração de fermentação, Olsson e Hahn-Hägerdal sugeriram um sistema incluindo a isomerização de xilose e a fermentação com *S. cerevisiae* em um processo simultâneo. Nesse bioprocessamento, a isomerase da xilose (EC 5.3.1.5) converte a xilose em xilulose, que é subsequentemente utilizada pelas células de levedura e, portanto, a cofermentação das matérias-primas contendo lignocelulose foi melhorada. No entanto, as altas concentrações de subprodutos (CO<sub>2</sub> e xilitol), a baixa estabilidade enzimática, além de fatores como pH e temperatura incompatíveis aliadas à reversibilidade da transformação enzimática são os principais inconvenientes deste bioprocessamento (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Para além desta técnica, Ishola e colaboradores desenvolveram e avaliaram um novo método de produção de bioetanol lignocelulósico que inclui uma etapa adicional de filtração (Simultaneous Saccharification, Filtration and Fermentation – SSFF). O SSFF é um bioprocessamento integrado que permite a hidrólise enzimática simultânea de biomassa lignocelulósica, filtração de açúcares a partir da hidrólise e fermentação do filtrado com levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No

SSFF, a matéria-prima contendo lignocelulose pré-tratada é enzimaticamente hidrolisada em um biorreator, enquanto a suspensão é continuamente bombeada através de uma membrana de fluxo cruzado. O material bruto volta para o biorreator onde é submetido a uma nova etapa de hidrólise e o filtrado rico em açúcar para fermentação (ISHOLA et al., 2013).

A membrana (módulo feito de polietileno com um invólucro de polipropileno usado em uma microfiltração de fluxo cruzado) capaz de filtrar a suspensão lignocelulolítica pré-tratada em até 14,4% por sólidos suspensos em massa, sem entupimento, e funcionou continuamente por 28 dias. A cepa floculante de *S. cerevisiae* foi reutilizada sucessivamente por 5 lotes diferentes de SSFF, e seus cultivos resultaram em um rendimento de etanol de até 85,0% do rendimento teórico. Outros autores também usaram o sistema SSFF para captação simultânea de glucose e xilose por linhagens modificadas de levedura *S. cerevisiae* com a capacidade de fermentar xilose na produção de bioetanol a partir de palha de trigo. Neste processo, o rendimento de etanol de 90% do rendimento teórico (ISHOLA; BRANDBERG; TAHERZADEH, 2015).

Cabe ainda ressaltar uma potencial e cada vez mais utilizada abordagem de integração para a conversão de matérias-primas contendo celulose em bioetanol denominada de bioprocessamento consolidado (*Consolidated bioprocessing* – CBP). Nesta abordagem, a produção da celulase e a fermentação requerem apenas um microrganismo. Portanto, a produção de celulase, a hidrólise da celulose e a fermentação são realizadas em uma única etapa. A rigor, o conceito de CBP envolve quatro reações biológicas em uma única etapa: (1) a produção de enzimas (celulases e hemicelulases); (2) hidrólise de carboidratos em açúcares; (3) fermentação de hexoses (glucose, manose e galactose) e (4) fermentação de pentoses (xilose e arabinose). A CBP apresenta as seguintes vantagens em comparação com os outros sistemas integrados de produção de bioetanol: os sistemas enzimáticos e de fermentação são completamente compatíveis e, portanto, os custos de produção de bioetanol são reduzidos, investimentos de capital e operação não são necessários e parte do o substrato não é gasto na produção de celulase (CHANG et al., 2013).

Na CBP, diferentemente dos sistemas supracitados (SHF, SSF e SSCF) que possuem um protagonismo de fungos, uma vasta gama de bactérias é empregada merecendo especial destaque o firmicute *Clostridium thermocellum*

que é utilizado para a produção de enzimas, hidrólise de celulose e fermentação de glucose. O sistema CBP com *C. thermosaccharolyticum* apresenta conversão de substrato 31% maior que o sistema CBP com *Trichoderma reesei* ou *S. cerevisiae*. No entanto, os principais problemas deste sistema ainda não são adequadamente resolvidos, tais como: redução do rendimento de etanol devido à formação de sais acéticos e outros ácidos orgânicos (por exemplo, lactato) e baixa tolerância ao etanol por parte do gênero *Clostridium*. Embora a CBP seja interessante do ponto de vista econômico, até agora, nenhum microrganismo eficaz que exibe todos os recursos necessários foi encontrado – o que impulsiona as pesquisas destinadas ao estabelecimento de novos microrganismos e novos métodos de otimização (JIN et al., 2011).

Dentre os caminhos possíveis para a busca desta otimização, a engenharia genética poderia melhorar as propriedades de microrganismos que já estão sendo aplicados na fermentação do etanol. Microrganismos com alta atividade de celulase precisam aumentar as propriedades de fermentação enquanto microrganismos com propriedades de fermentação satisfatórias precisam ter atividade celulolítica e/ou hemicelulolítica otimizadas. Por exemplo, a linhagem recombinante melhorada de *C. thermocellum* produz 60 g de etanol para cada litro de melaço em caldo (PAPANNEK et al., 2015).

Além disso, o uso de engenharia genética melhorou a atividade celulolítica de cepas recombinantes altamente produtivas de bactérias *E. coli*, *K. oxytoca* e *Z. mobilis*. Sakamoto e colaboradores produziram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante capazes de hidrolizar por meio de hemicelulases e endoxilanasas de *T. reesei*,  $\beta$ -xilosidase de *Aspergillus oryzae* e  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus aculeatus*, assim como assimilar xilose através da expressão de xilose redutase e xilitol desidrogenase de *P. stipitis* e *S. cerevisiae*. Esta linhagem recombinante produz com sucesso o bioetanol a partir do hidrolisado de palha de arroz, sem a necessidade de adição de enzimas hidrolíticas. Os autores confirmaram que essa linhagem de engenharia de superfície celular pode ser altamente eficaz na consolidação da produção de bioetanol a partir de matérias-primas hemicelulósicas. Apesar de todos esses incrementos, os desafios de otimização na metodologia CBP requerem ainda um incremento de microrganismos que ofereçam novas oportunidades metabólicas – fora dos

sistemas já saturados e conhecidos que aparentam ter-se esgotado nas tentativas já realizadas para otimizar o processo (SAKAMOTO et al., 2012).

#### 1.4 O Celulossomo microbiano

Vários microrganismos produzem enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos vegetais celulose e hemicelulose (como mostrado na tabela 1). As celulasas e hemicelulasas representam um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise desses polissacarídeos e podem ser produzidas por vários organismos, desde eucariotos, como cupins e gastrópodes, até bactérias e fungos, desempenhando um papel importante nos ecossistemas e determinando decisivamente o ciclo biogeoquímico do carbono (DETNS et al., 2002).

**Tabela 1.** Relação de enzimas purificadas e descritas na literatura pertencentes ao complexo celulolítico bacteriano com potencial aplicação industrial

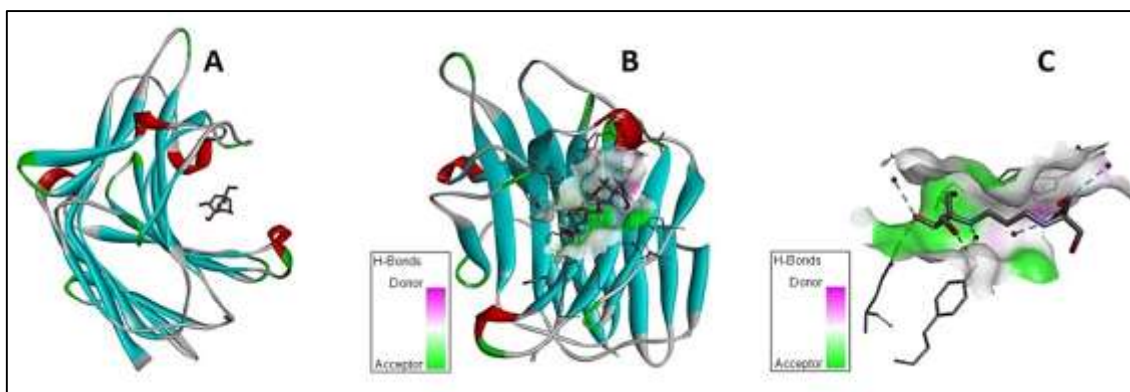
Microrganismo	Tipo	Massa		Temperatura	Referência
		Molecular (kDa)	pH Ótimo		
<i>Actinomyces</i> sp.	EG	57,1	6,0	55,0	(KIM et al., 2016)
<i>Cellulophaga algicola</i>	EG	40,0	6,0	40,0	(WANG; YU; HAN, 2016)
<i>Thermobifida halotolerans</i>	EG	45,9	8,5	55,0	(YIN et al., 2015)
<i>Bacillus vallismortis</i>	EG	80,0	7,0	65,0	(GAUR; TIWARI, 2015)
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	EG	40,0	5,0	50,0	(GENC et al., 2015)
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	EG	38,3	4,5	60,0	(WANG et al., 2015a)
<i>Bacillus subtilis</i>	EG	56,0	6,0	60,0	(CHUAN WEI et al., 2015)
<i>Paenibacillus</i> sp.	EG	63,5	6,0	40,0	(DHAR et al., 2015)
<i>Clostridium thermocellum</i>	EG	137,1	6,0	70,0	(HAQ et al., 2015)
<i>Bacillus</i> sp.	EG	37,0	6,5	60,0	(DOS SANTOS et al., 2018)
<i>Xanthomonas campestris</i>	EG	38,0	7,0	45,0	(PUHL et al., 2019)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	EG	73,0	6,5	50,0	(DUTOIT et al., 2019)
<i>Clostridium cellulovorans</i>	EG	112,0	7,5	50,0	(KOZAKI; MIYAKE, 2019)
<i>Enterobacter</i> sp.	EG	38,0	7,0	60,0	(ONTAÑON et al., 2019)
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	EG	59,0	7,0	65,0	(MOHAMMADI; NAJAVAND; PAZHANG, 2019)
<i>Bacillus licheniformis</i>	EG	65,8	7,0	60,0	(DE ARAÚJO; DE OLIVEIRA NETO; POLIKARPOV, 2019)
Arqueal <i>Incertae sedis</i>	EG	55,4	6,0	105,0	(SULEIMAN et al., 2019)
<i>Lactobacillus</i> spp.		61,0	8,0	65,0	(ZHANG et al., 2019a)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	EO	45,0	6,5	60,0	(KUMAR et al., 2012b)

<i>Cellulosilyticum ruminicola</i>	EO	13,0	4,0	70,0	(CAI; ZHENG; DONG, 2011)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	EO	80,0	5,5	60,0	(NAKATANI; LAMONT; CUTFIELD, 2010)
<i>Cellulomonas fimi</i>	EO	121,2	5,0	60,0	(CURRY et al., 1988)
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	EO	45,0	7,0	40,0	(MACKENZIE; BILOUS; JOHNSON, 1984)
<i>Thermotoga thermarum</i>	BG	56,0	5,0	80,0	(LONG et al., 2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	BG	38,8	12,0	75,0	(ASHA; PATHMA; SAKTHIVEL, 2015)
<i>Vibrio</i> sp.	BG	101,0	6,0	45,0	(WANG et al., 2015b)
<i>Pseudonocardia</i> sp.	BG	105,0	7,0	37,0	(DU et al., 2014)
<i>Lactobacillus brevis</i>	BG	330,0	7,0	30,0	(MICHLMAYR et al., 2010)

(EG: Endoglucanase, EO: Exoglucanase, BG: Beta-Glicosidase)

As celulasas (ou  $\beta$ -amilases) são capazes de hidrolisar as ligações O-glicosídicas entre os resíduos de glicose dispostos em uma configuração isomérica do tipo Beta, como no polissacarídeo mais abundante na biosfera, que é a celulose, ser degradado apenas por uma pequena porção de organismos capazes de realizar sua catálise em moléculas de glicose que poderiam ser usadas em diferentes processos (tabela 2), como na produção de etanol. Além deste potencial emprego na indústria de biocombustíveis, atualmente as celulasas são amplamente utilizadas nas indústrias de papel, têxtil e detergente (BUBNER; PLANK; NIDETZKY, 2013).

O coquetel enzimático, que é comumente chamado de diferentes enzimas responsáveis pela degradação da celulose de sua forma cristalina para açúcares, é composto pelos três maiores grupos de celulasas envolvidas no processo de hidrólise: (1) endo- $\beta$ -1,4-glucanases (endoglucanase ou EC 3.2.1.4) que hidrolisam as regiões internas da estrutura de celulose nas regiões amorfas das fibras, criando regiões terminais redutoras e não redutoras livres (figura 4); (2) exo- $\beta$ -1,4-glucanases (exoglucanase ou EC 3.2.1.91) que hidrolisam as regiões terminais redutoras e não redutoras que formam unidades de celobiose; (3)  $\beta$ -glicosidases (BG ou EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose (formada por oligômeros de glicose) para produzir glicose livre (SUN; CHENG, 2002).



**Figura 4.** Um modelo estrutural típico de uma endoglucanase extracelular bacteriana: Estrutura de monômero inteiro em associação com um análogo de polissacarídeo (A) no sítio ativo (B) com interações predominantes de ligações H entre as duas estruturas, como mostrado em detalhes (C). O estudo estrutural foi realizado com base na endoglucanase de *Bacillus subtilis* descrita por Furtado et al. 2011 com Código PDB 3O5S, com modificações.

Como se deduz da breve exposição dos mecanismos de ação das hidrolases acima mencionadas, as endo- $\beta$ -1,4-glucanases são de fundamental importância para a degradação da celulose, pois são as primeiras a degradar o polímero iniciando o evento em cascata, portanto, as endoglucanases são as enzimas mais importantes no processo de degradação do material lenhocelulósico, visando a produção de 2-etanol, por ser a única classe de enzima capaz de iniciar irreversivelmente a geração de glicose a partir de resíduos agrícolas pré-tratados (VASQUEZ et al., 2007).

**Tabela 2.** Aplicação de hidrolases celulolíticas bacterianas em diferentes atividades econômicas

<b>Atividade Econômica</b>	<b>Função</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<b>Indústria Alimentícia</b>	Hidrólise de celulose que compõe diversos produtos alimentícios feitos com plantas; gestão da viscosidade dos alimentos pela degradação da celulose presente em sopas e cremes.	Processamento industrial nas etapas de extração de sucos ou óleos vegetais, diminuição dos componentes da fibra celulósica na composição final dos alimentos ou alteração na textura de certos alimentos.	(MADHU; RAMTEKE, 2019)
<b>Indústria de Bebidas</b>	Hidrólise de polissacarídeos vegetais para aumentar a glicose	Estabilização de texturas e clarificação de cervejas e vinhos,	(ANOOP KUMAR et al., 2019)



	livre no processo de fermentação alcoólica.	além de melhoria na produção de álcool.	
<b>Indústria Têxtil</b>	Bioestabelecimento e biopolimento de tecidos de algodão.	Melhoria na substituição da lavagem de pedrapomes em um processo de biopolimento, atuando sobre tecido feito de algodão, o que leva a uma desfibrilação da liocel.	(JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019)
<b>Indústria Papeleira</b>	Processamento de celulose de celulose, remoção de tinta em fábricas de papel reutilizado.	Melhoria no processamento de celulose, redução de tratamentos químicos e consumo de água durante a produção de papel.	(BISWAS et al., 2019)
<b>Agricultura</b>	Desenvolvimento de novas cultivares, solarização de polissacarídeos presentes em protoplastos	Modificações nos componentes da parede celular das plantas para produzir novas cultivares mutantes e novos híbridos empregados nas lavouras.	(GARCIA-GALINDO et al., 2019)
<b>Indústria de Biocombustíveis</b>	Produção de etanol a partir de material celulósico	Hidrólise da celulose das paredes celulares das plantas em açúcares redutores livres para produzir etanol a partir da fermentação alcoólica	(BINOD et al., 2019)
<b>Indústria Farmacêutica</b>	Hidrolisação de celulose em formulações farmacológicas	Produção de digestina e outros suplementos enzimáticos que atuam na celulose, hemicelulose e beta-glucana, a fim de ajudar as restrições alimentares.	(DEBNATH et al., 2019)

<b>Manejo de Resíduos e Bioconversão</b>	Biomitização de resíduos celulósicos	Gestão ambiental para reduzir a poluição sem o uso de produtos químicos ou queimaduras	(SHAH; RANAWAT; MISHRA, 2019)
--	--------------------------------------	--	-------------------------------

Devido aos diferentes mecanismos de ação presentes nas celulases, é possível estabelecer coquetéis que atendem a diferentes estratégias de hidrólise, sendo a mais comum a sinergia endoexo onde as endoglucanases atuam para gerar terminações redutoras e não redutoras, que por sua vez são clivadas por exoglucanases do tipo I (específicas para terminações redutoras) e tipo II (específicas para terminações não redutoras); ou o sistema de sinergismo exo-exo em que as exoglucanases do tipo I e II atuam simultaneamente nos terminais já existentes nas fibras sem romper as seqüências internas da celulose, o que implica a não formação de novas terminações durante todo o processo de degradação; finalmente deixando o sinergismo exo-BG, onde as exoglucanases fornecem oligômeros de glicose diretamente para as  $\beta$ -glucosidases para geração gratuita de glicose (BUBNER; PLANK; NIDETZKY, 2013).

