



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS**  
**PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA**  
**AMAZÔNIA LEGAL (BIONORTE)**

**VICTOR HUGO GOMES SALES**

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS EM CONTEÚDO RUMINAL**  
**DE BOVINOS**

**PALMAS (TO)**

**2019**

**VICTOR HUGO GOMES SALES**

**Prospecção de bactérias celulolíticas em conteúdo ruminal de bovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE) como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Emerson Adriano Guarda

Co-Orientador: Dr. Wardsson Lustrino Borges

**PALMAS (TO)**

**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- S163p Sales, Victor Hugo Gomes.  
Prospecção de bactérias celulolíticas em conteúdo ruminal de bovinos. /  
Victor Hugo Gomes Sales. – Palmas, TO, 2019.  
111 f.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus  
Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em  
Biodiversidade e Biotecnologia, 2019.  
Orientador: Emerson Adriano Guarda  
Coorientador: Wardsson Lustrino Borges
1. Prospecção de bactérias celulolíticas. 2. Conteúdo ruminal de bovinos.  
3. Celulases. 4. Otimização de processo. I. Título

**CDD 660.6**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**VICTOR HUGO GOMES SALES**

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS EM CONTEÚDO RUMINAL  
DE BOVINOS**

Tese apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Palmas, Curso de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE) foi avaliada para a obtenção do título de Doutor e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

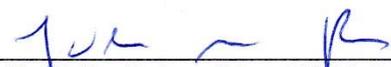
Orientador: Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda

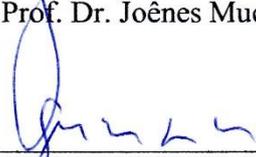
Coorientador: Dr. Wardsson Lustrino Borges

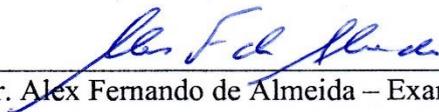
Data de aprovação: 14/02/2019.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda - Orientador, UFT (Presidente)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Joênes Mucci Pelúzio – Examinador interno, UFT

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Guilherme Nobre L. do Nascimento – Examinador interno, UFT

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida – Examinador externo, UFT

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Leandro Kanamaru Franco de Lima – Examinador externo, EMBRAPA

Dedico o presente estudo aos meus pais, Celso dos Reis Sales *in memoriam* e Mara Rúbia Gomes Sales, por serem exemplos em minha vida. Dedico também a minha esposa Elisa Maria de Oliveira, pela compreensão, ajuda e companheirismo durante a realização deste trabalho e as minhas filhas Maria Clara de Oliveira Gomes Sales e Mariana de Oliveira Gomes Sales que tornam a minha vida completa.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer inicialmente a Deus pela minha vida e por todo amor, misericórdia, consolação, proteção, força, educação e direcionamento que Ele me concedeu.

Ao meu orientador Dr. Emerson Adriano Guarda por ter propiciado e concebido a realização desse trabalho e também pelas as orientações durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Wardsson Lustrino Borges, pela dedicação, pelos ensinamentos e pela amizade durante todo o período de realização do doutorado.

A Universidade Federal do Tocantins em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE).

A Embrapa Amapá, em especial aos pesquisadores Dr. Adílson Lopes Lima, Dra. Cristiane Ramos de Jesus Barros, Dr. Ricardo Adaime e Ma Jurema do Socorro Azevedo Dias por ter cedido a infraestrutura para a realização de alguns experimentos no Bloco de Laboratório de Proteção de Plantas. Agradecer também ao apoio dos analistas Ma. Adriana Bariani e Me. Leandro Fernandes Damasceno e ao assistente Jacivaldo Barbosa da Costa pela a ajuda durante a realização do doutorado.

A Embrapa Agrobiologia, em especial ao pesquisador Dr. Jerri Edson Zilli por ter cedido a infraestrutura para a realização da extração e sequenciamento do DNA dos isolados celulolíticos desse trabalho. Agradecer também o apoio da analista Ma. Natalia Neutzling Camacho pela grande ajuda durante o processo de extração e sequenciamento do DNA.

Ao meu querido amigo Dr. Harvey Alexander Villa-Velez pela a ajuda nos estudos com a Rede Neural Artificial, contribuição significativa para o trabalho.

A minha esposa, Elisa Maria de Oliveira, pelo carinho, força, companheirismo e compreensão durante esse período, as nossas filhas, Maria Clara de Oliveira Gomes Sales e Mariana de Oliveira Gomes Sales pela compreensão e carinho, são a razão da minha existência.

A minha mãe Mara Rúbia, meus irmãos, Michelle e Paulo Victor, minha cunhada Ana Claudia e minhas sobrinhas e sobrinhos, Maria Fernanda, Maria Eduarda, Amanda Vitória, Celso Neto e João Guilherme, por todo carinho, amor, esforço e apoio.

Ao meu pai *in memoriam* por em vida ter proporcionado para mim e meus irmãos a educação de boa qualidade e nos incentivado a buscar sempre o conhecimento.

A todos os professores, pesquisadores, colegas, amigos e funcionários da UFT, IFAP, Embrapa Amapá e Embrapa Agrobiologia que ajudaram nessa caminhada. Aqueles que em qualquer momento se colocaram disponíveis, sem citar nomes, para não correr o risco de esquecer alguém, pois tantos foram aqueles que colaboraram para esta realização.

## RESUMO

A procura por novas fontes de matérias-primas para a produção de biocombustíveis vem sendo amplamente estudada no meio acadêmico para consolidar a matriz energética dos países com a redução da utilização das fontes fósseis. O presente trabalho objetivou prospectar bactérias celulolíticas a partir de biomassa lignocelulósica residual (Conteúdo ruminal de bovinos) com potencial aplicação na produção de etanol de segunda geração. Foi realizada inicialmente a prospecção de bactérias celulolíticas em conteúdo ruminal de bovinos, em seguida foi quantificado a produção de celulase total (Fpase) extracelular produzida por essas bactérias em fermentação submersa em meio mineral suplementado com bagaço de cana sem tratamento hidrolítico, bem como, a caracterização e identificação dos isolados por biologia molecular. Para alcançar os objetivos propostos foi realizada o isolamento das bactérias em meio BHM com Carboximetil-celulose (CMC), sendo revelada com vermelho Congo. Após um isolado foi selecionado e empregado estratégias para aumentar a produção de celulase, para selecionar os fatores nutricionais do meio de cultivo com efeitos significativos positivos no processo de produção de celulase um delineamento Plackett-Burman e Regressão Multivariável (*Stepwise*) foram utilizadas. A partir da pré-seleção dos melhores parâmetros para a produção de celulase, foi realizado um estudo de otimização do processo utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e modelagem por Redes Neurais Artificiais (RNA), para identificar as melhores condições nutricionais que maximizam a produção da enzima. Foram isoladas 16 bactérias com capacidade de degradar celulose, dessas, 15 foram amplificadas no 16S rDNA e identificadas usando o banco de dados do Genbank da NCBI, resultando em cinco diferentes gêneros (*Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas* e *Klebsiella*). Com produção de celulase variando de 0,34 a 0,63 FPU/mL. O isolado V13 (BR 13961) foi selecionado para o processo de otimização por estar classificado como de média eficiência. Os fatores nutricionais pré-selecionados (Ureia,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e extrato de levedura) apresentaram efeitos significativo positivo no processo de produção de celulase para esse isolado. A otimização por Redes Neurais apresentou um modelo matemático mais ajustado aos dados experimentais, sendo a arquitetura *feed-forward* com três neurônios na camada oculta, função de transferência “trainlm” e função de treinamento “radbas” apresentando aumento na produção de celulase em 2,13 vezes.

**Palavras-chaves:** Conteúdo ruminal bovino. Bactérias celulolíticas. Modelagem matemática.

## ABSTRACT

The search for new sources of raw materials for the production of biofuels has been widely studied in the academic world to consolidate the energy matrix of countries with the reduction of the use of fossil sources. The present work aimed to prospect cellulolytic bacteria from residual lignocellulosic biomass (ruminal content of cattle) with potential application in the production of second generation ethanol. Cellulolytic bacteria were prospected for ruminal bovine contents, after which the total extracellular cellulase production (Fpase) produced by these bacteria was quantified in submerged fermentation in mineral medium supplemented with sugarcane bagasse without hydrolytic treatment, as well as characterization and identification of isolates by molecular biology. In order to reach the proposed objectives, the isolation of the bacteria in BHM medium with Carboxymethylcellulose (CMC) was performed, being developed with Congo red. After an isolate was selected and employed strategies to increase cellulase production, to select the nutritional factors of the culture medium with positive effects in the cellulase production process a Plackett-Burman and Multivariable Regression (Stepwise) were used. From the pre-selection of the best parameters for the production of cellulase, a process optimization study was carried out using a Rotational Central Compound Design (DCCR) and Artificial Neural Network (RNA) modeling to identify the best nutritional conditions that maximize the production of the enzyme. Sixteen bacteria capable of degrading cellulose were isolated, 15 of which were amplified in 16S rDNA and identified using the NCBI Genbank database, resulting in five different genera (*Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas* and *Klebsiella*). With cellulase production ranging from 0.34 to 0.63 FPU / mL. Isolate V13 (BR 13961) was selected for the optimization process because it is classified as medium efficiency. The pre-selected nutritional factors (Urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and yeast extract) had significant positive effects on the cellulase production process for this isolate. The optimization by Neural Networks presented a mathematical model more adjusted to the experimental data, being the feed-forward architecture with three neurons in the hidden layer, transfer function "trainlm" and training function "radbas" presenting increase in the production of cellulase in 2.13 times.

**Keywords:** Bovine ruminal content. Cellulolytic bacteria. Mathematical modeling.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Projeção do consumo mundial de energia até 2040, pelos membros e não membros da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).....	17
Figura 2. Consumo de energia nos países não membros OECD.....	17
Figura 3. Consumo mundial de energia por tipo de fonte, relatório da EIA .....	18
Figura 4. Atlas comparativo da produção de energias renováveis nos anos de 1975 e 2015 .....	18
Figura 5. Operações unitárias para a obtenção de álcool a partir de biomassa.....	23
Figura 6. Sistema digestório bovino.....	25
Figura 7. Halo de degradação de Carboximetil celulose de alguns isolados do conteúdo ruminal. A) BR13819, Alta capacidade; B) BR13864, Média capacidade; C) BR13818, baixa capacidade; .....	34
Figura 8. Dendrograma resultante da análise de 16 isolados (com base no índice enzimático e atividade FPásica) obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância de Mahalanobis como medida de distância. O valor do coeficiente de correlação (r) é de 0,769.....	36
Figura 9. Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A árvore com a maior probabilidade de log (-7754.33) é mostrada envolvendo 38 sequências nucleotídicas. Havia um total.....	37
Figura 10. Isolado V13 BR13861. A) Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei; B) Atividade celulolítica em meio sólido suplementado com CMC e revelado com vermelho congo.....	60
Figura 11. Gráficos A) Valores observados versus valores preditos pelo modelo matemático da produção de celulase em um intervalo de 95% de confiança e B) Probabilidade normal da análise multivariável (Stepwise). .....	62
Figura 12. Gráficos do delineamento Plackett-Burman A) Diagrama de Pareto; B) Histograma da distribuição normal dos dados; C) Valores preditos versus valores observados. ....	63
Figura 13. Diagrama de Pareto do Delineamento Central Composto Rotacional no processo de otimização da produção de celulase pelo isolado celulolítico.....	65
Figura 14. Superfícies de resposta e gráfico de contorno dos fatores nutricionais na produção de celulase total pelo isolado. ....	66
Figura 15. Arquitetura feed-forward que apresentou melhor ajuste para a simulação da produção de celulase total (FPU/mL). ....	69
Figura 16. Análise de resíduos obtidos da melhor rede neural: função de treinamento “trainlm”, arquitetura feed-forward, função de transferência “radbas” e número de neurônios “3”. ....	69
Figura 17. Simulação da produção de celulase utilizando a RNA. ....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nichos tróficos e principais produtos de espécies bacterianas e Archaea. ....	28
Tabela 2. O índice enzimático e atividade FPase (FPU/mL) livre de células dos isolados.....	35
Tabela 3. Comparação das sequências do gene 16S rRNA dos isolados obtidos com as sequências dos genes 16S rRNA no GenBank. ....	38
Tabela 4. Delineamento Plackett & Burman para composição do meio de cultivo para produção de FPase. ....	56
Tabela 5. Delineamento Central Composto Rotacional para três fatores nutricionais previamente selecionados para otimizar a produção de FPase. ....	57
Tabela 6. Matriz dos delineamentos experimentais de seleção dos fatores nutricionais e os dados de resposta para a produção de celulase total .....	61
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) da regressão multivariável (Stepwise) para a seleção dos fatores nutricionais do meio de cultivo submerso para a produção de celulase pelo isolado. ....	61
Tabela 8. Matriz do DCCR no processo de otimização da produção de celulase total. ....	64
Tabela 9. Matriz dos dados para a modelagem matemática por redes neurais artificiais.....	67
Tabela 10. Melhores resultados e validação estatística da análise de redes neurais artificiais.	68

## LISTA DE SIGLAS

- AC – Atividade celulolítica
- AEO – *Annual Energy Outlook*
- ANOVA – Análise de variância
- ARM-Stepwise – Análise de regressão Multivariável (*Stepwise*)
- ART – Açúcares redutores
- BCA – Bagaço de cana-de-açúcar
- BHM – *Bushnell Haas Medium*
- BioH<sub>2</sub> – Biohidrogênio
- CMC – Carboximetil-celulose
- CRB – Conteúdo ruminal bovino
- CRB-JD – Coleção Johanna Döbereiner
- DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DCCR – Delineamento Central Composto Rotacional
- DNS – Ácido dinitro-3,5-salicílico
- FPU – *Filter Paper Unit*
- IEA – *International Energy Agency*
- IEO – *International Energy Outlook*
- INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- MRE% – Erro médio relativo
- MSE – Erro médio quadrático
- NCBI – *National Center Biotechnology Information*
- NREL – *National Renewable Energy Laboratory*
- OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*
- OVAT – *One Variable At a Time*
- PB – Delineamento em Plackett-Burman
- R<sup>2</sup>ajustado – Coeficiente de determinação ajustado
- RNA – Redes Neurais Artificiais
- SISGEN – Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado do Ministério do Meio Ambiente
- UPGMA - *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO .....</b>	<b>14</b>
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
4.1 Consumo energético mundial .....	16
4.2 Biorrefinarias .....	19
4.2.1 Biorrefinarias de bioetanol .....	20
4.2.1.1 Matérias-primas.....	20
4.2.1.1.1 Fontes sacarinas e amiláceas .....	21
4.2.1.1.2 Fontes lignocelulósica .....	21
4.2.1.1.3 Biomassa aquática .....	22
4.2.2 Produção de Bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica .....	22
4.2.3 Uso da biomassa lignocelulósica para produção de outros biocombustíveis .....	23
4.2.3.1 Produção de biohidrogênio (BioH <sub>2</sub> ) .....	24
4.2.3.2 Produção de Metano .....	24
4.3 Rúmen bovino .....	25
4.4 Micro-organismos associados ao rúmen bovino .....	26
4.5 Aproveitamento biotecnológico .....	29
4.6 Perspectivas futuras .....	30
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>30</b>
<b>ARTIGO 1 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICA EM CONTEÚDO RUMINAL BOVINO .....</b>	<b>29</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1 Isolamento das bactérias celulolíticas .....	31
2.2 Índice enzimático .....	32
2.3 Cultivo submerso .....	32
2.4 Atividade celulase total (FPase).....	33
2.4. Sequenciamento do gene 16S rDNA.....	33
2.5. Análise de agrupamento .....	34

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>40</b>
<b>COVER LETTER.....</b>	<b>48</b>
<b>RESEARCH HIGHLIGHTS.....</b>	<b>49</b>
<b>ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASE POR <i>BACILLUS</i> SP. BR13861 USANDO PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E MODELAGEM MATEMÁTICA POR REDES NEURAIIS .....</b>	<b>50</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1 Matéria-prima e preparação da amostra .....</b>	<b>53</b>
<b>2.2 Isolamento e identificação do isolado celulolítico .....</b>	<b>53</b>
<b>2.3 Índice enzimático .....</b>	<b>54</b>
<b>2.4 Cultivo submerso .....</b>	<b>54</b>
<b>2.5 Atividade celulase total (FPase).....</b>	<b>55</b>
<b>2.6 Seleção dos fatores nutricionais do meio de cultivo para a produção de celulase .....</b>	<b>55</b>
2.6.1 Delineamento Plackett-Burman.....	55
2.6.2 Análise de regressão linear multivariável ( <i>Stepwise</i> ).....	56
<b>2.7 Otimização da produção de celulase .....</b>	<b>56</b>
2.7.1 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).....	56
2.7.2 Modelagem por Redes Neurais Artificiais (RNA) .....	57
2.8.3 Validação estatística .....	58
<b>2.9 Validação do modelo matemático .....</b>	<b>59</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Micro-organismo celulolítico .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 Seleção dos fatores nutricionais com efeito significativo.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3 Otimização do processo de produção de celulase .....</b>	<b>64</b>
<b>3.4 Redes Neurais Artificiais (RNA) .....</b>	<b>67</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>COVER LETTER.....</b>	<b>79</b>
<b>RESEARCH HIGHLIGHTS.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE I - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE</b>	<b>88</b>

<b>APÊNDICE II – MEIOS DE CULTURAS UTILIZADOS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO 1 – INFORMAÇÕES DA PUBLICAÇÃO DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA EM FORMA DE CAPÍTULO DE LIVRO .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 2 – CADASTRO DO PROJETO DE PESQUISA NO SISGEN .....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O suprimento de energia está na base da estruturação e da dinâmica operacional da sociedade humana nos seus mais diversos aspectos, desde o bem-estar individual até o desempenho industrial e de prestação de serviços (SILVA, 2010). O consumo mundial de energia aumenta com o acelerado crescimento econômico mundial e boa parte dessa energia consumida provém de fontes fósseis, tais como: o petróleo, carvão e gás natural (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2007).

A crescente combustão dessas fontes, aliada ao desmatamento, são os principais responsáveis pelo acúmulo de gases poluentes na atmosfera, particularmente o dióxido de carbono, responsável pelo efeito estufa, gerando como consequência alterações climáticas, sendo essa uma outra grande preocupação além do aumento do consumo.

A união de tais fatores levou a constatação da necessidade de um novo padrão de produção de energia e da configuração de um novo arranjo produtivo, maximizando a importância de uma matriz energética mais sustentável, diversificada e que utilize fontes renováveis. Pereira Jr et al. (2008) relata em seu trabalho que é necessário realizar mudanças nos padrões de industrialização e de consumo da sociedade humana, de forma a reduzir esses impactos ambientais.

Neste contexto, e por motivos econômicos, geopolíticos e ambientais, as atenções se voltam para fontes alternativas de energia, em especial os biocombustíveis. Datar et al. (2007), informa que a energia proveniente da biomassa é uma dessas fontes renováveis promissoras, mas ressalva, que essa matéria-prima utilizada para a produzir, deve vir de culturas não alimentares ou de resíduos agrícolas, sendo denominadas de matérias-primas de segunda geração. Segundo Furlan (2009) infere que o bioetanol é o biocombustível com as perspectivas mais promissoras para o futuro, pois não é dependente de reservas petrolíferas, obtido de fontes renováveis e apresentando baixos níveis de emissões de gases de efeito estufa.

Em seu trabalho Menon e Rao (2012) expõe que o desenvolvimento desses biocombustíveis de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica tem muitas vantagens quando comparado com os biocombustíveis de primeira geração, devido a não competição com as culturas alimentares, as perdas de energia líquida para a emissão de gases de efeito estufa, bem como o aumento nos preços dos alimentos.

A bioconversão de material lignocelulósico em etanol combustível poderia fazer uso de abundantes fontes renováveis, mas em grande parte ainda inexplorada, tais como os resíduos

agrícolas (palha de milho, bagaço de cana, trigo e palha de arroz, etc) e resíduos florestais (como serragem) (INGRAM; DORAN, 1995; ZALDIVAR et al, 2001).

Além dessas fontes, cabe destacar os resíduos agroindustriais que estão entre as maiores fontes de biomassa do mundo, essa biomassa acumulada ainda pouco explorada gera problemas ambientais, e conseqüentemente, problemas econômicos para o setor agroindustrial. Em seus estudos Cardona e Sánchez (2007) corroboram a informação e descrevem que muitos desses materiais lignocelulósicos são subprodutos de atividades agrícolas, resíduos industriais (agroindustriais) ou resíduos domésticos e, relata que são enormes as possibilidades a partir dessas matérias-primas para a produção de biocombustível.

Em frigoríficos, assim como em vários tipos de indústria, há um alto consumo de água, esse alto consumo acarreta a geração de grandes volumes de efluentes. Por exemplo, de 80 a 90% da água consumida nas diversas etapas de processamento de carne e seus derivados são descarregadas como efluente líquido em sistemas convencionais de tratamento (PACHECO, 2008). De acordo com Aguilar (2002) esses efluentes apresentam além da elevada vazão, a grande carga de sólidos em suspensão, nitrogênio orgânico e uma DBO<sub>5</sub> de aproximadamente 4.200mg/L. Dependendo da forma de tratamento do efluente, devido à sua constituição, esses despejos são altamente putrescíveis e começam a se decompor em poucas horas, gerando mal odor nos arredores dos estabelecimentos, causando incômodos à população local (PACHECO, 2008).

