



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO PARA
PRODUÇÃO DE XILANASE E DE BIOETANOL**

ISABELA DA SILVA VASCONCELOS RODRIGUES

2019



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

ISABELA DA SILVA VASCONCELOS RODRIGUES

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO PARA PRODUÇÃO DE
XILANASE E DE BIOETANOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

R696u Rodrigues, Isabela da Silva Vasconcelos
Utilização de bactérias isoladas do solo para produção de xilanase e de bioetanol/ Isabela da Silva Vasconcelos Rodrigues; orientadora : Prof. Dr. Roberta Pereira Miranda Fernandes – São Cristóvão, 2019.
55f. : il.

Tese (Doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Enzimas. – aplicações industriais. 4. Xilanase. 5. Álcool. 6. Biocombustíveis. I. Fernandes, Roberta Pereira Miranda, orient. II. Título.

CDU: 606:577.15

ISABELA DA SILVA VASCONCELOS RODRIGUES

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO PARA PRODUÇÃO DE
XILANASE E DE BIOETANOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

APROVADA em 31 de julho de 2019.

Prof^a. Dr.^a Francine Ferreira Padilha
UNIT

Prof. Dr. Ricardo Scher
UFS

Prof^a. Dr.^a Sona Arun Jain
UNIT

Prof^a. Dr.^a Camila de Souza Varize
UFS

Prof^a. Dr.^a Roberta Pereira Miranda Fernandes
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todas as conquistas e vitórias alcançadas.

A minha família pelo apoio e amor incondicional, meu pai Anchieta Vasconcelos, por sempre acreditar e sonhar junto comigo, minha mãe Amaise Vasconcelos pela dedicação ímpar, meu esposo Tiago Rodrigues por todo o seu esforço, pelo seu amor e carinho, minha irmã Sara Vasconcelos por todo apoio e pela sua amizade.

A minha orientadora Dra. Roberta P. M. Fernandes, pela imensa disponibilidade em me orientar. Obrigada pela confiança na responsabilidade deste trabalho, contribuindo como referência para a minha formação profissional e acadêmica.

A todos do Laboratório de Enzimologia (DFS, UFS), em especial a Tamiris Carvalho por toda a sua ajuda e apoio, Mayara Mendes (por todas as reações enzimáticas compartilhadas), Brenda Moutinho, Rafael Salomão, Kleiton e Nikolas por fazerem o dia a dia mais divertido e produtivo.

Aos meus colegas de doutorado por dividirem e transformarem os momentos difíceis mais agradáveis. Em especial à Katily Pereira.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade pela oportunidade de realização do doutorado.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Resíduos Lignocelulósicos.....	2
2.2 Enzimas xilanolíticas.....	3
2.3 Fermentação de xilose por bactérias.....	6
2.4 Bioetanol.....	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
4. ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE XILANASES POR <i>BACILLUS</i> SP. TC-DT13 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	15
Resumo	15
Abstract.....	16
4.1. Introdução	17
4.2. Material e Métodos	18
4.3. Resultados e Discussão	19
4.4. Conclusões	21
4.5. Referências Bibliográficas	21
Figuras e Tabelas	24
5. ARTIGO 2: UTILIZAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Bacillus</i> spp. E <i>Paenibacillus</i> sp. FERMENTADORES DE XILOSE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL	31
Resumo	31
Abstract.....	32
5.1. Introdução	32
5.2. Material e Métodos	33
5.3. Resultados e Discussão.....	36
5.4. Conclusões	39
5.5. Referências Bibliográficas	39
Figuras e Tabelas	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura		Página
1	Distribuição da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas superiores (Brandt, Gräsvik, Hallett & Welton, 2013).....	2
2	Estrutura da xilana mostrando diferentes ligações intermoleculares e substituições.....	3
3	(a) Estrutura de xilana e os locais de seu ataque pelas enzimas xilanolíticas. A estrutura do substrato é composto de ligações β -1,4 ligadas a resíduos de xilose. Ac, grupo acetil.; α -Araf, α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcUA, α -4-O- ácido metilglucurônico; pcou, ácido p-cumárico; fer., ácido ferúlico. (b) A hidrólise de xilo-oligossacárido por β -xilosidase. (Colinns, 2005).....	4
4	Metabolismo bacteriano da xilose é assimilada pela via da xilose isomerase (XI) ou pela via Weimberg (WMB) para o crescimento celular. Além das vias XI e WMB, a via Dahms, a via da foscoquetolase ou a via sintética xilulose-1-fosfato (X1P) é utilizada para o catabolismo da xilose. Abreviaturas: X5P, fosfato de xilulose-5; GAP, gliceraldeído; PEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; OAA, oxaloacetato; ACCOA, acetil-CoA; CIT, citrato; ICIT, isocitrato; DHAP, di-hidroxiacetofosfato; XI, xiloseisomerase; XLK, xilulose-5-quinase; XL1K, xilulose-1-quinase; XPK, fosfoketolase; DAL, aldolase de 2-ceto-3-desoxi-axilato; X1PA, aldolase de xilulose-1-fosfato; GLX, derivação de glioxilato, codificada por XLDH por xylB, xilose desidrogenase; XLS codificado por xilC, xylonolactonase; XDY codificado por xylD, xylonatedesidratase; KDY codificado por xilX, 2-ceto-3-desoxi-axilato desidratase; e KSH codificado por xilA, α -cetoglutaratosemialdeídodesidrogenase. (Kim, 2018).....	7
5	Produção mundial de etanol combustível por país ou região (em milhões de galões) Fonte de dados: RenewableFuelsAssociation.....	8

ARTIGO 1

Figura		Página
1	Atividade xilanolítica de extratos brutos proteicos de <i>Bacillus</i> sp TC-DT13 utilizando diferentes substratos como resíduos agrícolas (SB, bagaço de cana; WB, farelo de trigo; CC, sabugo de milho; CH, casca de milho; CB, bagaço de coco; CSH, casca de mandioca) como fonte de carbono. A fermentação submersa foi realizada a 32°C, 150 rpm durante 72 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.....	26
2	Produção de xilanase por fermentação sólida (SSF) pelo <i>Bacillus</i> sp. TD-TD13 à 30 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata.....	27
3	Efeito do nível de umidade na atividade da xilanase pelo <i>Bacillus</i> sp. TC-DT13 a 32°C por 96 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.....	28
4	Produção de xilanase pelo <i>Bacillus</i> sp. TC-DT13 ao longo do tempo, à 30 °C por 240 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.....	29
5	Temperatura ótima para produção de xilanase pelo <i>Bacillus</i> sp. TC-DT13 ao longo de 144 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.....	30

ARTIGO 2

Figura		Página
1	Perfil de crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas com diferentes concentrações de xilose (2%, 3%, 4% e 5%).	47
2	Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas com 2% de xilose a 30 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....	48
3	Quantificação de xilose residual no processo fermentativo a 30 °C em 36 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey)	49
4	Produção de etanol sob processo fermentativo a 30°C em 36 horas. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).....	50
5	Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas com 2% de xilose a 100rpm/30 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....	51
6	Quantificação de xilose residual no processo fermentativo a 100 rpm/30°C em 36 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).....	52
7	Produção de etanol sob processo fermentativo a 100 rpm/30°C em 36 horas. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).....	53

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela	Página
1 Efeito da suplementação de fonte de carbono na produção de xilanase pelo <i>Bacillus</i> sp. TC-DT13 por fermentação sólida.	24
2 Efeito da suplementação de fonte de nitrogênio na produção de xilanase pelo <i>Bacillus</i> sp. TC-DT13 por fermentação sólida.	25

ARTIGO 2

Tabela	Página
1 Linhagens de bactérias isoladas do solo	42
2 Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) em 36h de fermentação sem agitação.....	43
3 Dados cinéticos da fermentação sem agitação.....	44
4 Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) em 36h de fermentação com agitação.....	45
5 Dados cinéticos da fermentação com agitação.....	46

RESUMO

RODRIGUES, Isabela da Silva Vasconcelos. **UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO PARA PRODUÇÃO DE XILANASE E DE BIOETANOL.** São Cristóvão: UFS, 2019. 56p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

Os microrganismos são capazes de secretar enzimas e realizar a quebra de diversas moléculas orgânicas. Por isso, os microrganismos possuem vasta aplicabilidade em diversos processos biotecnológicos. Dentre as enzimas produzidas por micro-organismos, as xilanases possuem alto potencial biotecnológico, sendo de interesse para indústrias alimentícia, farmacêutica e de produção de papel. Além da produção de enzimas de interesse industrial, outro viés biotecnológico com o uso de microrganismo é a produção de bioetanol. O objetivo do presente estudo foi utilizar bactérias isoladas do solo para produção de xilanase e de bioetanol. Para a produção de xilanase através do *Bacillus* sp TC-DT13 foi realizada uma seleção com resíduos agroindustriais através da fermentação submersa. O resíduo selecionado na etapa anterior foi utilizado para produzir enzimas xilanolíticas sob fermentação em estado sólido. Dentre os resíduos utilizados, o farelo de trigo foi selecionado como o melhor indutor de produção de xilanase com 1500 U/mL. Enquanto que na fermentação em estado sólido, o uso de farelo de trigo como o único substrato de fermentação na proporção de 1:4 de umidade ao longo de um período de 144 horas induziu uma quantidade excessiva de xilanase atingindo 2943 U/g. O uso de fontes de carbono e nitrogênio não influenciou o aumento da produção de enzimas xilanolíticas. O uso dos resíduos agroindustriais na fermentação sólida, além de aumentar a produção de xilanase e reduzir os custos, também é uma alternativa favorável ao meio ambiente. Para produção de etanol, linhagens de *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* sp foram testadas quanto a sua capacidade de fermentar xilose. As linhagens foram submetidas à fermentação com xilose em diferentes concentrações. Dentre as linhagens testadas para avaliação de desenvolvimento em meio com xilose, 5 linhagens TC-DT8, TC-DT64, TC-DT81 e TC-DT139 e TC-DT13 foram selecionadas por obterem maior crescimento celular em 2% de xilose. Na fermentação sem agitação, o *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8 foram as linhagens que mais promoveram a produção de etanol em 36 horas com 7,06 e 4,33 g L⁻¹, respectivamente. Enquanto que na fermentação com agitação a produção de etanol entre as linhagens variaram de 1,59 g L⁻¹ até 2,6 g L⁻¹. Portanto, pode-se concluir que algumas das linhagens bacterianas testadas foram capazes de se desenvolverem em meio contendo xilose. Além disso, o *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8 produziram etanol tanto com agitação quanto sem agitação.

Palavras-chave: microrganismos industriais, xilanase, xilose, etanol, processos fermentativos, resíduos agroindustriais.

* Comitê Orientador: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora).

ABSTRACT

Rodrigues, Isabela da Silva Vasconcelos. **Industrial use of *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. in extracellular xylanase and biofuel production.** São Cristóvão: UFS, 2019. 56p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity). *

Microorganisms can secrete enzyme-rich substances that are capable of breaking down a series of organic molecules. Therefore, microorganisms have wide applicability in a number of biotechnological processes. Among the microbial enzymes, xylanases have high biotechnological potential and are of interest for the food, pharmaceutical and papermaking industries. Aside from the production of industrially useful enzymes, another trend of a biotechnological use of microorganisms is bioethanol production. This study addressed the isolation of soil bacteria for xylanase and bioethanol production. For xylanase production by *Bacillus* sp. TC-DT13, agro-industrial residues were selected by submerged fermentation. The selected residue was used to produce xylanolytic enzymes by solid state fermentation. Of the tested residues, wheat bran was found to be the best inducer of xylanase production (1500 U/mL). On the other hand, wheat bran as the sole fermentation substrate in solid state fermentation for 144 hours, at a bran : moisture ratio of 1:4, induced an excessive amount of xylanase (2943 U/g). The use of carbon and nitrogen sources did not raise the xylanolytic enzyme production. The use of agro-industrial wastes in solid state fermentation, apart from increasing xylanase production and reducing costs, is also an environmentally friendly alternative. For ethanol production, *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* sp. were tested with regard to their ability to ferment xylose. The strains were subjected to xylose fermentation at different enzymatic concentrations. Among the strains tested for development evaluation in xylose medium, the five (TC-DT8, TC-DT64, TC-DT81 and TC-DT139 and TC-DT13) with highest cell growth in 2% xylose were selected. Under stirred fermentation, the ethanol production of the strains varied from 1.59 - 2.6 g L⁻¹. Therefore, it can be concluded that some of the bacterial strains tested were able to grow in xylose-containing medium. Moreover, *Bacillus* sp. TC-DT13 and *Paenibacillus* sp. TC-DT8 produced ethanol with and without stirring.

Keywords: industrial microorganisms, xylanase, xylose, ethanol, fermentative processes, agro-industrial residues.

* Advisory committee: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os principais decompositores de matéria orgânica são os microrganismos, estes são capazes de secretar enzimas e realizar a quebra dessas moléculas orgânicas liberando açúcares, os quais são utilizados em suas necessidades metabólicas. Diversas espécies de bactérias possuem aplicabilidades na biotecnologia. As bactérias do gênero *Bacillus sp.* e *Paenibacillus sp.* são capazes de produzir enzimas que possuem diversas utilidades, além de realizarem a fermentação de açúcares produzindo bioetanol.

Na agricultura são produzidos todos os anos altas quantidades de resíduos agrícolas, em sua maioria compostos de material lignocelulósico. A xilana constitui o maior componente da hemicelulose e é o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular de plantas terrestres (THOMAS et al., 2013). Este polissacarídeo é um substrato de indução de enzimas xilanolíticas.

As xilanases são enzimas de interesse para vários ramos da indústria devido a seu potencial em aplicações biotecnológicas, tais como: bioconversão de materiais lignocelulósicos em açúcares mais simples para a produção industrial de vários produtos, incluindo biocombustíveis; processamento de alimentos para ração animal; a clarificação de sucos e vinhos; a melhoria da qualidade do pão; bi branqueamento e processamento de tecidos; branqueamento de celulose; produção de silagem e tratamento de resíduos (BUTT et al., 2008; BAJAJ; SINGH, 2010).

Além do crescente interesse da produção de enzimas industriais, outro viés biotecnológico com o uso de microrganismo é a produção de bioetanol. O uso de combustíveis fósseis foi um dos principais fatores para expansão da indústria e desenvolvimento da sociedade moderna, no entanto tais recursos são esgotáveis, não-renováveis, além de contribuírem para a poluição ambiental. Uma nova vertente de pesquisas destinou-se à produção de biocombustível, como alternativa ao uso de combustíveis fósseis.

A produção de bioetanol por micro-organismo se dá pela fermentação de açúcar quando este é metabolizado. A xilose é um monômero de açúcar formado pela reação de hidrólise de polissacarídeos como o hemicelulose e a celulose. Este açúcar pode ser utilizado como substrato em processos fermentativos (O'NEILL et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2012). Os microrganismos metabolizam a xilose a partir de uma isomerização realizada por uma enzima denominada xilose isomerase (XI), após este processo a xilose é convertida em xilulose, e segue para a rota metabólica, e a partir do processo de fermentação ocorre a produção de bioetanol (MADHAVAN et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi (i) Produzir xilanases por *Bacillus sp.* TC-DT13 utilizando fermentação em estado sólido e submersa com resíduos agroindustriais como substrato e (ii) Utilizar linhagens de *Bacillus spp.* e *Paenibacillus sp.* fermentadores de xilose para produção de etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resíduos Lignocelulósicos

Recursos fósseis, como petróleo, carvão e gás natural, contribuem para a fundação da moderna sociedade, fornecendo energia e materiais para a nossa vida diária. No entanto, os recursos fósseis não são renováveis e suas reservas são limitadas. Com a crescente demanda de energia dos seres humanos na sociedade e a diminuição das reservas fósseis, se faz necessário estudos de recursos renováveis para o desenvolvimento sustentável no futuro (MA et al., 2019).

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente para utilização mais eficiente dos resíduos agrícolas e industriais que são geralmente considerados desperdícios, pois estes são acumulados no meio ambiente causando poluição ambiental e afetando o ecossistema (MANDER et al., 2014). Além disso, os recursos de biomassa, que são originalmente formados pela via da fotossíntese biológica a partir do dióxido de carbono atmosférico (CO_2), água e luz solar, podem fornecer energia e recursos de carbono. A natureza fornece grandes quantidades de biomassa a cada ano. Globalmente, 170 bilhões de toneladas métricas de fontes de biomassa são produzidas (CORMA, 2007).

Além disso, o desperdício resulta uma perda de materiais potencialmente valiosos, os quais podem ser processados como os alimentos, combustíveis e outros produtos químicos. Os resíduos agroindustriais também possuem grande potencial como fonte de carbono e energia renovável. Entretanto, a utilização efetiva destes materiais na produção de enzimas, biocombustíveis e outros metabólitos necessitam de mais estudos (POORNA; PREMA, 2006).

O material lignocelulósico é um dos componentes mais abundantes na natureza e é a principal fonte de energia renovável. Representa uma quantidade extremamente grande de recursos biológicos disponíveis no planeta com inúmeras aplicações. O principal componente da lignocelulose da parede celular das plantas é a celulose juntamente com a lignina e a hemicelulose (Figura 1). Celulose e hemicelulose são polissacarídeos formados por diferentes monossacarídeos e a lignina é um componente aromático sintetizado a partir de precursores de fenilpropanoides.

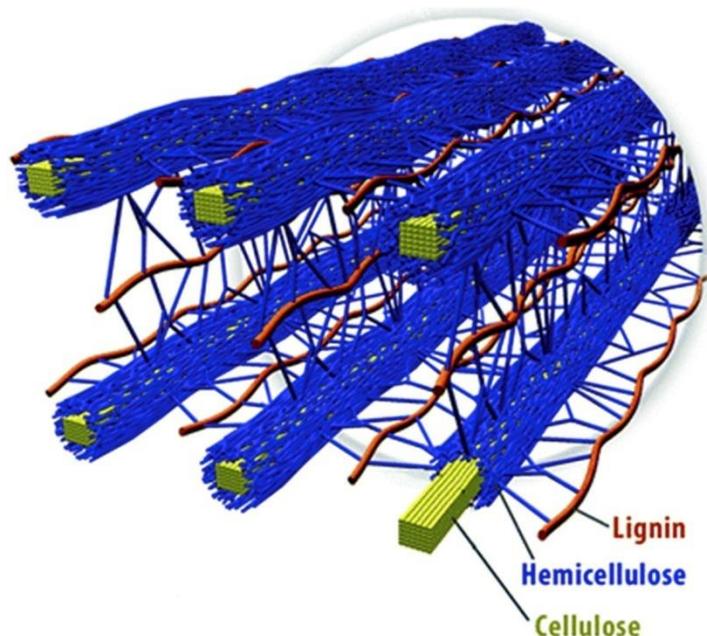


Figura 1. Distribuição da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas superiores (BRANDT et al., 2013).

Celulose e hemicelulose constituem em torno de 45 e 30% do peso seco total da madeira, respectivamente. A celulose é um polímero linear, constituído por subunidade de D-glucose ligadas por ligações glicosídicas β -1,4 formando moléculas de celobiose. A hemicelulose é um polissacarídeo com peso molecular menor do que a celulose, o qual é constituído por D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, -4-O-metilglucurônico, D-galacturônico e ácidos D-glucurônico. Esses açúcares são ligados por ligações β -1,4 e, ocasionalmente, ligações glicosídicas β -1,3 (PEREZ, 2002). Além disso, a celulose é um polissacarídeo morfogênico essencial para a estabilidade das paredes celulares das plantas e fornece uma importante matéria-prima para uma variedade de indústrias de fibra e combustível baseadas em plantas (LAMPUGNANI et al., 2019).