#### 1.5 Microrganismos extremófilos marinhos: Fontes promissoras para a biotecnologia de enzimas

As linhagens bacterianas desenvolvem, com seus hospedeiros escleractíneos, uma íntima associação que resulta em cooperação na qual os procariontes são favorecidos pelo abrigo e disponibilidade de nutrientes e corais protegidos de possíveis patógenos pela competição interespecífica dos microrganismos presentes (LINS-DE-BARROS et al., 2013).

Quando submetidos a uma nova condição ambiental, os corais sofrem com o fenômeno da sucessão ecológica devido à diminuição da aptidão de sua microbiota associada à elevação concomitante da capacidade de competição por locais de adesão e à virulência de alguns patógenos; esse processo leva à inserção de outros microrganismos na microbiota do coral, causando uma modificação da diversidade e desestabilizando o equilíbrio mútuo entre os procariontes e o hospedeiro, que por sua vez se torna ainda mais suscetível devido à agressão dos patógenos atualmente presentes e ao desenvolvimento

de virulência em cepas anteriormente não patogênicas (AINSWORTH; GATES, 2016).

Esses fatores de estresse culminam em favorecer ainda mais a sucessão dos microrganismos originais, levando a um círculo vicioso capaz de envolvimento crônico da homeostase do coral, levando a um déficit qualitativo na associação mútua entre o coral e o componente fotobiótico da associação, são algas do gênero *Symbiodinium* (comumente referido como zooxanthellae) que causa a alteração da pigmentação responsável pela síndrome do branqueamento de corais (clareamento) (ROSENBERG et al., 2007).

Uma análise preliminar das bactérias cultiváveis presentes nos tecidos dos corais mostra uma diferença notável tanto em riqueza quanto em abundância quando comparada à coluna de água na região do ambiente coral, esses achados evidenciam que a relação entre microrganismos e o coral hospedeiro vai além conveniências locais, mas reflete uma associação complexa ao longo do tempo. De fato, estudos recentes mostraram que populações bacterianas específicas estão relacionadas a corais específicos, sugerindo uma relação de coevolução entre as espécies (ROSENBERG et al., 2007).

Entre as várias interações ecológicas presentes nos corais, algumas associações com microrganismos desempenham papel preponderante na prevenção de infecções, geralmente devido à ocupação em áreas de superfície dos corais, competição de nutrientes e secreção de moléculas com atividade bacteriana e enzimática, entre outras (KREDIET et al., 2013), resultando no fracasso da colonização de outros microrganismos com menos competição e potencialmente virulentos para os corais.

Semelhante à barreira imposta pela microbiota comensal que coloniza o tegumento, mucosa e outras estruturas em humanos, protegendo-os pela competição com os locais de adesão e nutrientes com os microrganismos "exógenos", as bactérias associadas aos corais desempenham um papel importante na manutenção da homeostase desses organismos, protegendo-os da patogenicidade de outros microrganismos (LINS-DE-BARROS et al., 2013).

Sabe-se que uma parcela muito pequena dos microrganismos pode ser isolada e cultivada por métodos tradicionais e, mesmo para estes, não é possível acessar a filogenia das espécies apenas a partir do seu isolamento. No entanto, o uso de bibliotecas genômicas construídas para o gene 16S rRNA, depositadas

em grandes bancos de dados mundiais e disponíveis para acesso gratuito por vários pesquisadores, possibilita não apenas pesquisar completamente a diversidade bacteriana, mas também estabelecer objetivamente relações entre os organismos amostrados (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003).

Por esse motivo, o uso de ferramentas moleculares e de bioinformática para a classificação de microrganismos, bem como a descoberta de novas espécies a partir do seqüenciamento genômico, permitiu uma compreensão mais ampla dos mecanismos evolutivos por trás das relações ecológicas encontradas na natureza (ESCOBAR-ZEPEDA; VERA-PONCE DE LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015).

Entre os gêneros de bactérias celulolíticas que ocorrem em associação com os corais, o gênero *Bacillus* apresenta uma distribuição onipresente nos ecossistemas aquáticos, interagindo com uma ampla gama de organismos das regiões bênticas às zonas entre-marés (tempo submerso, tempo exposto ao sol) (WILLIAMS et al., 2010). No presente trabalho, é possível apresentar uma grande adaptação fisiológica aos mais diversos ambientes, o que se reflete nas enzimas utilizadas no metabolismo desses procariontes.

Ao associar-se aos corais das zonas entre-marés como o antiozoário *Siderastrea stellata*, as bactérias associadas devem ser capazes de suportar extremos de salinidade e temperatura, bem como a flutuação desses parâmetros físico-químicos ao longo do dia, o que torna esse nicho ecológico um candidato muito forte para a prospecção de celulases extracelulares de interesse para a indústria de produção de Etanol-2G, substituindo os organismos atualmente disponíveis e caracterizados na literatura (LINS-DE-BARROS et al., 2013).

## 1.6 Otimização fatorial de hidrolases bacterianas

Tradicionalmente, os processos de otimização são realizados monitorando a influência de um fator de cada vez (*One Factor at a Time* – OFAT) nas respostas experimentais, mantendo outros parâmetros constantes. A principal desvantagem da estratégia OFAT é a exclusão de efeitos interativos entre as variáveis estudadas. Além disso, estimar o efeito de um grande número de variáveis na resposta leva a perda de tempo, mão de obra e reagente, tornando o processo caro (AANCHAL et al., 2016). Considerando que, os métodos

estatísticos podem avaliar o efeito interativo de muitos fatores, minimizando o número de experimentos e condições de ensaio para uma resposta desejável (AKHTAR et al., 2015).

Nesse contexto, entre as técnicas multivariadas mais relevantes, a metodologia da superfície de resposta (*Response Surface Methodology* – RSM) mostrou aplicação notável em várias otimizações de processos, principalmente relativa à produção de etanol (DASGUPTA et al., 2013), produção de bacteriocinas (KUMAR et al., 2012a), degradação de cromóforos (DEMIREL; KAYAN, 2012), produção de quitinases de *Chitolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 (HAO et al., 2012) além de celulases de bactérias (AKHTAR et al., 2015; DEKA et al., 2011; LEE et al., 2012) e fungos (ANURADHA JABASINGH; VALLI NACHIYAR, 2010; MEKALA et al., 2008; SHU et al., 2013; SONI; NAZIR; CHADHA, 2010).

A metodologia da superfície de resposta consiste em uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais para descrever o comportamento dos dados com o objetivo de fazer previsões estatísticas para otimizar a resposta. Nos últimos anos, a otimização da celulase usando RSM de bactérias e fungos foi explorada para otimizar a atividade e a especificidade em relação a vários substratos celulósicos (AKHTAR et al., 2015; SARAVANAN et al., 2012).

Para atingir as condições ideais, superfícies geradas derivadas de modelos lineares podem ser usadas para indicar a direção na qual os parâmetros originais devem ser deslocados. No que diz respeito à produção de celulase microbiana, o tipo de linhagem, as condições de cultura, a disponibilidade de substratos e nutrientes são fatores importantes que afetam o rendimento da celulase. Ingredientes do meio, como fonte de carbono, de nitrogênio e concentração de sais (como  $MgSO_4$ ,  $NaCl$  ou  $MnCl_2$ ) são geralmente descritos como fatores promotores para a produção de celulases (ANURADHA JABASINGH; VALLI NACHIYAR, 2010).

A seleção dentre uma vasta gama de possibilidade de combinação dos mais variados parâmetros numa abordagem OFAT para cepas recém-isoladas (em relação as quais pouco se sabe a respeito das condições ótimas fisiológicas ou mesmo necessidades para cultivo) com o objetivo de otimização de processos de fermentação, resulta em redundância e baixa eficácia tornando todo o

processo caro e trabalhoso. Portanto, o design baseado em abordagens estatísticas possibilitou um contínuo aprimoramento nas estratégias de otimização, possibilitando encontrar – até mesmo para linhagens inéditas – as melhores combinações fatoriais de cultivo e emprego nas mais variadas plataformas de fermentação (THANOON et al., 2018).

#### 1.6.1 Metodologia de superfície de resposta

A metodologia da superfície de resposta é uma aproximação da função de resposta:

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_q) + e$$

Onde “(X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, ..., X<sub>q</sub>)” são variáveis independentes, enquanto “e” é o erro e consiste em técnicas envolvidas em matemática e estatística, baseadas no ajuste de modelos empíricos aos dados obtidos em experimentos concretos. O fatorial fracionário de primeira, segunda e terceira ordem são as principais funções de aproximação do RSM, que podem ser aplicadas tanto numericamente quanto graficamente na otimização de processos. Projetos de primeira e segunda ordem são mais comumente usados na otimização de celulases produzidas por vários microrganismos. No caso de duas ou mais respostas, é importante descobrir o ajuste ideal total comprometido para a função absoluta nos dois domínios. As propriedades desejáveis dos projetos de superfície de resposta são verificação constante de variância, estimativa de transformações, ortogonalidade e rotatividade, detecção de falta de ajuste, estimativa de erro interno, adequação, construção de projetos de ordem superior e análises gráficas (AANCHAL et al., 2016).

#### 1.6.2 Planejamento Plackett-Burman

Plackett-Burman é um design de dois níveis usado para rastrear um grande número de fatores que afetam significativamente um processo. Muitas variáveis podem afetar a resposta desejável e é praticamente inviável identificar sua contribuição individual. Portanto, existe a necessidade de selecionar as variáveis significativas com profundo efeito na otimização. Ele permite dois níveis para cada uma das k variáveis de controle exigindo uma menor quantidade de

execuções experimentais. O principal efeito de cada variável pode ser estatisticamente determinado de acordo com a seguinte equação:

$$E_{xi} = (V_{max} \pm V_{min}) / N$$

Onde “E” é o efeito principal da variável “xi” enquanto “ $(V_{max} \pm V_{min})$ ” constitui o intervalo de uma dada variável de atividade em ensaios, na qual a variável independente (xi) estava presente em concentrações alta ( $V_{max}$ ) e baixa ( $V_{min}$ ) e “N” é o número médio de ensaios. Este design já vem sendo empregado com sucesso na literatura para otimização estatística das celulases de organismos como *Aspergillus niger*, bem como na otimização do processo de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* (DEKA et al., 2011).

### 1.6.3 Planejamento composto central (CCD)

O CCD (*Central Composite Design*) é um projeto de segunda ordem, adequado para experimentação paralela, que permite informações com razoável robustez estatística para testar a falta de ajuste sem envolver muitos pontos intermediários para cada variável estudada (algo que ocorre quando se emprega o design Plackett-Burman). É um projeto apropriado para ajustar uma superfície quadrática, que funciona bem para otimizar os parâmetros dos mais variados processos fornecendo informações sobre efeitos de interação direta e em pares. Após a triagem dos parâmetros significativos usando o modelo linear, a meta muda para a otimização do produto e do processo dos fatores de influência selecionados. O estudo do efeito de interação entre duas variáveis e a eficiência com número mínimo de execuções faz do CCD um modelo único e mais amplamente utilizado para otimização de vários processos. As principais variáveis de processo em suas unidades de medida que afetam a resposta são usadas para otimização adicional. No entanto, ao projetar um experimento, a codificação das variáveis é feita como “X1” e “X2”, centralizado em “0”, e se estendem a “+1” e “-1” (ou até mesmo valores diferentes de +1 ou -1, por exemplo,  $\alpha = \pm(2)^{1/2}$ ) a partir do centro da região experimental (HYMAVATHI et al., 2009).

O objetivo é começar em algum lugar usando nosso melhor conhecimento prévio ou atual e procurar o ponto ideal de resposta maximizada ou minimizada. Quatro estágios de otimização estão envolvidos principalmente no CCD: (1)

execução de experimentos estatisticamente projetados de acordo com o plano; (2) previsão precisa do modelo matemático, com base nos dados experimentais e foco nas estatísticas obtidas da análise de variância (ANOVA); (3) controle da eficiência do modelo previsto com diagnóstico parcelas; (4) estimativa da resposta seguida de validação do modelo. A equação do modelo para termos quadráticos de segunda ordem é escrita da seguinte forma:

$$y = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_i b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j b_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Onde “y” é a resposta prevista, “β<sub>0</sub>” é o coeficiente constante, “β<sub>1</sub>” é o coeficiente linear, “β<sub>12</sub>” é o coeficiente para o efeito de interação, “X<sub>1</sub>” é o valor codificado sem dimensão e “E” é o erro. Tal design já foi utilizado para otimizar os parâmetros de produção (xilose, extrato de carne bovina, concentração de NaCl, pH e faixa de temperatura) que influenciam a produção de celulases de *Bacillus sp.*, sendo também empregado na otimização das condições para a produção de endo-β<sub>1,4</sub>-glucanase por *A. nidulans* S sob fermentação em estado sólido envolvendo um CCD de quatro fatores e cinco níveis, levando à atividade máxima da enzima de 28,96 para 32,59 U/g. Alguns estudos descritos na literatura, para determinar o efeito interativo dos componentes do meio de fermentação utilizando CCD, demonstraram que o farelo de trigo, o farelo de soja, a palha da cana-de-açúcar e a dextrina de malte tiveram um impacto significativo na produção de celulases, resultando em um aumento de 70% na atividade (ANURADHA JABASINGH; VALLI NACHIYAR, 2010).

#### 1.6.4 Planejamento Box-Behnken

O design Box-Behnken (BB) é uma classe de projeto rotativo de segunda ordem baseado em uma análise fatorial em três níveis, que pode ser usado como uma alternativa ao CCD. O design BB tem vantagens em evitar pontos extremos em menor número de experimentos; no entanto, o CCD pode se encaixar melhor no modelo, fornecendo melhores informações sobre a função, pois inclui todos os pontos extremos. Portanto, é recomendável escolher um design adequado de acordo com a necessidade de otimização do processo. O CCD pode ser considerado um modelo semelhante a uma “esfera”, no qual todos os pontos são equidistantes da “superfície”, enquanto no design BB os pontos considerados



seriam aqueles tangentes à “superfície” da “esfera” quando incorporada dentro de uma “caixa” projetada, composta pelas “bordas” da “caixa” (AANCHAL et al., 2016).