Neste trabalho foi feito um estudo do potencial de bactérias advindas do rúmen bovino residual, para produção de celulases. Estas tiveram sua produção avaliada por tratamentos matemáticos afim de aumentar sua capacidade, fornecendo um bioproduto com potencial de aplicação para produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi de prospectar do conteúdo ruminal de bovinos, bactérias com capacidade celulolítica, visando a utilização no processo de produção de etanol de segunda geração.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar um *screening* de bactérias com capacidade celulolítica no conteúdo ruminal de bovinos;
- Caracterizar por biologia molecular as bactérias isoladas com capacidade celulolítica;
- Analisar os extratos enzimáticos das bactérias isoladas que apresentaram capacidade celulolítica, quanto a produção de celulases totais (FPase);
- Selecionar uma bactéria que apresenta eficiência quanto a atividade celulolítica e identificar os fatores nutricionais do meio que potencializam a indução da produção da celulase e otimizar o processo por modelagem matemática.

### 3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Essa tese de doutorado foi dividida inicialmente em capítulos, nos quais são abordados os seguintes temas:

No Capítulo 1 é apresentado a “**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**” onde são abordados assuntos sobre Biorrefinaria, Biorrefinaria de etanol, Biocombustíveis lignocelulósicos, Tipos e fontes de biomassas, Rotas de obtenção de biocombustíveis, dando ênfase a hidrólise enzimática (tipos de micro-organismos, enzimas e fontes). Esse capítulo foi publicado em forma de capítulo no Livro Tópicos Especiais em Biotecnologia e Biodiversidade, Volume 1, Editora CRV: Paraná, ISBN 978-85-444-2151-2, 2017, sendo a editora classificada pela CAPES em L3. Maiores informações do livro no Anexo 1.

No Capítulo 2, intitulado “**CONTEÚDO RUMINAL BOVINO APRESENTA BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**” é apresentada a prospecção de bactérias com capacidade celulolítica no conteúdo ruminal de bovinos, sendo realizada a caracterização e identificação dessas por sequenciamento genético, bem como a produção de celulases totais (FPase) dos isolados no estudo.

No Capítulo 3, intitulado “**ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE CELULASE POR *BACILLUS* sp. V13 (MH82004) USANDO PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E MODELAGEM MATEMÁTICA**” apresenta o uso de ferramentas matemáticas para incrementar a produção de celulase total de um isolado de *Bacillus* sp. V13 obtido a partir de conteúdo ruminal de bovinos, com capacidade de hidrolisar biomassa celulósica (bagaço de cana sem tratamento hidrolítico). Foi utilizado um design Plackett-Burman, Análise de Regressão Linear Multivariável (Stepwise), Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Redes Neurais Artificiais (RNA) para selecionar os fatores nutricionais e otimizar a produção de celulase.

#### 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A sociedade humana é altamente dependente de energia em seus mais diversos aspectos, seja para o bem-estar individual, coletivo ou até mesmo no desempenho industrial e prestação de diversos serviços. Dessa forma o fornecimento de energia está na dinâmica operacional da sociedade (SILVA, 2010). O aumento do consumo de energia está diretamente relacionado com o crescimento econômico mundial e boa parte dessa energia consumida provém principalmente da queima de petróleo, carvão e gás natural, fontes fósseis não renováveis (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2007).

A crescente combustão dessas fontes não renováveis, propiciam elevada emissão de gases de efeito estufa, ocasionando impactos ambientais que contribuem nas alterações climáticas. De acordo com Pereira Jr et al. (2008) é necessário que seja realizada mudanças importantes no consumo e nos padrões atuais de industrialização, visando reduzir esses impactos ambientais. Assim, é necessário criar um novo padrão de produção de energia e a apresentação de novas configurações arranjos produtivos, que levem em consideração uma matriz energética mais sustentável, diversificada e que utilize fontes renováveis.

Neste contexto, e por motivos econômicos, geopolíticos e ambientais, as atenções se voltam para fontes alternativas de energia, em especial os biocombustíveis. Datar et al. (2007), informa que a energia proveniente da biomassa é uma dessas fontes renováveis promissora, mas ressalva, que essa matéria-prima utilizada para a produzir, deve vir de culturas não alimentares ou de resíduos agrícolas, sendo denominadas de matérias-primas de segunda geração. De acordo com Furlan (2009) o bioetanol é o biocombustível com as perspectivas mais promissoras para o futuro, pois esse não é dependente de reservas petrolíferas, são obtidos de fontes renováveis e apresentam baixos níveis de emissões de gases de efeito estufa. Uma outra vantagem apresentada por Menon e Rao (2012) é que a produção do biocombustível de segunda geração não interfere nos preços dos alimentos, devido a não competição com as culturas alimentares.

Na conversão de material lignocelulósico em bioetanol, se pode fazer uso de diversas fontes renováveis abundantes, mas que, em grande parte pouco exploradas, como exemplos: palhadas de milho, de trigo e de arroz e resíduos florestais (como serragem) (INGRAM; DORAN, 1995; ZALDIVAR et al., 2001). Além dessas fontes, Cardona e Sánchez (2007) destacam que os resíduos agroindustriais e domésticos são matérias-primas potenciais para a produção de biocombustíveis.

Em frigoríficos, assim como em vários tipos de indústria do segmento alimentício, há um alto consumo de água, e esse alto consumo acarreta diretamente e uma grande geração de volumes de efluentes. Segundo Pacheco (2008) de toda a água consumida no processamento, 80 a 90% são descarregadas como efluente líquido em sistemas convencionais de tratamento. Esses efluentes apresentam além da elevada vazão, uma grande carga de sólidos em suspensão, nitrogênio orgânico e uma DBO<sub>5</sub> de aproximadamente 4.200mg/L (AGUILAR et al., 2002).

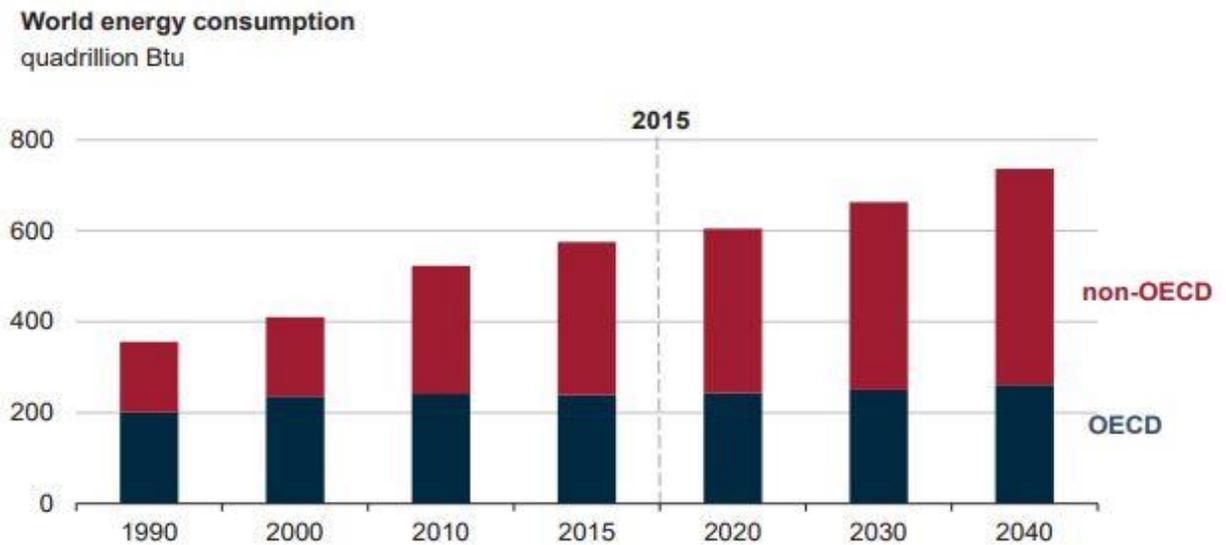
Diante desse contexto, encontrar substitutos para a produção de combustíveis não renováveis é de fundamental importância para a manutenção da qualidade de vida nos próximos anos e nada mais racional do que os produzir com base em matéria orgânica renovável (biomassa). Assim, o conteúdo ruminal bovino se apresenta como uma promissora matéria-prima para a produção de biocombustíveis de segunda geração.

#### **4.1 Consumo energético mundial**

Fazendo uma retrospectiva sobre as fontes de energia usadas pela humanidade desde sua pré-história, fica evidente que, o início da revolução industrial marcou profundamente a sociedade humana, onde houve a mudança entre o desenvolvimento incremental de fontes de baixa potência, para rápidos avanços a partir de fontes de alta potência, ou seja, passamos da simples queima de lenha para a produção de energia em reatores nucleares, em pouco mais de um século, demonstrando a capacidade que o ser humano tem de transformar e ampliar a sua matriz energética.

Para Osaki et al. (2012) a necessidade de fornecer energia em escala cada vez maior e simultaneamente de maneira econômica e sustentável, resulta em um desafio extremamente complexo para a humanidade cuja solução tem como condição essencial a articulação entre diversas áreas das ciências básicas e engenharias, e também a criação de políticas de Estado a curto, médio e longo prazo. A energia do futuro será baseada nas experiências recentes e será o resultado das escolhas realizadas e não do destino (HAMRIN et al., 2007). Dessa forma, os cenários energéticos poderão ajudar nessas tomadas de decisões e avaliações, desde que, os mesmos apresentem uma gama de opções de fontes de energias e incluam também os dados da análise realizada, sendo essas as ferramentas analíticas que irão descrever o nosso abastecimento de energia no futuro.

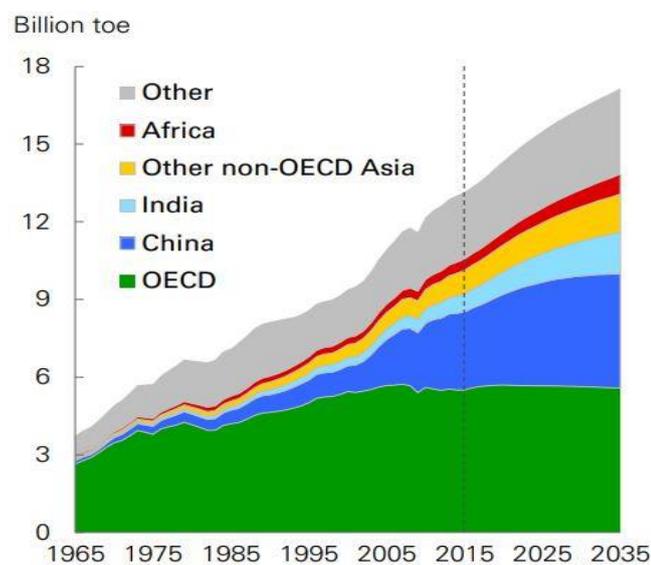
Na Figura 1 é apresentado no relatório *International Energy Outlook (IEO) 2017* as projeções do consumo de energia mundial nos próximos anos.



Fonte: Adaptado de (IEA, 2017a)

Figura 1. Projeção do consumo mundial de energia até 2040, pelos membros e não membros da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD).

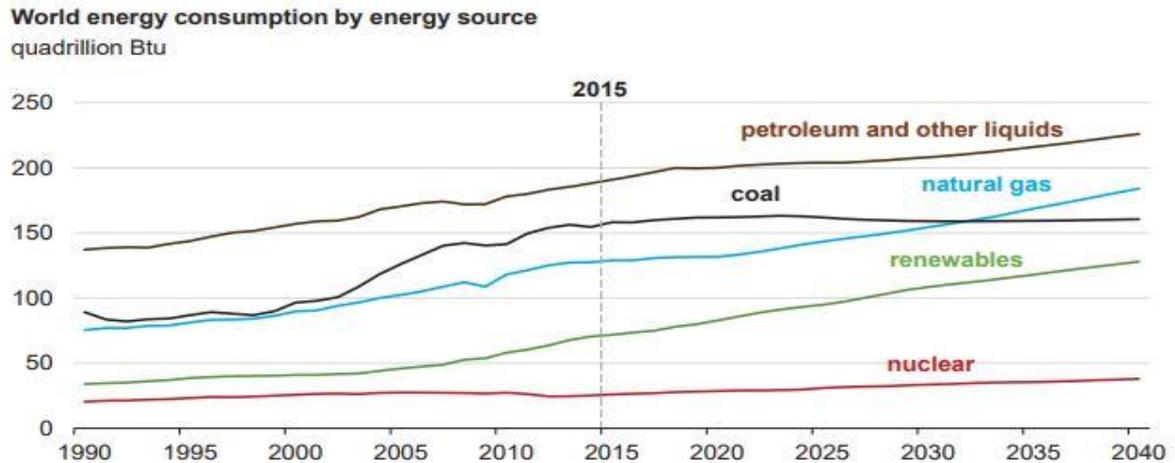
Haverá um aumento de 28% no consumo de energia em 2040, e a maior parte do aumento é observada nos países não pertencentes a OECD, entre 2015 e 2040 a projeção do consumo de energia nesses países aumentará em 41% em contraste o aumento do consumo de energia para os países membros será de 9%. De acordo com a IEA (2017a) esse aumento é esperado devido a três fatores: forte crescimento econômico; Crescimento rápido da população e do aumento no acesso à energia comercializada, esse consumo por região pode ser observado na Figura 2.



Fonte: (BP, 2017)

Figura 2. Consumo de energia nos países não membros OECD

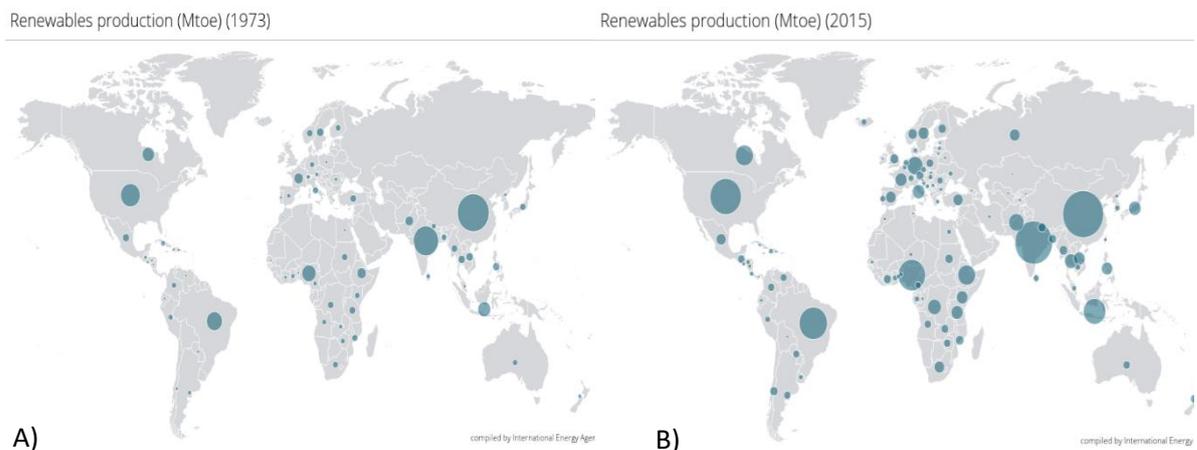
A partir da análise nas projeções no *Annual Energy Outlook* (AEO) 2017, se pode antecipar com muita segurança que a matriz energética nos próximos anos apresentará um aumento no consumo de energias renováveis (maior participação), conforme apresentada na Figura 3.



Fonte: Adaptado de (IEA 2017b).

Figura 3. Consumo mundial de energia por tipo de fonte, relatório da EIA

É possível verificar que, ao longo dos últimos 42 anos, a produção de energia alternativa vem crescendo, bem como contribuição de outros países na geração dessa fonte de energia. A *International Energy Agency* (IEA) apresenta a contribuição dos países na produção de energias alternativas em Mtoe na matriz energética mundial, conforme os atlas de produção de energias renováveis nos anos de 1975 e 2015, figura 4A e 4B.



Fonte: (IEA, 2017)

Figura 4. Atlas comparativo da produção de energias renováveis nos anos de 1975 e 2015

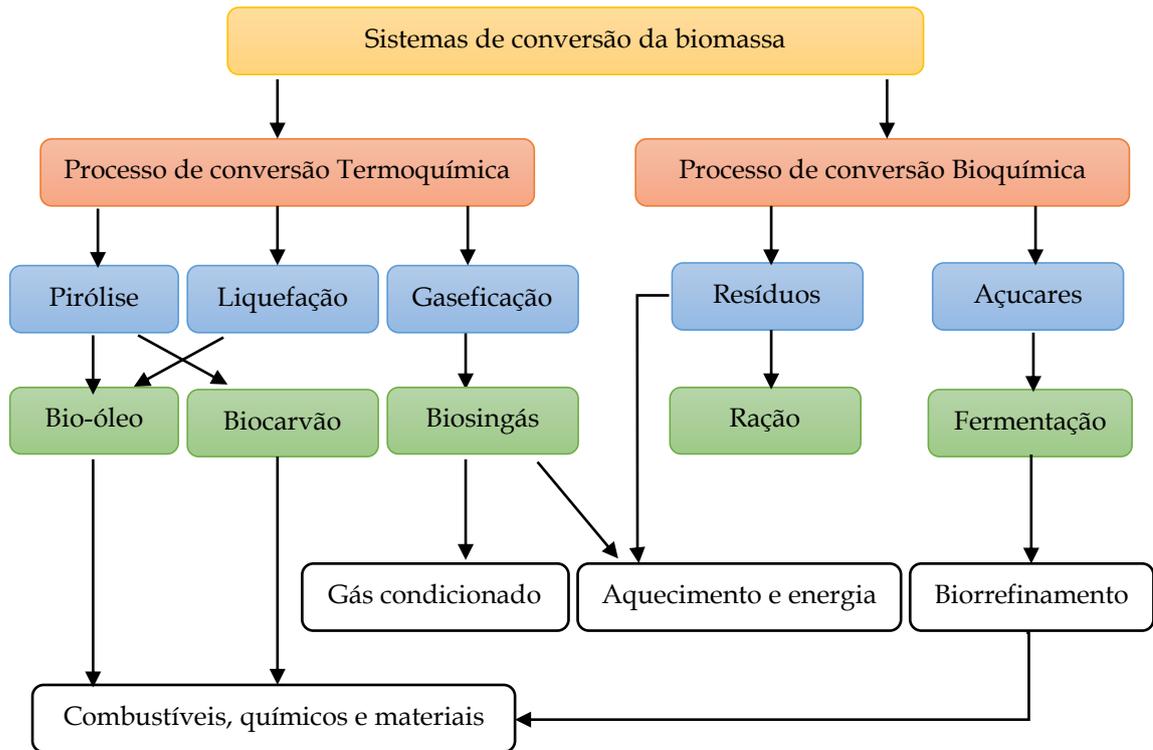
## 4.2 Biorrefinarias

Dentro dessas discussões sobre a questão energética, aprofundada por cenários sobre a escassez das fontes não renováveis e mudanças climáticas Pacheco (2006) apresenta que a tendência é surgir novas pesquisas e estudos técnicos, econômicos e sociais para o desenvolvimento de novas tecnologias para o fornecimento de energias renováveis, tais como: energia eólica e solar, pequenas centrais hidroelétricas, e energia gerada a partir de matéria orgânica, biomassas de origem animal ou vegetal.

A *American National Renewable Energy Laboratory* (NREL), define as biorrefinarias como indústrias que convertem a biomassa e a utilizam para produzir: combustíveis, energia e/ou produtos químicos (NREL 2008). Outro conceito é apresentado pela *International Energy Agency* (IEA), onde as biorrefinarias são apresentadas como indústrias de processamento de biomassa em uma larga gama de produtos comercializáveis, tais como: alimentos, rações, materiais, químicos e/ou energia (combustíveis, eletricidade, calor) (IEA 2010). Demirbas (2009a) conceitua as biorrefinarias como indústrias análogas as refinarias de petróleo, onde diversos produtos são obtidos a partir de uma única matriz, conforme a Figura 5.

De acordo com Demirbas (2009a) e IEA (2010) a classificação das biorrefinarias é realizada de acordo com o tipo de plataforma utilizada; os tipos de produtos produzidos; matéria-prima utilizada e os processos de conversão. Assim, quanto a plataforma utilizada, as biorrefinarias são agrupadas nas plataformas (C5 e C6); quanto aos tipos de produtos em: Biorrefinarias de produtos energéticos (bioetanol, biodiesel, biohidrogênio e outros combustíveis sintéticos) e biorrefinarias de materiais (químicos, comida, ração, etc); quanto ao tipo de biomassa (culturas energéticas, culturas alimentares ou ainda dos resíduos agroindústrias, florestais ou industriais); quanto ao processo de conversão em: bioquímicos (fermentação e conversão enzimática); termoquímicos (pirólise e gaseificação); químicos (hidrólise ácida, transesterificação, etc.) e mecânicos (fracionamento, pressão, etc.) (DEMIRBAS, 2009b; IEA 2010).

A NREL (2008) apresenta as principais vantagens das biorrefinarias, sendo elas: produção de diversos produtos; exploração do potencial máximo das biomassas; agregação de valor; aumento da rentabilidade; e redução da demanda energética e da emissão de gases de efeito estufa. Segundo Ghatak (2011) e IEA (2011), essa ampla variedade na produção de diversos produtos tem a vantagem também de diminuir a dependência da produção de um único produto, bem como aumentar a sustentabilidade no uso racional da biomassa, evitando ou reduzindo a competição existente entre elas, para a produção alimentos ou combustíveis.



Fonte: Adaptado de (DEMIRBAS, 2009a).

Figura 5. Diagrama esquemático do conceito de uma biorefinaria a partir de uma biomassa em diferentes rotas de conversão.

#### 4.2.1 Biorrefinarias de bioetanol

##### 4.2.1.1 Matérias-primas

O bioetanol é obtido através da conversão da biomassa e aparece como uma maneira eficiente de reduzir o consumo e a dependência de combustíveis fósseis, podendo ser utilizado como aditivo ou substituto da gasolina. Por estes motivos hoje o bioetanol é o combustível não fóssil mais utilizado no mundo (DEMIRBAS, 2009c).

As principais rotas para síntese de bioetanol são agrupadas de acordo com a biomassa, sendo denominados de Bioetanol de primeira geração (Fermentação de biomassa sacarina/amilácea); bioetanol de segunda geração (Fermentação da biomassa lignocelulósica) e Bioetanol de terceira geração (Fermentação da biomassa de micro e macroalgas).