Hemiceluloses podem ser definidas como os segundos polissacarídeos mais abundantes na natureza. Este polissacarídeo está presente na parede celular da planta em íntima associação com celulose e lignina para contribuir para a sua rigidez. Esses polímeros aparecem em maior quantidade na parede celular primária e também são encontrados na parede celular secundária. São parcialmente solúveis em água e solúveis em álcalis diluídos, o que possibilita a separação neste meio (SPIRIDON; POPA, 2008).

O componente da hemicelulose mais relevante e comumente encontrado na natureza é xilana. Sua estrutura é variável, alterando de um esqueleto linear de resíduos de xilose ligados a β -1,4 a heteropolissacarídeos altamente ramificados, onde os açúcares xilose são substituídos por ramos contendo resíduos acetil, arabinosil e glucuronosil, de acordo com a espécie (Figura 2) (BAJPAI, 2014; RENNIE; SCHELLER, 2014; SPIRIDON; POPA, 2008). A deposição de xilana na parede celular secundária é necessária para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas e também aumenta a recalcitrância da parede celular, ajudando a defender a planta contra herbívoros e patógenos (RENNIE; SCHELLER, 2014).

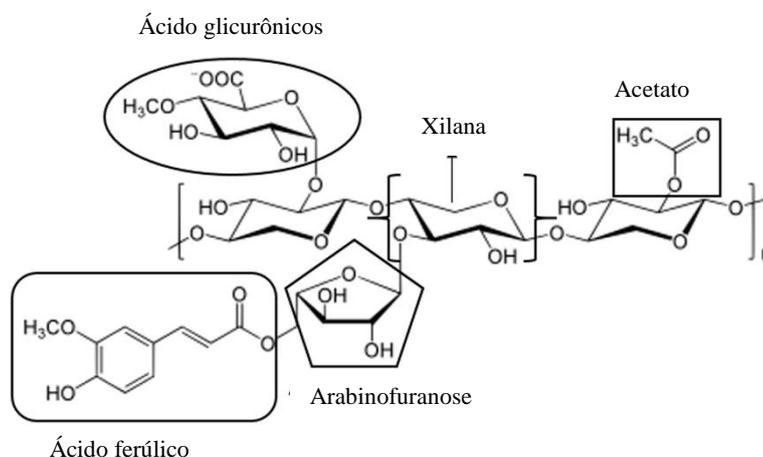


Figura 2. Estrutura da xilana mostrando diferentes ligações intermoleculares e substituições.

2.2 Enzimas xilanolíticas

Hemicelulases são frequentemente classificadas de acordo com sua ação sobre substratos distintos e são biodegradadas em açúcares monoméricos e ácido acético. Uma importante distinção deve ser feita entre endo- β -1,4-xilanase e β -xilosidase. A endo-1,4- β -xilanase gera oligossacarídeos da clivagem da xilana; enquanto a β -xilosidase gera oligossacarídeos de xilana, produzindo xilose (VERARDI et al., 2016; JEFFRIES, 1994).

Endo- β -1,4-xilanase e β -xilosidase fazem parte da classe de enzimas de hidrolases glicosídicas. Esta é classificada em famílias. As endo-xilanases são encontradas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11, 26 e 43. Endo-xilanases da família 10 (antigamente conhecida como F) e 11

(antigamente conhecida como G) têm sido descritas na literatura. Enquanto as β -xilosidase estão agrupadas em cinco famílias 3, 39, 43, 52 e 54 (JUTURU et al., 2012).

Xilanases são glicosidasas (hidrolases O-glicosídeo, 3.2.1.x CE), que catalisam as endo hidrolases de ligações β -1,4 D-xilosídicas em xilana. Elas são um grupo generalizado de enzimas, envolvidas na produção de xilose, uma fonte primária de carbono para o metabolismo celular em infecção de plantas por agentes patogênicos, e são produzidas por uma multiplicidade de organismos incluindo bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes (PRADE, 1995; COLLINS et al., 2005).

De acordo com Paes et al. (2012), atualmente a maioria dos micro-organismos produzem diferentes tipos de xilanases. E essa diversidade pode estar relacionada com alguns fatores, como a redundância genética (WONG et al., 1988) e modificações pós-traducionais (BIELY, 1985).

O substrato das xilanases, a xilana, é um dos principais polissacarídeos estruturais em células presentes nas plantas, e é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, representando cerca de um terço de todo o carbono orgânico renovável da terra (PRADE, 1995). A xilana é encontrada em grandes quantidades em madeiras de angiospermas (15-30% do teor de parede celular) e resinosas de gimnospermas (7-10%), bem como em plantas anuais (<30%).

A xilana é o principal carboidrato encontrado na hemicelulose e sua degradação completa requer a ação cooperativa de uma variedade de enzimas hidrolíticas, devido a sua complexidade e heterogeneidade (Figura 3). As Endo- β -1,4-xilanase clivam aleatoriamente a estrutura da xilana, as β -xilosidase decompõem monômeros de xilose a partir da extremidade não redutora de xilo-oligossacarídeos e xilobiose, enquanto que a remoção dos grupos laterais são catalisados por uma α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase, esterase de acetil xilana, esterase de ácido ferúlico e esterase de ácido p-cumárico (COLLINS et al., 2005).

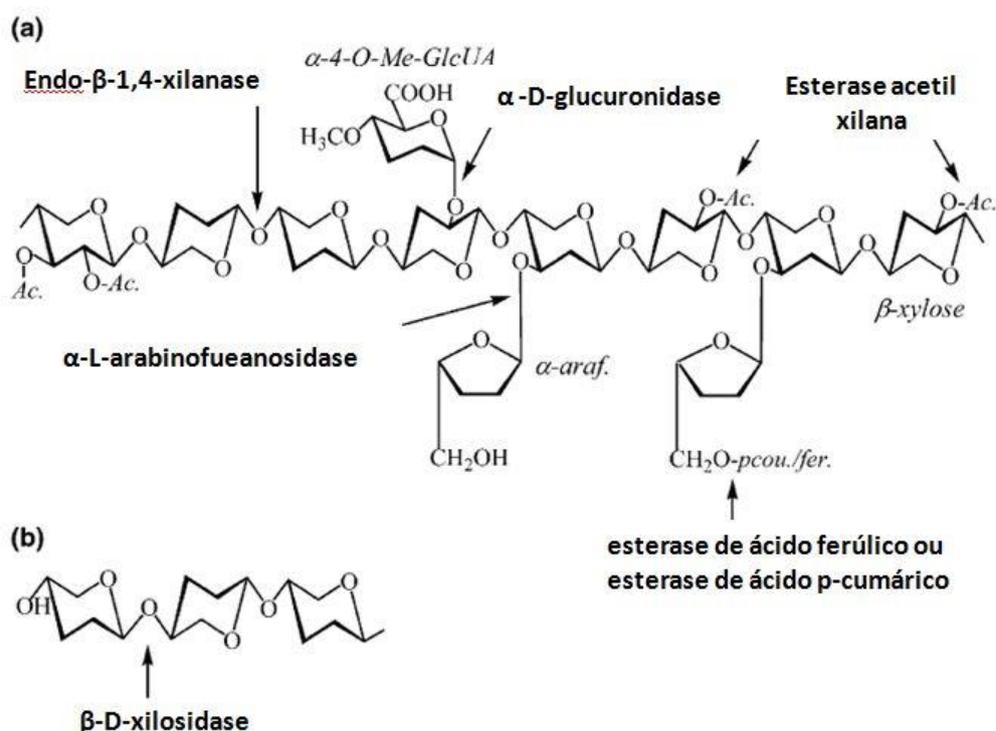


Figura 3. (a) Estrutura de xilana e os locais de seu ataque pelas enzimas xilanolíticas. A estrutura do substrato é composto de ligações β -1,4 ligadas a resíduos de xilose. Ac, grupo acetil.; α -Araf, α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcUA, α -4-O- ácido metilglucurônico; pcou, ácido p-cumárico; fer., ácido ferúlico. (b) A hidrólise de xilo-oligossacarídeo por β -xilosidase. (COLLINS, 2005).

As xilanases se tornaram o foco de intensa pesquisa nos últimos anos. Elas são produzidas por uma grande variedade de diferentes microrganismos (HAN et al., 2019; GULSAH et al., 2019; ZHANG; SANG, 2015; LIU et al., 2014; RAHMAN et al., 2014; SHARMA et al., 2014) mas, devido à sua alta diversidade metabólica, as bactérias possuem maior interesse para a produção de xilanase e para aplicações industriais (BAJAJ; SINGH, 2010).

Há uma grande variedade de micro-organismos capazes de produzir xilanases relatados na literatura, tais como: *Jonesia denitrificans*, *Aspergillus terreus*, *Acinetobacter junni*, *Bacillus subtilis*, entre outros, os quais produziram 77 U/mg, 839,33 U(g-ds)⁻¹, 317 U/mL, 400 U/mL, respectivamente (SANGHI, 2008; BOUCHERBA et al., 2010; LO et al., 2010; SHARMA et al., 2014). Entretanto, devido ao seu alto rendimento e estabilidade a pH alcalino, os produtores de xilanase mais estudados entre as fontes bacterianas são as espécies de *Bacillus* (YASINOK et al., 2010).

As xilanases são de grande interesse para vários ramos da indústria devido a seu potencial em aplicações biotecnológicas, tais como: bioconversão de materiais lignocelulósicos em açúcares mais simples para a produção industrial de vários produtos, incluindo biocombustíveis, processamento de alimentos para ração animal, a clarificação de sucos e vinhos, a melhoria da qualidade do pão, bi branqueamento e processamento de tecidos, branqueamento de celulose, produção de silagem, tratamento de resíduos etc (BUTT et al., 2008; BAJAJ; SINGH, 2010).

O mercado global de enzimas industriais deverá atingir US \$ 6,5 bilhões em 2020, impulsionado pela grande demanda a partir das indústrias de alimentos, ração animal e aplicações de produção de etanol, como também pela rigorosa repressão ambiental sobre os produtos químicos e processos convencionais (COMPANIES & MARKETS, 2014). Porém, a produção de enzimas nas indústrias é muitas vezes limitada devido aos altos custos dos substratos para a cultura dos micro-organismos (ALVES-PRADO et al., 2010). Além disso, as xilanases são enzimas induzíveis e necessitam de indutores como a xilana, para serem expressas (GUPTA; KAR, 2009).

Por isso, é necessário explorar substratos relativamente mais baratos para a produção e, conseqüentemente, melhorando o custo benefício. Os resíduos agrícolas podem ser uma alternativa, pois os mesmos apresentam matéria-prima de baixo custo para a produção de enzimas em escala industrial, e estes podem não somente servir como substratos econômicos, mas também podem oferecer vantagens estratégicas e ambientais (GEETHA; GUNASEKARAN, 2010; BAJAJ; WANI, 2011).

Para produção de enzima a nível comercial, além de utilizar-se de substratos de baixo custo, é necessária também uma fermentação eficiente. Em vários estudos foram demonstrados que a fermentação em estado sólido tem várias vantagens sobre a fermentação submersa, devido ao pequeno volume de solvente necessário para a recuperação do produto, resultando numa alta produtividade de unidades por volume, na baixa contaminação, problemas de espuma e uma melhor exploração dos resíduos agrícolas como o substrato (KEWALRAMI et al., 1988; NIGAM; SINGH, 1996).

Vários estudos reportam a produção de xilanases através da fermentação submersa utilizando bactérias, porém há poucos estudos com a produção eficaz desta enzima utilizando bactérias através da fermentação sólida (HASHEMI et al., 2010; SINGH et al., 2010; UR REHMAN et al., 2012; PANWAR et al., 2014; EL-SHISHTAWY et al., 2014).

A fermentação sólida é um processo heterogêneo trifásico, compreendendo fases sólidas, líquidas e gasosas, que oferece benefícios potenciais para o cultivo microbiano para bioprocessos e produtos em desenvolvimento. Nas últimas duas décadas, a SSF ganhou atenção significativa para o desenvolvimento de bioprocessos industriais, particularmente devido à menor necessidade de energia associada a altos rendimentos de produtos e menos produção de águas residuais, com menor risco de contaminação bacteriana. Além disso, é um

sistema favorável ao meio ambiente, principalmente por utilizar resíduos sólidos agroindustriais como substrato (fonte de carbono) (THOMAS et al., 2013).

Este bioprocesso é realizado na ausência, ou quase ausência, de água livre; no entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo. A matriz sólida pode ser a fonte de carbono (e outros nutrientes), ou pode ser um material inerte para suportar o crescimento dos microrganismos (com solução de crescimento impregnada) (COSTA et al., 2018).

O uso da fermentação sólida na produção de enzimas tem várias vantagens, incluindo a facilidade de recuperação dos produtos formados, a ausência de formação de espuma e pequenas reações, como também permite a utilização de resíduos agro-industriais como substratos (LONSANE; RAMESH, 1990; PANDEY, 1992).

2.3 Fermentação de xilose por bactérias

D-xilose é o segundo monossacarídeo mais abundante na natureza, responsável por aproximadamente 35% do total de açúcar na biomassa lignocelulósica. Com isso, a xilose deve ser fermentada com alta eficiência para melhorar sua conversão em etanol ou outros produtos bioquímicos (SÀNCHEZ-NOGUÉ; KARHUMAA, 2015). Por isso, a bioconversão da xilose é de suma importância e tem atraído grande interesse.

Comparado com a glicose, e em termos de via metabólica e via fermentativa, o metabolismo da xilose em etanol é pouco conhecido e poucos são os microrganismos capazes de metabolizar essa pentose, pois, mesmos os fungos que possuem alta taxa de sacarificação, são incapazes de converter açúcar em etanol com alta eficiência sem a ação de enzimas celulolíticas purificadas (HO et al., 2012). Várias análises aprofundadas discutiram o metabolismo da xilose e sua engenharia utilizando leveduras modificadas (KIM et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Entretanto poucos trabalhos evidenciam o metabolismo da xilose por bactérias.

Uma vez que a xilose é transportada para o citoplasma bacteriano e isomerizado à D-xilulose, a via das pentoses fosfato (PPP) é a principal via bioquímica para o metabolismo da xilose. O PPP não oxidante converte D-ribulose-5-fosfato de D-ribose-5-fosfato, D-xilulose-5-fosfato, D-sedoheptulose-7-fosfato, D-eritrose-4-fosfato, D-fructose-6-fosfato e D-gliceraldeído-3-fosfato. O PPP oxidativo converte o D-glucose-6-fosfato em D-ribulose-5-fosfato, CO₂ e NADPH. Assimilação de xilose via PPP é chamado de via xilose isomerase (XI) (Figura 4).

As espécies de *Bifidobacterium* são capazes de utilizar xilose para produzir acetato e outros produtos fermentativos através da rota da foscoquetolase, na qual a foscoetolase cliva xilulose-5-fosfato ao gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato (HENARD et al., 2015). A via da foscoetolase contorna um piruvato a reação descarboxilase e a PPP oxidativa, que resulta em eficiência de carbono (BOGORAD et al., 2013; LIN et al., 2018). Além da via XI, uma via sintética foi projetada. Nesta via, a xilose quinase é capaz da fosforilação da xilulose na posição 1 para produzir xilulose-1-fosfato (X1P), que é convertido em di-hidroxiacetofosfato (DHAP) e glicolaldeído por uma aldolase X1P. Subsequentemente, o DHAP entra na via Embden-Meyerhof (EMP) e o glicolaldeído pode ser ainda metabolizado no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Esta via foi designada a via sintética X1P (CAM et al., 2016).

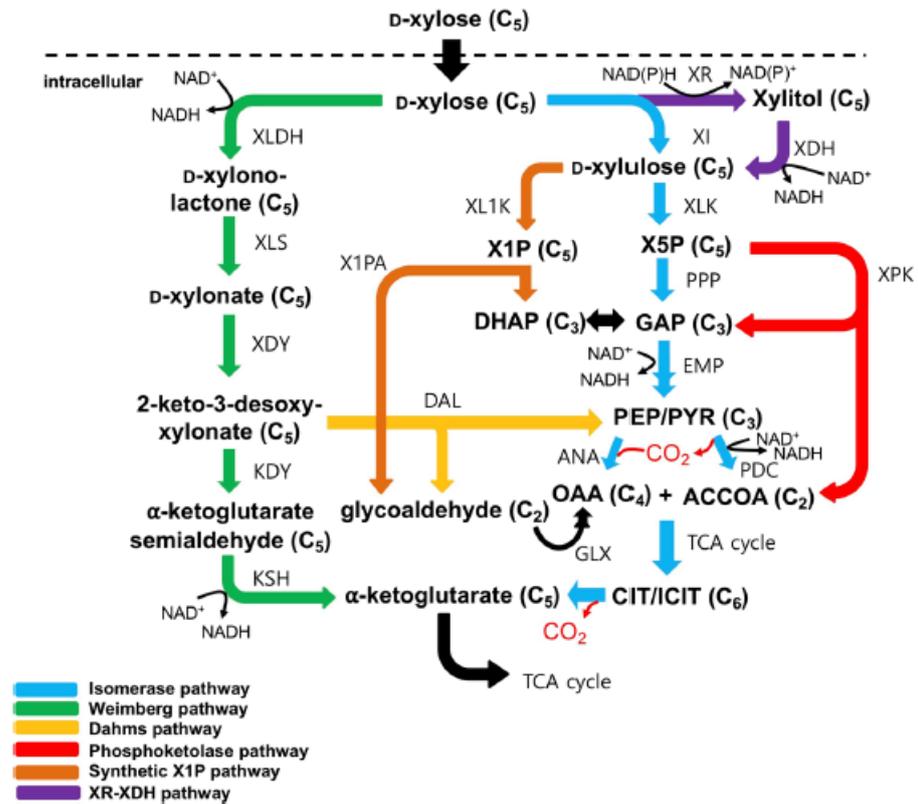


Figura 4. Metabolismo bacteriano da xilose é assimilada pela via da xilose isomerase (XI) ou pela via Weimberg (WMB) para o crescimento celular. Além das vias XI e WMB, a via Dahms, a via da fosfoquetolase ou a via sintética xilulose-1-fosfato (X1P) é utilizada para o catabolismo da xilose. Abreviaturas: X5P, fosfato de xilulose-5; GAP, gliceraldeído; PEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; OAA, oxaloacetato; ACCOA, acetil-CoA; CIT, citrato; ICIT, isocitrato; DHAP, di-hidroxiacetofosfato; XI, xilose isomerase; XLK, xilulose-5-quinase; XL1K, xilulose-1-quinase; XPK, fosfoquetolase; DAL, aldolase de 2-ceto-3-desoxi-xilato; X1PA, aldolase de xilulose-1-fosfato; GLX, derivação de glioxilato, codificada por XLDH por xylB, xilose desidrogenase; XLS codificado por xilC, xylonolactonase; XDY codificado por xylD, xylonate desidratase; KDY codificado por xilX, 2-ceto-3-desoxi-xilato desidratase; e KSH codificado por xilA, α-cetoglutaramato semialdeído desidrogenase. (KIM, 2018).

2.4 Bioetanol

O cenário energético mundial precisa urgentemente de alternativas para substituir os combustíveis fósseis, principalmente como resultado dos danos causados por essas fontes de energia ao meio ambiente (NIGAM; SINGH, 2011). Os combustíveis à base de petróleo são amplamente utilizados em todo o mundo, um cenário que envolve custos elevados e preocupações com o clima (SEARCHINGER et al., 2008; SATHRE, 2014), já que a queima de combustíveis como gasolina e diesel contribui para a liberação da maioria dos gases causadores do efeito estufa (SATHRE et al., 2014; HÖÖK; TANG, 2013). Por estas razões, os biocombustíveis são alternativas atraentes para os combustíveis fósseis, sendo o bioetanol uma fonte de energia promissora, limpa e renovável. É o biocombustível mais utilizado em todo o mundo, tanto na forma pura quanto como aditivo da gasolina (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Até o início do século XIX, a biomassa contribuiu predominantemente como fonte de energia; hoje em dia, no que diz respeito às ações globais de fornecimento de energia, apenas uma pequena parte (REN21, 2006). Entre o total de energia consumida, 18% é de fontes renováveis, onde a bioenergia compartilha a maior parte (14%) e contribui com 10% do

fornecimento global de energia. A biomassa florestal (cerca de 90% da biomassa lenhosa) é a principal fonte de energia usada principalmente na culinária, fundição de ferro e outros minérios de metal em todo o mundo (WER, 2016).