Os projetos BB baseados em metodologia de superfície têm sido amplamente empregados para otimizar os parâmetros físicos, como pH e tempo de incubação, além dos componentes do meio. No design BB, há um ajuste fino entre o modelo quadrático e as estatísticas experimentais. Para entender a relação entre resposta e outros parâmetros influentes, gráficos de contorno baseados em estatísticas são gerados para avaliar as mudanças na superfície de resposta para prever a relação fator de resposta. A temperatura e o tempo de incubação, juntamente com a concentração do indutor, foram otimizados para melhorar a atividade da celulase de *Trichoderma reesei* usando o design BB (MEKALA et al., 2008).

A metodologia da superfície de resposta ajuda na identificação de relações casuais entre diferentes fatores e respostas, usando um modelo matemático que representa o sistema que se demonstra robusto e confiável. Atualmente, a aplicação do RSM na otimização da celulase tem sido amplamente preferida ao método OFAT clássico, devido à geração de um grande número de informações de cada vez a partir de um número menor de experimentos. A possibilidade de avaliar o efeito da interação entre as variáveis é outra vantagem da estratégia de otimização usando o RSM. É necessário um projeto experimental adequado para empregar a otimização experimental baseada no RSM, a fim de avaliar a qualidade do modelo ajustado e sua precisão para antecipar a relação com os dados experimentais obtidos (TARIQ et al., 2018).

O desenho experimental simétrico de segunda ordem amplamente utilizado para a produção de celulase microbiana é o CCD. No entanto, o design da Box-Behnken apresenta matrizes mais eficientes e mostrou implicações bem-sucedidas, resultando no número de trabalhos publicados nos últimos anos. A otimização dos parâmetros físicos e dos ingredientes do meio levou ao aprimoramento da produção de celulase e a estratégia pode ser implementada com sucesso em um processo de biorrefinaria. Otimização adicional dos parâmetros do processo que afetam a celulase produzida a partir de *Bacillus spp.*, *Trichoderma spp.* e *Aspergillus spp.* precisam ser estudados para produção

industrial em larga escala e estabelecimento de uma tecnologia inovadora de bioprocessos concretos e eficientes (AANCHAL et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, otimizar e padronizar os parâmetros de produção de uma  $\beta$ -1,4-endo-glucanase isolada a partir de uma linhagem marinha de *Bacillus subtilis* (Bc22Cel) e modelar, *in silico*, a sua estrutura.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar molecularmente a linhagem bacteriana marinha, com base na homologia do gene do RNA ribossomal 16S;
- Detectar a secreção extracelular da Bc22Cel em substrato sintético e em bagaço processado de cana-de-açúcar;
- Otimizar a produção de Bc22Cel utilizando a metodologia de superfície resposta;
- Realizar um estudo estrutural a partir de modelagem, *in silico*, da Bc22Cel.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Identificação molecular do isolado bacteriano.

##### 3.1.1 Extração de DNA

O DNA genômico total linhagem gram-positiva, isolada a partir de estudos anteriores (DOS SANTOS et al., 2018), foi extraído seguindo o método de CHENG e JIANG (2006) ligeiramente modificado. A extração iniciou-se com adição de 400 µL de tampão STE, pH 8,0 (Tris-HCL 1 M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M) e centrifugação das células bacterianas por 5 minutos a 10.000 g em centrífuga refrigerada da marca Eppendorf modelo 5490R, em seguida o pellet foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE, pH 8,0 e em seguida foram adicionados 200 µL de pérolas de vidro (Ø 425-600 µm) e 200 µL de fenol saturado (pH 8,0).

Os microtubos foram levados ao vórtex por 90 segundos e novamente centrifugados por 5 minutos a 10.000 g em 4 °C. Posteriormente foi removido 160 µL da fase superior do sobrenadante e adicionou-se 40 µL de TE e 100 µL de clorofórmio seguindo-se de uma nova centrifugação por 5 minutos a 10.000 g em 4 °C de onde, novamente, removeu-se 160µL do sobrenadante com a sequencial adição de 40 µL de TE e 5 µL de RNAase (10 mg/mL). Após a incubação da amostra a 37 °C por 10 minutos em banho-maria acrescentou-se 100 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) seguindo de uma homogeneização e centrifugação a 13.000 g por 5 minutos a 4 °C, o volume de 150 µL da fase superior do sobrenadante contendo DNA foi acondicionado em um microtubo e congelado a -20°C. A concentração e pureza do DNA extraído foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 UV/Vis.

3.1.2 Amplificação do gene rRNA 16S, purificação, sequenciamento dos produtos de PCR e construção de árvore filogenética da linhagem SR22.

A partir do DNA total previamente extraído, as sequências gênicas do rRNA 16 S foram amplificadas no termociclador (Primus, EUA) utilizando 2 µL do primer universal 26F (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 2 µL do 1492R (5' - ACGGCTACCTTGTTACGACTT- 3') com a concentração de 50 pmol/µL no seguinte *mix* reacional: 13 µL tampão de PCR (Ludwig Biotech); 2 µL de dNTP a 10 Mm (Ludwig Biotech); 0,5 µL de Taq Polimerase a 5 U/µL (Ludwig Biotech), 4 µL de DNA extraído com concentração aproximada de 50 ng/µl. A amplificação do gene foi realizada com temperatura de desnaturação inicial a 94 °C e nas seguintes condições: 25 ciclos com 94°C por um minuto, 57°C por dois minutos e 72°C por dois minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para verificar a presença da banda de 1500 pb correspondente ao gene de rRNA 16S, foi realizada a eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 0,8% utilizando-se GelRed™ (Biotium) para a detecção das bandas com DNA e sob uma voltagem de 100 volts. O gel foi observado e fotografado no transluminador de UV e em seguida a banda do produto da PCR foi recortada do gel e purificada utilizando o kit de purificação da AxyPrep™ DNA Gel Extraction (AxiGen Biosciences, EUA) conforme recomendações do fabricante. A concentração e pureza do DNA purificado foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 26F (5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3') e 3 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%.

Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento

foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v 1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; *BioLIMS Project* "3100\_Project1"; *Run Module 1* "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"; e *Analysis Module 1* "BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz".

As sequências de gene rRNA 16S foram comparadas com as sequências depositadas no banco de sequências do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando-se BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para o alinhamento filogenético, foi realizada uma busca no banco de dados BLASTn e bootstrapping de 1.000 réplicas para a sequência do gene 16S rRNA sequenciado, o software MEGA 6.0 foi utilizado para monitoramento de múltiplas seqüências e para a construção de um dendrograma pelo método *neighbor-joining* utilizando-se os parâmetros de busca previamente estabelecidos (ALTSCHUL et al., 1990).

### 3.2 Avaliação do Crescimento Bacteriano

O crescimento das linhagens selecionadas nos experimentos de atividade enzimática extracelular celulolítica em meio sólido bem como as linhagens escolhidas para os experimentos de cultivo em meio líquido foram acompanhadas por meio de espectrofotometria a 600 nm (utilizando-se cubetas de vidro) para a determinação da faixa ótima de pH para crescimento, as culturas foram estudadas e catalogadas de acordo com os parâmetros morfofisiológicos obtidos a partir da coloração de Gram realizada de acordo com SCHERRER, 1961. Durante os experimentos de cultivo em meio líquido a absorbância diária das culturas foi medida durante quatro dias para um acompanhamento detalhado do crescimento das linhagens estudadas.

### 3.3 Indução de celulasas em meio líquido e avaliação da atividade enzimática frente ao substrato sintético Carboximetilcelulose

A fim de obter celulasas extracelulares, culturas da linhagem SR22 foram inicialmente cultivadas em 100 mL de caldo CMC. Após a fase exponencial de

crescimento, as células bacterianas provenientes foram inoculadas (alíquota de 500 µL de suspensão na escala de 0.5 McFarland) em 500 mL de caldo CMC (descrito no item 3.5) e os frascos inoculados foram incubados a 40 °C sob agitação (150 rpm) durante um período de 1 a 4 dias e então centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C, a fim de coletar e congelar o sobrenadante da cultura a -20 °C.

A atividade celulásica foi determinada através da quantificação de açúcares redutores, resultantes da clivagem enzimática de um substrato celulósico, utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Em resumo, 500 µL de substrato (1% CMC solúvel em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0) e 500 µL da enzima bruta presente no sobrenadante do cultivo foram incubados por 60 min a 40 °C e a reação foi finalizada com a adição de 1 mL de DNS sendo, o volume reacional, fervido a 100 °C durante 5 min, posteriormente a absorbância foi medida a 520 nm em leitor de microplaca (BioTek, EUA) e comparada com uma curva padrão previamente construída com concentrações determinadas de D-Glucose nas mesmas condições experimentais descritas. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de glucose por minuto.

#### 3.4 Indução de celulasas em meio líquido e avaliação da atividade enzimática a partir de diferentes pré-tratamentos do material lignocelulolítico obtido da cana-de-açúcar

Para além do substrato sintético utilizado nos ensaios de indução e produção de celulasas extracelulares, visando a uma melhor correspondência com o processo industrial, foram realizados experimentos utilizando o material lignocelulósico *in natura* ou submetidos a diferentes processos físicos visando a redução de sua granulometria utilizando o moinho multiuso TE-631/4. Tal material foi denominado de “Bagaço Processado de Cana-de-Açúcar” (BPC) apresentando três diferentes níveis de acordo com a granulometria média do processado obtido a partir do moinho (BRÉMOND et al., 2018), a indução e detecção de celulasas foi realizada de acordo com a metodologia exposta no item 3.3.

### 3.5 Avaliação da atividade celulolítica por zimografia em placa a partir de diferentes pré-tratamentos do material lignocelulolítico obtido da cana-de-açúcar

Culturas bacterianas da linhagem SR22 foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) até OD600 = 0,6. Em seguida, 5 µL de cada suspensão bacteriana foi inoculada no centro de uma placa contendo meio CMCase contendo o seguinte (g/L): 1,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,145 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 5,0 NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; 0,05 CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O e 1 mL de solução de elemento traço (contendo o seguinte (g/L): 2,2 MnSO<sub>4</sub>; 0,5 ZnSO<sub>4</sub>; 0,5 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,016 CuSO<sub>4</sub>; 0,025 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,046 CoCl<sub>2</sub>). No meio CMCase, foi adicionado 1% (m/v) de CMC para controle bem como BPCs submetidos a diferentes pré-tratamentos e 10 g/L de agar bacteriológico. As placas foram mantidas por 1 h para permitir uma difusão completa, seguida de incubação a 37 e 55 ° C por 48 h. Posteriormente, a placa foi inundada com solução de Iodeto de Potássio (0,2 %) por 2 min. Os cultivos examinados para a hidrólise da CMC ou do BPCs através da medição de suas zonas de halo correspondentes e a capacidade hidrolítica da linhagem foi determinada pela identificação do índice celulolítico (IC) usando a seguinte expressão:

$$IC = \frac{\text{Diâmetro da zona de hidrólise}}{\text{Diâmetro da colônia bacteriana}}$$

### 3.6 Dosagem de Açúcares Redutores Totais

Os açúcares redutores totais dos experimentos de cultivo de bactérias em meio líquido foram quantificados, a cada 24 h, pelo método descrito por MILLER (1959) com o uso do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Alíquotas de 1 mL do cultivo em meio líquido foram centrifugadas a 8 000 rpm, 4 °C, por 15 minutos e 0,5 mL do sobrenadante incubado com 1,5 mL do reagente contendo DNS por 10 minutos à 100 °C, posteriormente o resultado foi observado em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000) a 520 nm e comparado com uma curva padrão previamente construída com concentrações determinadas de D-Glucose nas mesmas condições experimentais descritas. Os experimentos de espectrofotometria foram realizados em cubetas de quartzo e em triplicatas.

### 3.7 Quantificação de Proteínas Solúveis Totais

Para a quantificação de proteínas solúveis durante os experimentos de cultivo em meio líquido, a cada 24 h, utilizou-se a metodologia proposta por BRADFORD (1976). Alíquotas de 0,5 mL, obtidas a partir do sobrenadante da centrifugação a 8 000 rpm, 4 °C, por 15 minutos de 1 mL do cultivo em meio líquido, foram diluídas em 1,5 mL do Reagente de Bradford e suas absorvâncias lidas em espectrofotômetro a 595 nm e comparadas com uma curva padrão previamente construída com concentrações determinadas de Albumina Bovina Sérica (BSA). Os experimentos de foram realizados em cubetas de quartzo e em triplicatas.

### 3.8 Otimização da produção de carboximetilcelulases utilizando-se BPCs por metodologia de Superfície de Resposta

A linhagem *Bacillus subtilis* subsp. SR22 foi cultivada em meio CMCase em um dado conjunto de condições (conforme item 3.5). Os parâmetros foram variados para estudar seu efeito na produção de Endoglucanases. Duas classes de variáveis foram otimizadas por meio de desenho estatístico *Box-Behnken Design* (Tabela 3) em três fatores utilizando o software Minitab® 17 (Minitab, LLC, State College, EUA).

**Tabela 3.** Lista de variáveis estudadas para produção de celulase por *Bacillus subtilis* subsp. SR22 utilizando Box Behnken design para 3 fatores em 2 diferentes classes

Classe de Fator	Fator	Parâmetro Mínimo (-1)	Parâmetro Central (0)	Parâmetro Máximo (+1)
	pH	5,0	6,0	8,0
Químico	Concentração de NaCl	0,0 M	1,0 M	2,0 M
Físico	Temperatura	40 °C	60 °C	80 °C



### 3.9 Modelagem computacional da Bc22Cel

Com o intuito de prever a estrutura e função biológica da proteína Bc22Cel cuja produção se pretende otimizar no presente trabalho (item 3.8), previamente isolada e caracterizada físico-quimicamente (DOS SANTOS et al., 2018), com base em proteínas conhecidas depositadas (PDB 3O5S). Uma sequência de aminoácidos sem o peptídeo sinal foi submetida ao servidor I-TASSER de modelagem comparativa automatizada de proteínas (YANG et al., 2014) e um 3D modelo foi obtido. A sobreposição entre o modelo 3D da Bc22Cel e proteínas com similaridade estrutural derivadas de microrganismos filogeneticamente próximos à linhagem em estudo foi realizado com o auxílio do software VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

### 3.10 Análises Estatísticas

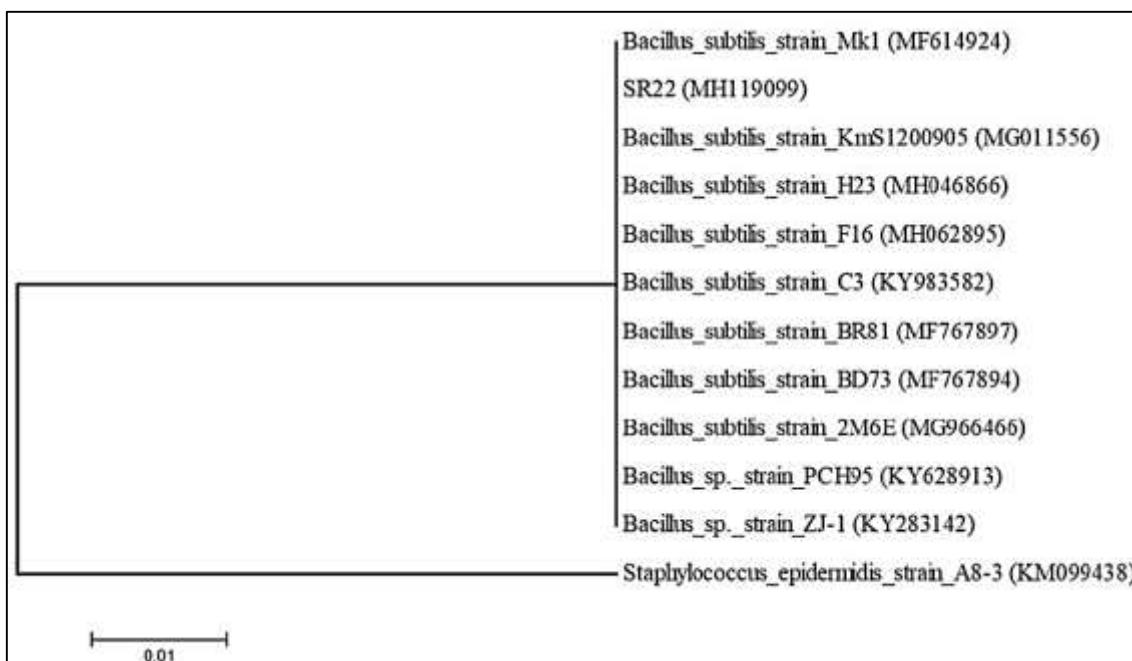
A significância estatística da diferença entre os processos otimizados e aleatórios produzidos em várias condições de tratamento foi determinada usando a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelos testes *post hoc* de diferença significativa de Tukey (HSD). As análises estatísticas foram realizadas usando o software Minitab® 17 onde as diferenças consideradas significativas se deram com valor de probabilidade menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação e Filogenia do Isolado Bacteriano

O isolado marinho SR22 mostrou-se, sob microscopia óptica, um bacilo gram-positivo formador de esporos, anaeróbio facultativo e catalase positivo, além de negativo para produção de indol bem como de H<sub>2</sub>S e utilização de citrato. As mesmas características morfológicas diagnósticas para linhagem celulolíticas de *Bacillus subtilis* descritas em trabalhos anteriores.