Nesse contexto, as biomassas (fontes sacarinas) no processo de conversão não necessitam ser hidrolisadas pois apresentam monossacarídeos fermentescíveis (açúcares redutores), contudo, as outras biomassas (amiláceas e lignocelulósicas) necessitam de um pré-tratamento para a liberação desses açúcares, e esse processo é denominado de hidrólise (IEA 2011). O processo de hidrólise de acordo com Lima (2001) e IEA (2011) pode ser realizado por

via química (hidrólise ácida e/ou básica – visando quebrar as ligações químicas), enzimática (realizada por enzimas produzidas por micro-organismos - que atuarão sobre as ligações químicas) e físicas (explosão por vapor, microondas, ultrassom e etc).

#### 4.2.1.1.1 Fontes sacarinas e amiláceas

Os chamados biocombustíveis de primeira geração são aqueles obtidos das culturas dedicadas, usualmente utilizadas na alimentação humana e animal. Nos Estados Unidos a principal cultura dedicada é o milho, no Brasil temos a cana-de-açúcar (HOEKMAN, 2009; GHATAK, 2011). De acordo com Halford (2010) nessas culturas os açúcares podem estar livres, por exemplo na cana-de-açúcar e beterraba sacarina; ou parcialmente livres, na forma de amido (polímero de glicose, que a plantas sintetizam para armazenar energia), como exemplo o milho, a mandioca e a batata. A energia da biomassa é uma fonte promissora de energia renovável, mas a matéria prima utilizada para produzi-la deve vir de culturas não alimentares ou de resíduos agrícolas e/ou agroindustriais (matérias-primas de segunda geração), para evitar a concorrência com fontes de alimento e terras aráveis.

#### 4.2.1.1.2 Fontes lignocelulósica

A segunda geração de biocombustíveis utiliza principalmente materiais lignocelulósicos para a produção de combustíveis líquidos (etanol e butanol) ou combustíveis gasosos (hidrogênio ou metano) (DATAR et al., 2007). Essa matéria-prima pode ser derivada de: ecossistemas florestal e aquático; culturas (gramíneas perenes); e de resíduos agroindústrias e industriais (SIMS, 2011; IEA 2011).

Para a obtenção do bioetanol, neste caso é necessário que a celulose e hemicelulose sejam convertidas em açúcares fermentescíveis, seja por ação química, biológica ou física (IEA 2011). A celulose é rica em açúcares facilmente fermentescíveis, em sua maioria a glicose, contudo a fração de hemicelulose é composta também por pentoses (xilose e arabinose) as quais não são fermentadas pelos organismos usualmente utilizados na indústria de biocombustíveis (RAGAUSKAS, 2006). Desse modo, fica evidente que as biorrefinarias a partir de materiais lignocelulósicos usam um *mix* de fontes de biomassa para a produção de uma série de produtos por meio de combinação de tecnologias, a partir das três frações básicas: hemicelulose, celulose e lignina (SANTOS et al., 2011), por conversão termoquímica e fermentação de açúcares (PEREIRA Jr et al., 2008).

A conversão da biomassa lignocelulósica por processo termoquímico inclui os processos de pirólise, gaseificação e liquefação, todos esses processos finalizam com a produção de biocombustíveis renováveis e produtos químicos diversos (DEMIRBAS, 2009a). No processo de conversão dessa biomassa em biocombustíveis, são gerados produtos secundários com alto valor econômico, tais como: gomas, resinas, ceras, terpenos, esteróides, taninos, ácidos e alcalóides. De acordo com Naik et al. (2010) esses produtos secundários podem ser utilizados para a produção de químicos com alto valor, tais como: flavorizantes, rações, produtos farmacêuticos, cosméticos e nutracêuticos, usando técnicas de processamento integrado.

#### 4.2.1.1.3 Biomassa aquática

As mais recentes tecnologias para obtenção de biocombustíveis, chamados de terceira geração, utilizam como matérias-primas, fontes antes nunca exploradas, como exemplo, as microalgas. As microalgas são consideradas um dos organismos mais antigos do planeta, estão dispersos em quase toda sua superfície, nos mais diversos ambientes e nas mais diversas condições e elas apresentam três mecanismos para o seu crescimento: fotoautótrofo, heterotrófico e mixotrófico (MATA, 2010).

Com esses mecanismos, as microalgas e macroalgas podem fixar o carbono e produzir tanto lipídeos, quanto açúcares. Essa biomassa é rica em proteínas, e esse conjunto de características faz com que essas possam vir a ser utilizadas como fontes para fermentação e consequente produção de bioetanol, biodiesel, biohidrogênio entre outros. (SINGH; GU 2010). O uso dessa biomassa de acordo com Ghatak (2011) desperta atenção, pois em teoria o uso de microalgas não compete com a disponibilidade das *commodities* alimentares e é uma fonte sustentável. Diversos produtos podem e devem ter sua produção explorada nestas biorrefinarias, estes podem ser: químicos (adesivos, detergentes, tintas, lubrificantes, ácidos e etc.), materiais (fibras, papel, gomas e etc.) ou alimentícios (rações, glúten e etc.) (GHATAK, 2011).

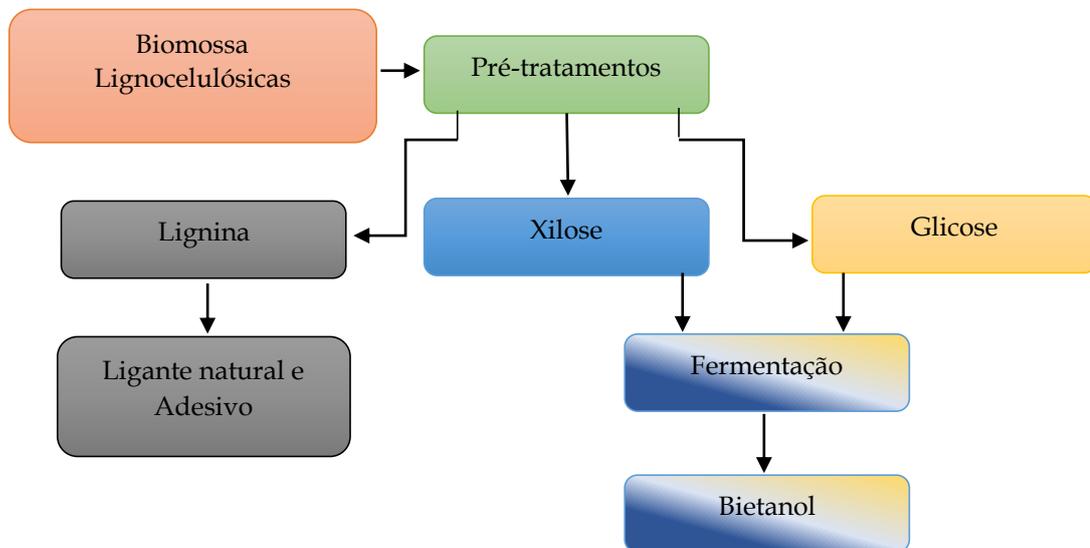
#### 4.2.2 Produção de Bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica

Hill et al. (2006) destacam que, para um biocombustível ser uma alternativa viável, esse deve proporcionar um ganho líquido de energia, benefícios ambientais, que seja

economicamente competitivo e ser reproduzível em grandes quantidades sem redução do fornecimento de alimentos.

Um fator importante para vencer os obstáculos que impedem a produção rentável do bioetanol a partir de lignocelulose seria melhorar a tecnologia na fase de pré-tratamento que tem o objetivo de solubilizar a hemicelulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Embora existam inúmeras tecnologias de pré-tratamento essa etapa tornou-se o maior componente de custo do processo de obtenção do bioetanol (MOSIER et al., 2005; KIM; HONG, 2001).

A conversão das unidades da biomassa para combustíveis líquidos tais como o etanol requer um número de operações unitárias básicas, incluindo pré-tratamento (hidrólise), fermentação e recuperação do etanol. Na Figura 6 é apresentada as operações unitárias básicas para a conversão de biomassa lignocelulósica a bioetanol.



Fonte: Adaptado de (NAIK et al., 2010).

Figura 5. Operações unitárias para a obtenção de álcool a partir de biomassa

#### 4.2.3 Uso da biomassa lignocelulósica para produção de outros biocombustíveis

O material lignocelulósico, pode ser convertido em diversos materiais e químicos, além da produção de etanol. Os principais produtos obtidos são fibras, plásticos sintéticos, borracha e papel. Além de diversos gases obtidos pelo processo de gaseificação (DEMIRBAS, 2009b). De acordo com Sedlmeyer (2011), xilanas podem ser obtidas dessa biomassa residual a aplicação deste químico é reconhecida na indústria de alimentos, novos materiais e na biotecnologia.

#### 4.2.3.1 Produção de biohidrogênio (BioH<sub>2</sub>)

Em geral, existem duas formas para produção de bioH<sub>2</sub>: utilizando organismos vivos fotossintéticos (bactérias fotossintéticas, cianobactérias e algas verdes); e, por organismos fermentativos (anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos) (KUMAR et al., 2000).

Kumar e Das (2001) relata que os processos que utilizam micro-organismos fermentativos necessitam de melhoras significativas para a sua exploração comercial e que a taxa de produção de hidrogênio pode ser melhorada através do desenvolvimento de estirpes microbianas e também por melhoria na densidade celular pela imobilização das células. Entretanto, o principal obstáculo para a comercialização de bioH<sub>2</sub> é o alto custo de produção, havendo a necessidade de chegar a estratégias que podem torná-lo economicamente mais viável (CHENG et al., 2011).

Das e Veziroğlum (2001) relacionam os processos de produção de bioH<sub>2</sub> em: Biofotólise da água usando algas e cianobactérias; foto decomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas; produção fermentativa de hidrogênio a partir de compostos orgânicos; e sistemas híbridos usando fermentação e bactérias fotossintéticas.

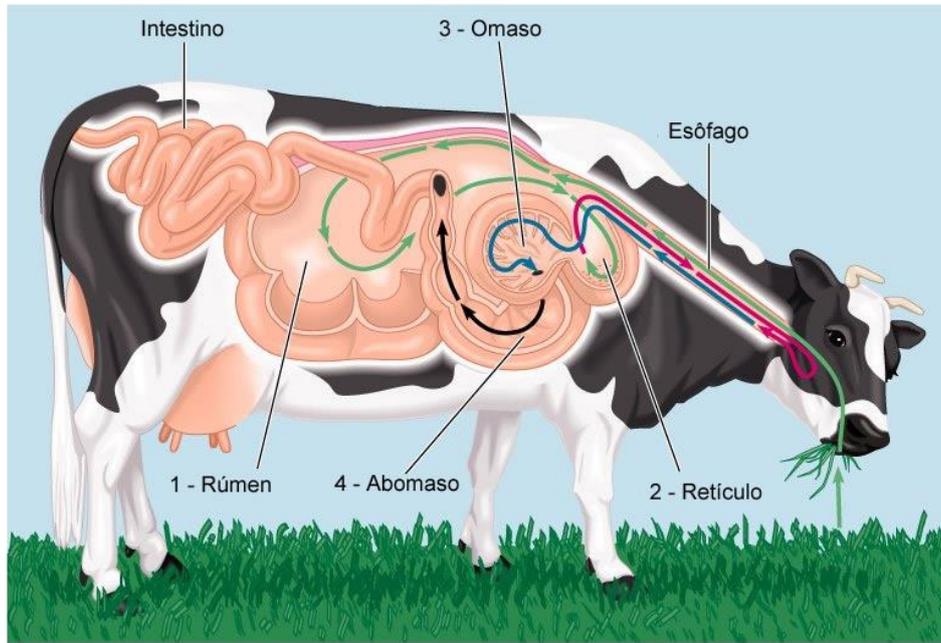
#### 4.2.3.2 Produção de Metano

Segundo Chandra et al. (2012) a produção de metano a partir de uma variedade de resíduos biológicos por meio da tecnologia de digestão anaeróbica está crescendo em todo o mundo e é considerado ideal em muitos aspectos, por causa de seus benefícios econômicos e ambientais. Dois dos fatores mais importantes a serem considerados quando da aplicação de fermentação do material lignocelulósico para a produção de metano são: a velocidade e a biodegradabilidade do material, os quais demonstram que quanto mais rápido for a degradabilidade da biomassa menor o tamanho do reator para a reação e conseqüentemente menor o custo, tornando dessa forma o processo economicamente mais atrativo. Ambos os fatores são funções das propriedades intrínsecas do material lignocelulósico em si e dos micro-organismos envolvidos (TONG et al., 1990).

Segundo Naik et al. (2010) ao utilizar resíduos de biomassa lignocelulósica através do processo de digestão anaeróbica haverá a geração de combustível líquido e biofertilizante para produção agrícola.

### 4.3 Rúmen bovino

O sistema digestório dos animais ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) apresenta estômago com quatro câmaras ou compartimentos (Figura 6) denominados de rúmen, retículo, omaso e abomaso.



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Fonte: Lesnau (2013)

Figura 6. Sistema digestório bovino.

De acordo com Santos (2008) as três primeiras câmaras, também chamadas de pré-estômagos, têm a função de armazenar o material ingerido e parcialmente digerido, sendo que somente o abomaso, última câmara, tem a função de digestão dos alimentos, função essa equivalente ao estômago simples da maioria dos outros animais. De acordo com Czerkawski (1986) no processo de ruminação, uma proporção do sólido digerido no abomaso é regurgitada e o bolo é misturado com saliva e mastigado pelo animal, sendo que esse processo pode ocupar até oito horas por dia. Durante a ruminação do sólido, a massa parcialmente digerida é misturada com saliva e comprimida. O líquido comprimido é engolido, com parte sendo arrastada do retículo para o rúmen e parte passando para o Omaso e então indo para o intestino. Por isso, o rúmen funciona como um grande “depósito” no qual os alimentos semidigeridos ficam armazenados e são fermentados. Alguns produtos simples provenientes da fermentação que ocorre no rúmen são absorvidos diretamente, enquanto outros precisam ser digeridos no abomaso (DYCE et al., 2004).

O rúmen contém uma das mais variadas e densas populações microbianas conhecidas na natureza. O ecossistema microbiano é amplamente diversificado, sendo constituído de bactérias, protozoários ciliados, fungos anaeróbicos e bacteriófagos, além de micro-organismos não cultiváveis, um ecossistema estável e ao mesmo tempo dinâmico, estável porque é bem estabelecido e capaz de transformar o alimento ingerido pelo animal em ácidos graxo voláteis, e dinâmico porque a população microbiana pode ser alterada com a mudança da alimentação animal, numa forma de se adaptar aos novos ingredientes alimentares (KAMRA, 2005).

No Brasil, o rúmen, como alimento humano, é utilizado no preparo do prato conhecido como dobradinha ou buchada. Sabe-se que parte do rúmen obtido no abate dos animais é voltado ao mercado interno, parte voltada ao mercado externo e aqueles abatedouros que possuem tecnologia mais especializada são capazes de transformar o rúmen em ração para os próprios animais. Na Índia, foi realizado um trabalho com “snacks” de rúmen de búfalo com porcentagens diferentes de milho, resultando em boa aceitação sensorial (ANANDH et al., 2005).

Outras formas de aproveitamento do rúmen têm sido desenvolvidas. Foi feito um pedido de patente para utilização do rúmen bovino como adubo em substituição aos compostos orgânicos atualmente utilizados (INPI, 2006). No sul de Minas Gerais também têm sido produzidas botas com couro obtido a partir do rúmen. O rúmen tem sido utilizado de algumas formas, mas quanto à alimentação humana, sua aplicação ainda é limitada (OCKERMAN; HANSEN, 1994).

Algumas aplicações para o Rúmen já são conhecidas, contudo, poucos estudos foram realizados no aproveitamento do conteúdo ruminal (biomassa lignocelulósica) que é descartada em grandes volumes nos sistemas de tratamento de efluentes das indústrias processadoras). Alternativas seriam a produção de biocombustíveis de segunda geração e a prospecção de micro-organismos produtores de celulase, devido a ampla diversidade microbiana.

#### **4.4 Micro-organismos associados ao rúmen bovino**

Apesar da disponibilidade de dados sobre a taxonomia, ecologia e fisiologia dos micro-organismos ruminais, em especial as bactérias, a microbiota do rúmen, por ser um ambiente complexo, ainda necessita de muitos estudos para que seu ecossistema possa ser melhor compreendido (KOBAYASHI, 2006). Esses micro-organismos são, em sua maioria, micro-organismos termófilos (temperatura ótima entre 39°C e 40°C), adaptados para sobrevivência em anaerobiose e em meio com variação de pH entre 5,5 e 7,0. A microbiota ruminal é composta

por fungos, bactérias, *Archaea* e protozoários, porém as bactérias são as mais abundantes e diversas, compondo cerca de 95% da população total (KOBAYASHI, 2006; BRULC et al., 2009).

No rúmen bovino as bactérias se apresentam tanto em maior número de espécies quanto em capacidade metabólica, com tamanho que variam de 1 a 5  $\mu\text{m}$ . A densidade de bactérias no rúmen é uma das maiores em qualquer ecossistema conhecido (ARCURI et al. 2006 *apud* SIQUEIRA, 2007), podendo ser observados valores na grandeza de até  $10^{10}$  células/g de conteúdo. Krause e Russel (1996), relataram que o número de espécies ruminais não é totalmente conhecida, porém mais de 400 espécies já foram isoladas a partir dos tratos digestórios de diferentes animais (ARCURI et al., 2006).

A grande diversidade bacteriana do rúmen pode ser entendida observando os seguintes aspectos: possuem elevada atividade metabólica com baixo tempo de geração; diversidade de nutrientes ingerida pelo animal hospedeiro; evolução e a seleção de espécies mais adaptadas para o máximo rendimento bioquímico; repetição desse “ciclo virtuoso”, uma vez que a espécie melhor adaptada supera todas as outras na competição por um nicho trófico, criando dessa forma novas oportunidades para outras espécies. Na Tabela 1 são apresentadas algumas espécies de bactérias e *Archaea* do rúmen, nicho trófico e principais características (ARCURI, 2006 *apud* SIQUEIRA, 2007).

Segundo Krause et al. (2003), que cita diversos autores em seu trabalho, as principais espécies celulolíticas são *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* e *Fibrobacter succinogenes*. Estas hidrolizam celulose por meio de complexos enzimáticos denominados celulases. As celulases da maioria dos micro-organismos celulolíticos, estão associadas às células, aderidas firmemente às partículas fibrosas do conteúdo ruminal. Outra espécie importante segundo Arcuri et al. (2006) é a *Butirivibrio fibrosolvens*, que fermenta tanto celulose quanto hemicelulose, enquanto outras bactérias celulolíticas degradam a hemicelulose, mas não necessariamente utilizam os produtos dessa degradação.

A grande maioria dos fungos são aeróbios, porém alguns bolores anaeróbios foram isolados, sendo eles: *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarium*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis* e *Caecomyces equi*. Os fungos representam apenas 8% da biomassa microbiana (RUIZ, 1992).

Tabela 1. Nichos tróficos e principais produtos de espécies bacterianas e *Archaea*.

<b>Espécie</b>	<b>Nichos Tróficos</b>	<b>Principais Produtos</b>
<i>Ruminococcus albus</i>	PC, Cel	Ac, Fo, Et
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	PC, Cel, Hemicel	Bu, Fo, Lac
<i>Butyrivibrio fibrisolveins</i>	PC, Cel, Hemicel, Am, Pec, AD	Lac, Ac
<b>Fermentadores de carboidratos não-estruturais</b>		
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Am	Su, Fo, Ac
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Am, Lac, AD	Lac, Ac, Prop, Bu, H <sub>2</sub>
<i>Streptococcus bovis</i>	Am, AD	La, Ac, Fo, Et
<i>Eubacterium ruminantium</i>	Mal, AD	Ac, Fo, Bu, La
<i>Megasphaera elsdenii</i>	La, Mal, AA	Ac, Pro, Bu, AGVR
<b>Organismos fermentadores de pectinas</b>		
<i>Lacbnospira multiparus</i>	Pec, AD	La, Ac, Fo
<b>Lipolíticos</b>		
<i>Anaerovibrios lipolytica</i>	Glic, La	Ac, Su, Pro
<b>Proteolíticos</b>		
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	Pep, AA	AGVR, Ac
<i>Clostridium aminophilum</i>	Pep, AA	Ac, Bu
<i>Wolinella succinogenes</i>	Mal, Fu	Su
<b>Facultativos</b>		
<i>Lactobacillus sp</i>	Am, La, AD	La, Ac, Pro, Bu, H <sub>2</sub>
<i>Streptococcus sp</i>	Am, La, AD	La, Ac, Pro, Bu, H <sub>2</sub>
<b>Archaea (metanogênicos)</b>		
<i>Methanobrevibacter sp.</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , Fo	CH <sub>4</sub>
<i>Methanobacterium sp.</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>

PC – Parede celular; Cel – Celulose; Hemicel – Hemicelulose; Am – Amido; Pec – Pectina; Su – Succinato; Fo – Formato; Ac – Acetato; Bu – Butirato; Et – Etanol; Lac – Lactato; AGVR – Ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada; AD – Açúcares diversos; Glic – Glicerol; Pep – Peptídeos; AA – Aminoácidos; Mal – Maltodextrina; Fu – Fumarato.

#### 4.5 Aproveitamento biotecnológico

Para que a biomassa lignocelulósica seja utilizada, são necessários tratamentos que liberam seus açúcares monoméricos, para que então passem por fermentação biológica. Os principais passos da produção são: pré-tratamento (por processos físicos ou químicos) que libera as hexoses e pentoses da hemicelulose; tratamento enzimático (ou hidrólise química) que libera a glicose da celulose (ZALDIVAR et al. 2001).