A produção de etanol e biodiesel é outra área em expansão, que deverá crescer em 2024 para aproximadamente 134,5 e 39 bilhões de litros (REN21, 2006). No entanto, a figura 5 representa a tendência recente da produção de bioetanol nos principais países nos últimos cinco anos.

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol utilizando a cana-de-açúcar como matéria prima. Enquanto que os EUA, que é o maior produtor de etanol, foi responsável por cerca de 56% da produção mundial de etanol em 2018 a partir do amido de milho (GERBENS-LEENES et al., 2012). Segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção de etanol no Brasil na safra 2018/2019 deve alcançar 33,14 bilhões de litros, um aumento de 21,7% ou 5,9 bilhões de litros em relação à safra 2017/2018 (CONAB, 2019).

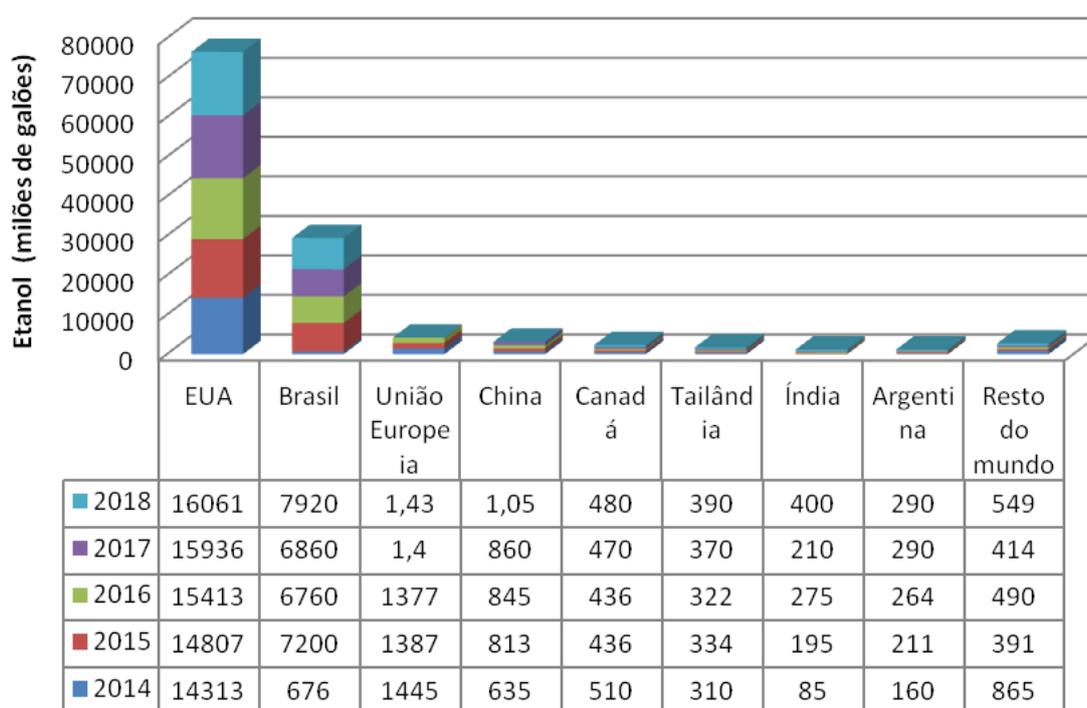


Figura 5. Produção mundial de etanol combustível por país ou região (em milhões de galões). Fonte de dados: Renewable Fuels Association.

Os biocombustíveis, como o biodiesel e o bioetanol, são basicamente de origem vegetal derivados da conversão controlada de biomassa lignocelulósica (CLAASSEN et al., 1999; GALBE et al., 2007; BHATIA et al., 2012; AULITTO et al., 2019). A vegetação e o tipo relacionado de biomassa residual com propriedades celulósicas podem ser usados para produzir biocombustíveis. Diversos componentes como gramíneas, estoques de milho, cana-de-açúcar, sorgo, entre outros, estão sendo usados em todo o mundo (LIN et al., 2006; KAZI et al., 2010). A utilização adequada de tais materiais celulósicos pode oferecer oportunidade de reduzir a carga de resíduos lingocelulósicos produzindo uma fonte de energia limpa (SADASHIVAM, 2006; GAMAGE et al., 2010).

O bioetanol, um produto ecologicamente correto, emite menos monóxido de carbono (cerca de 12-15%) e é produzido principalmente a partir de açúcares, amido ou celulose (PRIYA et al., 2010; ZAINAB; FAKHRA ZAINSA, 2014). O biocombustível de primeira geração começou com a utilização de cana-de-açúcar e milho, os materiais alimentares altamente exigentes, que começaram a afetar a oferta global de alimentos sobre a produção de biocombustíveis. Isso atraiu as atenções dos pesquisadores para esperar pela segunda geração

de biocombustíveis que inclui biomassa celulósica e resíduos orgânicos (BYADGI; KALBURGI, 2016). A biomassa celulósica, como resíduos agrícolas e industriais, são geralmente fontes abundantes e econômicas disponíveis em quase todos os países. O material lignocelulósico, que é um dos componentes mais abundantes na natureza, representa uma quantidade extremamente grande de recursos renováveis disponíveis no planeta, com inúmeras aplicações, incluindo a produção de biocombustíveis como o etanol (KUMAR; SHARMA, 2017).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F.C.; LEITE, R.S.R.; OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; DASILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from brazilian cerrado. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 161, p.333-346, 2010.
- AULITTO, M.; FUSCO, S.; NICKEL, D.B.; BARTOLUCCI, S.; CONTURSI, P.; FRANZÉN, C.J. Seed culture pre-adaptation of *Bacillus coagulans* MA-13 improves lactic acid production in simultaneous saccharification and fermentation. **Biotechnol Biofuels**, v. 12, n.45, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1382-2>.
- BAJAJ, B.K.; WANI, M.A. Enhanced production of a phytase with potentially suitable attributes for animal feed application from *Nocardia* sp. MB 36 by employing agro-residues as substrates. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, p. 620–628, 2011.
- BAJAJ, B.K.; SINGH, N. P. Production of xylanase from an alkali tolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1804-1818, 2010.
- BAJPAI, P. Xylan: Occurrence and structure. **Xylanolytic enzymes**, p. 9-18, 2014.
- BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **Appl. Indust. Microbio. Exp.**, v. 918, p.2-65, 2012.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.
- BOGORAD, I.W.; LIN, T.S.; LIAO, J.C. Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation. **Nature**, v. 502, p.693–697, 2013.
- BOUCHERBA, N.; GAGAOUA, M.; COPINET, E.; BETTACHE, A.; DUCHIRON, F.; BENALLAOUA, S. Purification and characterization of the xylanase produced by *Joselia denitrificans* BN-13. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 2694-2705, 2010.
- BRANDT, J.; GRÄSVIK, J.P.; HALLETT, T.; WELTON. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n.3, p. 550-583, 2013.
- BUTT, M.S.; NADEEM, M.T.; AHMAD, Z.; SULTAN, M.T. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v.46, p.22–31, 2008.
- BYADGI, S.A; KALBURGI, P.B. Production of Bioethanol from Waste Newspaper. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 555-562, 2016.

- CAM, Y.; ALKIM, C.; TRICHEZ, D.; TREBOSC, V.; VAX A.; BARTOLO, F.; BESSE, P.; FRANÇOIS, J.M.; WALTHER, T. Engineering of a synthetic metabolic pathway for the assimilation of (d)-xylose into value-added chemicals. **ACS Synth Biol**, v.5, n.7, p.607–618, 2016.
- CLAASSEN, P.A.M.; VAN LIER, J.B.; LOPEZ-CONTRERAS A.M.; VANNIEL, E.W.J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A.J.M. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051586>.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology**, v. 29, p.3-23, 2005.
- COMPANIES AND MARKETS. The United States, with its strong industrial base, represents the largest enzymes market, market worldwide, followed by Europe. Disponível em: <www.companiesandmarkets.com>. Acesso em: 10 de jul. de 2019.
- CONAB (2019) Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2859-producao-de-etanol-no-brasil-mantem-recorde-e-alcanca-33-58-bilhoes-de-litros>>. Acesso em: 10 de jun. de 2019.
- CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. **Chem. Ver**, v. 107, p. 2411-2502, 2007.
- COSTA, J.A.V.; TREICHEL, H.; KUMAR, V.; PANDEY, A. Advances in Solid-State Fermentation, in: Ashok Pandey, Christian Larroche, Carlos Ricardo Soccol (Eds). **Current Developments in Biotechnol. Bioeng**, p.1-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00001-3>.
- EL-SHISHTAWY, M.R.; MOHAMED, A.S.; ASIRI, M.A.; GOMAA, M.A.; IBRAHIM, H.I.; AL-TALHI, H.A. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. **BMC Biotechnology**, p. 14-29, 2014
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol**, v.108, p.41-65, 2007.
- GAMAGE, J.; HOWARD, L.; ZISHENG, Z. Bioethanol production from lignocellulosic, biomass. **J. Biobased. Mater. Bioenerg**, v.4, p.3-11, 2010.
- GEETHA, K.; GUNASEKARAN, P. Optimisation of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Bacillus pumilus* B20. **Biotechnology Bioprocess Engineering**, v. 15, p.882–889, 2010.
- GULSAH, A.; OZLEM, F.; MELDA, S.; BILGE, S.; MUSTAFA, B.; SUMEYYA, A.; BERNA, G.; AHMET, A. Novel Endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; Purification, Characterization and Application in Clarification of Fruit Juices. **International journal of biological macromolecules**, v.9, p.1-7, 2019.
- GERBENS-LEENES, P.W.; LIENDEN, A.R.; Hoekstra, A.Y.; Meer, Th.H. Biofuel scenarios in a water perspective: The global blue and green water footprint of road transport in 2030. **Proceedings of The National Academy of Sciences – PNAS**, v. 22, p. 764-775, 2012. 10.1016/j.gloenvcha.2012.04.001.

GUPTA, U.; KAR, R. Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.6, 2009.

HAN, Z.; FANG, G.H.; JIANGKE Y. Molecular and Biochemical Characterization of a Bimodular Xylanase From Marinifilaceae Bacterium Strain SPP2. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p.1507, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01507.

HASHEMI, M.; RAZAVI, S.H.; SHOJAOSADATI, S.A.; MOUSAVI S.M.; KHAJEH, K.; SAFARI, M. Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 110, p.333–337, 2010.

HENARD C.A.; FREED E.F.; GUARNIERI M.T. Phosphoketolase pathway engineering for carbon-efficient biocatalysis. **Curr Opin Biotechnol**, v. 36, p.183–188, 2015.

HO, C.Y.; CHANG, J.J.; LEE, S.C.; CHIN, T.Y.; SHIH, M.C.; LI, W.H.; HUANG, C.C. Development of cellulosic ethanol production process via co-culturing of artificial cellulosomal *Bacillus* and kefir yeast. **Applied Energy**, v.100, p.27-32, 2012.

HÖÖK, M.; TANG, X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change - A review. **Energy Policy**, v. 53, p. 797-809, 2013. 10.1016/j.enpol.2012.10.046.

JEFFRIES T. W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses, In: RATLEDGE C (Ed.). **Biochemistry of microbial degradation**, Kluwer, Dordrecht, p.233–277, 1994.

JUTURU, V.; WU, C. J. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1220-1221, 2012.

KAZI, F.K.; FORTMAN, J.A.; ANEX, R.P. Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. **Fuel**, v. 89, p. S20- S28, 2010.

KEWALRAMI N.; KAMRA D.N.; LALL D.; PATHAK N.N. Bioconversion of sugarcane bagasse with white rot fungi. **Biotechnology Letters**, v.10, p.369–72, 1988.

KIM, S.R.; HA, S.J.; WEI, N.; OH, E.J.; JIN, Y.S. Simultaneous cofermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends Biotechnol**, v. 30, n.5, p.274–282, 2012.

KIM, D., WOO, H. Deciphering bacterial xylose metabolism and metabolic engineering of industrial microorganisms for use as efficient microbial cell factories. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 102, 1-10, 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-9353-2.

KUMAR, A.K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feed stocks: a review. **Bioresour. Bioprocess**, p.4-7, 2017. DOI: 1161 10.1186/s40643-017-0137-9.

LAMPUGNANI, E.; FLORES-SANDOVAL, E.; QIAO, T.; MAREK, M.; JOHN, B.; STAFFAN, P. Cellulose Synthesis – Central Components and Their Evolutionary Relationships. **Trends in Plant Science**, 2019. 10.1016/j.tplants.2019.02.011.

- LIN, P.P.; JAEGER, A.J.; WU, T.Y.; XU, S.C.; LEE, A.S.; GAO, F.; CHEN, P.W.; LIAO, J.C. Construction and evolution of an *Escherichia coli* strain relying on nonoxidative glycolysis for sugar catabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.115, n.14, p.3538–3546, 2018.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current 1197 state and prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 69, n.6, p.627-642, 2006.
- LIU, X.; HUANG, Z.; ZHANG, X.; SHAO, Z.; LIU, Z. Cloning expression and characterization of a novel cold-active and halophilic xylanase from *Zunongwangia profunda*. **Extremophiles**, 2014.
- LO, Y.C.; LU, W.C.; CHEN, C.Y.; CHEN, W.M.; CHANG, C.Y. Characterization and high-level production of xylanase from an indigenous cellulolytic bacterium *Acinetobacter junii* F6-02 from southern Taiwan soil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 77-84, 2010.
- LONSANE B.K.; RAMESH M.V. Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p.1–56, 1990.
- MA, J.P.; SHI, S.; JIA, X.Q.; XIA, F.; MA, H.; GAO, J.; XU, J. Advances in catalytic conversion of lignocellulose to chemicals and liquid fuels. **Journal of Energy Chemistry**, p.1-35, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2019.04.026>.
- MADHAVAN, A.; TAMALAMPUDI, S.; USHIDA, K.; KANAI, D.; KATAHIRA, S.; SRIVASTAVA, A.; FUKUDA, H.; BISARIA, V.S.; KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1067-1078, 2009.
- MANDER, P.; CHOI, H.Y.; PRADEEP, G.C.; CHOI, S.Y.; HONG, H.J.; CHO, S.S.; YOO, C.J. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. **Process Biochemistry**, v. 49, p.451-456, 2014.
- MARTÍNEZ, M. L.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenulapolyomorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, Jaén, v. 40, p. 160–166, 2012.
- NIGAM, P.; SINGH, D. Processing of agricultural wastes in solid-state fermentation for microbial protein production. **Journal Science Industrial Research**, v. 55, p. 373–380, 1996.
- NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.
- O'NEILL M.A.; YORK, W.S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: ROSE J.K.C. (Ed.) **The Plant Cell Wall**, Oxford: Blackwell Publishing, cap. 1, p. 1-54, 2003.
- PAES, G.; BERRIN, J.G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.564-592, 2012.

- PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p.109–117, 1992.
- PANWAR, D.; SRIVASTAVA, P.K.; KAPOOR, M. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus sp.* PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatalysis and Agriculture Biotechnology**, v.3, p.118–125, 2014.
- PEREZ, J.; MUNOZ-DOURADO, J.; DE LA RUBIA, T. E.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p.53-63, 2002.
- POORNA, A.C.; PREMA, P. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p.106-112, 2006.
- PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 100–131, 1995.
- PRIYA, R.M., NITIN, V.G., MAYURI, K.K. Study of *Saccharomyces cerevisiae* 1303 3282 for the production of tomato wine. **International Journal Chemistry Science Applied**, v. 1, n.1, p.1-15, 2010.
- RAHMAN, M.A.; CHOI, Y.H.; PRADEEP, G.C.; CHOI, Y.S.; CHOI, E.J.; CHO, S.S.; YOO, J.C. A Novel Low Molecular Weight Endo-xylanase from *Streptomyces sp.* CS628 Cultivated in Wheat Bran. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 173, p.1469–1480, 2014.
- RENNIE, E.; SCHELLER, H.V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100-107, 2014.
- REN21 (Renewable Energy Policy Network for the 21st century). **Renewables, Global Status Report**, 2006. Disponível em: <https://web.archive.org/web/20110718181410/http://www.ren21.net/globalstatusreport/download/RE_GSR_2006_Update.pdf>. Acesso em: 10 de jul. de 2019.
- SADASHIVAM, S.M.A. **Biochemical methods**. New age international publishers, 2006.
- SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.
- SÀNCHEZ-NOGUÉ, V.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnol Lett**, p.1-12, 2015. DOI: 10.1007/s10529-014-1756-2.
- SANGHI, A.; GARG, N.; GUPTA, V.K.; MITTAL, A.; KUHAD, R.C. One step purification and characterization of a cellulase free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.467–476, 2008.
- SATHRE, R. Comparing the heat of combustion of fossil fuels to the heat accumulated by their lifecycle greenhouse gases. **Fuel**, v.115, p. 674-677, 2014. 10.1016/j.fuel.2013.07.069.
- SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T.H. Use of U.S. Croplands for Biofuels

Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land-Use Change. **Science**, v.319, 2008. 10.1126/science.1151861.

SHARMA, R.; KOCHER, G.S.; BHOGAL, R.S.; OBEROI, H.S. Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. **Journal Basic Microbiology**, v. 54, 2014.

SINGH, R.K; MISHRA, S.K; KUMAR, N. Optimization of α -amylase production on agriculture byproduct by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. **The Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 1, p. 867–876, 2010.

SPIRIDON, L.; POPA, V.I. Hemicelluloses: Major sources, properties and applications. M.N. Belgacem, G.A. Monomers (Eds.) **Polymers and composites from renewable resources**, Amsterdam, p. 289-304, 2008.

THOMAS, L.; JOSEPH, A.; ARUMUGAM, M.; PANDEY, A. Production, purification, characterization and over-expression of xylanases from actinomycetes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 875-884, 2013.

UR REHMAN, H.; QADER S.A.U.; AMAN, A. Polygalacturonase: production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p.387–391, 2012.

VERARDI, A.; BLASI, A.; MOLINO, A.; ALBO, L.; CALABRÒ, V. Improving the enzymatic hydrolysis of *Saccharum officinarum* L. bagasse by optimizing mixing in a stirred tank reactor: Quantitative analysis of biomass conversion. **Fuel Processing Technology**, v. 149, p.15–22, 2016.

WER (World Energy Report) .World Energy Council, 2016. ISBN:14639780946121588. Disponível em: <<https://www.worldenergy.org>>.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of 3-1,4- Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological reviews**, v. 52, p.305-317, 1988.

YASINOK, E.A.; BIRAN, S.; KOCABAS, A.; BAKIR, U. Xylanase from a soil isolate, *Bacillus pumilus*: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.1641–1652, 2010.

ZAINAB, B.; FAKHRA, A. Production of Ethanol by fermentation process by using Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Research Journal of Environmental Sci.**, v. 3, n.7, p.24-32, 2014.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn COB. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p.101-110, 2015.