Além dos achados microbiológicos tradicionais que, levaram a considerar o isolado pertencente ao gênero *Bacillus*, a análise molecular corroborou a hipótese de identificação com base no princípio de máxima verossimilhança (figura 5). A baixa taxa de substituições por site de polimorfismos além da utilização de *rootgroup* filogeneticamente aproximado por se tratar de clado pertencente aos Firmicutes permite tornar ainda mais restrito os níveis de variação entre os cladros (DANTUR et al., 2015; HUANG; SHENG; ZHANG, 2012).



**Figura 5.** Árvore filogenética de SR22 isolado e outras espécies relacionadas com base em sequências de 16S rDNA, construídas usando o princípio da máxima verossimilhança. A barra de escala representa 0,01 substituições por site.

A sequência nucleotídica (figura 6) obtida foi depositada no GenBank como código de acesso MH119099 e o grau de similaridade da sequência da cepa SR22 com *Bacillus* sp. foi de 99%. A sequência obtida contabilizou 900 nucleotídeos e foi rastreada para detecção, no ato de submissão ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), quanto a presença de quimeras pelo remetente utilizando *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5* (DOS SANTOS et al., 2018).

```
>MH119099.1 Bacillus subtilis strain SR22 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
CTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTAC
CACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAYGGCTCACCAAGGCAACGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG
GGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTA
AGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACCGGAAGAAC
```

**Figura 6.** Sequência nucleotídica em formato FASTA do gene da subunidade ribossomal 16S da linhagem *Bacillus subtilis* SR22 MH119099.

#### 4.2 Detecção de endoglucanases extracelulares por meio de zimografia em meio sólido

Ao analisar a capacidade de secreção em meio sólido de enzimas hidrolíticas capazes de degradar substratos celulósicos naturais (como o BPC - bagaço-de-cana) ou sintéticos (como CMC - carboximetilcelulose), o isolado *Bacillus subtilis* SR22 demonstrou-se capaz de utilizar diferentes fontes de celulose na presença e ausência de NaCl. A análise da capacidade de degradar substratos celulósicos na presença de concentrações elevadas de sal constitui indicativo da capacidade de utilização de uma celulase em processos industriais onde – a depender do pré-tratamento adotado na malha produtiva – pode incluir a utilização de ácidos e bases com a consequente formação de sais que se acumulam durante o processo (principalmente NaCl) (AN et al., 2015).

A zimografia em fase sólida revelou a capacidade da linhagem de *B. subtilis* SR22 de crescer e secretar enzimas tanto quando submetida ao CMC

como fonte única de carbono, como quando submetida ao meio contendo exclusivamente BPCs. As condições experimentais com a adição de 0,5 M de NaCl demonstraram uma atividade enzimática bem como uma razão de hidrólise significativamente menor quando em comparação com a mesma condição na ausência de sal. Apesar da origem marinha da linhagem, a mesma demonstrou uma diminuição quanto à sua atividade de divisão celular (inferida indiretamente a partir da diminuição do diâmetro da colônia) e quanto à sua fisiologia (inferida a partir da diminuição da atividade enzimática extracelular) ao ser submetida concomitantemente ao stress salino e de substrato.

O substrato sintético demonstrou-se mais facilmente degradável quando comparado ao BPC, haja vista que o último possui uma forma menos acessível de celulose complexada com lignina (tabela 4). Mesmo na condição experimental mais estressante ao microrganismo (BPC + 0,5 M de NaCl), este ainda foi capaz de demonstrar considerável halo de degradação e elevada atividade enzimática, de maneira a ser possível a sua classificação como microrganismo potencial para os ensaios de indução de endoglucanases em fase líquida e de otimização de produção realizados no presente trabalho (HAQ et al., 2016).

**Tabela 4.** Zimografia em fase sólida da linhagem *Bacillus subtilis* SR22 em diferentes condições de substrato

Zimografia em Placa				
Linhagem	SR22 em CMC	SR22 em CMC + NaCl 0,5 M	SR22 em BPC	SR22 em BPC + NaCl 0,5 M
Diâmetro de Hidrólise A (cm)	3,45	2,80	2,90	1,70
Diâmetro da Colônia B (cm)	1,25	1,09	1,00	0,60
Razão de Hidrólise (A/B)	2,76	2,57	2,90	2,83
Atividade Enzimática (U/mL)	48,21 ± 0,02	38,12 ± 0,02	39,74 ± 0,07	34,75 ± 0,05

CMC: Carboximetilcelulose (substrato sintético); BPC: Bagaço processado de Cana-de-açúcar (substrato natural). A presença de halos amarelados de degradação evidencia a ação enzimática das celulasas bacterianas.

### 4.3 Indução de endoglucanases em meio sintético e natural obtido da cana-de-açúcar

Os ensaios de indução de endoglucanases (secreção da enzima em meio líquido) foram realizados para os três diferentes tipos de processamento (figura 6) do substrato natural (BPC *in natura*, processado e pulverizado) bem como para o substrato sintético (CMC) e avaliados quanto ao nível de atividade enzimática e de açúcares redutores liberados no meio.

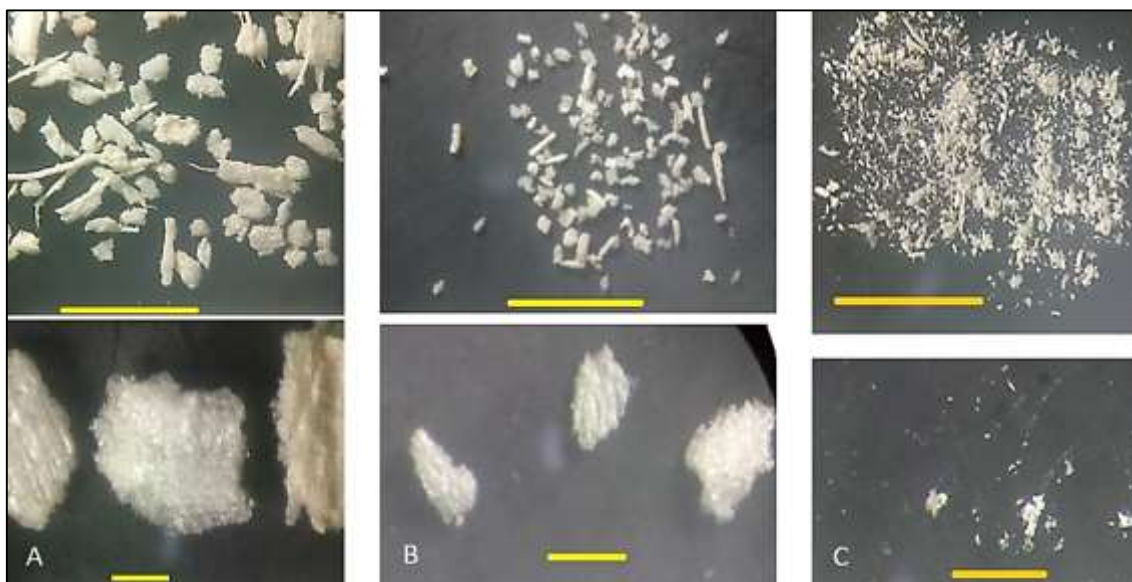
De todos os quatro tipos de meio, aquele com melhor capacidade de indução foi constituído de CMC com atividade enzimática máxima após 48 horas de cultivo de  $107,56 \pm 0,76$  (U/mL) seguido pelo BPC pulverizado ( $105 \pm 0,56$  U/mL), BPC triturado ( $98 \pm 0,17$  U/mL) e BPC *in natura* ( $80 \pm 0,06$  U/mL).

Tal padrão de indução já descrito na literatura para tipos similares de pré-tratamento é explicado pelo fato de que o microrganismo, quando em contato com substratos maiores, sofre um retardo em sua fase log de maneira que um maior tempo é necessário para atingir a densidade bacteriana necessária para uma degradação eficaz do material lignocelulósico (POTPROMMANEE et al., 2017; SURIYACHAI et al., 2013).

No caso do CMC e do BPC pulverizado, partículas de açúcares redutores são mais facilmente liberados no meio promovendo um rápido crescimento da população bacteriana capaz de mais facilmente instituir o sistema eficaz de *quórum sensing* que impulsiona a secreção em conjunto de enzimas hidrolíticas, no caso do BPC *in natura* e triturado esta liberação de carboidratos se dá de uma maneira mais retardatária por conta da recalcitrância da fibra o que atrasa os processos de divisão celular e conseqüentemente de indução de enzimas.

Apesar da atividade enzimática relativamente baixa obtida a partir do BPC triturado, esta condição foi a escolhida para os ensaios posteriores de otimização por ser o tipo de processamento que mais se assemelha com as condições industriais. O BPC pulverizado apesar do alto rendimento enzimático gerado na indução, teria o ônus de requerer um aporte muito maior de energia e de maquinário na planta industrial capaz de degradar o material lignocelulósico à uma menor granulometria (SCHWEINBERGER; TRIERWEILER; TRIERWEILER, 2019). Por tais razões, priorizando o fator custo-benefício

industrial, diferentes estratégias como aumento do período de indução (de 48 para 96 horas) bem como otimização dos parâmetros físico-químicos dos processos constituíram a estratégia adotada para um melhor aproveitamento da matéria-prima obtida.



**Figura 7.** Aspecto dos três diferentes tipos de processamento do bagaço-de-cana e suas diferentes granulometrias: Bagaço *in natura* (A), triturado (B) e pulverizado (C). A barra das imagens superiores representa 1 cm enquanto as imagens inferiores apresentam barra com escala de 1 mm.

#### 4.4 Otimização da indução de endoglucanases partir de diferentes pré-tratamentos de material lignocelulolítico.

A partir dos ensaios de indução, a condição escolhida para prosseguimento nas etapas de otimização envolveu o BPC triturado como fonte única de carbono, período de incubação de 96 horas restando o refinamento das condições de pH, Temperatura e Salinidade. Neste contexto, a linhagem bacteriana foi submetida a um desenho experimental sequencial através do qual se buscou delinear as condições estatisticamente ótimas de cultivo, posteriormente confirmadas empiricamente.

A otimização foi realizada a partir de planejamento estatístico Box-Behnken Design com randomização dos valores máximos, médios e mínimos para cada fator estudado, gerando uma matriz de randomização (tabela 5) que serviu por base da realização de experimentos com a linhagem *Bacillus subtilis* SR22 em meio contendo BPC triturado.

**Tabela 5.** Matriz de randomização dos ensaios para os parâmetros pH (A), Temperatura (B) e NaCl (C). Valor máximo (1), médio (0) e mínimo (-1) para cada parâmetro é apresentado para cada ensaio.

Ensaio	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
<b>Blocos</b>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
<b>A</b>	0	1	0	0	-1	-1	0	0	-1	0	-1	1	0	1	1
<b>B</b>	1	0	-1	1	0	0	0	0	-1	0	1	1	-1	0	-1
<b>C</b>	1	-1	-1	-1	-1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0

A resposta (atividade enzimática) foi otimizada por meio do estabelecimento de 15 experimentos, realizados em triplicata, em condições experimentais randomicamente estabelecidas, para as quais a resposta foi observada e registrada (tabela 6). Todos os ensaios randômicos apresentaram atividade enzimática, com exceção do ensaio “14” que, possivelmente, por ter sido realizado em condições extremas de pH e salinidade tornou inviável o desenvolvimento do microrganismo. A resposta foi extremamente variável a depender da condição experimental com intervalo de  $95,0 \pm 0,0038$  até  $297,1 \pm 0,0074$  demonstrando que as variáveis estudadas de fato impactam consideravelmente no rendimento do processo, justificando – assim – a necessidade de uma otimização detalhada da resposta conforme evidenciado em trabalhos anteriores (PREMALATHA et al., 2015).

Ordem (Aleatória)	Blocos		pH	Temperatura (°C)	Concentração NaCl (M)	Resposta (IU)
	Ensaio					
12	1	1	6,5	80	2	$127,2 \pm 0,0078$
6	2	1	8	60	0	$101,2 \pm 0,0014$
9	3	1	6,5	40	0	$290,1 \pm 0,0075$
10	4	1	6,5	80	0	$200,0 \pm 0,0095$
5	5	1	5	60	0	$117,0 \pm 0,0036$
7	6	1	5	60	2	$98,0 \pm 0,0140$
15	7	0	6,5	60	1	$297,1 \pm 0,0074$
14	8	0	6,5	60	1	$296,8 \pm 0,0035$
1	9	1	5	40	1	$102,3 \pm 0,0021$
13	10	0	6,5	60	1	$290,2 \pm 0,0031$
3	11	1	5	80	1	$90,0 \pm 0,1054$

4	12	1	8	80	1	78,9 ± 0,0012
11	13	1	6,5	40	1	295,3 ± 0,0007
8	14	1	8	60	2	0
2	15	1	8	40	1	95,0 ± 0,0038

**Tabela 6.** Matriz de planejamento experimental Box Behnken design para 3 fatores em 2 diferentes classes para otimização da concentração de NaCl, valor de pH e Temperatura para produção de celulases pela linhagem *Bacillus subtilis* SR22

Os dados de resposta obtidos a partir da realização de ensaios seguindo a matriz de experimentos permitiram verificar a diferença significativa na produção enzimática de estados não otimizados (tabela 4) e parcialmente otimizados (tabela 6).