No entanto, a dificuldade em se superar a resistência natural das plantas a quebra de seus açúcares por fontes biológicas tem tornado o processo muito caro para que seja economicamente viável (WYMAN, 2007). A presença de lignina dificulta ainda mais o processo, uma vez que ela forma uma barreira em torno das fibras de celulose e ainda possui afinidade por uma boa porção das celulasas, se ligando a elas e impedindo a sua ação (JØRGENSEN et al., 2007).

Os ruminantes são alguns dos poucos animais capazes de digerir a fibra vegetal e utilizá-la como fonte energética devido a sua relação simbiótica com os micro-organismos presentes no rúmen (WANG et al., 2012). Acredita-se que o curto período de tempo disponível para a execução dos diversos processos fermentativos e hidrolíticos impostos pelo trânsito contínuo de biomassa pelo trato digestório, o ambiente anaeróbio e as baixas quantidades de enzimas hidrolíticas produzidas criaram uma pressão seletiva que transformou os micro-organismos ruminais nos biorreatores consumidores de material lignocelulósico mais eficientes e naturais existentes (KOIKE; KOBAYASHI, 2009).

Os pré-tratamentos consistem em uma série de operações que aplicadas aos materiais lignocelulósicos, são capazes de quebrar as ligações que unem as macroestruturas com o objetivo de separar a lignina das fibras de celulose e hemicelulose tornando-as mais acessíveis para a ação das enzimas microbianas nos processos de sacarificação e fermentação. Os pré-tratamentos podem ser classificados em quatro categorias: físico, químico, biológico e combinado.

Segundo Lynd (1996) um pré-tratamento ideal é aquele que produz fibras reativas, preserva a utilidade da fração hemicelulósica e não libera compostos que inibam significativamente a fermentação. Os processos mais utilizados para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica se dividem em físicos (Explosão a vapor e Termohidrólise); Químicos (Hidrólise ácida, hidrólise alcalina e ORGANOSOLV); biológicos (micro-organismos) e combinados (Explosão de vapor catalisada).

#### 4.5 Considerações finais

Com a crescente demanda no consumo de energia, aliada com a necessidade de desenvolvimento de novas fontes de energias, principalmente as não renováveis, fica bem evidente a importância em prospectar novas matérias-primas para a produção de energia, sendo essa biomassa ainda pouco explorada, mas gerada em grandes quantidades, a coloca como uma potencial matéria-prima para esse fim.

#### 4.6 Perspectivas futuras

Consolidar essa biomassa lignocelulósica residual, como matéria-prima no processo de produção de biocombustíveis e de outros materiais, aplicando o conceito de biorrefinaria.

Bioprospetar novos micro-organismos capazes de produzir enzimas hidrolíticas, bem como otimizar os processos de produção desses complexos enzimáticos para diversas aplicações biotecnológicas.

### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. I. et al. Nutrient removal and sludge production in the coagulation flocculation process. **Water Research**, v. 36, n. 11, p. 2910-2919, 2002.

ANANDH, M. A. et al. Development and quality characteristics of extruded tripe snack food from buffalo rumen meat and corn flour. **Journal Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 263-267, 2005.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Org.). *Nutrição de ruminantes*. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 111-150.

BP p.l.c., BP Energy Outlook 2017 edition, London, United Kingdom, 2017. Disponível em: <<https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/energy-outlook-2017/bp-energy-outlook-2017.pdf>>. Acesso em: 11 de nov de 2017.

BRULC, J. M. et al. Gene-centric metagenomics of the fiber adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1948-1953, 2009.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and

integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p.2415-2457, 2007.

CHANDRA, R., TAKEUCHI, H., HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462-1476, 2012.

CHENG, C. et al. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. **Bioresource Technology**, v. 12, n. 18, p. 8514-8523, 2011.

CZERKAWSKI, J. W. An introduction to rumen studies. 1 ed. Oxford: Pergamon Press, 1986. 236 p.

DAS, D.; VEZIROĞLUM, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, n. 1, p. 13-28, 2001.

DATAR, R. et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 932-939, 2007.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: Current activities and future developments. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 11, p.2782-2801, 2009a.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. **Applied Energy**, v. 86, s.1, p. 151-161, 2009b.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Tratado de anatomia veterinária. 3ed. Traduzida. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 688 p.

EIA – Energy Information Administration. International Energy Outlook 2017. Disponível em: <[https://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484\(2017\).pdf](https://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484(2017).pdf)>. Acessado em 11 de nov de 2017a.

EIA – Energy Information Administration. Annuals Energy Outlook 2017 with projections to 2050. Disponível em: <[https://www.eia.gov/outlooks/aeo/pdf/0383\(2017\).pdf](https://www.eia.gov/outlooks/aeo/pdf/0383(2017).pdf)>. Acesso em: 11 nov 2017b.

FURLAN, V. J. M. Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da agroindústria do arroz. 2009. 90 f., Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

GHATAK, H. R. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 8, p. 4042-4052, 2011.

HALFORD, N. G. et al. Sugars in crop plants. **Annals of Applied Biology**, v. 158, n. 1, p. 1-25, 2010.

HAMRIN, J.; HUMMEL, H.; CANAPA, R. Review of the role of renewable energy in global energy scenarios for the International Energy Agency Implementing Agreement on Renewable Energy Technology Deployment, 2007. 85 p. Disponível em: <<http://infohouse.p2ric.org/ref/42/41014.pdf>>. Acesso em: 15 jan 2017.

HENDRIKS, A. T.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HILL, J. et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings National Academy Science**, v. 103, n. 3, p. 11206-11210, 2006.

HOEKMAN, S.K.; Biofuels in the U.S.: Challenges and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 14-22, 2009.

IEA, International Energy Agency. Technology Roadmaps: Biofuels for transport. p.56. 2011. Task 42 Biorefinery. Disponível em: <<http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery.htm>>. Acesso 22 mai 2017.

IEA, International Energy Agency. Disponível em: <<http://www.iea.gov>>. Acesso 11 nov 2017.  
IEA, International Energy Agency. Sustainable Production of Second-Generation Biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries. 2010. Disponível em: <[https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second\\_generation\\_biofuels.pdf](https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second_generation_biofuels.pdf)>. Acesso em: 15 jan 2017.

IEA, International Energy Agency. Technology Roadmaps: Biofuels for transport. 2011. International Energy Agency Bioenergy. Task 42 Biorefinery. Disponível em: <<http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery.htm>>. Acesso 22 mai 2017.

INGRAM, L. O., DORAN, J. B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 235-241, 1995.

INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Utilização de rúmen do aparelho digestivo de ruminantes no processo do hidrosemeadura. Brasília, 2006.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, v. 89, n. 1, p. 124-134, 2005.  
KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 77, n. 2, p. 139- 144, 2001.

KOBAYASHI, Y. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. *Animal Science Journal*, v. 77, n. 4, p. 375-385, 2006.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. *Journal of Animal Science*, v.22, n.1, p.131-138, 2009.

KRAUSE, D.O. et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, n. 5, p. 663-693, 2003.

KRAUSE, D.O.; RUSSEL, J.B. How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science*, v. 79, n. 8, p. 1467-1475, 1996.

KUMAR, N.; DAS, D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 29, n. 4-5, p. 280-287, 2001.

KUMAR, N. et al. Modeling and simulation of clean fuel production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 25, p. 945-952, 2000.

LEITÃO, V. O. Caracterização de uma bactéria anaeróbica termofílica isolada do rúmen de caprino e análise das enzimas do seu complexo celulolítico. 99 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2015.

LESNAU, G. Aparalho digestório 2. Anatomia veterinária. Disponível em: <<http://anatomiaanimaldescritiva.blogspot.com.br/2013/08/aparelho-digestorio-2.html>>. Acessado em 11 de nov 2017.

LIMA, U. A. de; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. de. Produção de Etanol. In: *Biotecnologia*

Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. 1. ed. v. 3, São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. 616p.

LYND, L. R. Overview and Evaluation of Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465, 1996.

MÁRQUEZ, A. et al. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 5, p.859-868, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S.; Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 17-32, 2010.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NAIK, S. N. et al. Production of first and second-generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.  
National Renewable Energy Laboratory (NREL) 2008. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/>>. Acesso 20 mai 2017.

OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. Industrialización de subproductos de origen animal. 1. ed. Zaragoza: Editora Acribia, 1994. 387 p.

OSAKI, M.R.; SELAN, B.; SELEGHIM JR., P. Cenários e perspectivas no desenvolvimento fontes renováveis de energia no brasil. Relatório de Estudos de Economias de Baixo Carbono (EBC), 2012. 26 p.

PACHECO, F. Energias renováveis: breves conceitos. Conjuntura e Planejamento, Salvador: SEI, n.149, 2006. p.4-11

PEREIRA JUNIOR, N.; et al. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Rio de Janeiro: Ed. Amiga Digital UFRJ, v.2, 2008. 45 p.

RAGAUSKAS, A. J. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

RUIZ, R. L. Microbiologia zootécnica. 1.ed. São Paulo: Ed. Roca, 1992. 314p.

SANTOS, L. C. Desenvolvimento de papilas ruminais. **PUBVET**, v. 2, n. 40, 2008.

SANTOS, M. F. R. F. dos; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. A. P. G. S. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. **Revista Economia & Energia**, n. 82, p. 14-32, 2012.

SEDLMEYER, F. B. Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1891-1898, 2011.

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. 2010, 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second-generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570-1580, 2010.

SINGH, J.; GU, S.; Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable* **Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596- 2610, 2010.

SIQUEIRA, Guilherme Benko de Energia e Proteína na nutrição de ruminantes [livro eletrônico] Universidade Federal do Tocantins: Palmas, 2007. 2,19 MB ; ePUB. il. tab.

TONG, X.; SMITH, L. H.; MCCARTY, P. L. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. **Biomass**, v. 21, n. 4, p. 239-255, 1990.

WANG, Y. et al. Effect of Exogenous Fibrolytic Enzyme Application on the Microbial Attachment and Digestion of Barley Straw In vitro. **Asian – Australian Journal of Animal Science**, v. 25, n. 1, p.66-74, 2012.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotrich ciliate protozoa. **Microbiological Review**, Washington. v. 50, n. 1, p. 25, 1986.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in**

**Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153-157, 2007.

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

ZHANG, Y. H. P. et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology Bioengineering**. v. 97, n. 2, p. 214-223, 2007

## ARTIGO 1 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICA EM CONTEÚDO RUMINAL BOVINO

Sales, V. H. G.<sup>1,4,\*</sup>; Oliveira, E. M.<sup>2</sup>; Zilli, J. E.<sup>3</sup>; Guarda, E. A.<sup>4</sup> e Borges, W. L.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal do Amapá, Campus Macapá. BR 220 km 03 Bairro Brasil Novo, 68909-398, Macapá-AP, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade do Estado do Amapá. Av. Presidente Vargas, 650, Bairro Central, 68900-070, Macapá-AP, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7, 23897-970, Seropédica-RJ, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas. Programa de pós-graduação Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE), Quadra 109 Norte, Av. NS15, ALCNO-14 Plano diretor, Palmas-TO, Brasil.

<sup>5</sup>Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Macapá-AP, Brasil.

\* Autor para correspondência: victor.sales@ifap.edu.br

### RESUMO

O rúmen bovino apresenta elevada biodiversidade de micro-organismos e acredita-se que esses, são mais eficientes no processo de degradação de biomassa vegetal, isso devido a pressão seletiva que esses micro-organismos estão submetidos dentro do rumén. O trabalho objetivou prospectar micro-organismos com capacidade celulolítica em conteúdo ruminal bovino. Amostras de conteúdo ruminal foram coletadas em um abatedouro industrial de bovinos na cidade de Macapá-AP, Brasil. O isolamento foi realizado utilizando meio Agar nutriente e meio Agar Bushnell Haas (BHM) contendo carboximetil-celulose (CMC), com incubação a 37°C por 96 h. A atividade celulolítica foi revelada usando o vermelho Congo, com posterior lavagem com solução de NaCl para a visualização da zona de degradação. A avaliação da Atividade celulolítica (AC) foi realizada pela razão entre o halo de degradação e da colônia em placa revelada com vermelho Congo. A celulase total foi mensurada de acordo com o protocolo de Ghose. A identificação dos micro-organismos foi realizada através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. Um total de 104 micro-organismos fenotipicamente distintos foram isolados em Agar nutriente, desses, 16 (15,38%) apresentaram capacidade celulolítica em Agar BHM-CMC. Foi possível amplificar e obter sequências parciais do gene 16S rDNA de 15 destes isolados. Cinco gêneros foram identificados, sendo o gênero *Bacillus* o mais representativo (n= 10; 66,7%), seguido por *Ochrobactrum* (n= 2; 13,3%) e *Microbacterium*, *Klebsiella* e *Stenotrophomonas* (n = 1, 6,7%). Alguns micro-organismos se destacaram em relação à capacidade celulolítica e produção da Fpase, sendo eles (BRS 13819, BRS 13836, BRS 13837, BRS 13838 e BRS 13961). O estudo evidenciou o potencial do conteúdo ruminal em ofertar micro-organismos com elevado potencial de aplicação biotecnológica, podendo estes serem utilizados no processo de produção de etanol de segunda geração.

**Palavras-chave:** 16S rRNA gene. Microbiota ruminal. Celulases. FPase. Biomassa lignocelulósica. Etanol de segunda geração.

## 1 INTRODUÇÃO

O rúmen evoluiu de forma a conter significativa diversidade de micro-organismos especializados na degradação de biomassas vegetais ricas em fibras, permitindo que esses animais sejam capazes de realizar a digestão de uma ampla variedade de biomassas (HENDERSON et al., 2013; KIM; MORRISON; YU, 2011; WANG et al., 2012). Acredita-se que o curto período de tempo disponível para a execução dos processos hidrolíticos e fermentativos, impostos pelo trânsito contínuo de biomassa no rúmen, as baixas quantidades de enzimas hidrolíticas produzidas e o ambiente anaeróbio, favorece uma pressão seletiva transformando os micro-organismos presentes no rúmen em biorreatores eficientes (KOIKE; KOBAYASHI, 2009).

A microbiota ruminal é composta por representantes dos domínios *Bacteria*, *Archea* (NOLLET; VERSTRAETE, 1996) e *Eukarya*, como fungos e protozoários ciliados (FOUTS et al., 2012; KAMRA, 2005) e vírus (BERG MILLER et al., 2012). O domínio *Bacteria* é o predominante e contribui significativamente para a conversão da biomassa em ácidos graxos de cadeia curta e proteínas microbianas (KIM; MORRISON; YU, 2011). A busca por novas enzimas que atuam na desconstrução do material lignocelulósico é de fundamental importância, pois estão envolvidas nos mais diversos processos da indústria têxtil, de limpeza, de alimentos, de ração animal, de biocombustível, de papel e celulose, farmacêutica e na gestão dos resíduos, (KASANA et al., 2008; PARK; PARK, 2001).

Para que a biomassa lignocelulósica seja utilizada no processo de produção de etanol de segunda geração são necessários tratamentos para liberação de açúcares monoméricos, passíveis de metabolização por leveduras. Estes pré-tratamentos (físicos, químicos ou biológicos) geralmente são de alto custo (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001) e a presença de lignina é um fator limitante do processo. A lignina além de formar barreira em torno das fibras, dificultando o acesso das celulases, se liga as celulases atuando como inibidor da ação sobre a celulose (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Diversos estudos nos últimos anos foram realizados com fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete* e *Fomitopsis* visando a produção de celulases. Contudo, nos últimos anos, estudos envolvendo bactérias celulolíticas vem ganhando destaque, isso se deve principalmente ao seu rápido crescimento, produção de complexos multienzimáticos e a resistência a condições externas (AZADIAN et al., 2017; IRFAN et al., 2017; LADEIRA et al., 2015; MENG et al., 2014; PADILHA et al., 2015; POTPROMMANEE et al., 2017). Destacam-se as bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*,

*Cellulosimicrobium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Bacterioides*, *Acetovibrio*, *Streptomyces*, *Microbispora*, *Fibrobacter* e *Paenibacillus* que são capazes de produzir diferentes tipos de celulases quando incubadas em condições anaeróbicas ou aeróbicas (AZADIAN et al., 2017; BALTACI; ADIGUZEL, 2016; HU et al., 2014; KHIANNINGAM et al., 2014; LO et al., 2009; NAIR et al., 2018; SEO et al., 2013; VYAS; CHHABRA, 2017; WAEONUKUL et al., 2009; WILSON, 2011).

Nesse contexto, deve ser dada atenção especial à exploração da biodiversidade desse nicho, de modo que as bactérias possam ser isoladas e caracterizadas como novas fontes produtoras de celulases altamente ativas e específicas (VENTORINO et al., 2015). A exploração dessa biodiversidade vem se consolidando nos últimos anos devida a produção competitiva de biocombustíveis renováveis que vem estimulando pesquisas com novas bactérias celulolítica, que apresentam alta taxa de crescimento e produção de *cocktail* enzimático completo para uma conversão mais eficiente de lignocelulose em açúcares fermentáveis (AMORE et al., 2012; SAINI; ARTI; TEWARI, 2012; VENTORINO et al., 2015).

Diante do exposto, o nosso estudo objetivou isolar e caracterizar, a partir do conteúdo ruminal bovino, isolados bacterianos com capacidade celulolítica.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Isolamento das bactérias celulolíticas**

Um total de três amostras compostas de conteúdo ruminal foram coletadas de 47 animais adultos em dias diferentes (n=3), abatidos em um abatedouro frigorífico na cidade de Macapá-AP, Brasil (0°00'39.1"N 51°12'06.7"W). As amostras foram coletadas de 10% dos animais abatidos de forma aleatória ao longo do abate, sendo armazenadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração em caixa de isopor contendo gelo em gel. As amostras foram transportadas para o laboratório em condições assépticas sob refrigeração onde foram homegeinizadas para o isolamento das bactérias.

Para obtenção das colônias isoladas, inicialmente 5 g da amostra foi suspensa em 50 mL de solução salina peptonada (0,85% NaCl; 0,1% peptona, m/v) incubada em agitador orbital (180 rpm, 37°C/1h). A partir desta suspensão, realizou-se diluição seriada até 10<sup>-8</sup> (BALTACI; ADIGUZEL, 2016). Para cada diluição, uma alíquota de 100 µL foi espalhada em meio Agar nutriente contendo (g/L): Extrato de levedura, 3; Peptona bacteriológica, 5; Cloreto de sódio,

3; Agar bacteriológico, 13,0 e agente antifúngico Nistatina (100.000 UI/mL), 4,0 mL/L. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h.

Os isolados obtidos em meio agar nutriente foram cultivados em meio Agar Bushnell Haas (BHM-CMC) contendo (g/L): Carboximetil-celulose (CMC), 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,05; CaCl<sub>2</sub>, 0,02 e Agar, 20,0), com incubação a 37°C por 96 h para avaliar o crescimento em meio contendo CMC como única fonte de carbono. Após a incubação as placas foram reveladas utilizando 20 mL de vermelho Congo 0,25% (m/v) por 30 min, em seguida lavadas com solução de NaCl 1M. A formação de uma zona clara ao redor da cultura foi considerada como indicativo de hidrólise do polissacarídeo pela enzima metabolizada pelo micro-organismo conforme preconizado por (BALTACI; ADIGUZEL, 2016).

## 2.2 Índice enzimático

O índice enzimático foi calculada de acordo com a metodologia proposta por (FERBIYANTO; RUSMANA; RAFFIUDIN, 2015), seguindo a equação abaixo:

$$AC = [(Diâmetro da Zona Clara - Diâmetro da colônia) / Diâmetro da colônia] \quad \text{Eq. (1).}$$

## 2.3 Cultivo submerso

Para avaliação da atividade de celulase total os isolados foram cultivados em caldo nutriente e 1 mL do cultivo (10<sup>10</sup> UFC/mL) foi utilizado como inóculo em 30 mL do meio mineral contendo (g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,4; Peptona bacteriológica, 1; CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0,3; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,3; Extrato de levedura, 0,25; FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,005; CoCl<sub>2</sub>, 0,002; ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,001; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,0016 e 0,3 mL/L de Tween 80, pH ajustado para 4,8, suplementado com bagaço de cana 1% (m/v), sem pré-tratamento hidrolítico. As amostras foram então incubadas sob agitação orbital a 140 rpm, 37°C por 72 h. O bagaço de cana utilizado foi secado a 70°C durante 48 h, moído em moinho tipo Wiley e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min, antes do processo de fermentação submersa.

O extrato bruto obtido foi filtrado e 15 mL centrifugado a 3600 rpm por 10 min, sendo retirada uma alíquota de 1 mL do sobrenadante para a análise da atividade de celulase total extracelular.

## 2.4 Atividade celulase total (FPase)

A avaliação da atividade FPase (em Papel Filtro), foi realizada de acordo com o método proposto por Ghose (1987) e a determinação dos teores de açúcares redutores por espectrofotometria a 540 nm, conforme método DNS (MILLER, 1959). Maiores detalhes das etapas para quantificação da atividade FPásica pode ser encontrada no Apêndice 1.

## 2.4. Sequenciamento do gene 16S rDNA

A extração do DNA total dos micro-organismos foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de DNA no produto obtido foi mensurada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e a integridade verificada em gel de agarose (1% m/v, 60V, 1h).