4. ARTIGO 1

PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Bacillus* sp. TC-DT13 UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

Periódico aceite: *Preparative Biochemistry and Biotechnology*

RESUMO

Xilanases são enzimas industriais e têm sido investigadas por possuírem alto potencial biotecnológico em várias indústrias, como as indústrias de alimento, de papel e farmacêutica. Entretanto, as produções dessas enzimas requerem substratos com alto custo, pois, estima-se que mais de 30% da produção é devido ao uso desses substratos. O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de xilanases extracelulares pelo *Bacillus* sp. TC-DT 13 utilizando fermentação em estado sólido e submerso com resíduos agroindustriais como substrato, visando reduzir o custo dessas enzimas. Os resíduos agrícolas foram coletados em feiras locais. A seleção dos resíduos para a produção de xilanases pelo *Bacillus* sp TC-DT13 foi realizada em fermentação submersa a 30°/150 rpm por 72h. O melhor resíduo selecionado foi utilizado na fermentação sólida (FSS) com as proporções de umidade de (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5) utilizando água/solução de sais (K₂HPO₄ e MgSO₄·7H₂O) à 30°C por 96 h de incubação. No período de incubação houveram coletas periódicas de 48, 72, 96, 120, 144, 192 e 240 horas. Após cada coleta foi realizada a extração das xilanases e o ensaio enzimático foi realizado pelo método de Miller. Todos os resíduos agroindustriais foram testados em fermentação submersa para selecionar o melhor indutor para a produção de xilanase. Dentre esses resíduos, o farelo de trigo foi selecionado como o melhor indutor de produção de xilanase com 1500 U/mL. Enquanto que na fermentação em estado sólido, o uso de farelo de trigo como o único substrato de fermentação na proporção de 1:4 de umidade ao longo de um período de 144 horas induziu uma quantidade excessiva de xilanase atingindo 2943 U/g. O uso de fontes de carbono e nitrogênio não influenciou o aumento da produção de enzimas xilanolíticas. O uso dos resíduos agroindustriais na fermentação sólida, além de aumentar a produção de xilanase e reduzir os custos, também é uma alternativa favorável ao meio ambiente.

Palavras-chave: xilanase, resíduos agroindustriais, processos fermentativos, enzimas microbianas, farelo de trigo.

ABSTRACT

Título: Production of xylanases by *Bacillus* sp. TC-DT13 in solid-state fermentation and submerged fermentation with agro-industrial residues

Xylanases have gained increasing importance due to their diverse applications in the food, paper, and pharmaceutical industries; however, the production of these enzymes currently uses expensive substrates. It has already been estimated that more than 30% of the enzyme production cost originates from the substrate. The present study aimed to optimize the production of extracellular xylanases by the *Bacillus* sp. TC-DT 13 using solid-state fermentation with agro-industrial residues, with the view to reducing the production cost of these enzymes. All the agro-industrial residues were tested in submerged fermentation to select the best inductor to produced xylanase. Among these residues, wheat bran was selected as the best inducer of xylanase production with 1500 U/mL. While that in the solid-state fermentation, the use of wheat bran as the only fermentation substrate at a ratio of 1: 4 moisture over a time of 144 hours induced hyper amount of xylanase reaching 2943 U/g. The use of carbon and nitrogen sources didn't influence the increase in the production of xylanolytic enzymes. The use of agro-industrial residues in the solid-state fermentation, besides increasing the production of xylanase, reduces the costs of production and is an environmentally friendly alternative.

Keywords: Xylanase; agro-industrial residues; fermentation process; microbial enzyme; wheat bran.

4.1. Introdução

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente para utilização mais eficiente dos resíduos agrícolas e industriais que são geralmente considerados desperdícios, pois estes são acumulados no meio ambiente causando poluição ambiental e afetando o ecossistema¹. Como também resultam numa perda de materiais potencialmente valiosos, os quais podem ser processados como alimentos, combustíveis e outros produtos químicos. Os resíduos agroindustriais também possuem grande potencial como fonte de carbono e energia renovável. Entretanto, a utilização efetiva destes materiais na produção de enzimas, biocombustíveis e outros metabólitos necessitam de mais estudos².

A hemicelulose e celulose representam mais de 50% do peso seco dos resíduos agroindustriais^{3, 4, 5}. A xilana é o maior componente da hemicelulose, e sua hidrólise completa requer a ação de uma variedade de enzimas hidrolíticas, tais como as endo- β -1,4-D-xilanase. As xilanase podem ser produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, como os fungos, bactérias, leveduras⁶.

Xilanases como as enzimas industriais, tem sido investigadas por possuírem alto potencial biotecnológico em várias indústrias, como as indústrias de alimento, de papel e farmacêutica. Porém, a produção de xilanase a partir de fontes microbianas utilizando a xilana comercialmente como substrato de crescimento tem um custo elevado, uma vez que foi estimado que mais de 30% do custo de produção de enzimas industriais é contabilizado pelo custo do substrato⁷.

Por isso, o uso de substratos com baixo custo como os resíduos agroindustriais, tem sido investigados por possuírem uma alternativa para a redução do custo da produção das xilanases, como também por oferecerem vantagens ambientais^{8,9}.

Vários estudos reportam a produção de xilanases através da fermentação submersa utilizando bactérias, porém há poucos estudos com a produção eficaz desta enzima utilizando bactérias através da fermentação sólida^{9, 10, 11, 12 13}.

A fermentação sólida é um processo heterogêneo trifásico, compreendendo fases sólidas, líquidas e gasosas, que oferece benefícios potenciais para o cultivo microbiano para bioprocessos e produtos em desenvolvimento. Nas últimas duas décadas, a SSF ganhou atenção significativa para o desenvolvimento de bioprocessos industriais, particularmente devido à menor necessidade de energia associada a altos rendimentos de produtos e menos produção de águas residuais com menor risco de contaminação bacteriana. Além disso, é um sistema favorável ao meio ambiente, principalmente por utilizar resíduos sólidos agroindustriais como substrato (fonte de carbono)¹⁴.

Este bioprocessos é realizado na ausência, ou quase ausência, de água livre; no entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo. A matriz sólida pode ser a fonte de carbono (e outros nutrientes), ou pode ser um material inerte para suportar o crescimento dos microrganismos (com solução de crescimento impregnada)¹⁵.

O uso da fermentação sólida na produção de enzimas tem várias vantagens, incluindo a facilidade de recuperação dos produtos formados, a ausência de formação de espuma e pequenas reações, como também permite a utilização de resíduos agroindustriais como substratos^{16, 17}.

Portanto, o objetivo desse estudo é produzir xilanases pelo *Bacillus* sp. TC-DT13, através da fermentação submersa e sólida, e avaliar a utilização dos resíduos agroindustriais como fonte de carbono para a diminuição do custo da produção desta enzima.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Microrganismo

O *Bacillus* sp TC-DT13 utilizado neste estudo foi isolado em um trabalho prévio¹⁸ e pertence a coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Este foi mantido em glicerol 50% a -80 °C e reativado em meio MLB composto por 0,3% de extrato de carne, 0,5% de NaCl, 0,2% de KNO₃, 0,1% de K₂HPO₄, 0,05% de MgSO₄.7H₂O e xilana 1% como única fonte de carbono¹⁹.

4.2.2. Coleta e Processamento dos resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais foram coletados nos campos experimentais da Embrapa de Sergipe e de feiras de frutas e verduras locais, e foram processados na Embrapa Tabuleiros Costeiros através da moagem.

4.2.3. Produção de xylanase por SmF

Inicialmente foi realizada a fermentação submersa com os resíduos agrícolas, utilizando o meio MLB composto por 0,3% de extrato de carne, 0,5% de NaCl, 0,2% de KNO₃, 0,1% de K₂HPO₄ e 0,05% de MgSO₄.7H₂O, substituindo a xilana por um dos resíduos (palha de milho, sabugo de milho, casca da mandioca, bagaço do coco, bagaço de cana, farelo de trigo). Foi preparado o pré-inóculo utilizando as colônias do *Bacillus* sp. TC-DT13, as quais foram inoculadas em Erlenmeyers de 50 ml contendo 10 ml de meio MLB com 1,0% do resíduo e incubado a 32°C/150 rpm até a observação do início da turvação do meio, com 0,5 de densidade ótica. Após turvação, 200 µL do pré-inóculo foi inoculado em Erlenmeyers de 50 ml contendo 20 ml de MLB com 1,0% do resíduo e incubado a 30°C/150 rpm por 72 horas. Durante o período de incubação foram realizadas coletas periódicas de 24, 48 e 72 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4. Produção de xylanase por SSF

Para a produção de xilanase por fermentação em estado sólido (SSF), Erlenmeyer contendo 5 g de farelo de trigo com 20 mL de solução de sais (0.04 g/L $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$ e 0.2g/L K_2PO_4) foram autoclavados previamente por 20 minutos a 121°C. Foi realizado o pré-inóculo com *Bacillus sp* TC-DT13 em Erlenmeyers de 50 ml contendo 10 ml MLB com 1% do respectivo resíduo, o qual foi incubado a 30°C/150 rpm até a observação do início da turvação do meio, com 0,5 de densidade ótica. Após turvação, 500 µL do pré-inóculo foi inoculado em Erlenmeyers de 50 ml contendo 5 g do respectivo resíduo umedecido, incubado a 30 °C em estufa bacteriológica por 240h. Durante o período de incubação, coletas periódicas foram realizadas de 48, 72, 96, 120, 144, 192 e 240 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.5. Extração enzimática

A extração foi realizada pela mistura do substrato fermentado com 50 mL de água destilada previamente esterilizada e incubados e agitados a 120 rpm da noite para o dia. A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi designado como o extrato bruto, o qual foi utilizado para avaliação da atividade enzimática.

4.2.6. Ensaio enzimático

A atividade enzimática foi determinada de acordo o método de Miller²⁰. Nesta metodologia os açúcares redutores formados durante a incubação dos extratos na presença de xilana foram dosados. Utilizou-se 10µL do extrato, o qual foi incubado a 90µL de tampão acetato, 100 mM com xilana (pH 6,0), a 50°C por 15 min, após o período de incubação, a reação foi parada com adição do DNS e aquecida a 100°C por 5 min. A reação foi quantificada colorimetricamente (λ 540 nm) utilizando-se placas de 96 poços, otimizando assim o tempo do ensaio e diminuindo a quantidade de amostra a ser utilizada. Uma unidade (U) da atividade da xilanase será definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 µmol de xilose por minuto sob as condições mencionadas acima. Para a curva padrão foi utilizada a glicose.

4.2.7. Efeito do nível de umidade

O efeito do nível de umidade sobre a produção de xilanase foi avaliado através do estudo com várias proporções (p/v) de farelo de trigo com solução de sais e com água (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5) 30°C por 96 horas. A atividade xilanolítica foi determinada do método de DNS, como descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.8. Influência da suplementação com fonte de carbono e nitrogênio

O efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de xilanase foi avaliado pela suplementação de 1% (p/p) por SSF com farelo de trigo a partir de diferentes fontes, como glicose, sacarose, maltose, lactose, extrato de levedura, ureia, nitrato de sódio, sulfato de amônio e cloreto de amônio. As amostras foram incubadas a 30°C durante 240 horas. Durante o período de incubação, as amostras foram coletadas periodicamente às 48, 96, 144, 192 e 240 horas. Combinação de farelo de trigo com fonte de carbono, fonte de nitrogênio e ambas as fontes foram testadas. A atividade xilanolítica residual foi determinada pelo DNS como descrito anteriormente na seção de ensaio enzimático. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.9. Determinação da temperatura ótima

A temperatura ótima para SSF foi avaliada com 20 a 60°C. A atividade xilanolítica foi determinada do método de DNS, como descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.10. Análise estatística

Os resultados do efeito da suplementação com fonte de carbono e nitrogênio obtidos após a experimentação foram avaliados estatisticamente através da ANOVA e teste de Tukey à $p < 0,05$ de nível de confiança através do programa SISVAR²¹. Todos os experimentos foram expressos por média \pm desvio padrão e calculados utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Seleção de resíduo agroindustrial por SmF

Sabe-se que os custos de cultivar micro-organismos que produzem xilanase são altos. Assim, há uma necessidade de investigar alternativas para substituir tais substratos. Os resíduos agroindustriais são substratos de baixo custo e têm sido frequentemente investigados. Por isso, resíduos agroindustriais, como palha de milho, sabugo de milho, casca de mandioca, bagaço de cana, e farelo de trigo foram utilizados como fonte de carbono e sua capacidade de induzir xilanases extracelulares por *Bacillus* sp TC-DT13 foi avaliada (Fig.1).

O resíduo agroindustrial que induziu a maior produção de xilanase foi o farelo de trigo, a partir do qual foi obtido aproximadamente 1500 U/mL, seguido do bagaço de cana e palha de milho com cerca de 1000 U/mL e 500 U/ml, respectivamente. Em comparação com outros estudos utilizando o farelo de trigo, os resultados obtidos no presente estudo foram superiores, produzindo maiores quantidades do que as produzidas por outros autores, que obtiveram uma atividade xilanolítica máxima de 36,8 U/mL, 28 U/mL e 11,968 U/mL, respectivamente^{22, 23, 24}. Além disso, pode-se observar que no trabalho de Faria et al²⁵, a quantidade de xilanase obtida com xilana como substrato foi de 46,6 U/mL, indicando que o uso de resíduos agroindustriais pode induzir o aumento da produção de xilanase. Por isso, o farelo de trigo foi selecionado como melhor indutor de enzimas xilanolíticas e foi utilizado para produção desta enzima através de fermentação sólida.

4.3.2. Produção de xilanase por SSF

A xilanase tem sido utilizada em muitas aplicações industriais, como o branqueamento de polpa de celulose, a clarificação de sucos e vinhos, a bioconversão de resíduos agrícolas, processamento têxtil, entre outros. Além disso, com o objetivo de produzir uma boa relação custo-benefício, muitas indústrias em todo o mundo se interessaram em encontrar fontes de carbono como alternativas baratas e ambientalmente favoráveis. Portanto, é necessário desenvolver um processo de produção de baixo custo. Uma alternativa são os resíduos agroindustriais que, além de reduzirem os custos de produção, também reduzem a poluição dos resíduos orgânicos depositados no meio ambiente. Além de um substrato barato, um método de fermentação ideal também é necessário para reduzir o custo de produção da enzima. A fermentação em estado sólido (SSF) é realizada sem a presença de água em movimento livre, mas contém um substrato sólido umedecido com água dissolvida como uma fase contínua para o crescimento de micro-organismos. Atualmente, a SSF é um método altamente preferido para a produção de enzimas industriais, especialmente a xilanase²⁴.

Trabalhos extensivos foram realizados utilizando fungos no sistema de SSF para a produção de xilanase utilizando resíduos agroindustriais lignocelulósicos^{26, 27, 28, 29, 30}. No entanto, existem poucos relatos sobre a produção de xilanase a partir de bactérias em SSF.

Um alto nível de atividade de xilanase foi produzido por *Bacillus* sp. TCDT-13 crescido utilizando farelo de trigo como um suporte sólido em SSF. O curso de tempo de produção de enzima foi seguido por 240 horas, com a quantidade máxima de 2943,5 U/g sendo observada em 144 horas (Fig. 2). A incubação posterior a esse tempo não melhorou o nível de produção da enzima. Das e Ray³¹ relataram produção de aproximadamente 253,98 U/gds por *Aspergillus* sp. S6, enquanto El-Shishtawy et al.⁹ relataram uma produção máxima de 150 U/g com *Bacillus megatherium*, ambos usando farelo de trigo como fonte na SSF. Em comparação com esses estudos, *Bacillus* sp. O TCDT-13 induziu a maior produção de

xilanase, mesmo após o menor período de incubação (48 horas), com aproximadamente 1000 U/g. Assim, o uso de resíduos agroindustriais além de reduzir os custos de produção, também induz um aumento na produção de enzimas xilanolíticas.

4.3.3. Efeito do nível de umidade

Uma relação entre os níveis de umidade e atividade enzimática em substratos sólidos tem sido relatada na literatura. O papel dos níveis de umidade no meio na SSF e seu efeito sobre o crescimento microbiano e a biossíntese de xilanase têm sido atribuídos ao impacto da umidade sobre as propriedades físicas do substrato sólido. Além disso, a água está envolvida na reprodução de microrganismos, bem como em seus processos metabólicos vitais, exigindo um teor de umidade de aproximadamente 70 a 80%³². Portanto, a otimização do teor de umidade do substrato em SSF desempenha um papel importante na determinação do sucesso do processo para atingir o rendimento máximo do produto desejado.

O efeito de diferentes teores iniciais de umidade no desempenho da SSF foi investigado para avaliar a influência da solução de sais e da água para elucidar o melhor teor de umidade (Fig. 3). Entre as proporções de umidade utilizadas, observou-se que a maior produção de xilanases ocorreu na proporção de 1:4, quando o meio foi umedecido com água (1359 U/g) e com solução de sais (1741 U/g). Outros estudos mostraram que a produção máxima de enzimas xilanolíticas é de 700 U/g e 261,12 U/g na proporção de 1:1 e 1:0,80, respectivamente^{31,33}. Assim, os melhores rendimentos com o teor de umidade ajustado foram obtidos no presente estudo, uma vez que estudos anteriores produziram menos de 60% e 85% da quantidade máxima de xilanase.

4.3.4. Determinação da temperatura ótima

O SSF é um processo que envolve vários fatores importantes e críticos que podem influenciar o desenvolvimento do processo, bem como o custo. Dentre esses fatores, a seleção do microrganismo e do substrato, além dos parâmetros físicos, químicos e biológicos, são de extrema importância para esse processo^{14,34,35}. Quanto à fisiologia do microrganismo e aos fatores físico-químicos, a temperatura afeta diretamente o crescimento do micro-organismo e, conseqüentemente, influencia a atividade dos produtos obtidos através da SSF. Portanto, a avaliação da temperatura ideal de fermentação é um passo crucial para melhorar as condições do processo de fermentação.

Para avaliação deste parâmetro, o SSF para produção de xilanase foi realizado em diferentes temperaturas (faixa de 20 a 60°C), sendo a máxima atividade de xilanase (2475 U/g) observada a 30°C (Fig. 4). Entretanto, mesmo a uma temperatura mais alta (40°C), uma produção relativamente alta de enzimas xilanolíticas (1535 U/g) foi realizada. Portanto, a temperatura ótima selecionada foi de 30°C.

4.3.5. Suplementação com fonte de carbono e nitrogênio

O crescimento de micro-organismos é dificultado pela biodisponibilidade de nutrientes, que por sua vez afeta a produção de enzimas. A produção de xilanase com adição de 1% (p/p) de maltose, amido, glicose, sacarose e lactose foi avaliada. A Tabela 1 mostra que dentre as fontes de carbono utilizadas para suplementação, a maltose foi a que mais induziu a produção, mas não influenciou no aumento da produção de xilanase. Portanto, com a maltose, a produção de enzimas xilanolíticas por *Bacillus* sp. O TCDT-13 na fermentação em estado sólido foi estatisticamente igual à produção com apenas farelo de trigo. Enquanto outras fontes de carbono como a lactose e a sacarose diminuíram a produção de xilanase possivelmente devido à repressão catabólica. Resultados semelhantes relataram para Virupakshi et al³⁶ com a produção de xilanase por *Bacillus* sp. JB-99 em fermentação em estado sólido que foi reprimida para lactose e sacarose como fontes de carbono.

Da mesma forma, diferentes fontes de nitrogênio a 1,0% (p / p) foram adicionadas ao substrato para estudar seu efeito na produção de xilanase. Entre todas as fontes de nitrogênio

testadas, a ureia foi a melhor para *Bacillus* sp. TCDT-13 em relação à síntese de xilanase em SSF, como mostrado na Tabela 2.