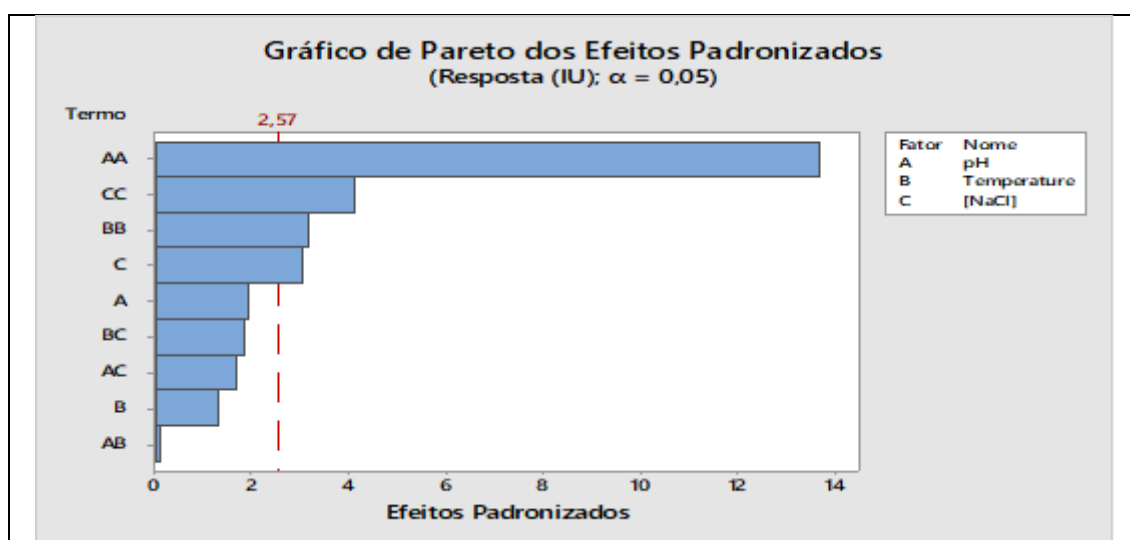
As randomizações permitiram constatar a influência diferenciada de cada fator na resposta obtida haja vista que valores de pH mais próximos ao neutro estiveram mais relacionados com valores de resposta mais elevados conforme descrito em trabalhos prévios (GUAN et al., 2017; HAO et al., 2012) enquanto que o parâmetro de salinidade elevada tendeu a diminuir os valores de resposta ou até mesmo relacionar com valor zero de atividade. De maneira intermediária, a Temperatura não demonstrou variações estatisticamente significativas dentre as condições experimentais geradas possivelmente pelo fato do microrganismo, em seu habitat natural, já se encontra habituado a flutuações de temperatura sendo, portanto, este parâmetro, pouco representativo nas alterações da fisiologia do organismo.

Este ranqueamento dentre os fatores a serem otimizados constituem etapa crítica para prosseguimento das análises pois devem levar em conta as características de cada isolado e as eventuais suscetibilidades e/ou adaptações a fatores ecológicos como temperatura ou pH, tais elementos recebem a mesma consideração por parte dos modelos estatísticos e necessitam de um refinamento, por parte do pesquisador, para ajustar os dados de natureza estritamente matemática ao critério biológico dos organismos – conforme ressaltado por trabalhos anteriores (SINGH et al., 2018; TAI et al., 2015).

Após a inserção dos dados de resposta na matriz de planejamento, foi gerado um gráfico de pareto com o objetivo de corroborar o ranqueamento de fatores evidenciado a partir dos dados obtidos na tabela 6. O gráfico de pareto



dos efeitos padronizados (figura 8) permitiu confirmar que, dentre os fatores estudados, o pH é que significativamente impacta mais diretamente no rendimento de produção enzimática seguido da concentração de NaCl e, por último, temperatura.

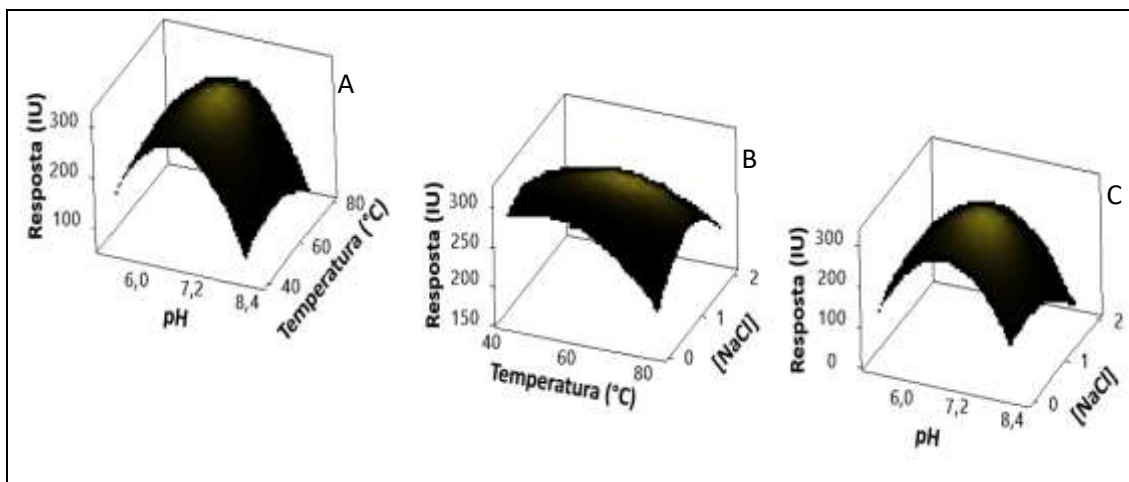


**Figura 8.** Diagrama de Pareto indicando o efeito estimado dos fatores pH (A), Temperatura (B) e concentração de NaCl (C) na produção de endoglucanases por *Bacillus subtilis* SR22.

Após a definição da relevância de cada parâmetro individualmente, observou-se a influência que estes possuiriam sobre a resposta enzimática quando aos pares (figura 9). Os gráficos de superfície resposta evidenciaram valores críticos para o par “pH x [NaCl]” graficamente representado por uma superfície mais “íngreme” neste tipo de correlação (figura 9, C), isto é, qualquer alteração em valores de pH ou de salinidade possuem um impacto muito acentuado na resposta (atividade enzimática) que se procura otimizar.

Em contraste ao par “pH x [NaCl]”, o gráfico resultante da correlação “Temperatura x [NaCl]” se caracterizou por uma superfície muito mais planificada quando em comparação com as demais representações, indicando que – para este tipo de correlação – um maior intervalo de variação é tolerado sem, contudo, alterar significativamente na resposta. Por se tratar de um isolado marinho de ocorrência na zona intertidal e, conseqüentemente, adaptado às variações

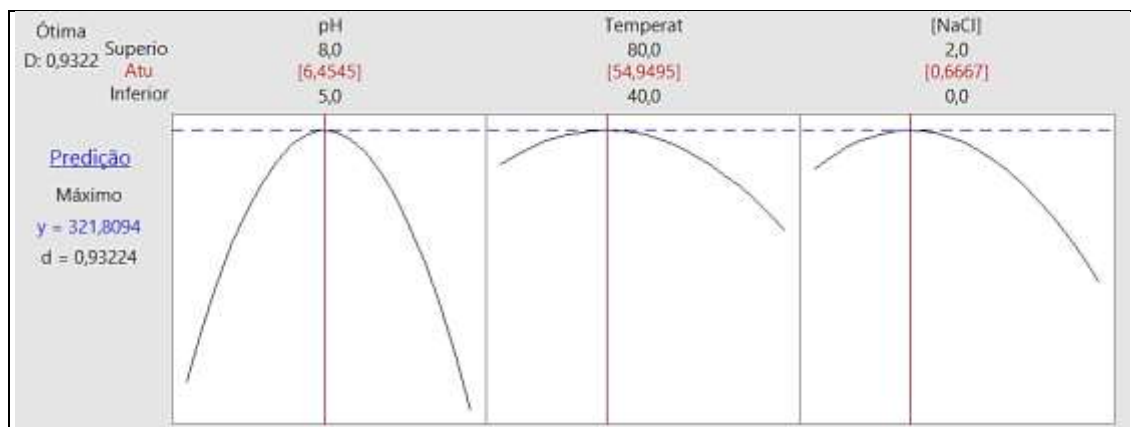
naturais de temperatura e salinidade, esperava-se que o microrganismo apresentasse, como apresentou, comportamento menos crítico ao par “Temperatura x [NaCl]” (figura 9, B) quando em comparação aos demais pares (figura 9, A e C). Tal comportamento durante a otimização de diversos tipos de hidrolases a partir de linhagens marinhas também foi observado para bactérias (DEVARAJ; RAJENDER; HALAMI, 2018; HABBECHÉ et al., 2014) isoladas de regiões intertidais.



**Figura 9.** Superfícies de resposta para a atividade de endoglucanases produzidas por *Bacillus subtilis* SR22 em função do pH e Temperatura (A), Temperatura e Concentração de NaCl (B) e pH e Concentração de NaCl (C).

Após análise conjunta do comportamento gráfico (figura 9) e resposta obtida por meio de matriz de planejamento experimental (tabela 6), buscou-se construir curvas de otimização para cada um dos parâmetros estudados: O pH (variando de 5 à 8); Temperatura (variando de 80 à 40 °C) e Salinidade (variando de 0 à 2 M de NaCl).

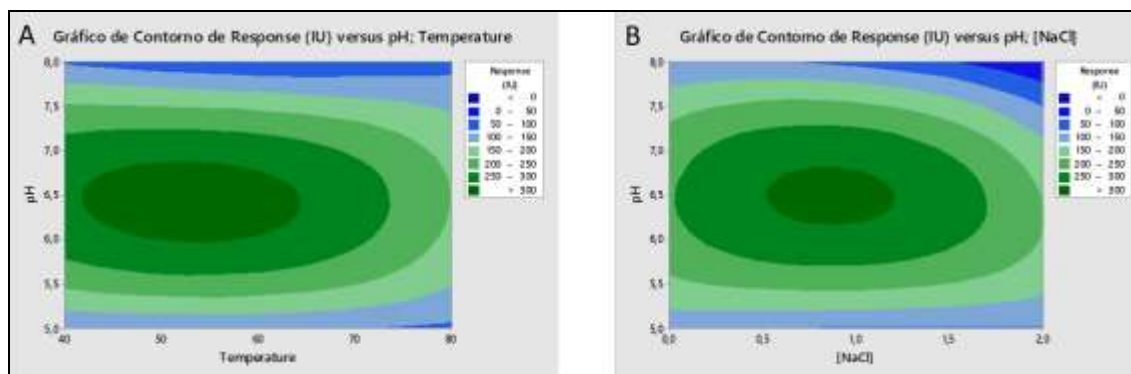
A otimização do processo delineou como rendimento máximo teórico a resposta (atividade enzimática) de  $321,809 \pm 0,932$  U/mL, significativamente maior do que o obtido experimentalmente na condição não-otimizada ( $297,1 \pm 0,0074$  U/mL). Como esperado, o pH apresentou curva mais crítica (figura 10, gráfico mais à esquerda) sendo a variável com menor tolerância à variação (figura 11) e, conseqüentemente, a que mais influencia na resposta. Os valores otimizados foram de: pH 6,45; Temperatura 54,94 °C e Salinidade 0,66 M NaCl.



**Figura 10.** Curvas de otimização na produção de endoglucanases para os parâmetros pH, Temperatura e Concentração de NaCl em relação ao isolado marinho *Bacillus subtilis* SR22. Predição máxima de resposta de  $321,809 \pm 0,932$  U/mL.

Os gráficos de contorno gerados apontaram que, para o valor médio de pH, uma região de máxima resposta (atividade enzimática acima de 300 U/mL) é possível de ser alcançada para valores próximos ou inferiores a  $60^{\circ}$  C de temperatura e de 1 M de NaCl (área verde escura da figura 11, A e B). Estudos recentes tem demonstrado que as maiorias das plantas industriais modernas na área de tratamento do material lignocelulósico tende a operar com temperaturas relativamente baixas na maioria das etapas para assim evitar o acúmulo de subprodutos voláteis derivados da lignina ou até mesmo metabólitos de origem microbiana derivados da degradação de açúcares simples bem como de ácidos e bases que tenderiam a degradar a infraestrutura fabril ou até mesmo gerar reações químicas indesejadas (PEREIRA et al., 2015).

Os ensaios com BPC triturado foram repetidos, nas condições operacionais otimizadas, e resultaram numa alta considerável de rendimento com a resposta real muito próxima ao máximo teórico ( $318,809 \pm 0,784$  U/mL). Uma variável emergente que possivelmente explique a diminuição do rendimento nas condições reais de experimento muito provavelmente tenha sido o fato de que o BPC triturado, por ter sido armazenado em câmara contendo sílica para evitar a hidratação e conseqüente contaminação por microrganismos decompositores como fungos, apresentou um grau de recalcitrância ainda maior do que aquele originalmente utilizado nos experimentos da matriz experimental.



**Figura 11.** Gráfico de contorno para a atividade de endoglucanases produzidas por *Bacillus subtilis* SR22 em função do pH e Temperatura (A) e pH e Concentração de NaCl (B).

#### 4.5 Modelagem computacional da endoglucanase Bc22Cel

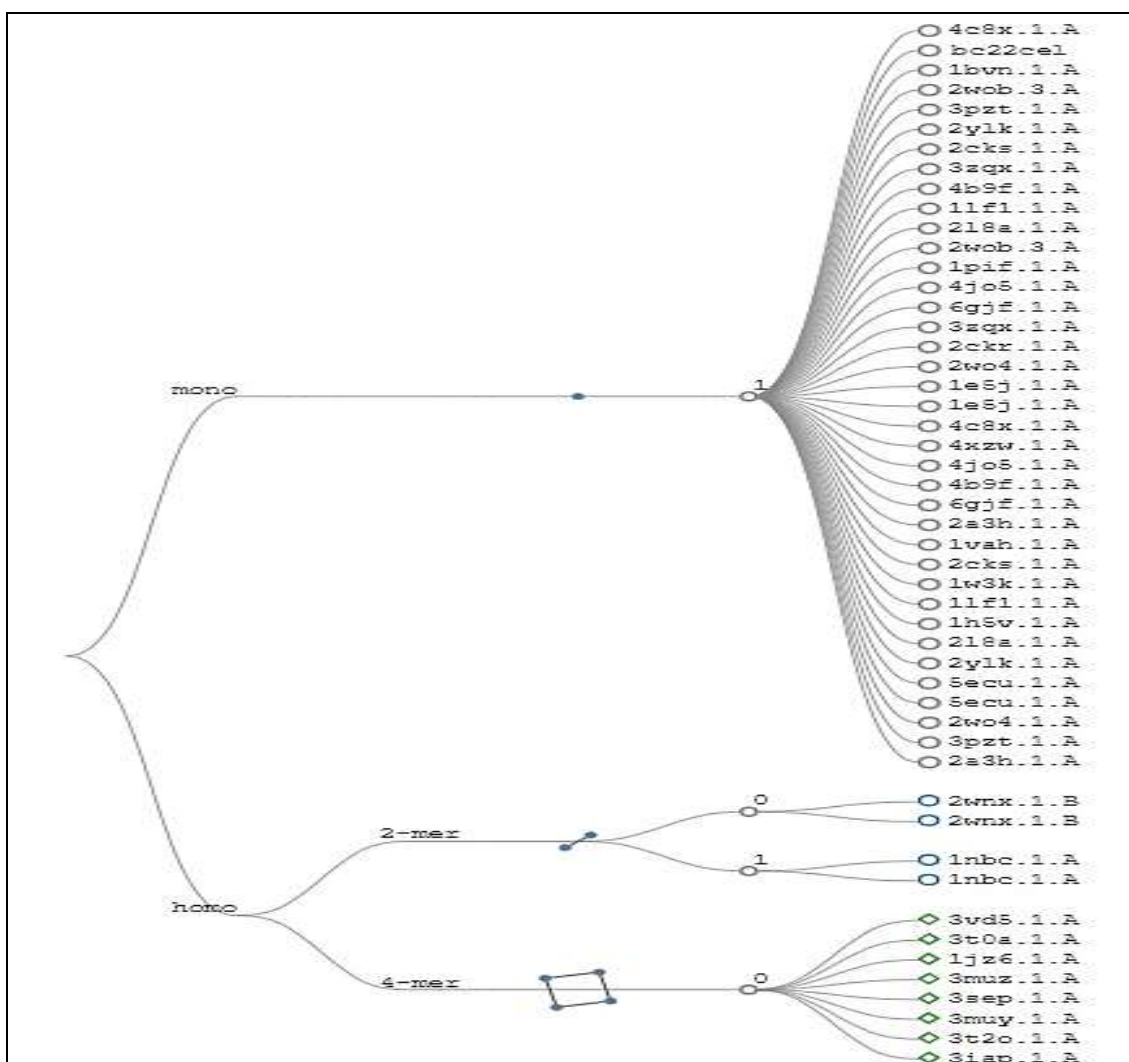
A partir de estudos anteriores, a endoglucanase majoritária pertencente ao celulosomo da linhagem *Bacillus subtilis* SR22 (Bc22Cel) foi isolada, purificada e caracterizada quanto aos seus parâmetros cinéticos. Durante o seu isolamento, a Bc22Cel demonstrou ser uma proteína monomérica com massa molecular aproximada de 37 kDa possuindo, portanto, quantidade teórica de 337 resíduos de aminoácidos em sua composição (DOS SANTOS et al., 2018).