O gene 16S rDNA foi amplificado com os iniciadores 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' e 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. A reação de PCR, com volume final de 50 µl, foi realizada em termociclador (Applied Biosystems™ SimpliAmp) nas seguintes condições: Taq DNA polimerase 1,5 U; tampão de PCR 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 50 mM de KCl – Promega, Madison, WI, USA), MgCl<sub>2</sub> 1,75 mM (Promega, Madison, WI, USA), dNTP 0,25 mM de cada, 0,2 µM de cada iniciador e 1 µl do DNA molde. A reação de amplificação foi realizada utilizando desnaturação inicial a 94°C/3 min, seguido de 29 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 58°C/1 min e extensão a 72°C/2 min, seguido de extensão final a 72°C/7 min.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando DYEnamic™ ET Dye Terminator kit (MegaBACE™) e um sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life Sciences). A identidade das sequências obtidas foi estimada com base em comparações com acessos disponíveis no banco de dados do *National Center Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando a ferramenta BLASTn. Posteriormente, as sequências foram alinhadas no Cluster W e a árvore filogenética foi construída baseada no método da máxima verossimilhança a 1000 bootstrap (TAMURA; NEI, 1993; TAMURA et al., 2011) com auxílio do software Mega X (KUMAR et al., 2018).

O acesso aos recursos genéticos foi cadastrado no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado do Ministério do Meio Ambiente

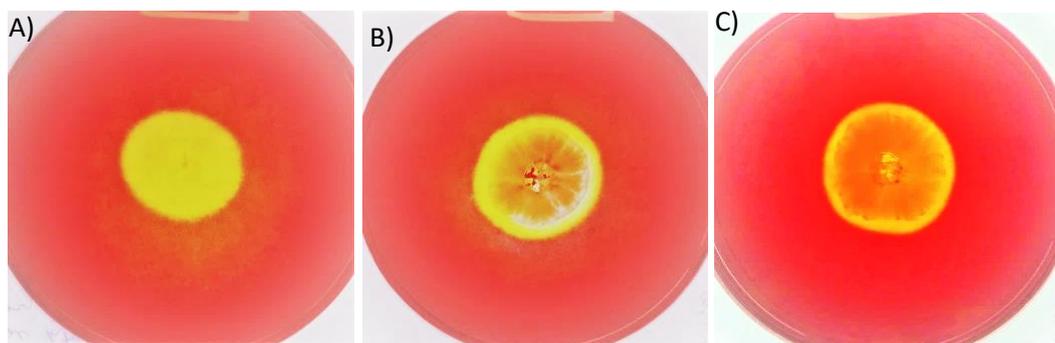
(SISGEN), Brasil sob o número ADAD04C de acordo com a Lei 13.123/2015 e seus regulamentos.

## 2.5. Análise de agrupamento

Os isolados foram agrupados de acordo com o índice enzimático e a atividade FPásica. A análise de agrupamento ou classificação, tem por objetivo evidenciar a existência de grupos homogêneos dentro da população amostral. O critério de agrupamento utilizado foi o do algoritmo UPGMA e a distância de Mahalanobis foi utilizada para medir a similaridade ou dissimilaridade entre os indivíduos proposto por (CRUZ; REGAZZI, 2001). Essa análise foi realizada para ajudar na tomada de decisão para a escolha do isolado para o processo de otimização da produção de celulase

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 104 micro-organismos fenotipicamente diferentes, considerando as características de tamanho, cor, formato, tipo de borda e relevo da colônia, foram obtidos a partir das 3 amostras compostas. Observou-se que 16 isolados (15,38%) apresentaram capacidade de crescer em meio sólido suplementado com CMC. O índice enzimático, avaliado na placa, apresentou variação de 0,17 a 0,67, indicando isolados com baixa, média e alta atividade, conforme observado na Figura 7. A análise qualitativa da capacidade celulolítica mostrou o isolado BR13819 com o maior índice celulolítico (0,67), valor próximo ao reportado por Ferbiyanto, Rusmana e Raffiudin (2015), seguindo a mesma metodologia.



Fonte: Autores

Figura 7. Halo de degradação de Carboximetil celulose de alguns isolados do conteúdo ruminal. A) BR13819, Alta capacidade; B) BR13864, Média capacidade; C) BR13818, baixa capacidade;

Na Tabela 2 é apresentada a análise do índice enzimático e da atividade FPásica dos 16 isolados com seus respectivos códigos na coleção Johanna Döbereiner (EMBRAPA AGROBIOLOGIA) e no GenBank da NCBI.

Tabela 2. O índice enzimático e atividade FPase (FPU/mL) livre de células dos isolados.

Código do isolado	Código do Isolado no GenBank	Índice enzimático (IE)	Fpase (FPU/mL)
BR13818	MH820049	0,17	0,41±0,035
BR13819	MH820050	0,67	0,53±0,012
BR13836	MH820051	0,25	0,51±0,045
BR13837	MH820052	0,23	0,57±0,021
BR13820*	-	0,21	0,40±0,017
BR13838	MH820053	0,37	0,62±0,051
BR13839	MH820054	0,38	0,50±0,031
BR13840	MH820055	0,23	0,34±0,051
BR13857	MH820041	0,35	0,50±0,025
BR13858	MH820044	0,20	0,52±0,021
BR13859	MH820045	0,18	0,40±0,032
BR13860	MH820046	0,22	0,51±0,036
BR13861	MH820047	0,44	0,45±0,025
BR13862	MH820048	0,46	0,63±0,020
BR13863	MH820042	0,42	0,44±0,021
BR13864	MH820043	0,44	0,38±0,035

\* Isolado não amplificado no gene 16S rDNA, não depositado no genbank

A maioria dos estudos envolvendo produção de enzimas celulases remetem a produção dessas por fungos, devidos esses, serem os principais decompositores de material lignocelulósico na natureza. Em seu trabalho com produção de açúcares redutores, Mohapatra et al. (2018) apresentaram o *Aspergillus fumigatus* CWSF-7 como um novo isolado promissor produtor de celulase, com atividade FPásica de 0,40 FPU/mL em seis dias de fermentação.

Os isolados em nosso trabalho apresentaram atividade similar e alguns superiores, contudo, com tempo de fermentação de apenas três dias. Outro ponto a destacar em nosso estudo, foi a utilização de bagaço de cana sem tratamento hidrolítico, fonte de carbono utilizada no processo de fermentação submersa, bem mais complexa a ser degradada. Assim, os isolados demonstraram alta potencialidade na produção de *cocktail* enzimático a ser utilizado no processo de obtenção de etanol de segunda geração.

Os isolados foram agrupados em três grupos distintos, baseado na análise combinada da atividade celulolítica e da produção de celulases totais (Figura 8).

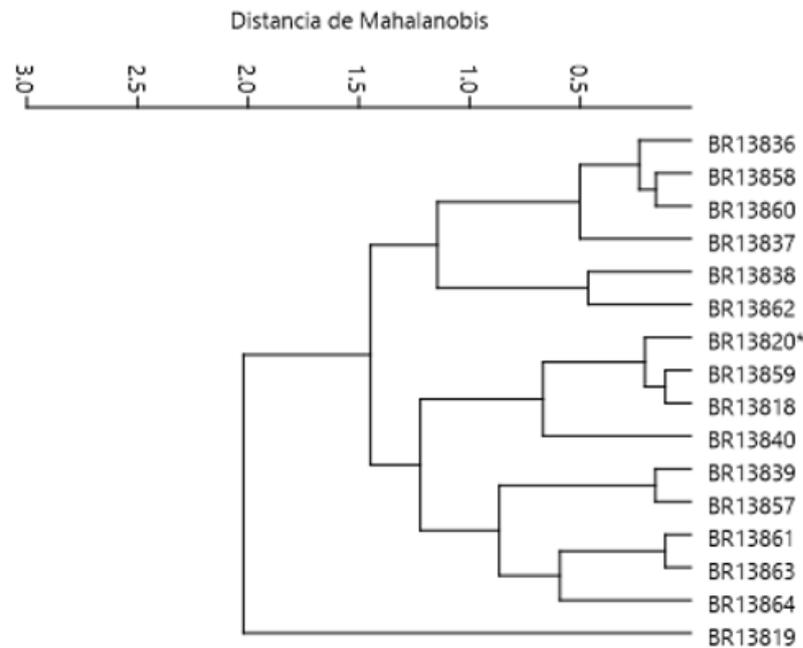


Figura 8. Dendrograma resultante da análise de 16 isolados (com base no índice enzimático e atividade FPásica) obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância de Mahalanobis como medida de distância. O valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) é de 0,769.

As linhagens que apresentaram potencial para a produção de celulase separadas em grupos. O isolado BR13819 destacou-se como sendo de alta eficiência para a análise combinada, ficando alocado sozinho no grupo A. Os demais isolados foram alocados no grupo B e C, respectivamente.

O grupo B (média eficiência) ficou composto por 7 isolados (BR 13818, BR 13820, BR 13839, BR 13840, BR 13857, BR 13859, BR 13961, BR 13863 e BR 13964), e o grupo C que apresentou baixa eficiência na análise combinada foi composto por 8 isolados (BR 13836, BR 13958, BR 13960, BR 13837, BR 13820, BR 13959, BR 13818 e BR 13840). Essa análise foi efetuada para ajudar na tomada de decisão futuras como estratégia na escolha de isolados para o processo de otimização da produção de celulase.

Foi possível amplificar e obter sequências do gene 16S rDNA para 15 dos 16 isolados que apresentaram capacidade de crescer em meio com BHM-CMC. As sequências obtidas variaram de 1000 a 1500pb e foram depositadas no NCBI sob os números de acessos MH820041 a MH820055.

Com base nas sequências do gene 16S rDNA pode-se identificar cinco gêneros distintos, sendo o gênero *Bacillus* o mais representativo ( $n= 10$ ; 66,7%), seguido pelo gênero *Ochrobactrum* ( $n= 2$ ; 13,3%). Os demais gêneros identificados foram *Microbacterium*, *Klebsiella* e *Stenotrophomonas* (Figura 9 e Tabela 3).

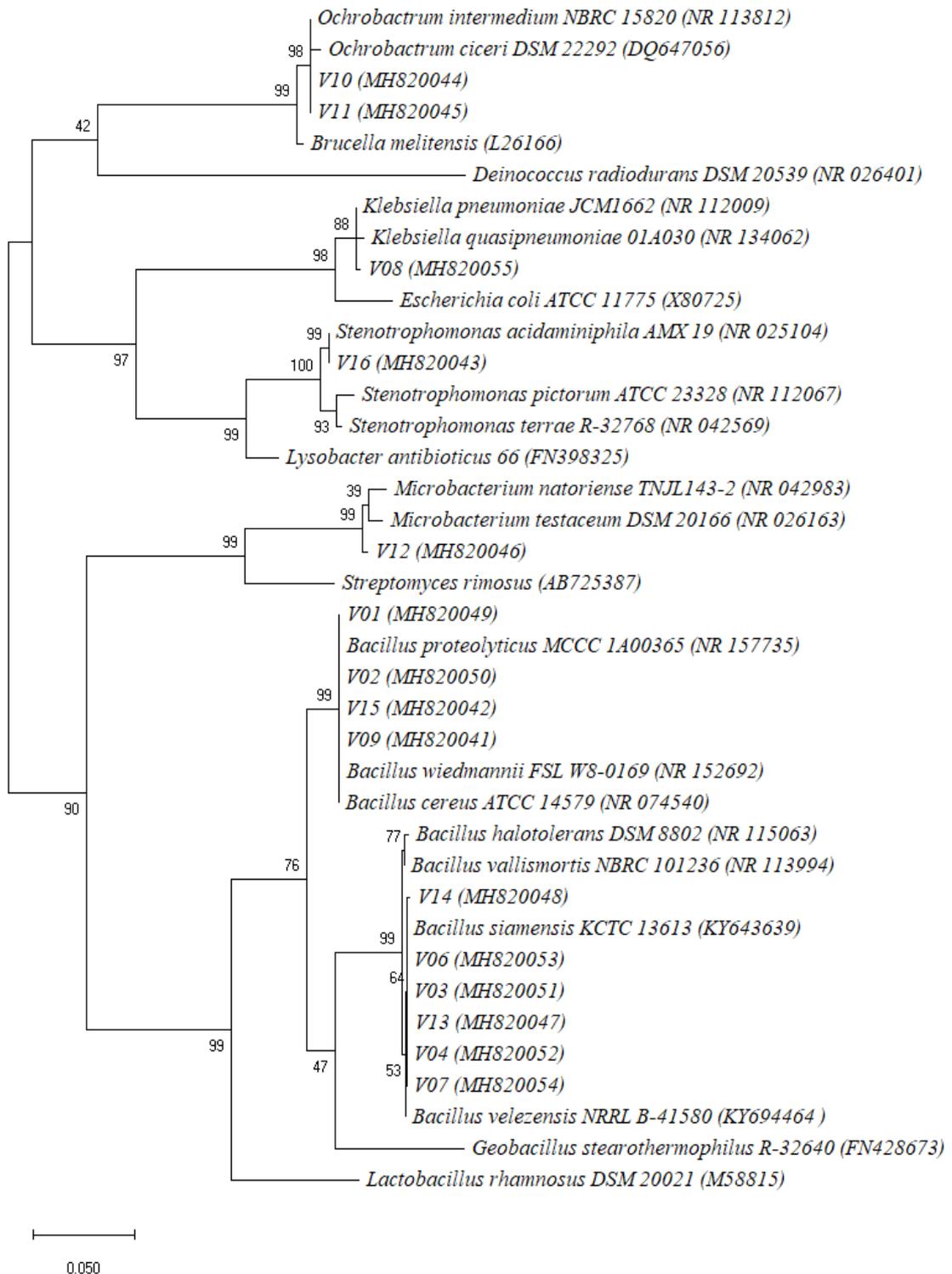


Figura 9. Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A árvore com a maior probabilidade de log (-7754.33) é mostrada envolvendo 38 seqüências nucleotídicas. Havia um total

Tabela 3. Comparação das sequências do gene 16S rRNA dos isolados obtidos com as sequências dos genes 16S rRNA no GenBank.

Isolados	Identificação	Correspondente mais próximo	Número de acesso	Similaridade
BR13818	<i>Bacillus sp. V01</i>	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NR074540.1	99%
BR13819	<i>Bacillus sp. V02</i>	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NR074540.1	99%
BR13836	<i>Bacillus sp. V03</i>	<i>B. siamensis</i> KCTC13613	KY643639.1	100%
BR13837	<i>Bacillus sp. V04</i>	<i>B. siamensis</i> KCTC13613	KY643639.1	100%
BR13838	<i>Bacillus sp. V06</i>	<i>B. siamensis</i> KCTC13613	KY643639.1	100%
BR13839	<i>Bacillus sp. V07</i>	<i>B. siamensis</i> KCTC13613	KY643639.1	100%
BR13840	<i>Klebsiella sp. V08</i>	<i>K. variicola</i> DSM 15968	CP010523.2	99%
BR13857	<i>Bacillus sp. V09</i>	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NR074540.1	99%
BR13858	<i>Ochrobactrum sp. V10</i>	<i>O. intermedium</i> NRC15820	NR113812.1	99%
BR13859	<i>Ochrobactrum sp. V11</i>	<i>O. intermedium</i> NRC15820	NR113812.1	99%
BR13860	<i>Microbacterium sp. V12</i>	<i>M. oleivorans</i> BAS69	NR042262.1	99%
BR13861	<i>Bacillus sp. V13</i>	<i>B. siamensis</i> KCTC13613	KY643639.1	100%
BR13862	<i>Bacillus sp. V14</i>	<i>B. siamensis</i> KCTC13613	KY643639.1	100%
BR13863	<i>Bacillus sp. V15</i>	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NR074540.1	99%
BR13864	<i>Stenotrophomonas sp. V16</i>	<i>S. acidaminiphila</i> AMX 19	NR025104.1	99%

A análise filogenética dos isolados evidenciou a predominância do gênero *Bacillus*, seguido do gênero *Ochrobactrum*. Esses gêneros também foram reportados por (BALTACI; ADIGUZEL, 2016) que estudou a diversidade de bactérias em amostras de rúmen bovino proveniente de um matadouro na Turquia. Esse gênero apresenta atualmente 377 espécies listadas ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)), e de acordo com (LOGAN; DE VOS, 2015) o seu *habitat* natural é o solo, que contém uma vasta variedade de carboidratos e polissacarídeos, que são utilizados como substratos para a produção de diversas enzimas durante o processo de degradação desses materiais complexos. Esse gênero também foi bem isolado em ambiente marinho, resíduos e trato digestório de animais (CHANTARASIRI, 2015; LIANG et al., 2014). Em estudos recentes com bactérias do gênero *Bacillus* isolados do trato digestório de diferentes animais ficou evidenciada a potencialidade de uso desses em diferentes aplicações industriais, tais como: na produção de celulases (AZADIAN et al., 2017; DAR et al., 2015; DAR; PAWAR; PANDIT, 2018; FERBIYANTO; RUSMANA; RAFFIUDIN, 2015; HU et al., 2014; PINHEIRO et al., 2015), de biossurfactantes (SHARMA; SINGH; VERMA, 2018), como promotores de

crescimento de plantas (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008) e na produção de biopesticida (EL-BENDARY, 2006; LACEY, 2007).

São conhecidas e listadas dezoito espécies do gênero *Ochrobactrum* ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)) e a sua principal ocorrência está relacionada em amostras clínicas humanas, em solo, em raízes de plantas (KÄMPFER; GLAESER; HOLMES, 2015) e trato digestório de diferentes animais (BALTACI; ADIGUZEL, 2016; KÄMPFER et al., 2011). Na literatura é reportada a utilização dessas espécies na produção de celulases (BALTACI; ADIGUZEL, 2016; HUANG; SHENG; ZHANG, 2012), na promoção do crescimento de plantas e no controle da podridão radicular do chá (CHAKRABORTY et al., 2009), também como fixadoras de nitrogênio em *Acacia mangium* (NGOM et al., 2004) e em processo de biodegradação (ABRAHAM; SILAMBARASAN, 2016; ARULAZHAGAN; VASUDEVAN, 2011).

Os gêneros *Microbacterium*, *Klebsiella* e *Stenotrophomonas* também foram reportados por Pinheiro et al. (2015). Os gêneros *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* e *Microbacterium* apresentam listadas, 17, 18 e 110 espécies, respectivamente ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)). O gênero *Klebsiella* ocorre principalmente no conteúdo intestinal, em amostras clínicas de seres humanos e animais, em solo, em água e em raízes de plantas, apresentando a capacidade de fixação de nitrogênio (GRIMONT; GRIMONT, 2015). Trabalhos recentes reportam a utilização de *K. variicola* TB-83D no processo de produção de bioetanol (SETA et al., 2018), de isobutanol, de 2-cetoisovalerato (GU et al., 2017), de 1,3-propanodiol (LAMA; SEOL; PARK, 2017; YANG et al., 2018) e na produção de biohidrogênio por *Klebsiella pneumoniae* (ESTEVAM et al., 2018).

A variedade de materiais a partir dos quais *Stenotrophomonas* podem ser isoladas é verdadeiramente notável, incluindo desde leite cru; águas estagnadas e fluviais; esgoto; peixe congelado; fezes de cobras, lagartos, sapos e coelhos; ovos podres; e solo em zonas petrolíferas, em tecido interno do pseudocaule de banana em decomposição, semente de algodão, vagem de feijão e mudas de tabaco (PALLERONI; VOS; MOOTER, 2015). Trabalhos apresentam esse gênero com grande potencial biotecnológico no processo de deslignificação de agrosíduos (OLAJUYIGBE; FATOKUN; OYELERE, 2018), remoção de solo contaminado com 1,1,1-Tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano (DDT) (FANG et al., 2018) e biodegradação e dissolução de hidrocarbonetos poli-aromáticos (TIWARI et al., 2016).

Alguns trabalhos apresentam a utilização de cepas de *Microbacterium* sp. em processo de biodegração de benzopireno (QIN et al., 2017), produção de xantoligossacarídeo (YANG et al., 2016), processo de biorremediação ambiental (AVRAMOV et al., 2016) e produção de

biopolímero microbiano (Poli- $\beta$ -hidroxibutirato) (OSMAN; ABD ELRAZAK; KHATER, 2016).

#### 4 CONCLUSÃO

As bactérias isoladas apresentaram boa capacidade em produzir enzimas capazes de hidrolisar a celulose da biomassa residual, podendo essas serem usadas no processo de obtenção de açúcares, no processo de produção de etanol da biomassa hidrolisada.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Embrapa Amapá e Embrapa Agrobiologia pelo suporte durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao programa de pós-graduação Biodiversidade e Biotecnologia (Rede BIONORTE) e a Universidade Federal do Tocantins (UFT) pela à oportunidade em realizar o doutorado.

Ao Instituto Federal do Amapá pela liberação para a realização do doutorado.

#### CONFLITO DE INTERESSE

Os autores reportam que não há conflito de interesse na pesquisa realizada.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABRAHAM, J.; SILAMBARASAN, S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 126, p. 13-21, 2016.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.

AMORE, A. et al. Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–12, 2012.

ARULAZHAGAN, P.; VASUDEVAN, N. Biodegradation of polycyclic aromatic

hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 388-394, 2011.

AVRAMOV, A. P. et al. Draft genome sequence of *Microbacterium oleivorans* strain Wellendorf implicates heterotrophic versatility and bioremediation potential. **Genomics Data**, v. 10, p. 54–60, 2016.

AZADIAN, F. et al. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 187-196, 2017.

BALTACI, M. O.; ADIGUZEL, A. Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. **Research Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 32–38, 2016.

BERG MILLER, M. E. et al. Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 207–227, 2012.

CHAKRABORTY, U. et al. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 625-634, 2009.

CHANTARASIRI, A. Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 3, 2015.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. UFV, 2001. 390p

DAR, M. A. et al. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 98, p. 73–80, 2015.

DAR, M. A.; PAWAR, K. D.; PANDIT, R. S. Prospecting the gut fluid of giant African land snail, *Achatina fulica* for cellulose degrading bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 103–111, 2018.

EL-BENDARY, M. A. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. Journal of Basic Microbiology, **Journal of basic microbiology**, v. 46, n. 2, p. 158-170, 2006.

ESTEVAM, A. et al. Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 9, p. 4276–4283, 1 mar. 2018.

FANG, H. et al. Biodegradability and ecological safety assessment of *Stenotrophomonas* sp. DDT-1 in the DDT-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, p. 145–153, 2018.