A partir dos resultados acima, o SSF foi realizado com a combinação de farelo de trigo com diferentes substratos, como mostrado na Fig. 5. A produção de xilanase aumentou até 144 horas, depois decaiu. Os resultados indicaram que a combinação de WB + M + U (farelo de trigo com maltose e ureia) produzida (2811,36 U/g) não foi melhor que somente WB (2943 U/g). Portanto, pode-se afirmar que a produção de xilanase por *Bacillus* sp. O TC-DT 13 com apenas farelo de trigo é suficiente para produção em grande escala.

4.4. Conclusões

O *Bacillus* sp. O TCDT-13 teve o potencial de utilizar resíduos agroindustriais como o farelo de trigo, como fonte de carbono para produzir grandes quantidades de xilanase em ambos os processos fermentativos (SmF e SSF). No processo de SSF, além de aumentar a produção das enzimas xilanolíticas, o custo do processo de fermentação foi reduzido porque o farelo de trigo forneceu nutrientes suficientes, sem necessidade de suplementos adicionais. Portanto, *Bacillus* sp. O TCDT-13 pode ser de considerável interesse comercial. Assim, pode-se concluir que as xilanases produzidas por *Bacillus* sp. TCDT-13, via fermentação em estado sólido, apresentam grande potencial para produção em larga escala.

Agradecimentos

Esse trabalho foi apoiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação do Estado de Sergipe (FAPITEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ) e Financiadora de Estudos e Projetos – Brasil (FINEP).

4.5 Referências Bibliográficas

- 1 Mander P, Choi HY, Pradeep GC, Choi SY, Hon HJ, Cho SS, Yoo CJ, Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. *Process. Biochem* **49**: 451-456 (2014) <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.011>
- 2 Poorna AC, Prema P, Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochem Eng J* **32**: 106-112 (2006).
- 3 Sánches C, Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotech Ad.* 185–194 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- 4 Beg QA, Kapoor M, Mahajan G, Hoondal S, Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl Microb and Biotech* **56**: 326–338 (2001). <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- 5 Juturu V, Wu CJ, Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnol Advanc* **30**:1220-1221 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>.
- 6 Joo HS, Chang CS, Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp.I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochem* **40**:1263–1270 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.05.010>
- 7 Geetha K, Gunasekaran P, Optimisation of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Bacillus pumilus* B20. *Biotechnol Bioprocess Eng* **15**: 882–889 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3094-0>
- 8 Bajaj, BK, Wani MA, Enhanced production of a phytase with potentially suitable attributes for animal feed application from *Nocardia* sp. MB 36 by employing agro-residues as substrates. *Engin Life Sci.* **11**: 620–628 (2011). <https://doi.org/10.1002/elsc.201100039>
- 9 El-Shishtawy, MR, Mohamed, AS, Asiri, MA, Gomaa, MA, Ibrahim, HI, Al-Talhi, HA, Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. *BMC Biotechnol* **14**:29 (2014). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-29>

- 10 Panwar D, Srivastava PK, Kapoor M, Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. *Biocatal and Agricul Biotechnol* **3**: 118–125 (2014).
- 11 UR Rehman, H, QADER, S, AMAN, A, Polygalacturonase: production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydr Polym* **90**: 387–391 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.055>
- 12 Singh RK, Mishra SK, Kumar N, Optimization of α -amylase production on agriculture byproduct by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. *The Resear J of Pharmaceut, Biolog and Chem Scien* **1**: 867–876 (2010).
- 13 Hashemi M, Razavi SH, Shojaosadati SA, Mousavi SM, Khajeh K, Safari M, Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *J Biosci Bioeng* **110**: 333–337 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.03.005>
- 14 Thomas L, Larroche C, Pandey, A. Current developments in solid-state fermentation, *Biochem Eng J* **81**: 146-161 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- 15 Costa JAV, Treichel H, Kumar V, Pandey A, Advances in Solid-State Fermentation, in: Ashok Pandey, Christian Larroche, Carlos Ricardo Soccol (Eds), Current Developments in Biotechnol. Bioeng. Elsevier. Pages 1-17 (2018). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00001-3>
- 16 Pandey A, Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem* **27**: 109–117 (1992). [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)80017-W](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W)
- 17 Lonsane BK, Ramesh MV, Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *Adv in Appl Microbiol* **35**: 1–56 (1990). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70242-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70242-9)
- 18 Rodrigues ISV, Silva CGS, Silva RS, Dolabella SS, Fernandes MF, Fernandes RPM, Screening of bacterial extracellular xylanase producers with potential for cellulose pulp biobleaching. *Acta Sci. Biol. Sci* 2019. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v41i1.42101>.
- 19 Adhyaru DN., Bhatt, N., Modi, H.A. 2013. Enhanced production of cellulose free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. *Biocatal. and Agric. Biotechnol.* **3**: 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.003>
- 20 Miller GL, Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* **31**: 426-428 (1959). <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- 21 Ferreira DF, Programa SISVAR. Sistema de Análise de Variância. Versão 4.6 (Build 6.0). *Lavras. DEX/UFLA* (2003).
- 22 Irfan M, Nadeem M, Syed Q, One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *J Radiat Res Appl Sci* **7**: 317-326 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.04.004>
- 23 Bajaj B and Manhas K, Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatal Agric Biotechnol.* **1**: 330–337 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.07.003>
- 24 Ling Ho, H, Heng KL, Xylanase production by *Bacillus subtilis* in cost-effective medium using soybean hull as part of médium composition under submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF). *J Biodivers Biopros Dev.* **2**:143 (2015). <https://doi.org/10.4172/2376-0214.1000143>
- 25 Faria NT, Marques I, Ferreira FC, Fonseca C, Production of xylanolytic enzymes by *Moesziomyces* spp. using xylose, xylan and brewery's spent grain as substrates. *N Biotechnol* **49**: 137-143 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.001>
- 26 Marzo C, Díaz AB, Caro I, Blandino A, Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Manag Res.* **37(2)**: 149-156 (2019). <https://doi.org/10.1177/0734242X18798699>

- 27 Marques NP, Pereira JC, Gomes E, Da Silva R, Araujo AR, Ferreira H, Rodrigues A, Dussán KJ, Bocchini, DA, Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Ind Crops Prod* **122**: 66-75 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>
- 28 Souza D, Venâncio A, Belo I, Salgado J, Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. *J Sci Food Agric* **98**: 5248-5256 (2018). <https://doi.org/10.1002/jsfa.9063>
- 29 Pereira GA, Basiani D, Gabardo S, Squina F, Ayba MAS, Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. *Biocatal and Agricul Biotechnol* **15**: 78-85 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.012>
- 30 Lee SH, Lim V, Lee CK, Newly isolate highly potential xylanase producer strain from various environmental sources. *Biocatal Agric Biotechnol* **16**: 669-676 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.024>
- 31 Das A, Ray L, Production of crude xylanase using a isolated fungal strain *Aspergillus* sp.S6 by solid state fermentation. *Mater Today Proc* **3**: 3343-3360 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.016>
- 32 Pandey A, Ashakumary L, Selvakumar P, Vijayalakshmi K, Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glycoamylase production in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol* **10** (4): 485-486 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00144481>
- 33 Gessesse A, Mamo G, High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol.* **25**: 68-72 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00006-X).
- 34 Salim SG, Sekuljica N, Stefanovic A, Tanaskovic SJ, Lukovic N, Knezevic-Jugovic Z, Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid-state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. *Bioresour Technol* **228**: 193-200 (2017).
- 35 Divate RD, Wang CC, Chou ST, Chang CT, Wang PM, Chung YC, Using wheat bran and soybean meal as solid-state fermentation substances for the production of *Xylaria nigripes* with bioactivities. *J Taiwan Inst Chem E.* **70**: 127-133 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.11.003>
- 36 Virupakshi S, Gireesh KB, Satish R, Gaikwad SR, Naik GR, Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochem* **40**: 431-435 (2005).

Tabela 1. Efeito da suplementação de fonte de carbono na produção de xilanase pelo *Bacillus* sp. TC-DT13 por fermentação sólida.

Fonte de Carbono	Atividade xilanolítica (U/g)
Lactose	717.52 ± 13.2 ^c
Sacarose	965.90 ± 50.8 ^c
Glicose	1503.48 ± 13.8 ^{bc}
Amido	1918.95 ± 19.8 ^b
Maltose	2228.45 ± 39.9 ^{ab}
Controle	2943.5 ± 47 ^a

Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

Tabela 2. Efeito da suplementação de fonte de nitrogênio na produção de xilanase pelo *Bacillus* sp. TC-DT13 por fermentação sólida.

Fonte de Carbono	Atividade xilanolítica (U/g)
Nitrato de sódio	3.52 ± 1.62^c
Sulfato de amônia	292.8 ± 1.71^c
Cloreto de ammonia	1673.7 ± 24.1^b
Extrato de levedura	1775.5 ± 25.4^b
Ureia	2049.2 ± 43.9^b
Controle	2943.5 ± 47^a

Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

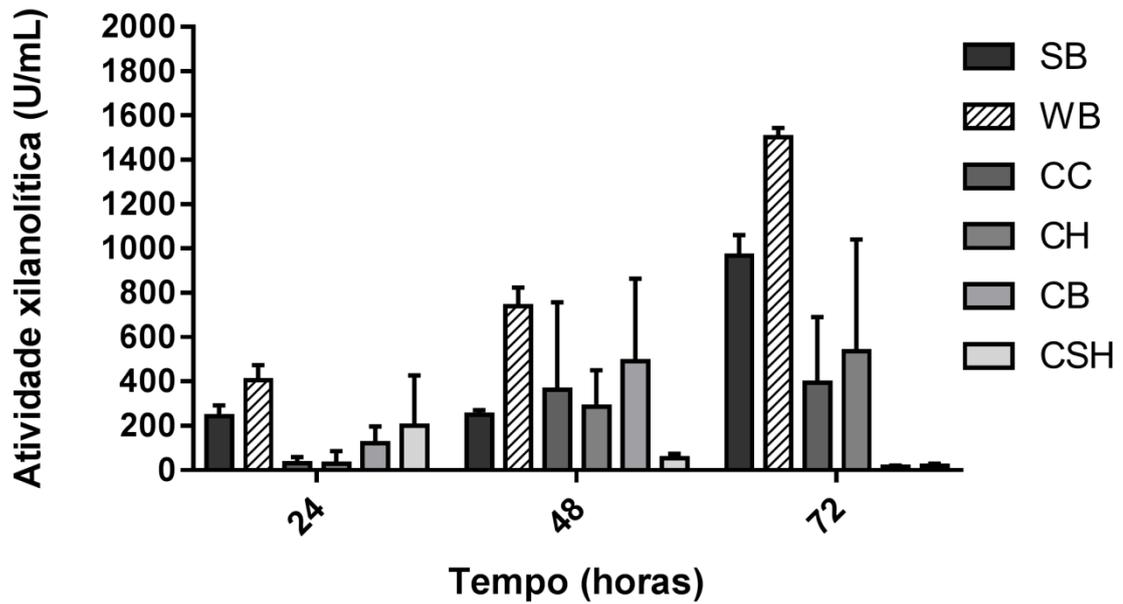


Figura 1. Atividade xilanolítica de extratos brutos proteicos de *Bacillus* sp TC-DT13 utilizando diferentes substratos como resíduos agrícolas (SB, bagaço de cana; WB, farelo de trigo; CC, sabugo de milho; CH, casca de milho; CB, bagaço de coco; CSH, casca de mandioca) como fonte de carbono. A fermentação submersa foi realizada a 32°C, 150 rpm durante 72 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

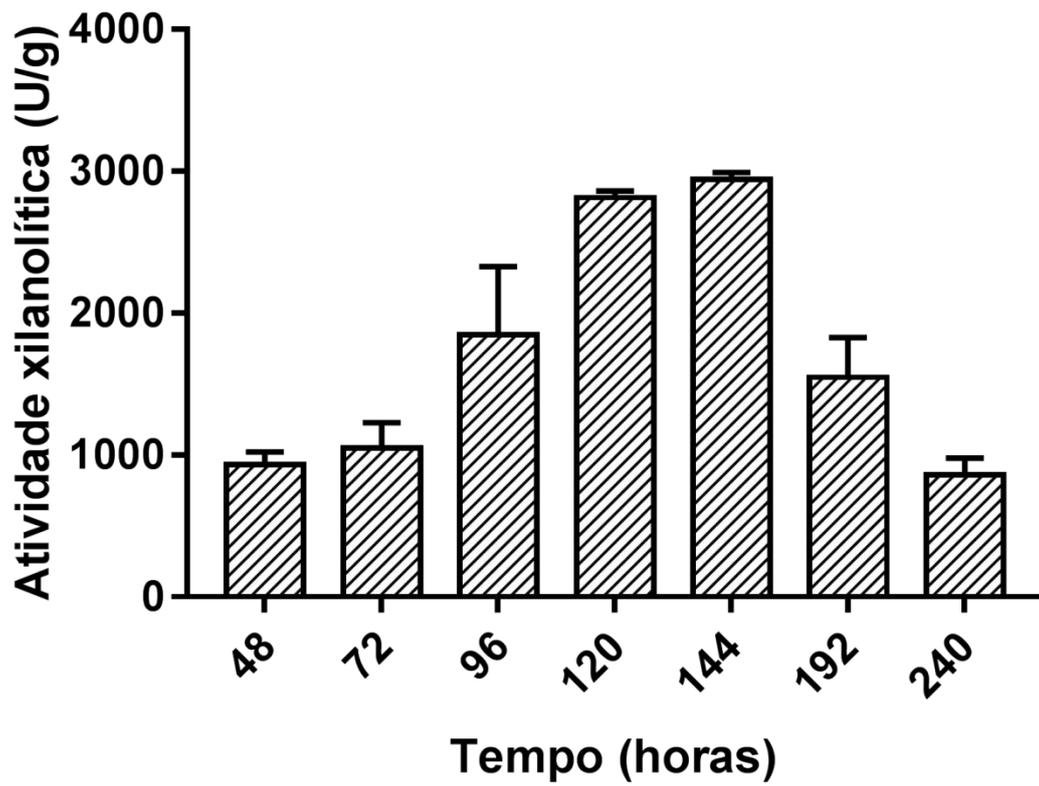


Figura 2. Produção de xilanase por fermentação sólida (SSF) pelo *Bacillus* sp. TD-TD13 à 30 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

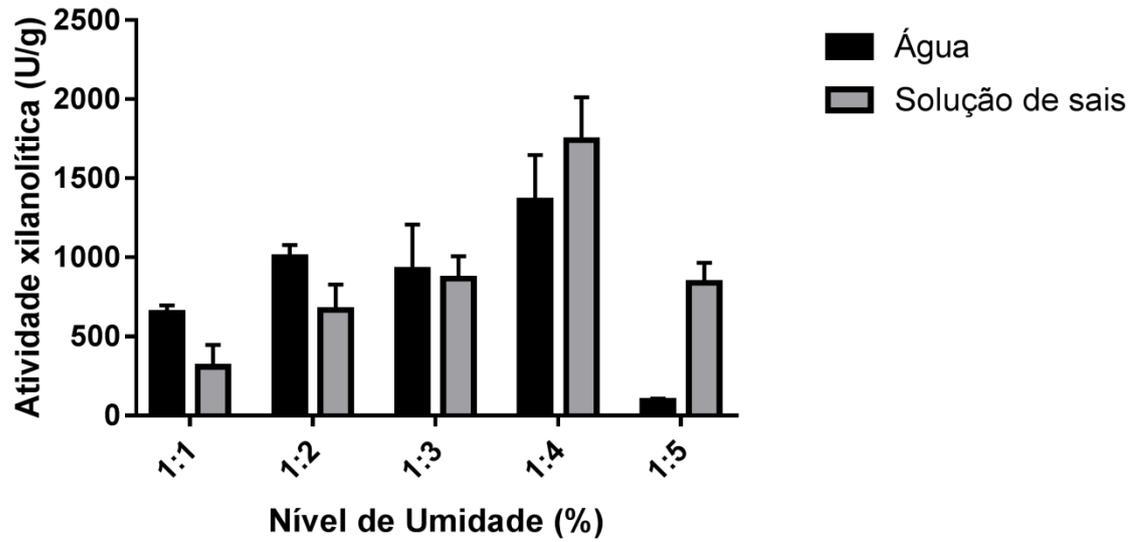


Figura 3. Efeito do nível de umidade na atividade da xilanase pelo *Bacillus* sp. TC-DT13 à 32°C por 96 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

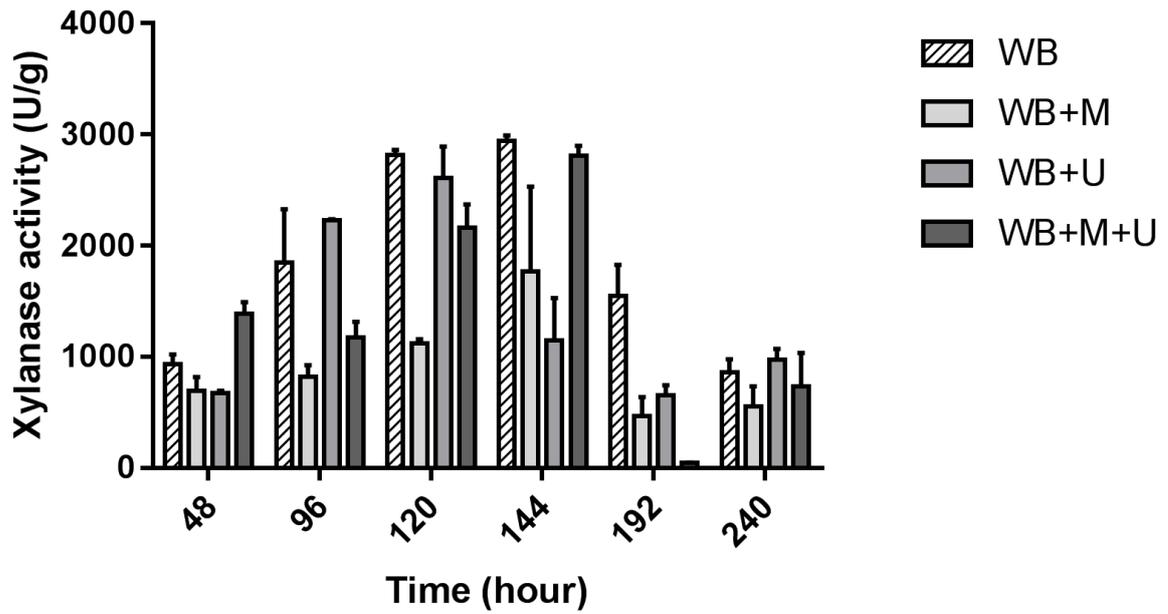


Figura 4. Produção de xilanase pelo *Bacillus* sp. TC-DT13 ao longo do tempo, a 30°C por 240 horas. WB (farelo de trigo), WB+M (farelo de trigo + maltose), WB+U (farelo de trigo + ureia) e WB+M+U (farelo de trigo + maltose + ureia). Os experimentos foram realizados em triplicata.