Os dados de modelagem molecular gerados a partir da comparação com estruturas tridimensionais obtidas por cristalografia de raios X e depositadas no *Protein Data Bank* – PDB, evidenciaram que a Bc22Cel – de todas as formas tridimensionais possíveis – estava termodinamicamente aproximada às estruturas monoméricas nativas para esta classe de enzimas. Após alinhamento com sequências de endoglucanases (figura 12) previamente descritas para *B. subtilis*, com diferentes parâmetros cinéticos quando comparadas à Bc22Cel demonstrando – assim – se tratar de moléculas diversas, observou-se uma distribuição alternada de motivos estruturais contendo alfa-hélices e beta-folhas paralelas e antiparalelas de acordo com o diagrama de Ramachandran gerado (figura 14).



Tais predições a respeito da natureza monomérica da molécula suscitadas a partir dos dados comparativos realizados e de acordo com a literatura, foram ainda corroborados a partir de árvore de modelos moleculares possíveis utilizando-se dados da plataforma SWISS-MODEL e associação aos dados previamente obtidos na plataforma I-TASSER (figura 13).

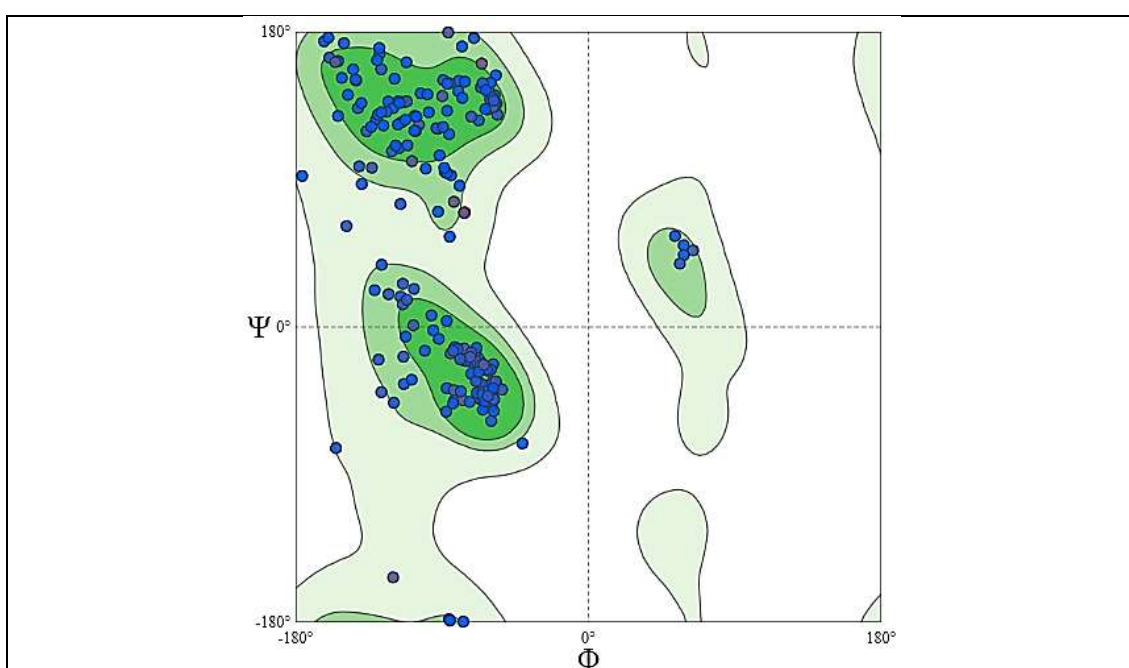
Ao levar em consideração todos os modelos tridimensionais teóricos, posicionou a estrutura prevista para a Bc22Cel no clado das enzimas monoméricas, robustecendo a hipótese de ser esta a conformação nativa da enzima.



**Figura 13.** Árvore de modelos moleculares possíveis para Bc22Cel. Modelos homotetraméricos, homodiméricos e monoméricos foram gerados a partir de dados gerados a partir dos servidores SWISS-MODEL e I-TASSER.

Todos os elementos culminaram no refino e na elaboração de um modelo tridimensional teórico proposto para a Bc22Cel elaborado a partir de refinamentos na plataforma I-TASSER após a construção da árvore de modelos com a inclusão do estudo de campos de força pelo software MODELLER®.

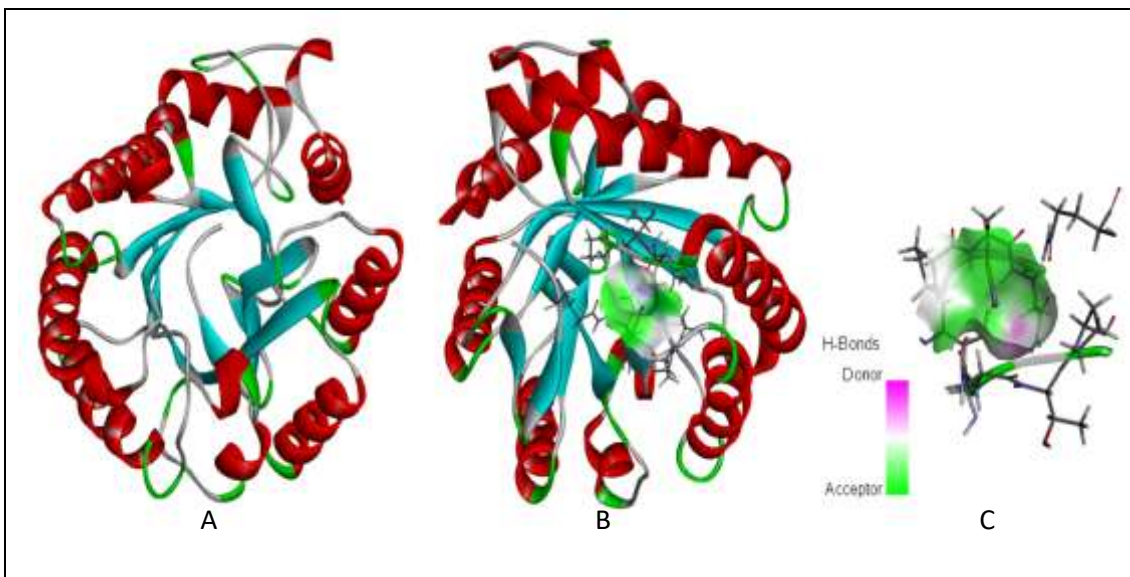
O modelo proposto (figura 15) é ilustrado com as regiões de alfa-hélice em vermelho e beta-folha em azul, estando as regiões de voltas destacadas em cinza. Pode-se observar que as regiões de voltas ainda constituem porção representativa da molécula indicando uma necessidade de aperfeiçoar ainda mais o modelo proposto.



**Figura 14.** Gráfico de Ramachandran gerado a partir do modelo tridimensional obtido para a Bc22Cel após modelagem comparativa pelo servidor I-TASSER.

A molécula de celulose, homopolissacarídeo linear constituído por resíduos de  $\beta$ -D-Glucose é propícia para a interação por meio de pontes de hidrogênio por conta da alta densidade de grupos hidroxilas presentes inter e intra-cadeia.

Assim, um dos parâmetros relevantes no estudo estrutural das endoglucanases é a avaliação de regiões propícias à formação de pontes de hidrogênio entre a enzima e o substrato. No modelo proposto, identificou-se região potencialmente relacionada a este tipo de interação, conforme destacado (figura 15, C).



**Figura 15.** Modelo tridimensional obtido para a Bc22Cel após modelagem comparativa pelo servidor I-TASSER. Aspecto geral da estrutura terciária da proteína (A), localização da região do sítio ativo da enzima (B) e detalhe dos resíduos críticos para formação de pontes de hidrogênio no interior do sítio ativo (C).



## 5 DISCUSSÃO

As demandas emergentes por energia aliada à conjuntura geopolítica de abandono de fontes danosas ao meio ambiente impulsionam, de maneira irrevogável, o estabelecimento de uma nova forma de economia energética que homenageia, concomitantemente, a eficiência bem como a sustentabilidade com o meio ambiente. É nesse contexto, que uma verdadeira revolução verde tem tomado conta do cenário mundial dos combustíveis desde o estabelecimento do protocolo de Kyoto e de maneira acentuada nos últimos anos (WBA, 2014).

Na corrida pelo combustível renovável, as nações que persistirem na opção política de “negacionismo” quanto a realidade bem como dominadas pelo senso comum que imobiliza frente ao novo e tende a sedimentar práticas ultrapassadas estarão, inexoravelmente, condenadas a assistirem – isoladas e relegadas ao obívio – o marchar constante do mundo em progresso aonde o petróleo e os seus derivados serão apenas o marco divisor do velho e do novo estilo de vida adotado em todo o globo (BUNDESREGIERUNG, 2012).

Assim, as pesquisas por fontes alternativas de energia surgem como necessidade estratégica para cada país que, ao saber explorar cada uma de suas potencialidades naturais, não poderá apenas “copiar” um modelo de uma outra nação, mas, antes, adaptar ao seu contexto produtivo local de maneira a obter o melhor rendimento e resolver problemas ambientais particulares por meio de sua própria inteligência inventiva.

No contexto brasileiro, esta realidade é ainda mais aguda: dada a gigantesca diversidade de nossas fontes de recursos naturais, um modelo holístico capaz de obter o máximo rendimento com o menor impacto ambiental não poderá ser gerado, se não a partir de nossas próprias experiências. A tecnologia do campo não mais está voltada apenas à produção de gêneros agropecuários, mas ao verdadeiro salto energético necessário: Acoplar as malhas industriais agropastoris aos processos de geração de energia e de biocombustíveis de última geração em uma verdadeira abordagem *top-down*.

No presente trabalho, a produção enzimática e o processamento de matéria-prima lignocelulósica à base de cana-de-açúcar foram otimizados de maneira a oferecer o máximo desempenho aliado ao mínimo impacto ambiental (por meio da utilização de reagentes químicos nocivos como ácidos e bases). Em uma etapa inicial buscou-se estabelecer o melhor processamento ao substrato natural de celulose mais abundante na região Nordeste do Brasil: o bagaço de cana-de-açúcar de maneira a reutilizar este que hoje é tido como rejeito agrícola e agregar valor ao seu manejo, conforme evidenciado como um dos principais objetivos ambientais e energéticos na indústria do etanol nacional (CORRÊA; BADINO; CRUZ, 2016; SHAH; RANAWAT; MISHRA, 2019).

De todos os métodos de processamento do material natural, o BPC triturado constituiu o de melhor custo-benefício e melhor reprodutibilidade no ambiente industrial. O principal objetivo ao se estabelecer estratégias de pré-tratamento ao material lignocelulósico consiste em potencializar o máximo de sua bioconversão à açúcares redutores sem onerar a malha produtiva de maneira a tornar o bioprocessamento insustentável do ponto de vista econômico, assim apesar da pulverização ter gerado índices produtos superiores, o gasto para a pulverização de largas escalas do bagaço-de-cana encareceria demais o produto gerado e não surtiria os efeitos desejados de ampliação do rendimento, tal dilema de melhor atividade enzimática em uma etapa produtiva que – ao levar em consideração o bioprocessamento como um todo – diminuiu consideravelmente a produção já se encontra descrito como uma das principais dificuldades no processo de otimização em escala industrial (JO et al., 2008; MÄKELÄ, 2017).

Dentre todas as metodologias de otimização atualmente disponíveis e citadas na literatura, os gráficos de superfície resposta despontam como os mais indicados para avaliar este tipo de problemática por fornecerem subsídios estatísticos robustos além de lidarem com uma ampla taxa de fatores a serem ajustados ao mesmo tempo e cujo os efeitos na resposta pode ser avaliada tanto de maneira individualizada como geral (IRFAN et al., 2017; PREMALATHA et al., 2015). Quando comparada aos dados prévios da literatura (tabela 7), a estratégia de otimização empregada no presente trabalho teve como percentual de otimização na produção de celulasas frente ao BPC na ordem de 7,30% – valor

consideravelmente superior ao obtido a partir de diferentes abordagens de otimização envolvendo linhagens de microrganismos do mesmo gênero do presente trabalho.

**Tabela 7.** Métodos estatísticos para otimização da produção de celulases microbianas

<b>Microrganismo</b>	<b>Software Utilizado</b>	<b>Método</b>	<b>Número de Fatores</b>	<b>Número de Ensaios</b>	<b>Atividade Máxima</b>	<b>Otimização (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus subtilis</i> SR22	Minitab	BBD	3	45	318,80 U/mL	7,30	Presente Trabalho
<i>B. subtilis</i> NA15	Design-Expert	PBD, CCD	11, 4	12	0,47 U/mL	7,00	(AKHTAR et al., 2015)
<i>B. subtilis</i> AS3	Minitab	PBD, CCD	7, 3	20, 20	0,43 U/mL	6,00	(DEKA et al., 2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i> UNPDV-22	Design-Expert	CCD	3	20	N.I.	1,70	(ZAMBARE; CHRISTOPHER, 2011)
<i>B. pumilus</i> EWBCM1	Design-Expert	CCD	3	20	0,57 IU/mL	N.R.	(SHANKAR; ISAIARASU, 2012)
<i>Bacillus</i> sp. JS14	Design-Expert	CCD	4	30	N.I.	20,00	(SINGH; SHARMA, 2012)
<i>Bacillus</i> sp. BVITRKH	Design-Expert	CCD	5	31	N.I.	N.R.	(SINGH et al., 2014)
<i>Bacillus</i> sp. JS14	Design-Expert	CCD	4	30	20,40 IU/L	N.R.	(SINGH; KAUR, 2012)
<i>Cellulomonas fimi</i> NCIM-5015	Minitab	PBD, CCD	12, 4	20, 30	0,58 IU/mL	N.R.	(ALI; MUTHUVELAY UDHAM; VIRUTHAGIRI, 2013)
<i>Trametes hirsuta</i>	Design-Expert	CCD	4	30	N.I.	N.R.	(JEYA et al., 2009)
<i>Aspergillus niger</i> HN-1	Design-Expert	PBD	11, 4	12, 30	N.I.	2,00	(SANDHU et al., 2013)
<i>Aspergillus nidulans</i> SU04	Design-Expert	CCD	4	30	28,94 U/g	N.R.	(JABASINGH, 2011)
<i>Aspergillus nidulans</i> MTCC344	Design-Expert	CCD	4	30	32,57 U/g	N.R.	(JABASINGH, 2011)
<i>Trichoderma reesei</i> NCIM 1186	Design-Expert	BBD	5	46	N.I.	1,24	(SARAVANAN et al., 2012)
<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>	Design-Expert	CCD	3	20	N.I.	N.R.	(BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010)

<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Design-Expert	BBD	3	17	0,71 U/mL	5,00	(MEKALA et al., 2008)
<i>Aspergillus oryzae</i>	N.I.	OFAT, BBD	4	27	0,92 FPU/g	N.R.	(HOA; HUNG, 2013)
<i>Myceliophthora</i> sp. IMI 387099	Minitab	BBD	3	17	8,66 U/g	4,23	(BADHAN et al., 2007)
<i>Aspergillus fumigatus</i> AMA	Minitab	BBD	3	17	9,73 U/g	2,88	(SONI; NAZIR; CHADHA, 2010)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Design-Expert	PBD, CCD	7, 4	8, 30	39,56 U/mL	8,05	(ANURADHA JABASINGH; VALLI NACHIYAR, 2010)
<i>Trichoderma reesei</i> HY07	Design-Expert	BBD	3	15	406,42 U/g	1,45	(SHU et al., 2013)

PBD: *Plackett-Burman design*; BBD: *Box-Behnken design*; CCD: *Central composite design*; OFAT: *One factor at a time design*; N.I.: Não Informado; N.R.: Não Realizado (i.e., otimização ineficaz), obtido a partir de AANCHAL et al., 2016, com modificações.