FERBIYANTO, A.; RUSMANA, I.; RAFFIUDIN, R. Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *Macrotermes gilvus*. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 22, n. 4, p. 197–200, 2015.

FOUTS, D. E. et al. Next Generation Sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

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

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. *Klebsiella*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–26.

GU, J. et al. Isobutanol and 2-ketoisovalerate production by *Klebsiella pneumoniae* via a native pathway. **Metabolic Engineering**, v. 43, p. 71–84, 1 set. 2017.

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

HENDERSON, G. et al. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. **PloS one**, v. 8, n. 9, e74787, 2013.

HU, X. et al. Cellulolytic Bacteria Associated with the gut of *Dendroctonus armandi* Larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Forests**, v. 5, n. 3, p. 455–465, 2014.

HUANG, S.; SHENG, P.; ZHANG, H. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 2563–2577, 2012.

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

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119–134, 2007.

KÄMPFER, P., GLAESER, S. P., & HOLMES, B. *Ochrobactrum*. In: **Bergey's Manual of Systemics of Archae and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–25, 2015.

KÄMPFER, P. et al. *Ochrobactrum pecoris* sp. nov., isolated from farm animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2278–2283, 2011.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current science**, v. 89, n. 1, p. 1–12, 2005.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503–507, 2008.

KHIANNANGAM, S. et al. Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 4, p. 90-96, 2014.

KIM, M.; MORRISON, M.; YU, Z. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 1, p. 49–63, 2011.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic rumen bacteria: Their ecology and functions. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 22, n. 1, p. 131–138, 2009.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2 sup., p. 133-163, 2007.

LADEIRA, S. A. et al. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, 2015.

LAMA, S.; SEOL, E.; PARK, S. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* J2B for the production of 1,3-propanediol from glucose. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1542–1550, 2017.

LIANG, Y. L. et al. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LO, Y. C. et al. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6–7, p. 417–425, 2009.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. Bacillus. In: **Bergey's Manual of Systemics of Archae and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–163, 2015.

MENG, F. et al. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 3, 2014.

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

MOHAPATRA, S. et al. Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, Pennisetum species through cellulase from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 262–272, 2018.

NAIR, A. S. et al. Waste office paper: A potential feedstock for cellulase production by a novel strain *Bacillus velezensis* ASN1. **Waste Management**, v. 79, p. 491–500, 2018.

NGOM, A. et al. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum clade* isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2004.

NOLLET, L.; VERSTRAETE, W. Gastro-enteric methane versus sulphate and volatile fatty acid production. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 42, n. 1–2, p. 113–131, 1996.

OLAJUYIGBE, F. M.; FATOKUN, C. O.; OYELERE, O. M. Biodelignification of some agro-residues by *Stenotrophomonas* sp. CFB-09 and enhanced production of ligninolytic enzymes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 120–130, 2018.

OSMAN, Y.; ABD ELRAZAK, A.; KHATER, W. Microbial biopolymer production by *Microbacterium* sp. WA81 in batch fermentation. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 250–262, 2016.

PADILHA, I. Q. M. et al. Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulase synthesized by *Bacillus* sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 35-42, 2015.

PALLERONI, N. J.; VOS, D.; MOOTER, V. DEN. *Stenotrophomonas*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–20.

PARK, J.; PARK, K. Improvement of the physical properties of reprocessed paper by using biological treatment with modified cellulase. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 1, p. 91–94, 2001.

PINHEIRO, G. L. et al. Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica*. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1-15, 2015.

POTPROMMANEE, L. et al. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1-16, 2017.

QIN, W. et al. Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 131–138, 2017.

SAINI, J. K.; ARTI; TEWARI, L. Simultaneous isolation and screening of cellulolytic bacteria: Selection of efficient medium. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 1339–1344, 2012.

SEO, J. K. et al. Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 isolated from the rumen of a native Korean goat. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 50–58, 2013.

SETA, K. et al. Potential use of methane fermentation digested slurry as a low-cost, environmentally-friendly nutrient for bioethanol production from crude glycerol by *Klebsiella variicola* TB-83D. **New Biotechnology**, v. 44, p. 1–5, 2018.

SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Production, characterization and environmental

applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 132–139, 2018.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512–526, 1993.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, Nei M, KUMAR S. 2011.MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TIWARI, B. et al. Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1102–1105, 1 set. 2016.

VENTORINO, V. et al. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. **Scientific Reports**, v. 5, ID 8161, 2015.

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

WAEONUKUL, R. et al. Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 grown on Avicel under aerobic conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 610–614, 2009.

WANG, Y. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on the microbial attachment and digestion of barley straw In vitro. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 66–74, 2012.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 259–263, 2011.

YANG, F. et al. Complete genome sequence of a xanthan-degrading *Microbacterium* sp. strain XT11 with the potential for xantho-oligosaccharides production. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 19–20, 20 mar. 2016.

YANG, X. et al. Improved production of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, p. 25–36, 2018.

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

## COVER LETTER

Para

XXXXXX,

Editor in Chief: XXXXXXXXXXXX

Caro editor,

Por favor, considere o documento de pesquisa original intitulado “Prospecção de bactérias com capacidade celulolítica de conteúdo ruminal bovino” por Sales, V. H. G., Guarda, E. A., Oliveira, E. M., Zilli, J.E. e Borges, W. L. para publicação no XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.

O presente trabalho relata o isolamento e a caracterização de bactérias obtidas a partir de conteúdo ruminal de bovinos que são capazes de hidrolisar biomassa celulósica. Os resultados permitiram identificar cinco gêneros distintos de bactérias capazes de degradar celulose utilizando bagaço de cana sem tratamento hidrolítico. O nosso trabalho apresenta novos isolados bacterianos potenciais para o processo de produção de enzimas para a degradação biológica dessa biomassa no processo de obtenção de etanol de segunda geração. Os autores leram e aprovaram o manuscrito submetido e assumem total responsabilidade pelo seu conteúdo. O manuscrito é um trabalho original dos autores e não foi submetido anteriormente à XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX ou a qualquer outro periódico. Os autores declaram não haver conflitos de interesse relativos a esta pesquisa ou seu financiamento.

Atenciosamente,

Prof. Victor Hugo Gomes Sales – Instituto Federal do Amapá, Brasil,  
Estudante de doutorado em Biotecnologia (BIONORTE), Universidade Federal do Tocantins  
Tocantins, Palmas – TO, Brasil.

Phone: (+55) 96 3198-2150 E-mail: victor.sales@ifap.edu.br

## RESEARCH HIGHLIGHTS

- Nós reportamos o isolamento de bactérias com capacidade celulolítica a partir do conteúdo ruminal de bovinos.
- Isolados dos gêneros *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Klebsiella* e *Stenotrophomonas* foram identificados por sequenciamento do 16S rDNA.
- Os isolados demonstraram degradação da celulose em bagaço de cana sem pré-tratamento.
- O estudo apresenta o conteúdo ruminal de bovinos como fonte potencial para o isolamento de bactérias celulolíticas.

**ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASE POR *BACILLUS* SP.  
BR13861 USANDO PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E MODELAGEM  
MATEMÁTICA POR REDES NEURAIS**

Sales, V. H. G.<sup>1,4,\*</sup>; Oliveira, E. M.<sup>2</sup>; Villa-Vélez, H. A.<sup>3</sup>; Guarda, E. A.<sup>4</sup> e Borges, W. L.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal do Amapá, Campus Macapá. BR 220 km 03 Bairro Brasil Novo, 68909-398, Macapá-AP, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade do Estado do Amapá. Av. Presidente Vargas, 650, Bairro Central, 68900-070, Macapá-AP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Maranhão, Coordenação do Curso de Engenharia Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologias, 65080-805, São Luís – MA, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas. Programa de pós-graduação Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Bionorte), Quadra 109 Norte, Av. NS15, ALCNO-14 Plano diretor, Palmas-TO, Brasil.

<sup>5</sup>Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Macapá-AP, Brasil.

\*Autor para correspondência: Victor Hugo Gomes Sales, e-mail: [victor.sales@ifap.edu.br](mailto:victor.sales@ifap.edu.br)

### RESUMO

Diversas estratégias para verificar a eficiência no processo de produção de celulase por micro-organismos vêm sendo usadas para produzir respostas rápidas e confiáveis, sendo essas baseadas em planejamentos experimentais e modelagem matemática por redes neurais artificiais. O trabalho objetivou otimizar a produção de celulase por um *Bacillus* sp. em cultivo submerso usando planejamentos experimentais e modelagem matemática. Sete fatores nutricionais foram estudados previamente, e pré-selecionados quanto ao efeito significativo positivo no processo de produção de celulase utilizando um delineamento Plackett-Burman e Análise multivariável (*Stepwise*). Após a seleção dos fatores foi realizada uma otimização do processo usando um Delineamento Central Composto Rotacional e Redes Neurais Artificiais. Três fatores nutricionais foram previamente selecionados, sendo eles: Ureia,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e Extrato de Levedura. A modelagem matemática por Redes Neurais Artificiais apresentou melhor ajuste quando comparado aos outros modelos encontrados, para essa rede a melhor arquitetura foi a *feed-forward* composta por três neurônios na camada oculta, com a função de treinamento “trainlm” e função de transferência “radbas”, com a melhor validação estatística ( $R^2_{\text{adj}} = 0,963$ , MRE = 2,111% e mse = 0,01852). Houve um incremento de 2,13 vezes no processo de produção de celulase pelo isolado a partir das estratégias proposta nesse trabalho.

Palavras-chave: Plackett-Burman; DCCR; Redes Neurais Artificiais; *Bacillus*; FPase;

## 1. INTRODUÇÃO

O etanol de segunda geração é um biocombustível renovável proveniente de fontes sacaríneas, amiláceas e lignocelulósicas, pouco poluente (YE et al., 2016) e de grande biodisponibilidade na natureza (HEREDIA; JIMNEZ; GUILLN, 1995). Este tipo de combustível emerge como um dos principais focos de pesquisa na atualidade devido a que esse não compete com a demanda de produção de alimentos e também por ser uma alternativa real ao suprimento do cada vez mais escasso combustível fóssil, causador de grandes impactos e mudanças ambientais irreversíveis (ALVIRA et al., 2010).

A produção de etanol através de fontes lignocelulósicas compreende as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação (DE FIGUEIREDO et al., 2017). O processo de hidrólise enzimática é o que mais limita a produção a escala industrial e, que por sua vez, é o impulsor do desenvolvimento de tecnologias de ponta para a obtenção de um combustível mais competitivo. Algumas estratégias podem ser utilizadas para a redução do elevado custo desse processo, sendo elas: a utilização de matérias-primas baratas (resíduos), implementação de novas tecnologias no processo de pré-tratamento e produção de enzimas que resultam na produção máxima de açúcares redutores e com baixa produção de inibidores (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Além dessas estratégias, nos últimos anos pesquisas voltadas para otimização desses processos, conjuntamente, ou isoladamente vem sendo realizadas para tornar essa tecnologia competitiva (BALUSU et al., 2005; GIORDANO; BECCARIA; GOICOECHEA, 2011; JUNG et al., 2015; NAIR et al., 2018; SAINI et al., 2015; SHAJAHAN et al., 2017; SREENA; SEBASTIAN, 2018).

O processo de hidrólise enzimática da biomassa em açúcares fermentescíveis é realizada por enzimas excretadas por micro-organismos, sendo as celulasas (endoglucanases, EC 3.2.1.4), exoglucanases (celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21)) as principais responsáveis pela conversão da cadeia polimérica da celulose em açúcares monoméricos (BRAS et al., 2011). Numerosos micro-organismos com capacidade celulolítica tem sido isolados e identificados, sendo os fungos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete* e *Fomitopsis* os mais estudados, pois são os degradadores naturais desses materiais na natureza (LIANG et al., 2014), portanto, os mais comercializados para tais propósitos (GUSAKOV; SINITSYN, 2012).

Além dos fungos, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas com bactérias celulolíticas devido ao seu rápido crescimento, a expressão de complexos multienzimáticos e a resistência a ambientes extremos (AZADIAN et al., 2017; IRFAN et al., 2017; LADEIRA et

al., 2015; MENG et al., 2014; PADILHA et al., 2015; POTPROMMANEE et al., 2017). Entre as bactérias destacam-se as pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Bacterioides*, *Acetovibrio*, *Streptomyces*, *Microbispora*, *Fibrobacter* e *Paenibacillus* que são capazes de produzir diferentes tipos de celulases quando incubadas em condições anaeróbias ou aeróbicas (AZADIAN et al., 2017; BALTACI; ADIGUZEL, 2016; HU et al., 2014; KHIANNIGAM et al., 2014; LO et al., 2009; NAIR et al., 2018; SEO et al., 2013; VYAS; CHHABRA, 2017; WAEONUKUL et al., 2009; WILSON, 2011). As espécies de *Bacillus* atraíram a atenção industrial devido à sua alta taxa de crescimento, a qual promove uma redução no tempo de fermentação e a secreção de enzimas extracelulares, o que propicia redução de custo efetivo no processo de separação (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004).

A eficiência da produção de celulase por bactérias é estudada através de estratégias de avaliação de parâmetros nutricionais e físicos pelo método OVAT – *One Variable At a Time* (LYND et al., 2002). Contudo, essa estratégia implica no uso de largos períodos de tempo já que são usados um alto número de experimentos, tornando difícil a avaliação da interação entre as variáveis do processo e muitas vezes não apresentando bons resultados por não levar em consideração as interações entre os fatores analisados (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010; MOORTHY; BASKAR, 2013). Assim, visando produzir respostas rápidas e confiáveis estratégias baseadas em métodos experimentais estatísticos vem sendo utilizadas, tais como: o delineamento Plackett-Burman (PB), utilizado para selecionar variáveis críticas em processos e o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), utilizado para avaliar a interação das variáveis independentes do processo e otimizar processos (BALUSU et al., 2005; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Sendo o processo de produção de enzimas extracelulares influenciados pelos parâmetros nutricionais e ambientais, esses devem ser otimizados em busca do nível ótimo, tornando o processo rápido e conveniente (KUMAR et al., 2011; KUPSKI et al., 2014). Abordagem convencional de otimização, ou seja, "Uma variável por vez" não consegue integrar várias variáveis de cada vez (HARSHVARDHAN; MISHRA; JHA, 2013), portanto, vários métodos estatísticos, como a metodologia de superfície de resposta (RSM) (BALUSU et al., 2005; PANDEY; NEGI, 2015; SHAJAHAN et al., 2017; SREENA; SEBASTIAN, 2018), Regressão Linear Multivariável (*Stepwise*) (CHEN et al., 2013; VILLA-VÉLEZ; VÁQUIRO; TELIS-ROMERO, 2015) e Redes Neurais Artificiais (RNA) (VATS; NEGI, 2013; VILLA-VÉLEZ; VÁQUIRO; TELIS-ROMERO, 2015) foram exploradas por pesquisadores para obter o nível ótimo de diferentes processos industriais. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi de

umentar a produção de celulase de um isolado de *Bacillus* sp. BR13861 previamente isolado de conteúdo ruminal bovino, a partir da seleção dos fatores nutricionais do meio de cultivo com efeito significativo positivo e em seguida a otimização do processo usando as estratégias de planejamentos experimentais e modelagem matemática por rede neural artificial.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima e preparação da amostra**

Foi utilizado bagaço de cana sem pré-tratamento para a produção de celulase em fermentação submersa. O bagaço de cana foi seco a 70°C durante 48h, moído em moinho tipo Wiley e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min, antes do processo de fermentação. Todos os reagentes químicos utilizados no experimento são de grau analítico e não sofreram nenhum tipo de modificação.

### **2.2 Isolamento e identificação do isolado celulolítico**

Foi utilizada a linhagem previamente de conteúdo ruminal de bovinos e analisada quanto à capacidade celulolítica. A extração do DNA total do micro-organismo foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de DNA no produto obtido foi mensurada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e a integridade verificada em gel de Agarose (1% m/v, 60V, 1h).

O gene 16S rDNA foi amplificado com os iniciadores 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' e 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. A reação de PCR, com volume final de 50 µl, foi realizada em termociclador (Applied Biosystems™ SimpliAmp) nas seguintes condições: Taq DNA polimerase 1,5 U; tampão de PCR 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 50 mM de KCl – Promega, Madison, WI, USA), MgCl<sub>2</sub> 1,75 mM (Promega, Madison, WI, USA), dNTP 0,25 mM de cada, 0,2 µM de cada iniciador e 1 µl do DNA molde. A reação de amplificação foi realizada utilizando desnaturação inicial a 94°C/3 min, seguido de 29 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 58°C/1 min e extensão a 72°C/2 min, seguido de extensão final a 72°C/7 min.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando DYEnamic™ ET Dye Terminator kit (MegaBACE™) e um sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life

Sciences). A identidade da sequência obtida foi estimada com base em comparação com acessos disponíveis no banco de dados do *National Center Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1997). Posteriormente, as sequências foram alinhadas no Cluster W e a árvore filogenética foi construída baseada no método da máxima verossimilhança a 1000X bootstraps (TAMURA; NEI, 1993; TAMURA et al., 2011) e a construção da árvore com auxílio do software Mega X (KUMAR et al., 2018).

O acesso ao recurso genético foi cadastrado no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado do Ministério do Meio Ambiente (SISGEN), Brasil sob o número ADAD04C de acordo com a Lei 13.123/2015 e seus regulamentos (ANEXO 2).

### 2.3 Índice enzimático

O índice enzimático foi calculada de acordo com a metodologia proposta por (FERBIYANTO; RUSMANA; RAFFIUDIN, 2015), seguindo a equação abaixo:

$$AC = [(Diâmetro da Zona Clara - Diâmetro da colônia) / Diâmetro da colônia] \quad \text{Eq. (1)}$$

### 2.4 Cultivo submerso

Para avaliação da atividade de celulase total os isolados foram cultivados em caldo nutriente e 1 mL do cultivo ( $10^{10}$  UFC/mL) foi utilizado como inóculo em 30 mL do meio mineral contendo (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,4; Peptona bacteriológica, 1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3; Extrato de levedura, 0,25;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,005;  $\text{CoCl}_2$ , 0,002;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,001;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,0016 e 0,3 mL/L de Tween 80, pH ajustado para 4,8, suplementado com bagaço de cana 1% (m/v), sem pré-tratamento hidrolítico. As amostras foram então incubadas sob agitação orbital a 140 rpm, 37°C por 72 h. O bagaço de cana utilizado foi secado a 70°C durante 48 h, moído em moinho tipo Wiley e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min, antes do processo de fermentação submersa.

O extrato bruto obtido foi filtrado e 15 mL centrifugado a 3600 rpm por 10 min, sendo retirada uma alíquota de 1 mL do sobrenadante para a análise da atividade de celulase total extracelular.

## 2.5 Atividade celulase total (FPase)

A avaliação da atividade FPase (em Papel Filtro), foi realizada de acordo com o método proposto por Ghose (1987) e a determinação dos teores de açúcares redutores por espectrofotometria a 540 nm, conforme método DNS (MILLER, 1959). Maiores detalhes das etapas para quantificação da atividade FPásica pode ser encontrada no Apêndice 1.

## 2.6 Seleção dos fatores nutricionais do meio de cultivo para a produção de celulase

Sete fatores nutricionais do meio do cultivo submerso ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Peptona,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Extrato Levedura e Ureia) foram analisados por duas metodologias diferentes (Plackett-Burman e Análise Multivariável - *Stepwise*) visando selecionar os principais fatores com efeitos significativos positivos no processo de produção de celulases pelo isolado, usando o software STATISTICA 2017a (Statsoft, Tulsa, US).

### 2.6.1 Delineamento Plackett-Burman

O delineamento Plackett-Burman utilizado para selecionar os fatores nutricionais do meio de cultivo submerso seguirá o modelo matemático descrito na equação (2), apresentando um total de 12 corridas com 4 pontos centrais para estimar o erro experimental (PLACKETT; BURMAN, 1946; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \varepsilon \quad i=1,2, \dots k \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde: Y é a variável independente (FPU/mL),  $\beta_0$  é o valor do intercepto do modelo,  $\beta_i$  é o coeficiente linear,  $x_i$  é o nível da variável independente e  $\varepsilon$  é o erro experimental.

Esse delineamento não considera a interação entre as variáveis, sendo uma abordagem linear utilizada para triagem de variáveis com efeitos significativos ( $p < 0,1$ ) (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os principais efeitos do delineamento são calculados como a diferença entre a média das medições feitas no nível alto (+1) e no nível baixo (-1) de cada fator (PLACKETT; BURMAN, 1946). Na tabela 4 é apresentada o esquema do delineamento PB utilizado no experimento com os respectivos níveis de cada fator.

Tabela 4. Delineamento Plackett & Burman para composição do meio de cultivo para produção de FPase.

Fatores nutricionais	Símbolo	Níveis dos fatores		
		-1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	+1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	x <sub>1</sub>	0,0	2,0	4,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	x <sub>2</sub>	0,0	1,4	2,8
Peptona (g/L)	x <sub>3</sub>	0,0	1,0	2,0
CaCl <sub>2</sub> (g/L)	x <sub>4</sub>	0,0	0,3	0,6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	x <sub>5</sub>	0,0	0,3	0,6
Extrato Levedura (g/L)	x <sub>6</sub>	0,0	0,25	0,5
Ureia (g/L)	x <sub>7</sub>	0,0	0,3	0,6

a Ausência do fator nutricional

b Pontos centrais em quadruplicata para estimar o erro experimental

### 2.6.2 Análise de regressão linear multivariável (*Stepwise*)

Foi empregada a análise de Regressão linear multivariável combinando os sete fatores nutricionais do meio de cultivo submerso através da função *Stepwisefit*, que utiliza a melhor combinação dos fatores baseados na adição ou exclusão dos termos no modelo matemático que está sendo avaliado a partir de um teste de significância ( $p < 0,05$ ). Assim, o modelo estabelecido pelo procedimento *Stepwise* engloba um conjunto de preditores que apresentam efeito importante sobre as variáveis resposta, e que melhor explicam a resposta de acordo com as interações em consideração (CEVIK, 2007; CHEN et al., 2013).