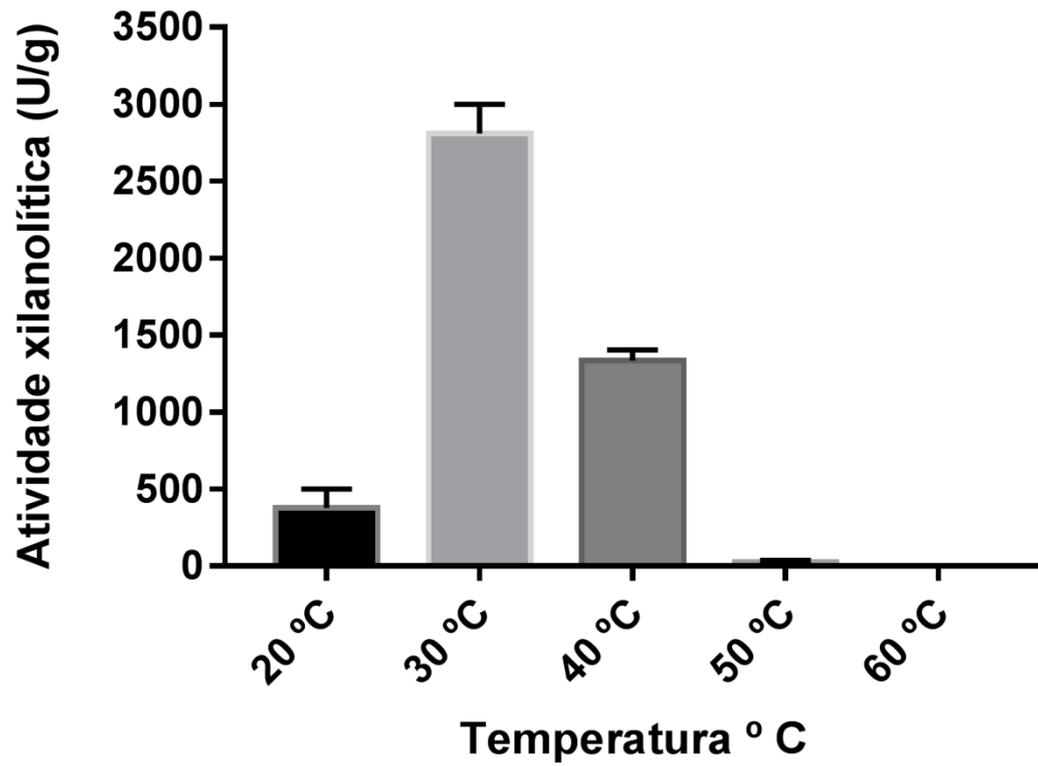


Figura 5. Temperatura ótima para produção de xilanase pelo *Bacillus* sp. TC-DT13 ao longo de 144 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5. ARTIGO 2

UTILIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Bacillus* spp. E *Paenibacillus* sp. FERMENTADORES DE XILOSE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Periódico submetido: *Letter in Applied Microbiology*

RESUMO

Entre as novas perspectivas para a produção de bioetanol está o uso de microrganismos. Os microrganismos são capazes de secretar substâncias ricas em enzimas e realizar a quebra de diversas moléculas orgânicas liberando açúcares, os quais são utilizados em suas necessidades metabólicas e como produto do metabolismo obtém-se o bioetanol. Os gêneros *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. apresentam diversas aplicabilidades na biotecnologia. A xilose é um monômero de açúcar fermentável obtido pela hidrólise de polissacarídeos como hemicelulose e a celulose. O objetivo deste trabalho foi utilizar linhagens de *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* sp. fermentadores de xilose para produção de etanol. Para a seleção dos microrganismos fermentadores de xilose foram utilizadas 17 linhagens de *Bacillus* spp. e 1 linhagem de *Paenibacillus* sp. e as concentrações de xilose de (2, 3, 4 e 5%), o parâmetro avaliado foi crescimento celular. A produção em etanol foi avaliada utilizando 5 linhagens de *Bacillus* spp. e 1 de *Paenibacillus* sp., na concentração de xilose de 2%, cultivadas sob as condições de aerobiose e anaerobiose no período de 36 horas. Foram avaliados o crescimento celular, xilose residual (g L^{-1}) e quantidade de etanol produzida (g L^{-1}). Das linhagens testadas, 14 foram capazes de fermentar a xilose. Dessas, 5 linhagens TC-DT8, TC-DT64, TC-DT81, TC-DT139 e TC-DT13 foram selecionadas por obterem maior crescimento celular em 2% de xilose. Na fermentação em anaerobiose, o *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8 foram as linhagens que mais promoveram a produção de etanol em 36 horas com 7,06 e 4,33 g L^{-1} , respectivamente. Enquanto que na fermentação em aerobiose a produção de etanol entre as linhagens variaram de 1,59 g L^{-1} até 2,6 g L^{-1} . Portanto, pode-se concluir que algumas das linhagens bacterianas testadas foram capazes de se desenvolverem em meio contendo xilose. Além disso, o *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8 produziram etanol tanto em anaerobiose quanto em aerobiose.

Palavras-chave: bioetanol, metabolismo bacteriano, fermentação alcoólica, bactéria do solo.

ABSTRACT

Título: Application of *Bacillus* spp and *Paenibacillus* sp. for ethanol production through D-xylose fermentation

Among the new perspectives for bioethanol production is the use of micro-organisms. Microorganisms are capable of secreting enzyme-rich substances and breaking down various organic molecules releasing sugars, which are used for their metabolic needs and as a product of metabolism bioethanol is obtained. The genera *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. have several applications in biotechnology. Xylose is a fermentable sugar monomer obtained by hydrolysis of polysaccharides such as hemicellulose and cellulose. The objective of this work was to use *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* sp. xylose fermenters for ethanol production. For selection of xylose fermenting microorganisms, 17 strains of *Bacillus* spp. and 1 strain of *Paenibacillus* sp. and xylose concentrations of (2, 3, 4 and 5%), the evaluated parameter was cell growth. Ethanol production was evaluated using 5 strains of *Bacillus* spp. and 1 of *Paenibacillus* sp., at 2% xylose concentration, cultivated under aerobic and anaerobic conditions within 36 hours. Cell growth, residual xylose (g L^{-1}) and amount of ethanol produced (g L^{-1}) were evaluated. Of the strains tested, 14 were able to ferment xylose. Of these, 5 TC-DT8, TC-DT64, TC-DT81 and TC-DT139 and TC-DT13 strains were selected for their highest cell growth in 2% xylose. In anaerobic fermentation, *Bacillus* sp. TC-DT13 and *Paenibacillus* sp. TC-DT8 were the strains that most promoted ethanol production in 36 hours with 7.06 and 4.33 g L^{-1} , respectively. While in aerobic fermentation ethanol production between strains ranged from 1.59 g L^{-1} to 2.6 g L^{-1} . Therefore, it can be concluded that some of these bacterial strains tested were able to grow in medium containing xylose. In addition, *Bacillus* sp. TC-DT13 and *Paenibacillus* sp. TC-DT8 produced ethanol in both anaerobic and aerobic conditions.

Keywords: bioethanol, bacterial metabolism, alcoholic fermentation, soil bacteria.

5.1. Introdução

O crescimento da população e os processos de industrialização induziram o aumento da demanda energética, assim como levou ao esgotamento dos combustíveis fósseis causando problemas ambientais. Com isso, houve um grande aumento acerca do interesse por energias renováveis e alternativas. Neste contexto, o etanol que é produzido em muitos países, possibilita um menor impacto econômico com relação aos combustíveis fósseis além de ser uma alternativa favorável ao meio ambiente (Nielsen & Keasling, 2016; Nikolic et al., 2010). Este biocombustível de fonte renovável pode ser obtido através de açúcar, amido ou material lignocelulósico (Tu & Hallet, 2019).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol utilizando a cana-de-açúcar como matéria prima. Enquanto que os EUA, que é o maior produtor de etanol, foi responsável por cerca de 56% da produção mundial de etanol em 2018 a partir do amido de milho (Gerbens-Leeneset et al., 2012; Mekonnen et al., 2018). Segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção de etanol no Brasil na safra 2018/2019 deve alcançar 33,14 bilhões de litros, um aumento de 21,7% ou 5,9 bilhões de litros em relação à safra 2017/2018 (Conab, 2019). Além do etanol de primeira geração, a cana-de-açúcar e outros materiais lignocelulósicos também podem ser aplicados para produção de etanol de segunda geração de forma eficiente (Chandel et al., 2018).

A lignocelulose está presente na parede celular das plantas e contém como componentes principais: a celulose (35%–50%), a hemicelulose (20%–35%), e a lignina (10%–25%) (Wang et al., 2018). As fibras celulósicas são organizadas em uma estrutura

cristalina altamente ordenada e constitui o principal componente da parede celular (30 e 50% da matéria seca total). Enquanto que a hemicelulose consiste em pentoses (D-xilose e L-arabinose), uma proporção menor de hexoses (D-manose, D-glicose e D-galactose) e ácidos de açúcar que são formados em um altamente ramificado, estrutura amorfa e mais facilmente hidrolisável. Já a lignina é um heteropolímero sintetizado a partir de precursores de fenilpropanoides (Champreda et al., 2019).

O açúcar pentose D-xilose é o segundo monossacarídeo mais abundante na natureza, responsável por aproximadamente 35% do total de açúcar na biomassa lignocelulósica (Haldar et al., 2016). Com isso, a xilose deve ser fermentada com maior eficácia para melhorar sua conversão em etanol ou outros produtos bioquímicos (Sánchez-Nogué & Karhumaa, 2015).

Comparada à glicose, em termos de via metabólica e via fermentativa, o metabolismo da xilose em etanol necessita de mais estudos. Além disso, poucos são os microrganismos capazes de metabolizar essa pentose, pois, mesmos os fungos que possuem alta taxa de sacarificação, são incapazes de converter açúcar em etanol com eficiência (Ho et al., 2012).

D-Xilose e L-arabinose podem ser metabolizadas por microrganismos através da via das pentoses fosfato (PPP). Para estes açúcares, existem vias bacterianas e fúngicas que convergem no intermediário químico D-xilulose-5-P. (Madhavan et al., 2012). Uma vez que a xilose é transportada para o citoplasma bacteriano e isomerizado à D-xilulose, a via das pentoses fosfato (PPP) é a principal via bioquímica para o metabolismo da xilose. A xilose isomerase (XI; E.C. 5.3.1.5) converte a xilose em xilulose que posteriormente é convertida em xilulose-5-fosfato através da via das pentoses (PPP) que em seguida é convertida em D-frutose-6-fosfato seguido da via glicolítica e convertida em etanol (Jackson & Nicolson, 2002; Kim & Whoo, 2018; Vieira et al., 2019).

Extensivos trabalhos utilizando fungos e leveduras com o objetivo de produzir etanol a partir da fermentação da xilose são encontrados (Ko et al., 2016; Caballero & Ramos, 2017; Huang et al., 2019). Entretanto, poucos são os trabalhos utilizando bactérias para produção desse biocombustível (Vieira, 2019).

Por isso, o objetivo desse trabalho foi utilizar bactérias que foram isolados do solo com potencial de produzir etanol, a partir da capacidade de fermentar a xilose.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Microrganismos

As linhagens de *Bacillus spp* e *Paenibacillus sp* (Tabela 1) utilizados neste estudo foram isolados em um trabalho prévio (Rodrigues et al., 2019) e pertencem a coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Este foi mantido em glicerol 50% a -80 °C e reativado em meio LB composto por 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de cloreto de sódio.

O acesso a opatrimônio genético foi registrado no “Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado” (SisGen), número AFFAF1E.

5.2.2. Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo utilizado para os ensaios fermentativos foi preparado com a adição de 100µL da suspensão dos microrganismos (conservadas em glicerol) em 10 mL de meio LB e a incubados (30°C/100 rpm) em incubador agitador overnight.

5.2.3 Seleção de micro-organismos fermentadores de xilose

Para o teste, 20 µL do pré-inóculo e adicionados em 180 µL de meio YEPX contendo concentrações de 2, 3, 4 e 5% de xilose em icroplicas de 96 poços à 30°C por 36 horas. A seleção das bactérias foi realizada através da análise da concentração celular determinada pela

absorbância em espectrofotômetro (Densidade óptica 600 nm) a partir de uma curva de calibração.

5.2.4 Fermentação em meio sintético de xilose 2%

O processo fermentativo foi realizado sob duas condições na presença e na ausência de agitação. Foi realizada a adição 200µL do pré-inóculo em 20 mL de meio YEPX contendo a xilose 2%. Os microrganismos foram incubados à 30°C por 36 horas. Após o período de fermentação as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm/30 min), e os sobrenadantes foram armazenados à -20°C. O mesmo ensaio fermentativo foi realizado com a agitação (100 rpm).

5.2.5 Quantificação de xilose residual

O consumo de xilose foi mensurado pelo método DNS (Miller, 1959). Utilizando-se 100 µL da amostra e 100 µL solução de DNS nos eppendorfs, os quais foram incubadas durante 5 minutos à 100°C. Após este processo as amostras foram resfriadas em banho de gelo e em seguida a reação foi quantificada colorimetricamente (λ 540nm) utilizando placa de 96 poços. Para curva padrão curva padrão foi utilizada a glicose. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

5.2.6 Quantificação de etanol

A quantificação de álcool em porcentagem de álcool em volume a 20°C foi determinada pelo método indireto pela determinação da densidade por picnometria de acordo com o método 0217/IV descrito por IAL (2008). O volume de 10 mL de amostra foi destilado em evaporador rotativo a 60 °C e 50 rpm. A solução hidroalcoólica obtida foi resfriada a 20 °C, transferida para um picnômetro, previamente calibrado, e pesada em balança analítica. A densidade relativa da solução hidroalcoólica foi obtida pela seguinte equação:

$$\frac{m_{am} - m_p}{m_{H_2O} - m_p} = \text{densidade relativa } 20^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$$

m_{am} = massa do picnômetro com a amostra

m_p = massa do picnômetro vazio

m_{H_2O} = massa do picnômetro com a água .

O teor de etanol (% v/v) foi obtido por meio da tabela de conversão da densidade relativa a 20°C/20°C determinada no destilado alcoólico da amostra.

5.2.7 Métodos analíticos

5.2.8.1 Fator de conversão substrato a célula ($g\ g^{-1}$) foi calculado pela Equação 1.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_t - S_f} \quad (1)$$

Onde,

X_f – concentração celular final ($g\ L^{-1}$)

X_0 – concentração celular inicial ($g\ L^{-1}$)

S_t – concentração de substrato total ($g\ L^{-1}$)

S_f – concentração de substrato final ($g\ L^{-1}$)

$Y_{x/s}$ – fator de conversão substrato a célula ($g\ g^{-1}$)

5.2.8.2 *Produtividade em célula (g L⁻¹.h⁻¹) foi calculado pela Equação 2.*

$$P_X = \frac{X_f - X_0}{S_t - S_f} \quad (2)$$

Onde,

X_f – concentração celular final (g L⁻¹)
 X₀ – concentração celular inicial (g L⁻¹)
 t_f – tempo total de fermentação (horas)
 P_x – produtividade em célula (g L.h⁻¹)

5.2.8.3 *Velocidade média de consumo do substrato g/L⁻¹.h⁻¹. calculado pela Equação 3.*

A velocidade média do consumo de substrato foi calculada através da Equação 3.

$$P_S = \frac{S_t - S_f}{t_f} \quad (3)$$

Onde,

S_f – concentração substrato final (g L⁻¹)
 S_t – concentração substrato total (g L⁻¹)
 t_f – tempo total de fermentação (horas)
 P_s – velocidade média consumo de substrato (g L⁻¹.h⁻¹)

5.2.8.4 *Fator de conversão substrato a etanol (g/g) foi determinado pela Equação 4.*

$$Y_{E/S} = \frac{E_f - E_0}{S_t - S_f} \quad (4)$$

Onde,

E_f – concentração produto final (g L⁻¹)
 E₀ – concentração produto inicial (g L⁻¹)
 S_t – concentração de substrato total (g L⁻¹)
 S_f – concentração de substrato final (g L⁻¹)
 Y_{e/s} – fator de conversão substrato a produto (g/g)

5.2.8.5 *Produtividade em etanol (g L.h) foi determinada pela Equação 5.*

$$P_E = \frac{E_f - E_0}{t_f} \quad (5)$$

Onde,

E_f – concentração produto final (g L⁻¹)
 E₀ – concentração produto inicial (g L⁻¹)
 t_f – tempo total de fermentação (horas)

Pe – produtividade em etanol ($\text{g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

5.2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplica, expressos por média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados estatisticamente através da ANOVA e teste de Tukey à $p < 0,05$ de nível de confiança utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Seleção das bactérias fermentadoras de xilose em diferentes concentrações

A partir do primeiro ensaio realizado em meio YEPX, com diferentes concentrações de xilose, foram realizadas as análises de crescimento celular (DO 600nm) para verificação do perfil de crescimento de cada linhagem.

Dentre as 18 linhagens de bactérias testadas, previamente isoladas do solo (Tabela 1), somente as linhagens TC-DT12, TC-DT26, TC-DT110 e TC-DT116 não foram capazes de crescer em meio contendo xilose como única fonte de carbono, após 36 horas. Por outro lado, neste mesmo período, as outras 14 linhagens foram capazes de crescer em xilose (Figura 1).

Com relação às concentrações de pentose testadas (2, 3, 4 e 5%), observou-se que as concentrações de 2 e 3% de xilose foram as que promoveram maior crescimento celular no período de 36 horas. Quando as concentrações mais elevadas foram testadas, em 4 e 5%, verificou-se a inibição desses microrganismos obtendo-se consideravelmente menor crescimento celular. Em estudos anteriores se evidenciou que a concentração inicial de xilose desempenha um papel importante na adaptação de microrganismos (El Asli & Qatibi AI, 2009). Através dos resultados obtidos observou-se que o aumento da concentração de xilose resultou em maior acúmulo de biomassa, diminuição do consumo de xilose, afetando diretamente a produção de etanol, corroborando com os resultados utilizando linhagens de *Escherichia coli* (Romero-García et al., 2016).

As linhagens que apresentaram maior capacidade de crescimento em meios contendo 4 e 5% de xilose, no período de 36 horas, foram: TC-DT8 (0,210), TC-DT 13 (0,192), TC-DT64 (0,513), TC-DT81 (0,400) e TC-DT139 (0,408).

O meio contendo 2% de xilose proporcionou crescimento maior e mais acelerado. Isto porque, nesta condição (2% de xilose), as linhagens TC-DT8 (0,480), TC-DT64 (0,600), TC-DT81 (0,400) e TC-DT139 (0,400) obtiveram maior pico de crescimento celular já no período de 12 horas de incubação. Somente a linhagem TC-DT13 (0,746) obteve maior pico de crescimento no período de 24 horas (Figura 1).

Tanto o meio contendo 2% da xilose, quanto as linhagens TC-DT8, TC-DT13, TC-DT64, TC-DT81 e TC-DT139 que mais se destacaram em relação ao crescimento (maior capacidade metabólica de utilizar xilose como fonte de carboidrato e direcionar para o crescimento), foram selecionados para os experimentos subsequentes, ou seja: para a avaliação da fermentação de xilose e bioconversão em etanol, sob condições anaeróbicas e aeróbicas.

5.3.2 Fermentação de xilose para produção de etanol sem agitação

5.3.2.1 Crescimento celular, xilose residual e produção de etanol

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, avaliação do crescimento em diferentes concentrações de xilose (item 5.3.1), 5 linhagens TC-DT8, TC-DT13, TC-DT64, TC-DT81 e TC-DT139 foram selecionadas, de acordo com o maior crescimento, para a realização das fermentações sem agitação.

Referente ao crescimento celular, no intervalo de 36 horas de fermentação, observou-se um padrão de comportamento para a maioria das linhagens, isto porque o crescimento

celular obtido foi estatisticamente igual para todas as linhagens com exceção do *Bacillus* sp. TC-DT81 (0,303), que apresentou o menor crescimento neste período (Tabela 2).

A avaliação do perfil de crescimento obtido pelos intervalos de 0, 6, 12, 24, 30 e 36 horas também revelou um padrão de crescimento para a maioria das linhagens (TC-DT8, TC-DT13, TC-DT64, TC-DT81, TC-DT139), com exceção do *Bacillus* sp. TC-DT13, sendo que, esta linhagem apresentou os menores valores: DO 0,165; 0,252; 0,344; 0,462; 0,388 nos intervalos 0, 6, 12, 24 e 36 horas, respectivamente (Figura 2).