Os microrganismos estão sujeitos a uma ampla variedade de fatores físicos, químicos e biológicos. Dentre os quais, destacam-se – para fins de metabolismo – as relações ecológicas, o pH, temperatura e estresse osmótico do meio (BHATIA; JOHRI; AHMAD, 2012). Para fins de aplicação em meio industrial, dado o controle biológico dos espaços, pode-se relevar as variáveis ecológicas e considerar os demais supracitados parâmetros como os essenciais na resposta biológica envolvida.

De todos os fatores estudados o pH demonstrou-se como o mais importante para o processo de otimização. A fisiologia de um microrganismo marinho já se encontra relativamente adaptado às flutuações de temperatura e salinidade, principalmente para aqueles que – assim como o microrganismo isolado e estudado no presente trabalho – possuem ocorrência natural na zona intertidal aonde, por conta dos efeitos das marés, o sal acaba por se acumular por conta da evaporação e a temperatura tende a subir (DOS SANTOS et al., 2018; VERAS et al., 2018).

Contudo, o pH da água do mar tende a uma maior constância por conta dos sistemas naturais de tamponamento que possui, razão pela qual o microrganismo muito provavelmente foi mais susceptível a esta variável e

resiliente às demais. Nos atuais modelos industriais o pH adotado no processo é próximo ao neutro por conta de etapas sequenciais de aplicação de ácidos e bases ao substrato lignocelulósico, de modo que o bioprocesso otimizado no presente trabalho ao tempo em que se mostra eficaz em aumentar o rendimento sem a necessidade do tratamento químico também evidencia como pH ótimo de atuação valores aproximados aos que já se utiliza na indústria não requerendo assim maiores mudanças para adequação dos processos tradicionais ao bioprocessamento enzimático de conversão da celulose em açúcares redutores (XU et al., 2018).

Conforme evidenciado desde o processo de isolamento e purificação, a Bc22Cel – endoglucanase constitutiva do celulosoma do isolado bacteriano estudado no presente trabalho – consiste em uma enzima monomérica como a grande maioria das endoglucanases bacterianas (algumas mais representativas descritas na tabela 1). Pelo fato da Bc22Cel se enquadrar no padrão mais geral das hidrolases bacterianas, a modelagem computacional bem como as estratégias para sua produção de maneira heteróloga é facilitada pelo alto grau de conservação e homologia com estruturas tridimensionais já bem estudadas e descritas na literatura e depositadas no PDB (IGARASHI et al., 2008; SAKAMOTO; TOYOHARA, 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho foi capaz de otimizar e atingir um rendimento considerável de indução e produção das enzimas celulolíticas de interesse. Contudo, se faz necessário – ainda – pormenorizar o mecanismo através do qual as enzimas de interesse são secretadas (canais, sistemas de efluxo envolvidos) bem como ampliar os estudos estruturais via *docking* de maneira a corroborar os dados cinéticos obtidos e, assim, tornar a estimativa realizada em laboratório ainda mais factível em escala industrial a partir de experimentos piloto e malhas industriais desenvolvidas para esta tecnologia haja vista a potencial aplicação, deste bioprocessamento otimizado, nos processos industriais para geração de bioetanol.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- O método de produção de enzimas celulolíticas a partir da linhagem *Bacillus subtilis* SR22 foi efetivamente otimizado com rendimento máximo teórico de  $321,809 \pm 0,932$  U/mL e prático de  $318,809 \pm 0,784$  U/mL;
- O bagaço processado de cana-de-açúcar, após trituração, foi eficaz para a produção de enzimas celulolíticas, de modo a se tornar um substrato efetivo e de baixo custo capaz de um alto rendimento de indução enzimática;
- Após a otimização dos parâmetros de indução, os valores de máximo rendimento foram de pH 6,45; Temperatura 54,94 °C e Salinidade 0,66 M NaCl;
- A modelagem computacional para a Bc22Cel, endoglucanase majoritária no celulosomo da *B. subtilis* SR22, indicou se tratar de uma enzima monomérica;
- Com base nos valores obtidos após o processo de otimização e de acordo com os parâmetros estruturais observados após a indução das celulasas provenientes da linhagem marinha *B. subtilis* SR22, este bioprocesso de conversão de material lignocelulósico em açúcares redutores fermentescíveis destaca-se pelo considerável custo-benefício e potencial aplicação nos processos industriais para geração de bioetanol, restando, contudo, necessário um aprimoramento das condições experimentais em uma planta industrial de pequena escala de maneira a avaliar eventuais variáveis emergentes ou ainda o design de variáveis enzimáticas heterólogas de maneira a otimizar, ainda mais, a eficiência do processo.

## 7 REFERÊNCIAS

AANCHAL et al. Response surface methodology for optimization of microbial cellulase production. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 21, n. 5, p. 11832–11841, 2016.

AGGARWAL, R.; DUTTA, T.; SHEIKH, J. Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 14, p. 100178, dez. 2019.

AINSWORTH, T. D.; GATES, R. D. Ocean Biology: Coral's microbial sentinels. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6293, p. 1518–9, 24 jun. 2016.

AKHTAR, N. et al. Simplification and optimization of media ingredients for enhanced production of CMCCase by newly isolated *Bacillus subtilis* NA15. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 34, n. 2, p. 533–541, 1 mar. 2015.

ALI, B. et al. Characterization of a fungal thermostable endoglucanase from Chinese Nong-flavor daqu by metatranscriptomic method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 183–190, 2019.

ALI, S. B. R.; MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Enhanced Production of Cellulase from Tapioca Stem Using Response Surface Methodology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 12, p. 40–51, 2013.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 5 out. 1990.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

AN, T. et al. Purification and characterization of a salt-tolerant cellulase from the mangrove oyster, *Crassostrea rivularis*. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 47, n. 4, p. 299–305, 2015.

ANOOP KUMAR, V. et al. Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage

Industries. In: **Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing**. [s.l.] Springer, Singapore, 2019. p. 323–343.

ANURADHA JABASINGH, S.; VALLI NACHIYAR, C. A new combinational statistical approach for cellulase optimization in *Aspergillus nidulans*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 8, p. 871–878, 2010.

ASHA, B. M.; PATHMA, J.; SAKTHIVEL, N. Isolation and characterization of a novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus subtilis* SU40. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 21–26, 2015.

BADHAN, A. K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504–510, 1 fev. 2007.

BALLESTEROS, I. et al. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28–29, n. 1, p. 307–315, mar. 1991.

BAYER, E. A. et al. From cellulosomes to celulosomics. **The Chemical Record**, v. 8, n. 6, p. 364–377, 2008.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Recombinant fibrolytic feed enzymes and ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment of crop residues to improve fibre degradability in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 256, p. 114260, set. 2019.

BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, jun. 2017.

BENAZZI, T. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4–5, p. 247–250, 10 abr. 2013.

BERLIN, A. et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287–296, 1 jun. 2007.

BHASKAR, T. et al. Thermochemical conversion of biomass to biofuels. In: **Biofuels**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. p. 51–77.



BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 65, 2012.

BINOD, P. et al. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 317–325, 1 fev. 2019.

BISWAS, P. et al. Wheat Bran as Substrate for Enzyme Production and its Application in the Bio-deinking of Mixed Office Waste (MOW) Paper. **BioResources**, v. 14, p. 5788–5806, 2019.

BJELIĆ, A.; GRILC, M.; LIKOZAR, B. Catalytic hydrogenation and hydrodeoxygenation of lignin-derived model compound eugenol over Ru/C: Intrinsic microkinetics and transport phenomena. **Chemical Engineering Journal**, v. 333, p. 240–259, 1 fev. 2018.

BRÉMOND, U. et al. Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, n. June 2017, p. 583–604, 2018.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4862–4874, jul. 2010.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120–128, 1 jan. 2010.

BUBNER, P.; PLANK, H.; NIDETZKY, B. Visualizing cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 1529–1549, 2013.

BUNDESREGIERUNG. Biorefineries Roadmap as a part of the German Federal Government action plans for the material and energetic utilisation of renewable raw materials. p. 108, 2012.

BURMAN, N. W.; SHERIDAN, C. M.; HARDING, K. G. Lignocellulosic bioethanol production from grasses pre-treated with acid mine drainage: Modeling and

comparison of SHF and SSF. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100299, set. 2019.

CAI, S.; ZHENG, X.; DONG, X. CBM3d, a novel subfamily of family 3 carbohydrate-binding modules identified in Cel48A exoglucanase of *Cellulosilyticum ruminicola*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 19, p. 5199–206, out. 2011.

CHANG, J. J. et al. Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 4 fev. 2013.

CHENG, H.-R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 1, p. 55–9, jan. 2006.

CHERUBINI, F.; STRØMMAN, A. H. Principles of biorefining. In: **Biofuels**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. p. 3–24.

CHU, B. C. H.; LEE, H. **Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation** **Biotechnology Advances**, set. 2007.

CHUAN WEI, K. S. et al. Cloning, expression and characterization of the endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* UMC7 isolated from the gut of the indigenous termite *Macrotermes malaccensis* in *Escherichia coli*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 103–109, mar. 2015.

CORRÊA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Power consumption evaluation of different fed-batch strategies for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 39, n. 5, p. 825–33, maio 2016.

CURRY, C. et al. Expression and Secretion of a *Cellulomonas fimi* Exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 2, p. 476–84, fev. 1988.

DA SILVA, A. R. G.; ERRICO, M.; RONG, B. G. Evaluation of organosolv pretreatment for bioethanol production from lignocellulosic biomass: solvent recycle and process integration. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 2, p. 397–411, 2018.

DANTUR, K. I. et al. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea*

saccharalis larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 15, 2015.

DARVISHI, F.; MOGHADDAMI, N. A. Optimization of an industrial medium from molasses for bioethanol production using the Taguchi statistical experimental-design method. **Fermentation**, v. 5, n. 1, 2019.

DASGUPTA, D. et al. Design and optimization of ethanol production from bagasse pith hydrolysate by a thermotolerant yeast *Kluyveromyces* sp. IIPE453 using response surface methodology. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, 2013.

DE ARAÚJO, E. A.; DE OLIVEIRA NETO, M.; POLIKARPOV, I. Biochemical characterization and low-resolution SAXS structure of two-domain endoglucanase BICel9 from *Bacillus licheniformis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1275–1287, 2019.

DE BARROS, R. DA R. O. et al. Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic saccharification of sugarcane bagasse and straw. **Bioresource technology**, v. 136, p. 288–94, maio 2013.

DEBNATH, S. et al. A Review on Natural Binders used in Pharmacy. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 55, 2019.

DEKA, D. et al. Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

DEMIREL, M.; KAYAN, B. Application of response surface methodology and central composite design for the optimization of textile dye degradation by wet air oxidation. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2012.

DETNS, R. C. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

DEVARAJ, Y.; RAJENDER, S. K.; HALAMI, P. M. Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Bacillus amyloliquefaciens* MCC2606 and analysis of fibrin degradation product by MS/MS. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 172–180, 2018.

DHAR, H. et al. Cloning and expression of low temperature active endoglucanase EG5C from *Paenibacillus* sp. IHB B 3084. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 259–266, 2015.

DOS SANTOS, Y. Q. et al. A new salt-tolerant thermostable cellulase from a marine bacillus sp. Strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 1078–1085, 2018.

DU, C. et al. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2845–2855, 15 mar. 2019.

DU, J. et al. Identification and characterization of a ginsenoside-transforming  $\beta$ -glucosidase from *Pseudonocardia* sp. Gsoil 1536 and its application for enhanced production of minor ginsenoside Rg2(S). **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e96914, 2014.

DUTOIT, R. et al. Crystal structure determination of *pseudomonas stutzeri* A1501 endoglucanase Cel5A: The search for a molecular basis for glycosynthesis in GH5\_5 enzymes. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 75, p. 605–615, 2019.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; VERA-PONCE DE LEÓN, A.; SANCHEZ-FLORES, A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 348, 2015.

FAO; OECD. **OECD-FAO Agricultural**. 2015.

FESTEL, G. W. et al. Modelling Production Cost Scenarios for Biofuels and Fossil Fuels in Europe. **SSRN Electronic Journal**, 2013.

FURTADO, G. P. et al. Biochemical and structural characterization of a  $\beta$ -1,3–1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1202–1206, maio 2011.

GAO, M. et al. Effect of SC-CO<sub>2</sub> pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. **Biosystems Engineering**, v. 106, n. 4, p. 470–475, ago. 2010.

GARCIA-GALINDO, I. et al. New Features and Properties of Microbial Cellulases

Required for Bioconversion of Agro-industrial Wastes. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 535–550, 1 jan. 2019.

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

GENC, B. et al. Purification and characterization of an extracellular cellulase from *Anoxybacillus gonensis* O9 isolated from geothermal area in Turkey. **Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India**, v. 36, n. 6, p. 1319–24, nov. 2015.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 141–146, 2006.

GUAN, X. et al. Expression, purification and molecular characterization of a novel endoglucanase protein from *Bacillus subtilis* SB13. **Protein Expression and Purification**, v. 134, p. 125–131, 2017.

HABBECHÉ, A. et al. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 4, p. 413–421, 2014.

HAO, Z. et al. Optimization of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated Chitinolytic bacterium *meiyuanensis* SYBC-H1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 177–186, jan. 2012.

HAQ, F. et al. **Recent progress in bioethanol production from lignocellulosic materials: A review** *International Journal of Green Energy* Taylor and Francis Inc., , 13 nov. 2016.

HAQ, I. UL et al. CenC, a multidomain thermostable GH9 processive endoglucanase from *Clostridium thermocellum*: cloning, characterization and saccharification studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1699–1710, 7 nov. 2015.

HEMANSI et al. Second Generation Bioethanol Production: The State of Art. In: [s.l: s.n.]. p. 121–146.

HOA, B. T.; HUNG, P. V. Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 6, p. 3269–3274, 2013.

HUANG, K. et al. Improving economics of lignocellulosic biofuels: An integrated strategy for coproducing 1,5-pentanediol and ethanol. **Applied Energy**, v. 213, n. October, p. 585–594, 2018.

HUANG, S.; SHENG, P.; ZHANG, H. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 2563–2577, 2012.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996.

HYMAVATHI, M. et al. Enhancement of L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) Using Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 191–198, 2009.

IGARASHI, K. et al. Characterization of an Endoglucanase Belonging to a New Subfamily of Glycoside Hydrolase Family 45 of the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, p. 5628–5634, 15 set. 2008.

IRFAN, M. et al. Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for saccharification using response surface methodology. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 29, 2017.

ISHOLA, M. M. et al. Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF): A novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 68–73, 2013.

ISHOLA, M. M.; BRANDBERG, T.; TAHERZADEH, M. J. Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. **Biomass and Bioenergy**, v. 77, p. 192–199, 1 jun. 2015.