## 2.7 Otimização da produção de celulase

### 2.7.1 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

Após a pré-seleção dos fatores nutricionais com efeito positivo e significativo no processo de produção de celulase pelo isolado, foi realizado um delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).

Neste planejamento foi utilizado um nível de significância de 95%, cinco níveis e três repetições no ponto central para estimar o erro experimental, totalizando 17 corridas. Três variáveis previamente selecionadas foram utilizadas para o processo de otimização da produção

de celulase (Tabela 5). Todas as corridas foram realizadas em triplicata e a atividade de celulase total em papel filtro (FPU/ml) foi tomada como a resposta.

Os dados experimentais obtidos no planejamento DCCR foram ajustados a um modelo de regressão polinomial de segunda ordem (Eq.(3)) para prever as respostas individuais.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad i, j= 1,2, \dots k \quad \text{Eq. (3)}$$

onde: Y é a variável dependente (FPU/mL) prevista,  $x_i$  e  $x_j$  são variáveis de entrada que influenciam a variável de resposta Y,  $\beta_0$  é o termo de compensação (Intercepto),  $\beta_i$  é o i-ésimo coeficiente linear,  $\beta_{ii}$  é o coeficiente do termo quadrático,  $\beta_{ij}$  é coeficiente de interação entre as variáveis independente e  $\varepsilon$  é o erro experimental.

Tabela 5. Delineamento Central Composto Rotacional para três fatores nutricionais previamente selecionados para otimizar a produção de FPase.

Fatores nutricionais	Símbolo	Nível dos fatores				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Ureia (g/L)	$x_1$	1,318	2,0	3,0	4,0	4,681
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	$x_2$	3,636	5,0	7,0	9	10,363
Extrato de levedura (g/L)	$x_3$	3,954	6,0	9,0	12,0	14,045

### 2.7.2 Modelagem por Redes Neurais Artificiais (RNA)

A RNA foi usada para descrever a relação dos três fatores nutricionais com a produção de celulase total (FPU/mL) usando um modelo não linear único. Para essa abordagem, foram consideradas as arquiteturas *feed-forward* e *cascade-forward* de redes de regressão com uma camada oculta. As funções de treinamento de Levenberg-Marquardt (trainlm) e quase-Newton backpropagation (trainbfg) e as funções de transferências: tansig (Eq. (4)), logsig (Eq. (5)), softmax (Eq. (6)) e radbas (Eq. (7)) foram avaliadas para cada arquitetura de rede (VILLA-VÉLEZ; VÁQUIRO; TELIS-ROMERO, 2015a). Os números de neurônios de camada oculta, variaram de dois a dez e foram testados para cada arquitetura acima descrita RNA, totalizando 16 modelos.

$$tansig(n) = 2/[1 + \exp(-2n)] - 1 \quad \text{Eq. (4)}$$

$$logsig(n) = 1/[1 + \exp(-n)] \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\text{softmax}(n) = \exp(n) / \text{sum}[\exp(n)] \quad \text{Eq. (6)}$$

$$\text{radbas}(n) = \exp(-n^2) \quad \text{Eq. (7)}$$

onde:  $n$  é a matriz dos vetores de entrada (coluna) da rede neural artificial.

### 2.8.3 Validação estatística

Neste estudo as modelagens matemáticas foram aplicadas usando as funções da biblioteca da *Statistic Toolbox do Matlab® 7.1* (MathWorks Inc., Natick, MA, EUA). Na avaliação dos métodos, os coeficientes ajustados de determinação “ $R^2_{adj}$ ” (Eq. (8)), o erro médio relativo “ $MRE$  (%)” (Eq. (9)) e o erro médio quadrático “ $mse$ ” (Eq. (10)) foram empregados para avaliar os parâmetros do modelo matemático, apresentando a proximidade entre os dados experimentais e previstos, a qualidade de um estimador ou o conjunto de previsões em termos de sua variação, bem como o grau de precisão da rede neural ou do modelo matemático previsto, respectivamente. Além disso, a função “regstats” foi usada para observar os valores residuais entre os dados experimentais e calculados e, a função “lillietest” foi usada para determinar se os resíduos seguiram uma distribuição normal (VILLA-VÉLEZ et al., 2015b).

$$R^2_{adj} = 1 - (1 - R^2) \frac{(n-1)}{(n-m)} \quad \text{Eq. (8)}$$

$$MRE = \frac{100}{n} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{|x_i^* - X_i|}{x_i} \quad \text{Eq. (9)}$$

$$mse = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i^* - X_i)^2 \quad \text{Eq. (10)}$$

onde,  $X_i^*$  representa os valores experimentais;  $X_i$  representa os valores estimados;  $n$  é o número de valores experimentais,  $m$  é o número de parâmetros estimados e  $R^2$  é o coeficiente de determinação. Um modelo com um  $MRE$  abaixo de 10% é considerado com boa precisão, e um modelo com um  $MRE$  entre 10 e 15% é considerado aceitável (SABLANI; BAIK; MARCOTTE, 2002).

## 2.9 Validação do modelo matemático

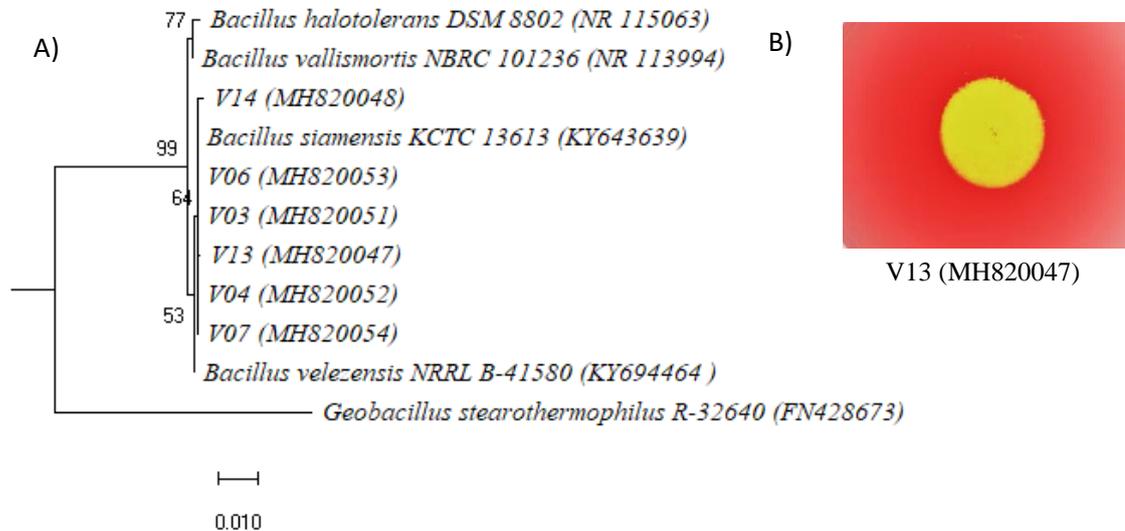
Após a otimização do processo de produção de celulase, foi realizada uma simulação com os fatores otimizados visando obter o valor estimado de produção de celulase, essas condições simuladas foram realizadas experi que será comparado com o valor obtido experimentalmente, afim de verificar a eficiência do modelo proposto durante a otimização.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Micro-organismo celulolítico

Foi isolado previamente de amostras compostas de conteúdo ruminal bovino uma bactéria com capacidade celulolítica e caracterizado como *Bacillus* sp. por biologia molecular (Figura 10A), com alta similaridade com *Bacillus siamensis* KCTTC 13613. A sua atividade celulolítica foi analisada em meio sólido suplementado com CMC, evidenciando atividade celulolítica após a revelação com vermelho Congo (Figura 10B). A atividade FPase foi mensurada após a fermentação submersa em meio mineral suplementado com bagaço de cana apresentando valor igual a  $0,45 \pm 0,025$  FPU/mL. Atualmente, o gênero *Bacillus* apresenta 377 espécies listadas ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)) isolado do solo (LOGAN; DE VOS, 2015), ambiente marinho, em resíduos e em trato digestório de diferentes animais (BALTACI; ADIGUZEL, 2016; CHANTARASIRI, 2015; DAR; PAWAR; PANDIT, 2018; LIANG et al., 2014; NAIR et al., 2018). Em trabalhos recentes esse gênero foi reportado como produtor de celulase (AZADIAN et al., 2017; DAR et al., 2015; DAR; PAWAR; PANDIT, 2018; FERBIYANTO; RUSMANA; RAFFIUDIN, 2015). Um estudo de mapeamento genômico completo do *Bacillus* sp. O275 foi identificada a atividade enzimática celulolítica, xilanolítica e lignocelulolítica, sendo essa última atividade relacionada a capacidade desse isolado em produzir peroxidases e laccases que estão envolvidas no processo de degradação de lignina (GONG et al., 2017), tal capacidade de produzir lignocelulases por esse isolado, reforça a produção de celulase pelo isolado em nosso trabalho, que produziu celulases em meio suplementado com bagaço de cana sem tratamento hidrolítico.

Figura 10. Isolado V13 BR13861. A) Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei; B) Atividade celulolítica em meio sólido suplementado com CMC e revelado com vermelho congo.



A sequência do 16S rDNA foi depositada no Genbank do NCBI (*National Center Biotechnology Information*) sob o número MH820047 e o isolado depositado na Coleção Johanna Döbereiner (CRB-JD) da Embrapa Agrobiologia sob o número BR 13961. De acordo com a Lei 13.123 do Ministério do Meio Ambiente do Brasil, o projeto foi cadastrado no sistema nacional de sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado sob o número ADAD04C.

### 3.2 Seleção dos fatores nutricionais com efeito significativo

A matriz do delineamento experimental para determinação das variáveis importantes no processo de produção de celulase pelo isolado *Bacillus* sp. BR13861 é apresentado na Tabela 6. Neste estudo, as variáveis com níveis de confiança acima de 95% na regressão multivariável e 90% no delineamento Plackett-Burman foram consideradas significativas, afetando a produção de celulase total (FPase). Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata e a média da atividade de celulase total FPase expressa em (FPU/mL) foi tomada como a resposta.

Tabela 6. Matriz dos delineamentos experimentais de seleção dos fatores nutricionais e os dados de resposta para a produção de celulase total

Corridas	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Peptona	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Extrato		FPU/mL±DP
						Levedur	Ureia	
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,76±0,060
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1,03±0,031
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,76±0,027
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,78±0,040
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,80±0,046
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0,82±0,019
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0,70±0,017
8	1	1	1	1	1	1	1	0,90±0,015
9	0	0	0	0	0	0	0	0,77±0,027
10	0	0	0	0	0	0	0	0,78±0,028
11	0	0	0	0	0	0	0	0,81±0,023
12	0	0	0	0	0	0	0	0,76±0,024

A partir dos dados experimentais de produção de celulase foi aplicada a Análise de Regressão Multivariável (Stepwise) e na Tabela 7 é apresentada a Análise de Variância (ANOVA) dos fatores nutricionais no processo de produção de celulase pelo isolado. De acordo com a ANOVA a regressão foi significativa ( $p < 0,05$ ) com  $R^2_{Adj} = 0,9179$ , indicado que o modelo matemático gerado se ajusta bem aos dados referentes a seleção dos fatores nutricionais. Cinco fatores apresentaram efeito significativo no processo, sendo dois fatores com efeito negativo (Peptona e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e três com efeitos positivos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Extrato de levedura e Ureia) com efeito positivo.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) da regressão multivariável (*Stepwise*) para a seleção dos fatores nutricionais do meio de cultivo submerso para a produção de celulase pelo isolado.

Efeito	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Ajustado</sub>	Erro padrão
Regressão	0,102348	7	0,014621	16,96118	0,020251*	0,9753	0,9179	0,02936
Residual	0,002586	3	0,000862	-	-	-	-	-
Total	0,104935	10	-	-	-	-	-	-

\* Significativo a 5% de significância

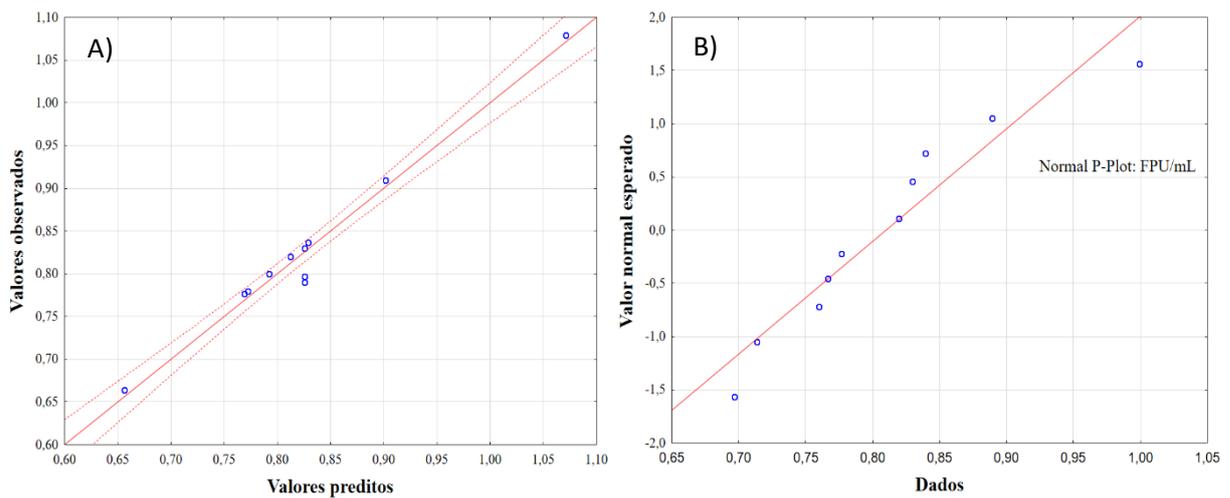
O modelo preditivo da regressão no processo de avaliação dos fatores é apresentado a seguir:

$$Y = 0,749 + 0,030X_1 - 0,036X_2 - 0,035X_3 + 0,156X_4 + 0,210X_5 \quad \text{Eq. (11)}$$

onde: Y = Produção de celulase total (FPU/mL); X<sub>1</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; X<sub>2</sub> - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; X<sub>3</sub> - Peptona; X<sub>4</sub> - Extrato de levedura e X<sub>5</sub> - Ureia.

A estatística do modelo matemático da regressão multivariável dos valores observados e da distribuição normal, estão representados na figura 11A e 11B, respectivamente, indicando boa precisão na condução do experimento de seleção dos fatores nutricionais.

Figura 11. Gráficos A) Valores observados versus valores preditos pelo modelo matemático da produção de celulase em um intervalo de 95% de confiança e B) Probabilidade normal da análise multivariável (*Stepwise*).

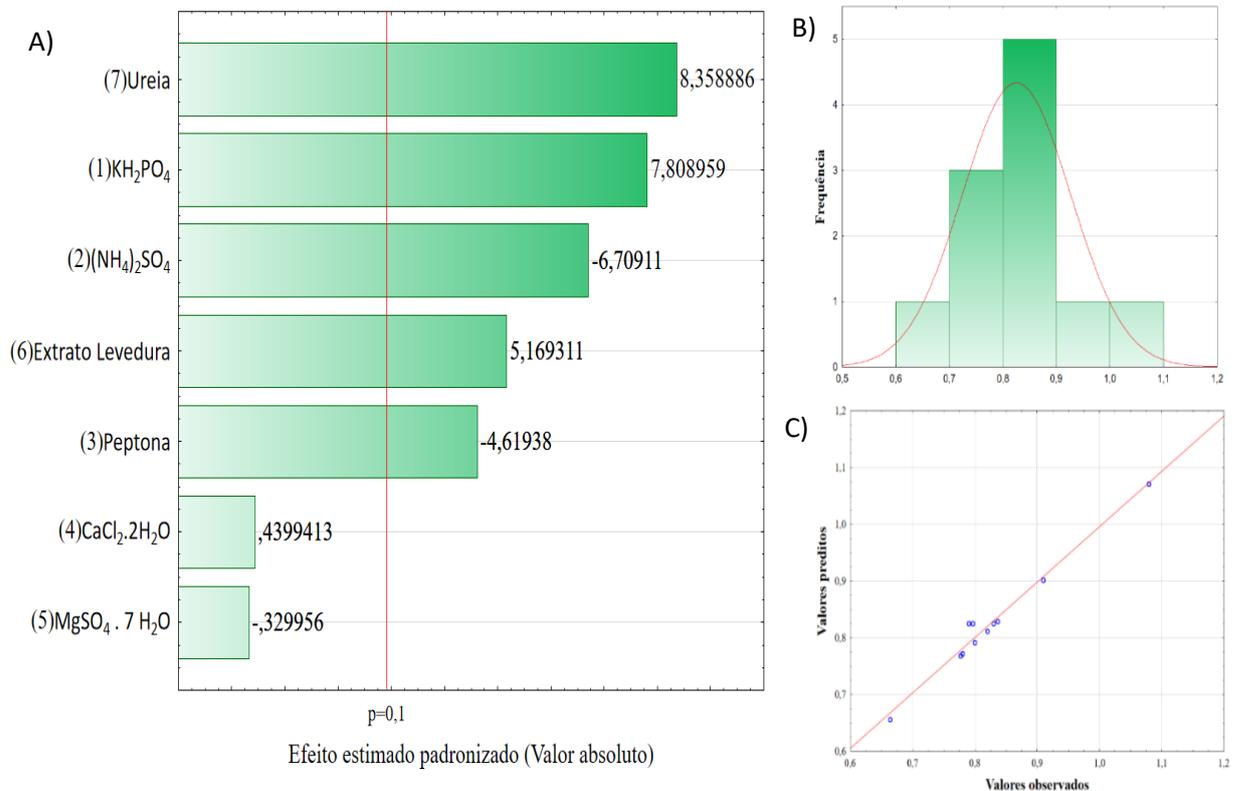


Na Figura 12A é apresentada o digrama de Pareto, que apresenta os fatores nutricionais com efeito significativo no processo de produção de celulase. O gráfico da distribuição normal (Figura 12B) e os valores preditos pelo modelo matemático versus valores observados (Figura 12C), demonstram que os dados apresentaram distribuição normal e estão bem ajustados a reta.

Os fatores nutricionais (Ureia, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Extrato de levedura) apresentaram efeito positivo e significativo, enquanto as variáveis [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Peptona] apresentaram efeito negativo e significativo no processo de produção de celulase no meio de cultivo submerso

(Figura 12A) usando o delineamento Plackett-Burman. As mesmas variáveis foram selecionadas pelo modelo matemático do delineamento.

Figura 12. Gráficos do delineamento Plackett-Burman A) Diagrama de Pareto; B) Histograma da distribuição normal dos dados; C) Valores preditos versus valores observados.



O modelo preditivo do delineamento Plackett-Burman é apresentado a seguir:

$$Y = 0,749 + 0,030X_1 - 0,036X_2 - 0,035X_3 + 0,156X_4 + 0,210X_5 \quad \text{Eq. (12)}$$

Onde: Y = Produção de celulase total (FPU/mL); X<sub>1</sub> – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; X<sub>2</sub> – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; X<sub>3</sub> – Peptona; X<sub>4</sub> – Extrato de levedura e X<sub>5</sub> – Ureia.

As variáveis Ureia, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Extrato de levedura por apresentarem efeito positivo na produção de celulase pelo isolado foram pré-selecionadas para a etapa seguinte (otimização por DCCR e Redes Neurais Artificiais).

### 3.3 Otimização do processo de produção de celulase

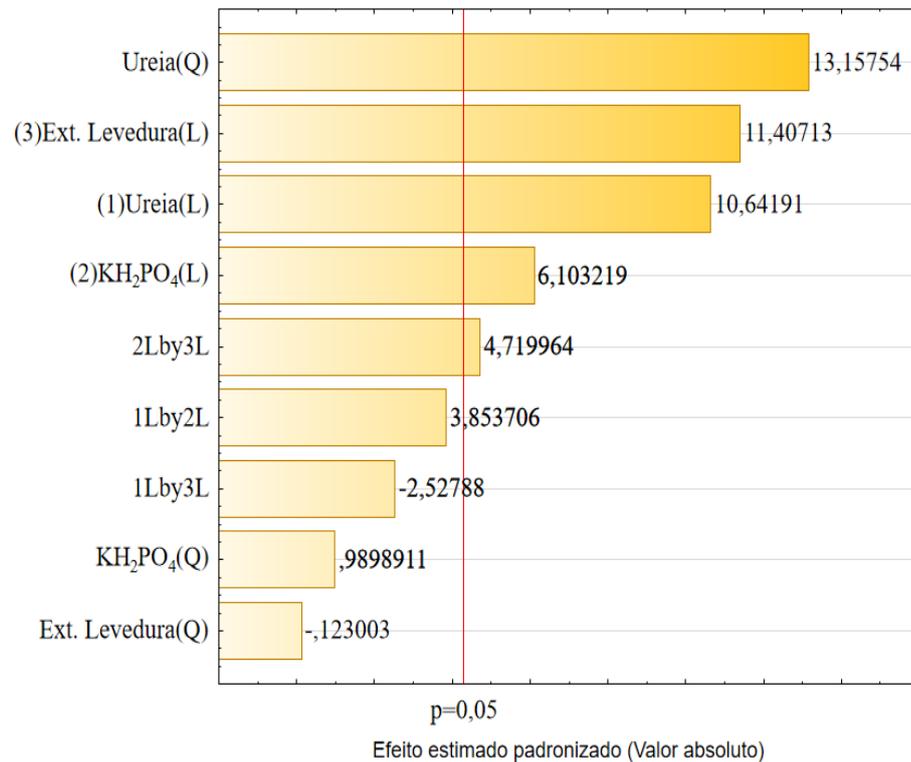
Três variáveis significativas (Ureia,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e Extrato de levedura) determinados a partir do delineamento PB e ARM (Stepwise) foram investigados afim de otimizar o processo de produção por DCCR e RNA afim de determinar os efeitos de cinco níveis e três fatores e suas interações na produção de celulase. As variáveis foram projetadas conforme a matriz apresentada na Tabela 8. Todas os experimentos foram realizados em quintuplicata e a média da atividade de celulase total FPase expressa em (FPU/mL) foi tomada como a resposta, variando de 0,369 a 1,051 FPU/mL.