Com relação à produção de etanol, dentre as linhagens selecionadas, apenas o *Bacillus* sp. TC-DT64 não apresentou capacidade de converter xilose em etanol. Por outro lado, as linhagens que apresentaram essa capacidade produziram uma variação de 1,05 até 7,06 g L⁻¹, no período de 36 horas de incubação (Figura 3).

Bacillus sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8 obtiveram maior produção de etanol com 7,06 e 4,33 g L⁻¹ (36 horas), respectivamente, em relação a todas linhagens testadas (Figura 3). Quanto ao rendimento de conversão de substrato em produto ($Y_{e/s}$), *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8 apresentaram 0,49 e 0,28 g g⁻¹ e produtividade de 0,19 g L.h e 0,13 g L.h, respectivamente. Além disso, para ambas as linhagens, *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8, verificou-se rendimento elevado em etanol, de 95,9% e 55,8%; bem como menor taxa de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) - corroborando que o açúcar foi direcionado preferencialmente para formação de etanol (Tabela 3).

O trabalho de Nguyen et al. (2019), no qual empregou-se uma linhagem de *Scheffersonmyces stipitis* para fermentação de xilose, verificou-se uma produção de 4,8 g L⁻¹ de etanol. Tal trabalho revelou um resultado semelhante ao que foi aqui obtido pela linhagem *Paenibacillus* sp. TD-DT8 (4,33 g L⁻¹). Entretanto, na literatura não foram encontrados trabalhos utilizando *Paenibacillus* sp. para produção de etanol a partir de xilose como fonte de carbono. Sendo assim, esse trabalho torna-se pioneiro no emprego de *Paenibacillus* sp para a fermentação de xilose e bioconversão em etanol. Além disso, no trabalho de Soares et al. (2019), foi obtido o valor máximo de produção de etanol de 0,02 g L⁻¹, a partir de linhagens bacterianas isoladas do solo (*Dysgonomonas* sp., *Coprococcus* sp., *Sporomusa* sp., *Bacteroides* sp., *Sedimentibacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Ruminococcus* sp., *Clostridium* sp.), utilizando um meio contendo 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 3,0 g L⁻¹ bagaço de cana.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura, envolvendo a fermentação de xilose, emprega-se leveduras para tal procedimento. Como por exemplo, no estudo de Varize et al. (2018), onde duas linhagens de uma nova espécie de levedura (*Spathaspora piracicabensis*), isoladas de madeira podre, produziram etanol com quantidades entre 3,37 e 3,48 g L⁻¹ a partir de 2% de xilose (YEPX) sob agitação com 150 rpm/28 °C. Tais dados demonstraram que as linhagens bacterianas aqui testadas foram mais eficientes no acúmulo de etanol a partir de 20 g L⁻¹ de xilose.

O metabolismo da xilose em leveduras ocorre por meio da ação de duas enzimas, que são a xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). Em algumas leveduras, a enzima xilose redutase (XR) utiliza apenas a coenzima NADPH, para liberar NADP⁺. Enquanto que em outras leveduras, a enzima XR necessita de ambas as coenzimas (NADPH e NADH), liberando NADP⁺ e NAD⁺, nessa ordem. Em seguida, a enzima xilitol desidrogenase (XDH) que é dependente da coenzima NAD⁺, causa desbalanço de coenzimas, limitando o processo de fermentação de xilose para produção de etanol, pois essa específica dependência pode ocasionar um acúmulo de xilitol (Van Dijken et al., 1986).

Em condições de anaerobiose, as coenzimas utilizadas pelas principais enzimas envolvidas, xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), há um desbalanço ainda maior de coenzimas, pois a coenzima NADP⁺ pode ser reduzida via frutose-6-fosfato, e a coenzima NADH não pode ser oxidada na ausência de oxigênio. Portanto ocorre acúmulo de xilitol e, conseqüentemente, redução da produção de etanol (Jeffries, 2006). Por isso, o controle de oxigenação é um dos fatores fisiológicos de suma importância na fermentação de

xilose. Além disso, a aeração determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre crescimento celular e bioconversão (Du Preez, 1994; Furlan et al., 1994).

Já na fermentação de xilose empregando bactérias, a enzima xilose isomerase (XI) é capaz de transformar a xilose diretamente em xilulose, tornando-se possível outra via metabólica. Esta via não produz xilitol, o que acarreta em maior acúmulo de etanol. No entanto, ainda não foi descrita essa capacidade natural em leveduras. Desse modo, a aplicação de bactérias para produção de etanol a partir de xilose é um processo vantajoso.

No que concerne a quantificação de xilose ao final da fermentação (36 horas), as linhagens que obtiveram maior produção de etanol, *Bacillus* sp. TC-DT13 (7,06) e o *Paenibacillus* sp. TD-DT8 (4,33), apresentaram 3,7 g L⁻¹ e 4,2 g L⁻¹ de xilose residual (Figura 4).

5.3.3 Fermentação de xilose para produção de etanol com agitação

5.3.3.1 Crescimento celular, xilose residual e produção de etanol

Assim como no ensaio fermentativo em condições anaeróbicas, foi possível constatar que sob agitação todas as linhagens selecionadas também obtiveram um perfil de crescimento semelhante, nos diferentes intervalos avaliados de 0, 6, 12, 24, 30 e 36 horas. As linhagens apresentaram uma variação de crescimento entre 0,453 e 0,550 ao final da fermentação (36 horas), conduzida em 100 rpm. Ao final da fermentação (36 horas) não houve diferença estatística para o crescimento entre as linhagens (Tabela 4).

Em condição de agitação (100 rpm) a densidade ótica obtida (DO 600nm) foi maior em relação ao ensaio fermentativo realizado sem agitação (item 5.3.2.), obtendo-se em média DO 0,600 para todas as linhagens avaliadas (previamente selecionadas - item 5.3.1.) (Figura 5).

Sabe-se que em processos fermentativos aeróbicos (com agitação), condições de agitação e aeração influenciam diretamente no crescimento de microrganismos, pois, essas condições fazem com que haja dispersão tanto de bolhas como de ar. A consequência dessa dispersão se dá pelo suprimento de oxigênio, manutenção das células e também pelo aumento da transferência de calor e de massa (Wang et al., 1979; Lee, 1990). Portanto, o acúmulo de biomassa no processo envolvendo aerobiose é relativamente maior do que a fermentação em anaerobiose.

Quanto ao rendimento de conversão de substrato em produto ($Y_{e/s}$), *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8 apresentaram 0,49 e 0,28 g g⁻¹ de produtividade de 0,19 g L.h e 0,13 g L.h, respectivamente. Além disso, para ambas as linhagens, *Bacillus* sp. TC-DT13 e *Paenibacillus* sp. TC-DT8, verificou-se rendimento elevado em etanol, de 95,9% e 55,8%; bem como menor taxa de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) - corroborando que o açúcar foi direcionado preferencialmente para formação de etanol (Tabela 3).

Quanto à produção de etanol, o experimento fermentativo revelou que todas as linhagens foram estatisticamente iguais, com produção média de 1,59 g L⁻¹ até 2,6 g L⁻¹ (Figura 7). Além disso, as linhagens apresentaram rendimento médio de conversão de substrato em produto ($Y_{e/s}$) 0,1 g g⁻¹, produtividade média de 0,050 g L.h, rendimento médio de 21,39% e taxa média de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) de 0,1 gg (Tabela 5). Mori e colaboradores (2019) produziram etanol em aerobiose utilizando 2% de glicose como fonte de carbono empregando a linhagem fúngica *P. sordida* YK-624, os qual obteve menor quantidade deste produto (0,6 g L⁻¹ em 48 horas), quando comparada com as linhagens testadas no presente estudo.

Neste contexto, justifica-se que a aeração pode ter sido o fator que influenciou o menor rendimento etanólico obtido. Isto porque, já é sabido que em processos fermentativos conduzidos sob aeração a produção de etanol é prejudicada. Em tais condições, o açúcar consumido é direcionado para a produção de biomassa e não para produção de etanol. Para

isso, baixos níveis de oxigênio são requeridos para que a produção ocorra de maneira mais eficiente (Schneider et al., 1983).

Referente à quantificação de xilose ao final da fermentação (36 horas), as linhagens apresentaram quantidades de xilose residual sem diferença estatística obtendo cerca de 4 g L^{-1} (Figura 7).

5.4. Conclusões

Conclui-se que as linhagens bacterianas testadas, *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* sp., possuem alta capacidade de se desenvolver em meios contendo xilose como única fonte de carbono. Algumas linhagens foram capazes de tolerar concentrações mais elevadas de xilose. Além disso, as linhagens selecionadas para os ensaios de fermentação foram eficientes na bioconversão de xilose em etanol, produzindo quantidades significativas em relação a linhagens da literatura. Em adição, este trabalho é pioneiro em demonstrar a produção de etanol utilizando uma linhagem de *Paenibacillus* sp. A utilização dessas bactérias para produção de etanol representa alternativas biotecnológicas promissoras.

Agradecimentos

Esse trabalho foi apoiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação do Estado de Sergipe (FAPITEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ) e Financiadora de Estudos e Projetos – Brasil (FINEP).

5.5. Referências Bibliográficas

Caballero, A., Ramos, J.L. (2017) Enhancing ethanol yields through D-xylose and L-arabinose co-fermentation after construction of a novel high efficient L-arabinose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Microbiology* 163, 442–452.

Champreda, V., Mhuanthong, W., Lekakarn, H., Bunternsook, B., Kanokratana, P., Zhao, X.Q., Zhang, F., Hiroyuki, I., Fujii, T., Eurwilaichitr, L. (2019). Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: From nature to application. *J BiosciBioeng* 128, 637-654. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.05.007.

Conab (Companhia de nacional abastecimento) (2019). Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2859-producao-de-etanol-no-brasil-mantem-recorde-e-alcanca-33-58-bilhoes-de-litros>>. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

Du Preez, J.C. (1994) Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme MicrobTechnol* 6,944-956.

El Asli, A., Qatibi, A.I. (2009). Ethanol production from olive cake biomass substrate. *BiotechnolBioprocE* 14, 118-122. DOI: 10.1007/s12257-008-0071-y.

Furlan, S.A., Bouilloud, P., Castro, H.F. (1994) Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochem* 29, 657-662.

Gerbens-Leenes, P.W., Lienden, A.R., Hoekstra, A.Y, Meer, Th.H. (2012) Biofuel scenarios in a water perspective: The global blue and green water footprint of road transport in 2030. *Global Environmental Change* 22, 764–775.

- Haldar, D., Sen, D., Gayen, K. (2016). A review on the production of fermentable sugars from lignocellulosic biomass through conventional and enzymatic route - a comparison. *Int J Green Energy* 13, 1232-1253.
- Ho, C.Y., Chang, J.J., Lee, S.C., Chin, T.Y., Shih, M.H., Li, W.H., Huang, C.C. (2012). Development of cellulosic ethanol production process via co-culturing of artificial cellulosomal *Bacillus* and kefir yeast. *Appl. Energy* 100, 27–32. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.03.016.
- Huang, S., Liu, T., Peng, B., Geng, A. (2018) Enhanced ethanol production from industrial lignocelluloses hydrolysates by a hydrolysate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. DOI: 10.1007/s00449-019-02090-0
- IAL. (2008) Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4^a ed. 1^a ed. digital. São Paulo. 1020 p.
- Jackson, S., Nicolson, S.W. (2002) Xylose as a néctar sugar: from biochemistry to ecology, *Comp BiochemPhysiol B* 131, 613-620.
- Jeffries, T.W. (2006) Engineering yeasts for xylose metabolism. *CurrOpinBiotechnol* 17, 320-326.
- Kim, D., Woo, H. (2018). Deciphering bacterial xylose metabolism and metabolic engineering of industrial microorganisms for use as efficient microbial cell factories. *ApplMicrobiolBiotechnol* 102, 1-10. DOI: 10.1007/s00253-018-9353-2.
- Ko, J.K., Um, Y., Woo, H.M., Kim, K.H., Lee, S-M. (2016) Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway, *Bioresource Technology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.124>
- Lee, C.K., Sandler, S.I. (1990) VANCOMYCIN PARTITIONING IN AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS: EFFECTS OF PH, SALTS AND AFFINITY LIGAND. *BiotechnolBioeng* 35, 408-416.
- Madhavan A, Srivastava A, Kondo A, Bisaria VS. (2012) Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biotechnol* 32,22–48.
- Mekonnen, M.M., Romanelli, T.L., Ray, C., Hoekstra, A.Y., Liska, A.J., Neale, C.M.U. (2018) Water , Energy , and Carbon Footprints of Bioethanol from the U . S .and Brazil. *Environ. SceinceTechnol* 52, 14508–14518.
- Miller, G.L.(1959) Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *AnalChem* 31, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mori, T., Kondo, O., Kawagishi, H., Hirai, H. (2019) Effects of Glucose Concentration on Ethanol Fermentation of White-Rot Fungus *Phanerochaetesordida* YK-624 Under Aerobic Conditions. *CurrMicrobiol* 76, 263-269. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-018-01622-3>
- Nguyen, D.T.T., Praveen, P., Loh, K.C. (2019) Co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Scheffersomyces stipitis* immobilized in polymeric membranes for fermentation of glucose and xylose to ethanol. *Biochemical Engineering Journal* 145, 145–152.

- Nielsen J., Keasling J.D. (2016) Engineering cellular metabolism. *Cell* 164(6), 1185–1197.
- Nikolic S., Mojovic, L., Pejin, D., Rakin, M., Vukasinovic, M. (2010) Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass Bioenergy* 34, 1449-1456.
- Rodrigues, I.S.V., Silva, C.G.S., Silva, R.S., Dolabella, S.S., Fernandes, M.F., Fernandes, R.P.M. (2019) Screening of bacterial extracellular xylanase producers with potential for cellulose pulp biobleaching. *ActaSciBiolSci* 41, 1-10. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v41i1.42101>
- Romero-García, J., Martínez-Patiño, C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E. (2016). Ethanol production from olive stone hydrolysates by xylose fermenting microorganisms. *Bioethanol* 2, 10.1515/bioeth-2016-0002.
- Sánchez-Nogué, V., Karhumaa, K. (2015). Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. *Biotechnol Lett* 37, 761-772.
- Schneider, B., Maleszka, R., Neirinck, L., Veliky, I.A., Wang, P.Y., Chan, Y.K. (1983) Ethanol production from D-xylose and several other carbohydrates by *Pachysolentamnophilus* and other yeast. *AdvBiochemEngBiotechnol* 27, 57-71.
- Soares, L.A., Silva Rabelo, C.A.B., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A. (2019) Screening and Bioprospecting of Anaerobic Consortia for Biofuel Production Enhancement from Sugarcane Bagasse. *ApplBiochemBiotechnol*, 1-20. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03074-2>
- Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products, in: Chandel, Anuj Kumar, Silveira, M.H.L. (Eds.), *Advances in Sugarcane Biorefinery*. Elsevier Inc. Oxford, United Kingdom 197–212. doi:10.1016/C2015-0-02033-0
- Tu, W.C., Hallett J.P. (2019) Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 20, 11-17.
- Van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbio. Lett* 32, 199-224.
- Varize, C.S., Cadete, R.M.; Lopes, L.D., Christofoleti-Furlan, R.M., Lachance, M.A., Rosa, C.A., Basso, L.C. (2018) *Spathaspora piracicabensis* f. a., sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 525-531. DOI: 10.1007/s10482-017-0974-8.
- Vieira, I.P.V., Cordeiro, G.T., Gomes, D.E.B., Melani, R.D., Vilela, L.F., Domont, G.B., Mesquita, R.D., Eleutherio, E.C.A., Neves, B.C. (2019) Understanding xylose isomerase from *Burkholderia cenocepacia*: insights into structure and functionality for ethanol production. *AMB Express* 9(73), 1-12. DOI: 10.1186/s13568-019-0795-4
- Wang, D.C.I., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E., Lilly, M.D. (1979) Fermentation and enzyme technology. *New York: John Wiley & Sons*, 374.

Tabela 1. Linhagens de bactérias isoladas do solo

Linhagens	Gênero/espécie
TC-DT 8	<i>Paenibacillus</i>
TC-DT 9	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 12	<i>Bacillus subtilis/ Bacillus anyloliquefaciens</i>
TC-DT 13	<i>Bacillus pumilus/ Bacillus safensis</i>
TC-DT 19	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 21	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT 22	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 26	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT 28	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 61	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 64	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 81	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 109	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 110	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 116	<i>Bacillus cereus</i>
TC-DT 139	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 150	<i>Bacillus sp</i>
TC-DT 159	<i>Bacillus sp</i>

Tabela 2. Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) em 36h de fermentação sem agitação.

Linhagens	DO (600 nm)
TC-DT 8	0,568 ± 0,038 ^a
TC-DT 13	0,530 ± 0,018 ^a
TC-DT 64	0,453 ± 0,09 ^a
TC-DT 81	0,541 ± 0,005 ^a
TC-DT 139	0,550 ± 0,040 ^a

Resultados obtidos no tempo de 36h de fermentação. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

Tabela 3. Dados cinéticos da fermentação sem agitação

Linhagem	$Y_{c/s}$ g g	P_x g L.h	P_s g L.h	$Y_{e/s}$ g g	P_e g L.h	Rendimento (%)
TC-DT8	0,021	0,009	0,441	0,285	0,125	55,8
TC-DT13	0,028	0,011	0,399	0,490	0,196	95,9
TC-DT81	0,019	0,008	0,434	0,088	0,038	17,2
TC-DT139	0,024	0,009	0,379	0,073	0,027	14,3

$Y_{c/s}$ Fator de conversão do substrato à célula (g g)

P_x Produtividade em célula (g L.h)

P_s Velocidade média do consumo do substrato (g L.h)

$Y_{e/s}$ Fator de conversão do substrato a etanol (g g)

P_e Produtividade em etanol (g L.h)

Rendimento em etanol (%)

Tabela 4. Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) em 36h de fermentação com agitação.