JABASINGH, S. A. **Response Surface Methodology for the Evaluation and**

**Comparison of Cellulase Production by *Aspergillus nidulans* SU04 and *Aspergillus nidulans* MTCC344 Cultivated on Pretreated Sugarcane Bagasse.** Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/286394316\\_Response\\_Surface\\_Methodology\\_for\\_the\\_Evaluation\\_and\\_Comparison\\_of\\_Cellulase\\_Production\\_by\\_Aspergillus\\_nidulans\\_SU04\\_and\\_Aspergillus\\_nidulans\\_MTCC344\\_Cultivated\\_on\\_Pretreated\\_Sugarcane\\_Bagasse](https://www.researchgate.net/publication/286394316_Response_Surface_Methodology_for_the_Evaluation_and_Comparison_of_Cellulase_Production_by_Aspergillus_nidulans_SU04_and_Aspergillus_nidulans_MTCC344_Cultivated_on_Pretreated_Sugarcane_Bagasse)>. Acesso em: 1 mar. 2020.

JAYASEKARA, S.; RATNAYAKE, R. Cellulose. **Intechopen**, 2 abr. 2019.

JEYA, M. et al. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5155–5161, nov. 2009.

JIA, L. et al. Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 158–164, 2015.

JIN, M. et al. Consolidated bioprocessing (CBP) performance of *Clostridium phytofermentans* on AFEX-treated corn stover for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1290–1297, jun. 2011.

JO, K. I. et al. Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 2, p. 182–188, 2008.

JOBLING, S. **Improving starch for food and industrial applications** *Current Opinion in Plant Biology*, abr. 2004.

KANG, Q. et al. **Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities** *Scientific World Journal* Hindawi Limited, , 31 dez. 2014.

KHUONG, L. S. et al. Effect of gasoline-bioethanol blends on the properties and lubrication characteristics of commercial engine oil. **RSC Advances**, v. 7, n. 25, p. 15005–15019, 2017.

KIM, S. C. et al. Cloning and Characterization of an Endoglucanase Gene from *Actinomyces* sp. Korean Native Goat 40. **Asian-Australasian journal of animal**

**sciences**, v. 29, n. 1, p. 126–33, jan. 2016.

KOZAKI, R.; MIYAKE, H. Enzymatic and molecular characterization of an endoglucanase E from *Clostridium cellulovorans* 743B. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xxx, n. xxx, 2019.

KREDIET, C. J. et al. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 280, n. 1755, p. 20122328, 22 mar. 2013.

KUMAR, M. et al. Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 3, p. 606–616, jun. 2012a.

KUMAR, S. et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of CbsA, a secretory exoglucanase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications**, v. 68, n. Pt 10, p. 1191–4, 1 out. 2012b.

LAU, M. J. et al. Ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment, enzymatic hydrolysis, and fermentation on empty palm fruit bunch fiber (EPFBF) for cellulosic ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 1847–57, nov. 2010.

LEE, Y. J. et al. Statistical optimization for production of carboxymethylcellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 by a recombinant *Escherichia coli* JM109/DL-3 from rice bran using response surface method. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 2, p. 227–235, abr. 2012.

LI, K.; LIU, S.; LIU, X. **An overview of algae bioethanol production** *International Journal of Energy Research* John Wiley and Sons Ltd, , 25 jun. 2014.

LING, C. Whey to ethanol: A biofuel role for dairy cooperatives? **Ethanol Biofuel Production**, p. 149–176, 2010.

LINS-DE-BARROS, M. M. et al. Microbial community compositional shifts in bleached colonies of the Brazilian reef-building coral *Siderastrea stellata*. **Microbial ecology**, v. 65, n. 1, p. 205–13, jan. 2013.



LIU, Z. H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, 2014.

LONG, L. et al. Cloning, Purification, and Characterization of a Thermostable  $\beta$ -Glucosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 3165–3177, 2016.

LOPES, P. et al. *Bacillus Licheniformis* CotA Laccase Mutant: Electrocatalytic Reduction of O<sub>2</sub> from 0.6 V (SHE) at pH 8 and in Seawater. **ChemElectroChem**, v. 6, n. 7, p. 2043–2049, 1 abr. 2019.

MACKENZIE, C. R.; BILOUS, D.; JOHNSON, K. G. Purification and characterization of an exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 1171–1178, set. 1984.

MADHU, S.; RAMTEKE, P. W. Cellulose as Potential Feedstock for Cellulase Enzyme Production: Versatility and Properties of Various Cellulosic Biomass – Part II. In: **Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases**. [s.l.] Springer, Cham, 2019. p. 117–125.

MÄKELÄ, M. **Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review** **Energy Conversion and Management** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017.

MANZANARES; ISIS, AMORES; IGNACIO, B. P.; BALLESTEROS, GEORGINA, M. M. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion. **Electronic Journal of Energy & Environment**, v. 1, n. 1, 2013.

MASLOVA, O. et al. Production of various organic acids from different renewable sources by immobilized cells in the regimes of separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SFF). **Bioresource Technology**, v. 272, p. 1–9, 1 jan. 2019.

MEKALA, N. K. et al. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical optimization of process parameters. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 122–31, dez. 2008.

MICHLMAYR, H. et al. Isolation and basic characterization of a beta-glucosidase

from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 2, p. 550–9, fev. 2010.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MITHRA, M. G.; SAJEEV, M. S.; PADMAJA, G. Comparison of SHF and SSF Processes under Fed Batch Mode on Ethanol Production from Pretreated Vegetable Processing Residues. **European Journal of Sustainable Development Research**, v. 2019, n. 2, p. 84, 2019.

MOHAMMADI, M.; NAJAVAND, S.; PAZHANG, M. Immobilization of endoglucanase Cel9A on chitosan nanoparticles leads to its stabilization against organic solvents: the use of polyols to improve the stability. **3 Biotech**, v. 9, n. 7, p. 1–10, 2019.

MORENO, A. D. et al. Pretreatment Technologies for Lignocellulosic Biomass Deconstruction Within a Biorefinery Perspective. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 379–399.

MUSSATTO, S. I. et al. **Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production** **Biotechnology Advances**, nov. 2010.

NAKAMURA, A. et al. Phase-diagram-guided method for growth of a large crystal of glycoside hydrolase family 45 inverting cellulase suitable for neutron structural analysis. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 20, n. 6, p. 859–863, 1 nov. 2013.

NAKATANI, Y.; LAMONT, I. L.; CUTFIELD, J. F. Discovery and characterization of a distinctive exo-1,3/1,4- $\beta$ -glucanase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain BB1. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 20, p. 6760–8, out. 2010.

OLIVIER-BOURBIGOU, H.; MAGNA, L.; MORVAN, D. **Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications** **Applied Catalysis A: General**, 31 jan. 2010.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates

for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312–331, 1996.

ONTAÑÓN, O. M. et al. A thermostable GH8 endoglucanase of *Enterobacter* sp. R1 is suitable for  $\beta$ -glucan deconstruction. **Food Chemistry**, v. 298, n. March, p. 124999, 2019.

PAPANEEK, B. et al. Elimination of metabolic pathways to all traditional fermentation products increases ethanol yields in *Clostridium thermocellum*. **Metabolic Engineering**, v. 32, p. 49–54, 1 nov. 2015.

PAVLEČIĆ, M. et al. Ethanol production from different intermediates of sugar beet processing. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 362–367, 2010.

PAVLEČIĆ, M. et al. Bioethanol production from raw sugar beet cosettes in horizontal rotating tubular bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1679–1688, 2017.

PEREIRA, S. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnol. Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 44, 2015.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51–52, n. 1, p. 117–124, set. 1995.

PORZIO, G. F. et al. Modelling lignocellulosic bioethanol from poplar: Estimation of the level of process integration, yield and potential for co-products. **Journal of Cleaner Production**, v. 34, p. 66–75, 2012.

POTPROMMANEE, L. et al. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. **PLoS ONE**, p. 1–16, 2017.

PREMALATHA, N. et al. Optimization of cellulase production by *Enhydrobacter* sp. ACCA2 and its application in biomass saccharification. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. October, p. 1–11, 2015.

PUHL, A. C. et al. Crystallographic structure and molecular dynamics simulations

of the major endoglucanase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* shed light on its oligosaccharide products release pattern. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 493–502, 2019.

QUINN, L. et al. *Zymobacter palmae*; pyruvate decarboxylase is less efficient than that of *Zymomonas mobilis* for ethanol production in metabolically engineered *Synechocystis* sp PCC6803. **bioRxiv**, p. 701193, 2019.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual review of microbiology**, v. 57, p. 369–94, 2003.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Fungal Laccase: A Versatile Enzyme for Biotechnological Applications. In: [s.l: s.n.]. p. 429–457.

ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 355–362, 26 maio 2007.

SAINI, A. et al. Prospects for Irradiation in Cellulosic Ethanol Production. **Biotechnology research international**, v. 2015, p. 157139, 2015.

SAKAMOTO, K.; TOYOHARA, H. Molecular cloning of glycoside hydrolase family 45 cellulase genes from brackish water clam *Corbicula japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 152, n. 4, p. 390–396, abr. 2009.

SAKAMOTO, T. et al. Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 203–210, 30 abr. 2012.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks** *Bioresource Technology*, set. 2008.

SANDHU, S. K. et al. Two-stage statistical medium optimization for augmented cellulase production via solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus niger* HN-1 and application of crude cellulase consortium in hydrolysis of rice straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12653–12661, 26 dez. 2013.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; OH, S. E. Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. MDS. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 302–315, 2012.

SARAVANAN, P. et al. Optimization of cellulase production using *Trichoderma reesei* by RSM and comparison with genetic algorithm. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 6, n. 4, p. 443–452, dez. 2012.

SCHERRER, R. The Mechanism of the Gram-Staining Method. The Site of the Gram Reaction in *Bacillus megaterium*. **Pathologfa et Microbiol.**, v. 24, n. 5, p. 756–67, 1961.

SCHWEINBERGER, C. M.; TRIERWEILER, J. O.; TRIERWEILER, L. F. Preheating Followed by Simultaneous Viscosity Reduction, Hydrolysis, and Fermentation: Simplifying the Process of Ethanol Production from Sweet Potato. **Bioenergy Research**, v. 12, n. 1, p. 94–102, 15 mar. 2019.

SHAH, F.; RANAWAT, B.; MISHRA, S. An Approach Toward Cellulase Production, Bioconversion, and Utilization. **Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts**, p. 207–223, 1 jan. 2019.

SHANKAR, T.; ISAIARASU, L. Statistical Optimization for Cellulase Production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 Using Response Surface Methodology. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2012.

SHU, G. et al. Optimization of cellulase production by *Trichoderma reesei* HY07 using response surface methodology. **Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology**, v. 5, n. 23, p. 5438–5442, 2013.

SINGH, J.; KAUR, P. Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus* sp. JS14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 505–512, 2012.

SINGH, J.; SHARMA, A. Application of response surface methodology to the modeling of cellulase purification by solvent extraction. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 03, n. 04, p. 408–416, 2012.

SINGH, K. et al. Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus VITRKHB*. **3 Biotech**, v. 4, n. 6, p. 591–598, dez. 2014.

SINGH, N. et al. Bioethanol production potential of a novel thermophilic isolate *Thermoanaerobacter* sp. DBT-IOC-X2 isolated from Chumathang hot spring. **Biomass and Bioenergy**, v. 116, n. January, p. 122–130, 2018.

SINGHANIA, R. R. et al. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 490–495, 2014.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 6, p. 416–425, jun. 2007.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 277–283, mar. 2010.

SRIVASTAVA, N. **Sustainable Approaches for Biofuels Production Technologies: From Current Status to Practical Implementation**. [s.l.] Biofuel and Biorefinery Technologies, 2019a.

SRIVASTAVA, N. Production of Food-Processing Enzymes From Recombinant Microorganisms. In: **Enzymes in Food Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2019b. p. 739–767.

SUBHEDAR, P. B.; RAY, P.; GOGATE, P. R. Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, p. 140–150, 2018.

SULEIMAN, M. et al. Extremely thermoactive archaeal endoglucanase from a shallow marine hydrothermal vent from Vulcano Island. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1267–1274, 2019.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

SURIYACHAI, N. et al. Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 171–178, 2013.

TAI, C. et al. Optimal control strategy for fed-batch enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass based on epidemic modeling. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 7, p. 1376–82, jul. 2015.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744–4753, jul. 2010.

TARIQ, R. et al. Optimization of endoglucanase production from thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* RT-17 and its application for saccharification of sugarcane bagasse. **Pakistan Journal of Botany**, v. 50, n. 2, p. 807–816, 2018.

THANOON, R. D. et al. Utilization of extracted protein from Fish Fin and chicken feather waste for alkaline protease production by indigenous bacteria. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 17–22, 2018.

TIAN, F. et al. [Purification, identification and characterization of an endoglucanase Egn20 from *Fusarium* sp. Q7-31T]. **Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica**, v. 55, n. 8, p. 1042–9, 4 ago. 2015.

VASQUEZ, M. P. et al. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136–140, n. 2, p. 141–153, 2007.

VERAS, B. O. DE et al. Screening of protease , cellulase , amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain. **F1000Research**, n. 0, p. 1–7, 2018.

VERENIUM. The nature of energy. 2008.

WAN, C.; LI, Y. Effectiveness of microbial pretreatment by *Ceriporiopsis subvermispora* on different biomass feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7507–7512, ago. 2011.

WANG, J. et al. Cloning, expression, and characterization of a thermophilic

endoglucanase, AcCel12B from *Acidothermus cellulolyticus* 11B. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25080–25095, 2015a.

WANG, L. et al. Simultaneous fermentation of biomass-derived sugars to ethanol by a co-culture of an engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, p. 269–276, 1 fev. 2019.

WANG, Y.; YU, W.; HAN, F. Expression and characterization of a cold-adapted, thermotolerant and denaturant-stable GH5 endoglucanase Celal\_2753 that withstands boiling from the psychrophilic bacterium *Cellulophaga algicola* IC166T. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 285–290, 13 fev. 2016.

WANG, Z. et al. A novel *Vibrio* beta-glucosidase (LamN) that hydrolyzes the algal storage polysaccharide laminarin. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 8, p. fiv087, ago. 2015b.

WBA. WBA Global Bioenergy Statistics 2014. **World Bioenergy Association**, p. 40, 2014.

WILLIAMS, K. P. et al. Phylogeny of gammaproteobacteria. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2305–14, maio 2010.

XIA, J. et al. **Engineering *Zymomonas mobilis* for Robust Cellulosic Ethanol Production****Trends in Biotechnology**Elsevier Ltd, , 1 set. 2019.

XU, Y. et al. Integrated bioethanol production to boost low-concentrated cellulosic ethanol without sacrificing ethanol yield. **Bioresource Technology**, v. 250, n. September 2017, p. 299–305, 2018.

YÁÑEZ-S, M. et al. Fuel ethanol production from *Eucalyptus globulus* wood by autocatalyzed organosolv pretreatment ethanol-water and SSF. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 39–48, 2013.

YANG, J. et al. **The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction****Nature Methods**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2014.

YIN, Y.-R. et al. Heterologous expression and characterization of a novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable GH6 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans*. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 4, p. 857–62, abr. 2015.



YOO, J. et al. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7583–7590, ago. 2011.

YÜKSEL, F.; YÜKSEL, B. The use of ethanol-gasoline blend as a fuel in an SI engine. **Renewable Energy**, v. 29, n. 7, p. 1181–1191, jun. 2004.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1–2, p. 17–34, 2001.

ZAMBARE, V.; CHRISTOPHER, L. Statistical analysis of cellulase production in *Bacillus amyloliquefaciens* UNPDV-22. **ELBA Bioflux**, v. 3, n. 1, p. 38–45, 2011.

ZHANG, S. et al. Endoglucanase improve the growth of homofermentative *Lactobacillus* spp. in ensilages. **Journal of Biotechnology**, v. 295, n. February, p. 55–62, 2019a.

ZHANG, Y. et al. Overcoming biomass recalcitrance by synergistic pretreatment of mechanical activation and metal salt for enhancing enzymatic conversion of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, 10 jan. 2019b.

ZHAO, L. et al. Techno-economic analysis of bioethanol production from lignocellulosic biomass in china: Dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Energies**, v. 8, n. 5, p. 4096–4117, 2015.