Linhagens	DO (600 nm)
TC-DT 8	$0,334 \pm 0,20^{ab}$
TC-DT 13	$0,406 \pm 0,03^a$
TC-DT 64	$0,334 \pm 0,19^{ab}$
TC-DT 81	$0,303 \pm 0,003^b$
TC-DT 139	$0,338 \pm 0,048^a$

Resultados obtidos no tempo de 36h de fermentação. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

Tabela 5. Dados cinéticos da fermentação com agitação

Linhagem	Y_{c/s} g g	P_x g L.h	P_s g L.h	Y_{e/s} g g	P_e g L.h	Rendimento (%)
TC-DT8	0,035978	0,015778	0,438541	0,100713	0,044167	19,70895899
TC-DT13	0,032577	0,014722	0,451914	0,098347	0,044444	19,2460064
TC-DT64	0,027421	0,012583	0,458896	0,145276	0,066667	28,42979489
TC-DT81	0,0328	0,015028	0,458158	0,458158	0,072222	30,84852169
TC-DT139	0,032859	0,015278	0,109332	0,109332	0,050833	21,39575735

Y_{c/s} Fator de conversão do substrato à célula (g g)

P_x Produtividade em célula (g L.h)

P_s Velocidade média do consumo do substrato (g L.h)

Y_{e/s} Fator de conversão do substrato a etanol (g g)

P_e Produtividade em etanol (g L.h)

Rendimento em etanol (%)

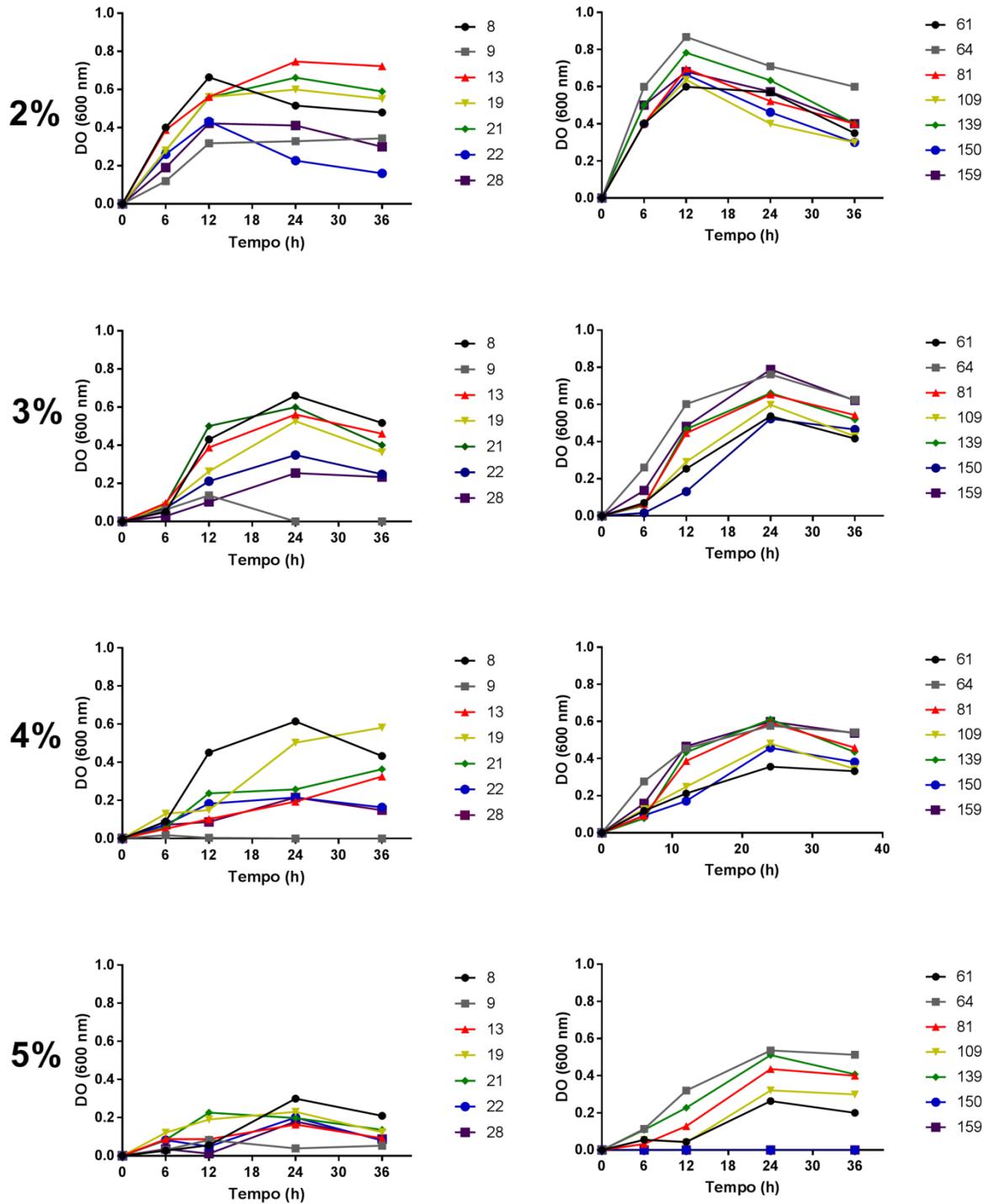


Figura 1. Perfil de crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas com diferentes concentrações de xilose (2%, 3%, 4% e 5%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

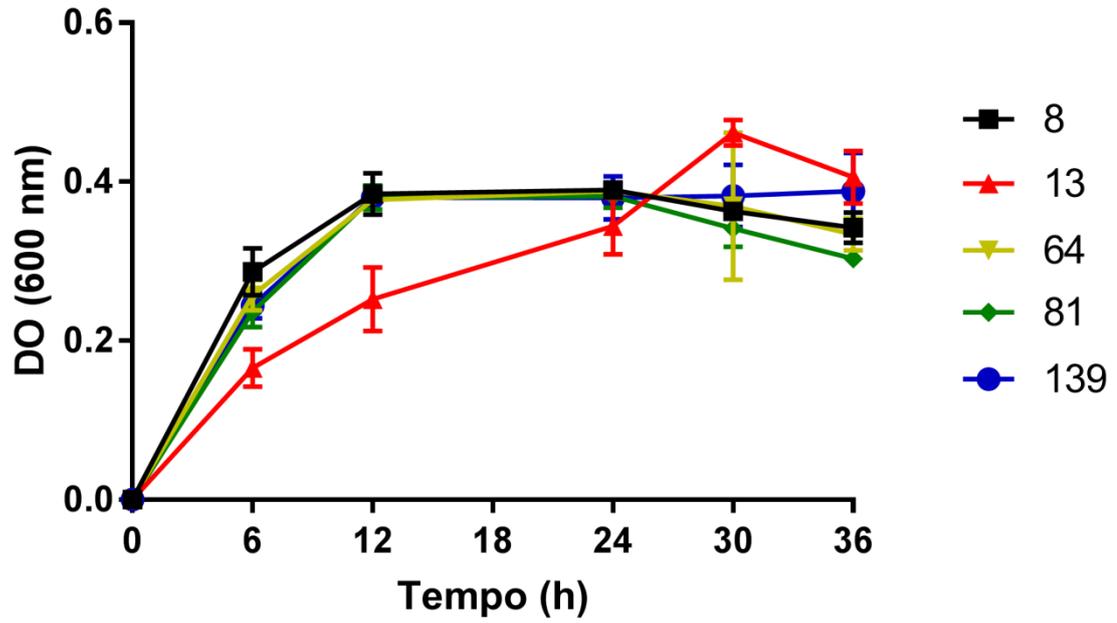


Figura 2. Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas com 2% de xilose à 30 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

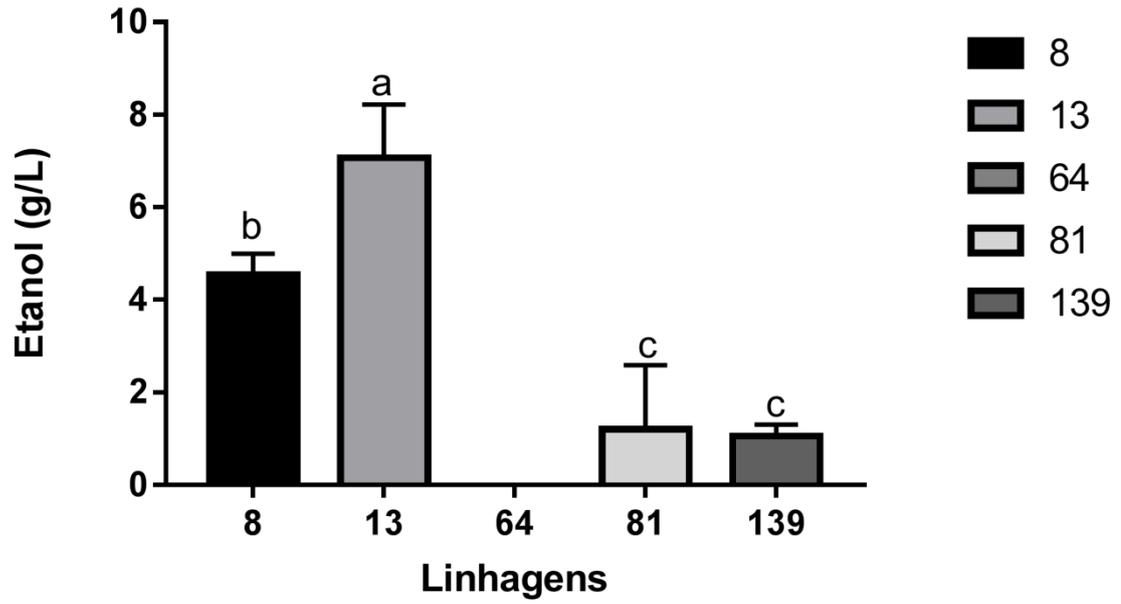


Figura 3. Produção de etanol sob processo fermentativo a 30°C em 36 horas. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

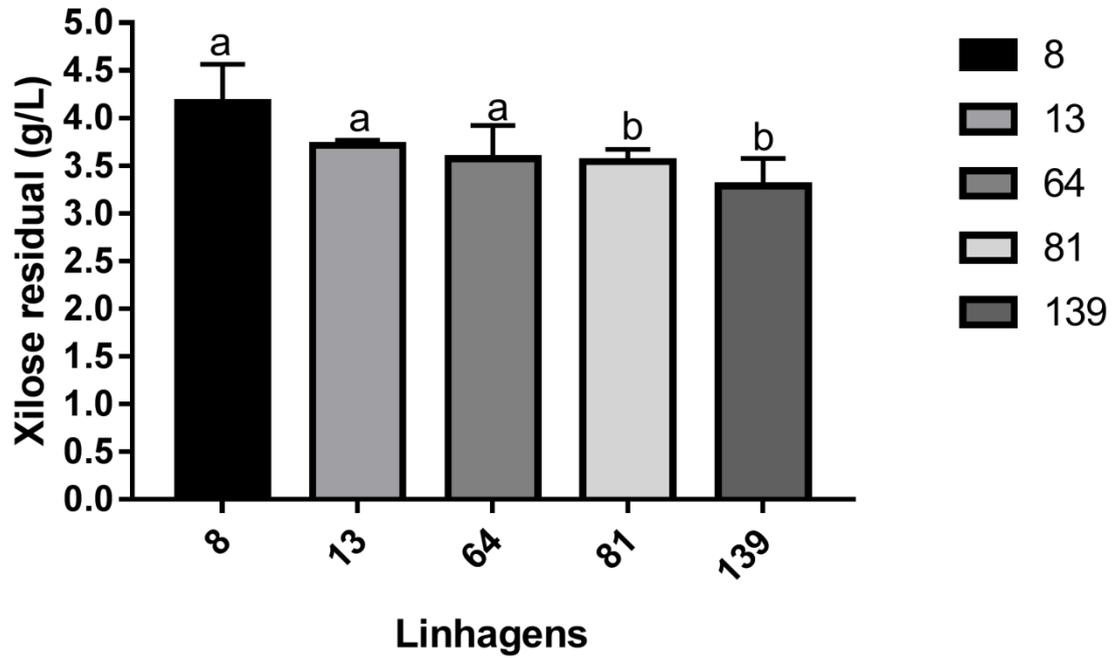


Figura 4. Quantificação de xilose residual no processo fermentativo a 30 °C em 36 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

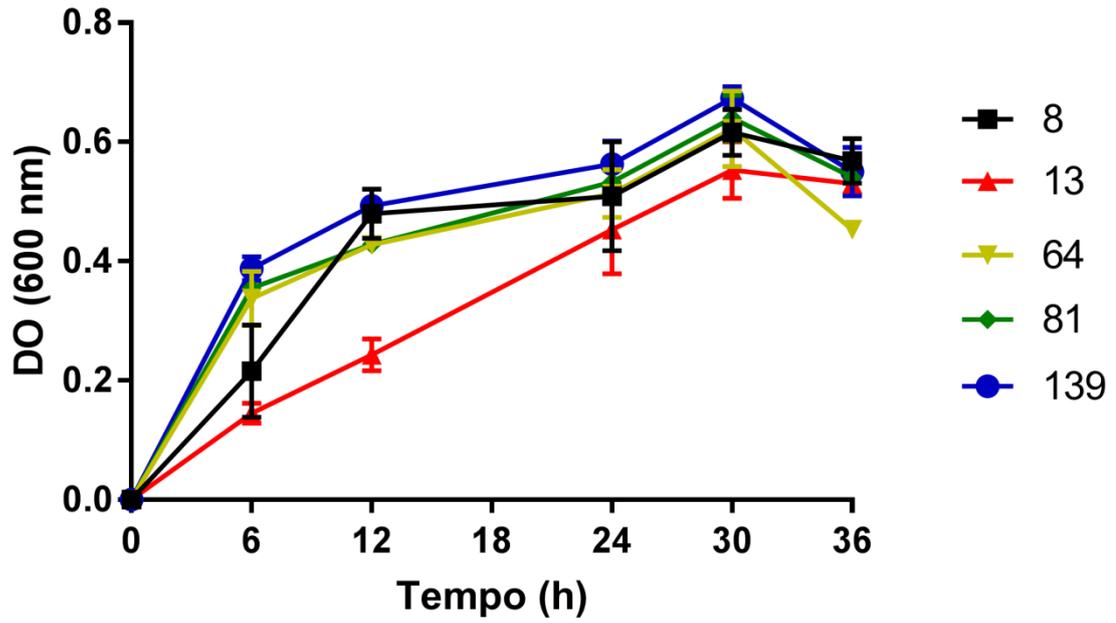


Figura 5. Crescimento celular das linhagens medido por DO (600 nm) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas com 2% de xilose à 30 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

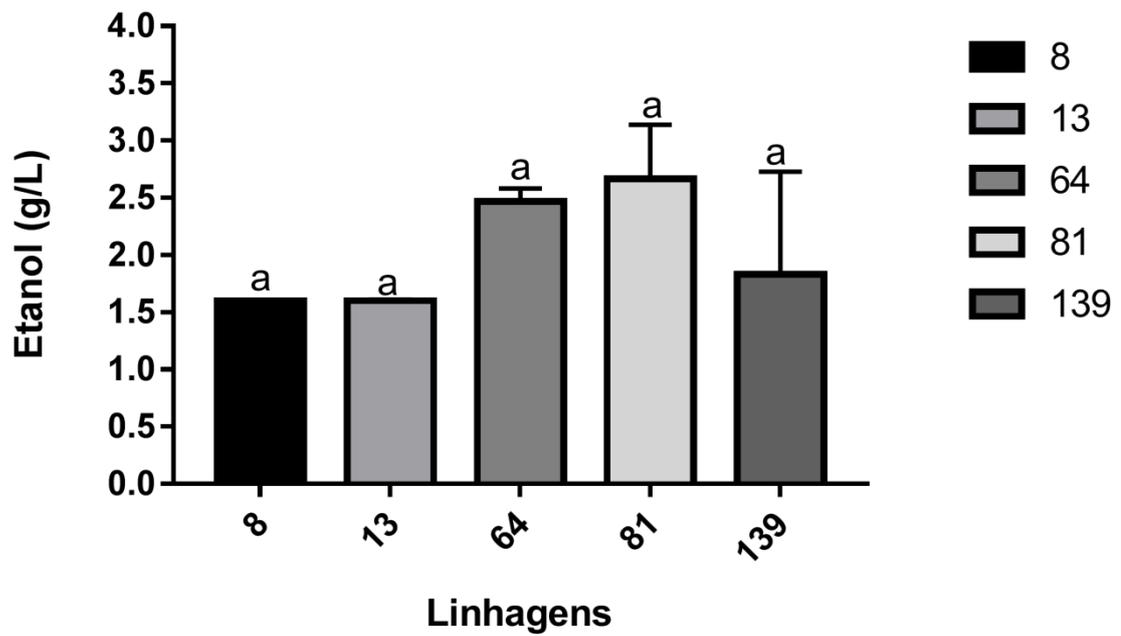


Figura 6. Produção de etanol sob processo fermentativo a 100 rpm/30°C em 36 horas. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

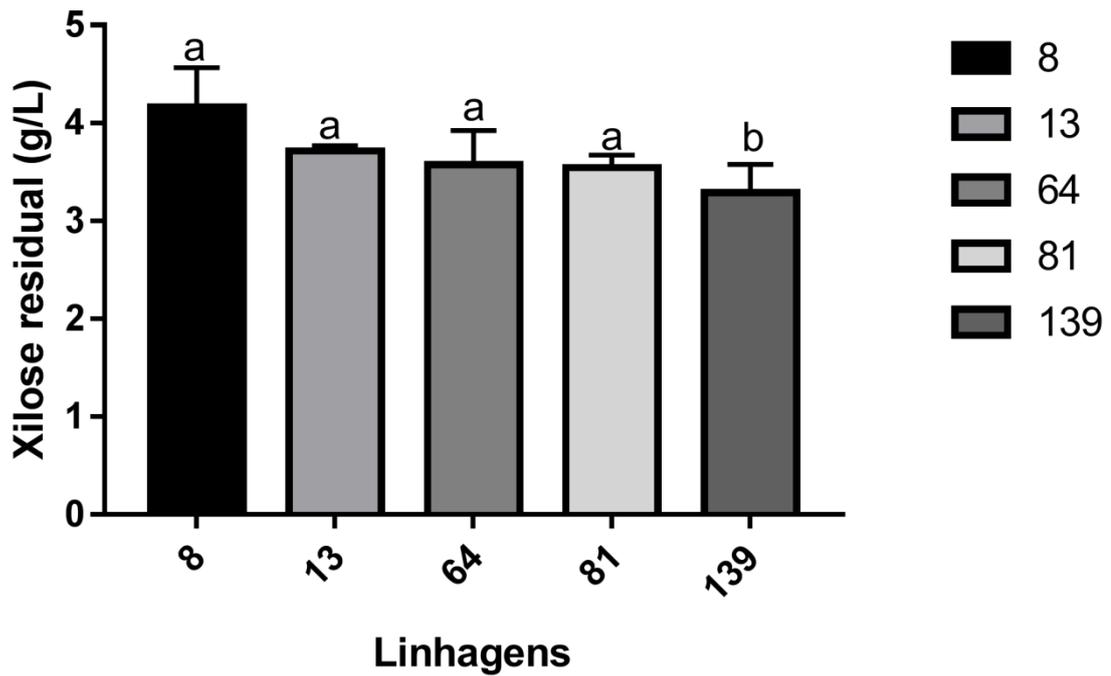


Figura 7. Quantificação de xilose residual no processo fermentativo a 100 rpm/30°C em 36 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores apresentados foram com as médias das triplicatas e as letras diferentes diferem significativamente com 0,05% de significância (teste de Tukey).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que a utilização de bactérias provenientes do solo são microrganismos que possuem alta aplicabilidade biotecnológica. Podendo essas, representarem uma alternativa promissora na produção de enzimas de interesse industrial, como as xilanases, utilizando resíduos agro-industriais. Além disso, essas bactérias também possuem potencial na produção de biocombustível, como o bioetanol a partir de processos fermentativos utilizando a xilose. Destacando o *Bacillus* sp. TC-DT13, tanto para produção de xilanase quanto para produção de etanol, e o *Paenibacillus* sp. TC-DT8, para a produção de etanol. Contudo, fazem-se necessários estudos auxiliares com relação a diversos aspectos. Dentre eles, a viabilidade econômica relacionada à aplicação desses microrganismos em processos de escala industrial.

ANEXOS

Figura 1A. Artigo 1 aceito pelo periódico Preparative Biochemistry and Biotechnology



Preparative Biochemistry and Biotechnology

Taylor & Francis

ISSN: 1082-6068 (Print) 1532-2297 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/lpbb20>

Production of xylanases by *Bacillus sp.* TC-DT13 in solid state fermentation using bran wheat

Isabela da Silva Vasconcelos Rodrigues, Jessyca Teles Barreto, Brenda Leite Moutinho, Mayara Mendes Gonçalves Oliveira, Rafael Salomão da Silva, Marcelo Ferreira Fernandes & Roberta Pereira Miranda Fernandes

To cite this article: Isabela da Silva Vasconcelos Rodrigues, Jessyca Teles Barreto, Brenda Leite Moutinho, Mayara Mendes Gonçalves Oliveira, Rafael Salomão da Silva, Marcelo Ferreira Fernandes & Roberta Pereira Miranda Fernandes (2019): Production of xylanases by *Bacillus sp.* TC-DT13 in solid state fermentation using bran wheat, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, DOI: [10.1080/10826068.2019.1663536](https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1663536)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1663536>

 Published online: 13 Sep 2019.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)