Tabela 8. Matriz do DCCR no processo de otimização da produção de celulase total.

Corridas	Ureia	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Extrato Levedura	FPU/mL±DP
1	-1	-1	-1	0,448±0,006
2	-1	-1	1	0,611±0,030
3	-1	1	-1	0,491±0,020
4	-1	1	1	0,667±0,021
5	1	-1	-1	0,783±0,021
6	1	-1	1	0,687±0,006
7	1	1	-1	0,806±0,055
8	1	1	1	1,051±0,015
9	-1,68	0	0	0,872±0,006
10	1,68	0	0	0,832±0,015
11	0	-1,68	0	0,548±0,011
12	0	1,68	0	0,614±0,015
13	0	0	-1,68	0,369±0,021
14	0	0	1,68	0,743±0,021
15	0	0	0	0,548±0,011
16	0	0	0	0,601±0,017
17	0	0	0	0,574±0,008

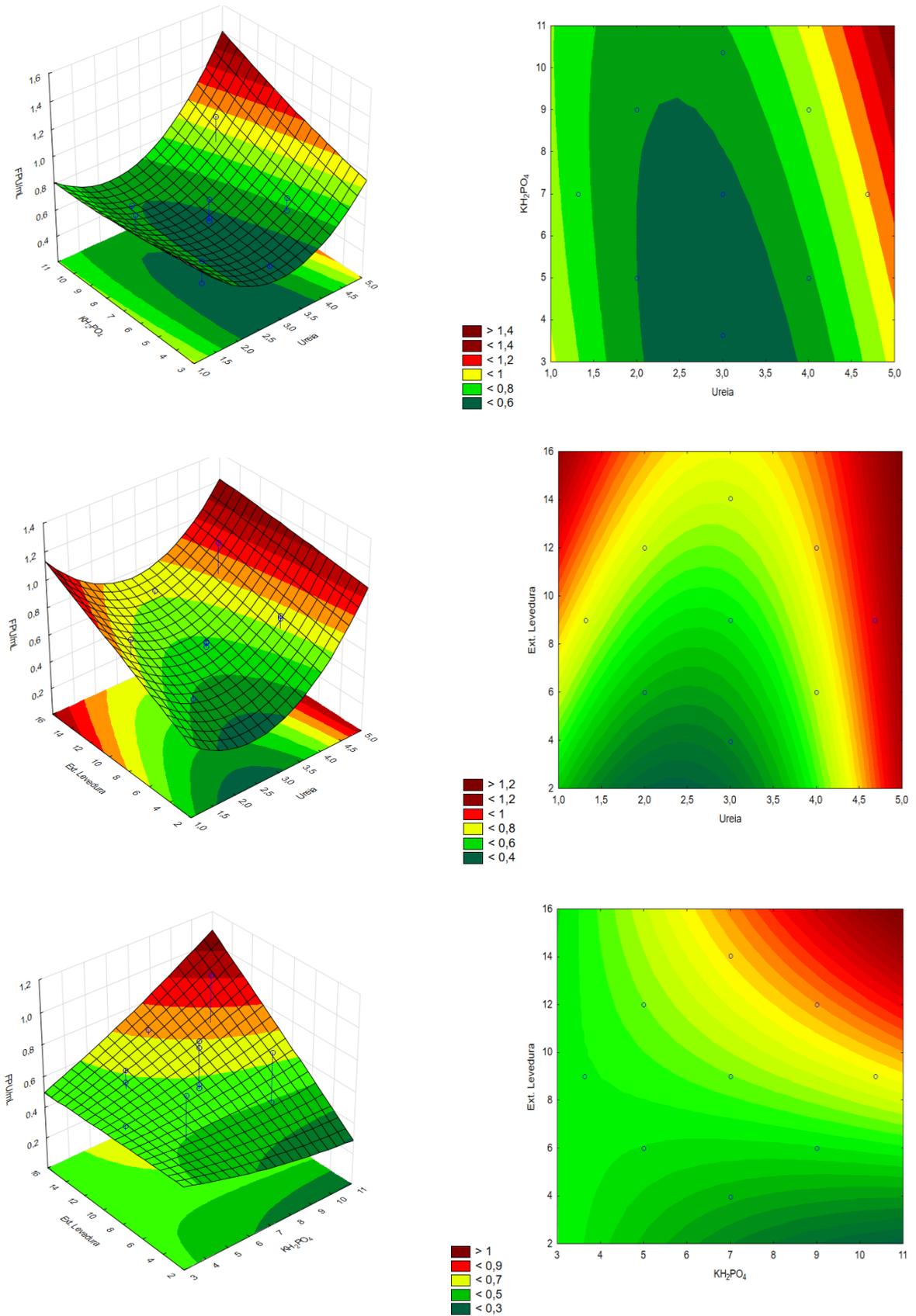
Na Figura 13 está representada no diagrama de Pareto com os efeitos dos fatores nutricionais pré-selecionados para o processo de otimização. Os fatores  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Extrato de Levedura e Ureia foram significativos a um nível de 5% de significância. A Figura 14 estão representadas as superfícies de resposta e gráficos de contorno das variáveis.

Figura 13. Diagrama de Pareto do Delineamento Central Composto Rotacional no processo de otimização da produção de celulase pelo isolado celulolítico



O valor do coeficiente de determinação do DCCR foi de 0,775 e um valor de  $R^2 > 0,75$  indica que o modelo é adequado e pode representar a relação real entre os fatores determinados. Contudo, a força em prever as respostas de um modelo é maior quando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) atinge valores próximos a 1 (CUI; ZAO, 2012). A precisão adequada é basicamente uma medida da relação sinal/ruído (S/N), e uma relação maior que 4 é desejável (JEONG;KIM, 2009). Neste estudo, a relação sinal ruído foi calculada usando a metodologia de Taguchi onde o valor maior de resposta é melhor ( $S/N = -10\log\sum y^{-1}/n$ ) para projetos robusto, a precisão adequada de 21,29 foi calculada e indica que este modelo pode ser usado no processo de produção de celulase. Ressalta que a falta de ajuste foi significativa, assim o modelo pode ser melhor ajustado (IEMMA; RODRIGUES, 2009).

Figura 14. Superfícies de resposta e gráfico de contorno dos fatores nutricionais na produção de celulase total pelo isolado.



Através da aplicação da análise de variância de regressão quadrática (ANOVA) nos dados experimentais, os resultados do DCCR foram analisados com base na equação polinomial de segunda ordem, como segue:

$$Y = 1,596 - 0,602X_1 + 0,104X_1^2 - 0,125X_2 + 0,001X_3 + 0,007X_2X_3 \quad \text{Eq. (13)}$$

Onde: Y = Produção de celulase total (FPU/mL); X<sub>1</sub> -Ureia; X<sub>2</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; X<sub>3</sub> – Extrato de levedura.

### 3.4 Redes Neurais Artificiais (RNA)

A matriz dos dados para a modelagem por RNA é apresentada na Tabela 9. A atividade da celulase total (FPU/mL) expressa como a média de dez repetições em cada corrida, totalizando 170 dados experimentais.

Tabela 9. Matriz dos dados para a modelagem matemática por redes neurais artificiais

Corridas	Ureia	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Extrato de Levedura	FPU/mL±DP
1	4	1,5	2	0,863±0,018
2	4	1,5	6	0,816±0,016
3	4	4,5	2	1,038±0,020
4	4	4,5	6	0,855±0,011
5	8	1,5	2	0,847±0,013
6	8	1,5	6	0,796±0,051
7	8	4,5	2	0,821±0,021
8	8	4,5	6	0,850±0,017
9	2,6	3	4	0,959±0,023
10	9,4	3	4	0,896±0,048
11	6	0,5	4	0,986±0,010
12	6	5,5	4	0,863±0,012
13	6	3	0,6	0,832±0,043
14	6	3	7,4	1,408±0,015
15	6	3	4	0,897±0,018
16	6	3	4	0,871±0,020
17	6	3	4	0,884±0,018

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para o desempenho da RNA. Uma boa validação estatística ( $R^2_{\text{ajustado}} = 0,963$ ,  $MRE = 2,111\%$  e  $mse = 0,01852$ ), pode ser observada na arquitetura de RNA (*feed-forward*), composta pela função de transferência “radbas” com três neurônios na camada escondida, apresentando as melhores avaliações.

Tabela 10. Melhores resultados e validação estatística da análise de redes neurais artificiais.

Função de treinamento	Arquitetura	Função de transferência	Número de neurônios	Número de parâmetros	$R^2$	$R^2_{adj}$	$MRE$ (%)	$mse$ ( $\times 10^{-2}$ )
trainlm	Feed-forward	tansig	4	21	0,966	0,962	2,127	1,866
		softmax	5	26	0,966	0,960	2,112	1,852
		logsig	4	21	0,966	0,962	2,120	1,859
		radbas	3	16	0,966	0,963	2,111	1,852
	Cascade-forward	tansig	3	19	0,966	0,962	2,126	1,864
		softmax	4	24	0,966	0,961	2,128	1,865
		logsig	3	19	0,966	0,962	2,128	1,866
		radbas	2	14	0,965	0,962	2,172	1,904
trainbfg	Feed-forward	tansig	7	36	0,963	0,954	2,097	1,827
		softmax	9	46	0,875	0,831	3,556	3,148
		logsig	9	46	0,962	0,949	2,135	1,864
		radbas	4	21	0,961	0,956	2,096	1,815
	Cascade-forward	tansig	6	34	0,966	0,957	2,041	1,787
		softmax	9	49	0,948	0,927	2,337	2,040
		logsig	6	34	0,963	0,954	2,022	1,763
		radbas	4	24	0,966	0,960	2,064	1,807

A seleção de neurônios nas camadas ocultas para obter os melhores resultados para as redes neurais foi determinada nos testes (variação de 2 a 10), para evitar os parâmetros superestimados observados nas demais arquiteturas com mais neurônios. Assim, as redes *cascade-forward* e *feed-forward* podem ser empregadas para simular a produção de celulase para o isolado celulolítico.

Os melhores parâmetros observados ( $R^2 = 0,966$ ;  $R^2_{Adj} = 0,963$ ;  $MRE=2,111\%$  e  $mse = 0,01852$ ) na modelagem das redes neurais foram apresentados pela arquitetura *feed-forward*, função de treinamento “trainlm” e função de transferência “radbas”. A Figura 15 mostra a arquitetura dessa RNA e a Figura 16 apresenta o desempenho estatístico dessa arquitetura, validando o modelo proposto na equação (4). O coeficiente de determinação da RNA analisadas foram alto, indicando um bom ajuste do modelo matemático (CUI; ZAO, 2012).

Figura 15. Arquitetura *feed-forward* que apresentou melhor ajuste para a simulação da produção de celulase total (FPU/mL).

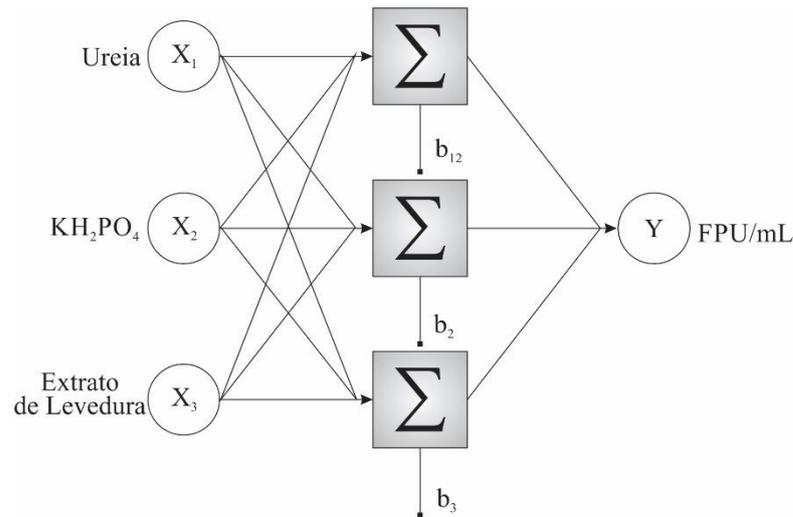
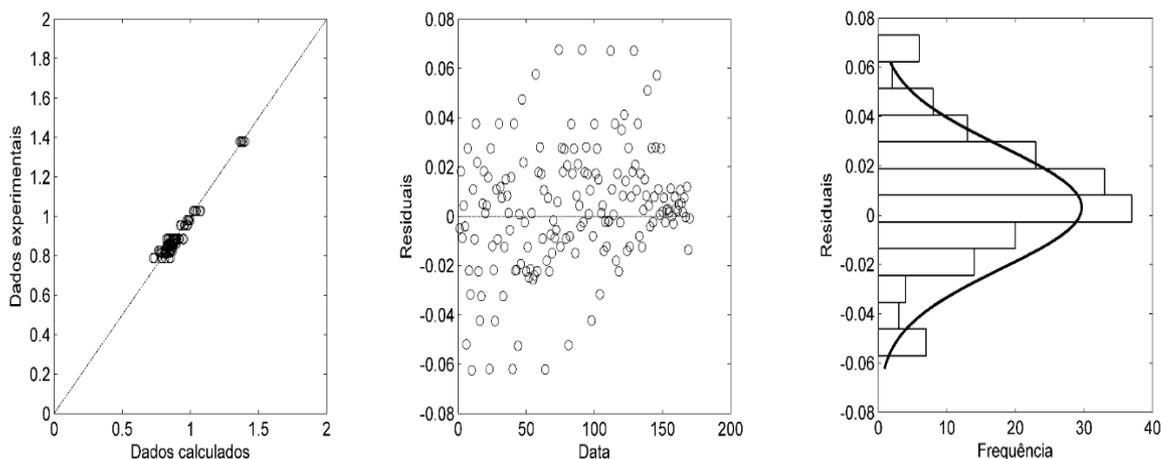


Figura 16. Análise de resíduos obtidos da melhor rede neural: função de treinamento “trainlm”, arquitetura *feed-forward*, função de transferência “radbas” e número de neurônios “3”.



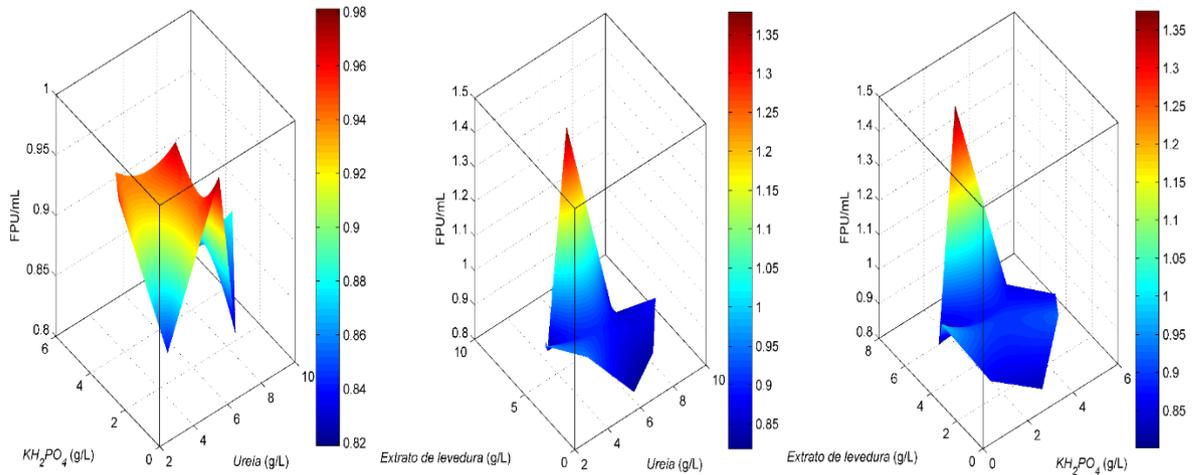
O modelo matemático para a arquitetura *feed-forward* foi obtido seguindo a equação abaixo:

$$f(x) = \psi\left[\left(\sum_{i,k=1}^n \varphi_i \omega_{ik} + \delta_k\right) + \sum_{j,k=1}^n \omega_{jk}^1\right] \quad \text{Eq. (14)}$$

Onde:  $\varphi_i$  são as entradas da rede,  $\omega_{ik}$  são os pesos do produto entre as entradas e os neurônios da camada oculta,  $\delta_k$  são os biases dos neurônios na camada oculta,  $\omega_{jk}^1$  são os pesos do produto entre os neurônios da camada oculta e as saídas da rede,  $\delta_j$  bias da rede de saída e  $\psi$  é a função de transferência “radbas” (Eq. 0) (LASHKARBOLOOKI et al., 2013; VILLA-

VÉLEZ et al., 2015b). Com os dados obtidos foi realizada a simulação de produção da celulase apresentada na Figura 17.

Figura 17. Simulação da produção de celulase utilizando a RNA.



A modelagem por redes neurais apresentou variação na produção da celulase total de 0,796 a 1,408 FPU/mL similar ao reportado por Nair et al. (2018) que encontrou valores de produção de 1,35 a 2,38 FPU/mL de um isolado *Bacillus velezensis* ASN1. Essa modelagem por redes neurais representou um aumento na produção de celulase de aproximadamente 2,13 vezes, quando comparada à produção inicial desse isolado. A mesma eficiência de acréscimo foi evidenciada por Sivapathasekaran et al. (2010) no processo de produção de biossurfactante por *Bacillus circulans* MTCC 8281, apresentando aumento de 70% na produção pelo processo de otimização por RNA quando comparada ao meio base utilizado inicialmente. Dessa forma, fica demonstrando a alta capacidade dos neurônios artificiais em apresentar pesos sinápticos e se adequarem as interações entre as variáveis no nosso estudo.

A eficiência da modelagem por redes neurais também foi verificada por Pappu e Gummandi (2016), que observaram maior ajuste do modelo matemático gerado pela rede neural no processo de otimização da produção de xilitol por *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413. A capacidade de prever o resultado do processo de produção de Spirulina foi verificada por Pappu, Vijayakumar e Ramamurthy (2013) que concluíram que a rede neural pode ser empregada para o gerenciamento eficaz de recursos em uma instalação de produção comercial da Spirulina em cultivo ao ar livre.

Em processo de produção de celulase por *Trichoderma reesei* RL-P37 foi observado por Tholodur, Ramirez e McMillan (1999) que a capacidade preditiva do modelo baseado em redes

neurais foi superior aos modelos cinéticos não estruturados e estruturados empregados comumente, em nosso estudo o mesmo comportamento foi observado na modelagem por rede neural que apresentou os melhores parâmetros de ajuste quando comparado com o DCCR.

No processo de otimização do meio de cultivo para a produção de Cefalosporina C duas metodologias foram comparadas por Dasari et al. (2009), superfície de resposta e redes neurais artificiais e os autores concluíram que ambos os modelos fornecem previsões de alta qualidade, contudo, a RNA se apresentou mais precisa na estimativa, demonstrando a superioridade da RNA sobre abordagens multi-fatorial o que tornaria essa técnica de estimativa uma ferramenta muito útil para monitoramento e controle da fermentação *on line*. Um alto rendimento no processo de liberação de açúcares redutores e na extração de polifenóis a partir de uma biomassa lignocelulósica de folhas de *Pinus roxburghii* foi verificada por Vats e Negi (2013) indicando a modelagem por redes neurais em um processo eficiente e econômico para a utilização dessa biomassa barata e sustentável para a produção de biocombustível de segunda geração e fitoquímicos úteis.

A criação de uma rede neural, bem como o treinamento dos neurônios para identificar os pesos sinápticos das variáveis e suas interações apresenta-se como uma técnica importante na modelagem do processo de celulase total. Afim de verificar a validação do modelo da Rede Neural Artificial prevista, uma simulação foi realizada nas seguintes condições Ureia (5,5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,0 g/L) e Extrato de Levedura (7,5 g/L), escolhida aleatoriamente, o qual apresentou atividade de celulase total prevista pelo modelo de 1,389 FPU/mL. A atividade de celulase total observada experimentalmente nessas mesmas condições foi de  $1,317 \pm 0,041$  FPU/mL, revelando um alto grau de precisão do modelo (94,8%). Assim, este resultado demonstra que a modelagem por rede neural pode ser efetivamente aplicada à otimização dos fatores nutricionais do meio de cultura na fermentação submersa para a produção de celulase, fornecendo informações úteis para o desenvolvimento da produção econômica e eficiente dessa enzima para a possível aplicação no processo de produção de etanol de segunda geração.

## 5 CONCLUSÃO

A otimização por Redes Neurais apresentou um modelo matemático mais ajustado aos dados experimentais, sendo a arquitetura feed-forward com três neurônios na camada oculta, função de transferência “trainlm” e função de treinamento “radbas”, apresentando aumento na produção de celulase em 2,13 vezes.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Embrapa Amapá e Embrapa Agrobiologia pelo suporte durante o desenvolvimento do trabalho. Ao programa de pós-graduação Biodiversidade e Biotecnologia (Rede BIONORTE) e a Universidade Federal do Tocantins (UFT) pela à oportunidade em realizar o doutorado. Ao Instituto Federal do Amapá pela liberação para a realização do doutorado.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores reportam que não há conflito de interesse na pesquisa realizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AZADIAN, F. et al. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 187-196, 2017.

BALTACI, M. O.; ADIGUZEL, A. Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. **Research Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 32–38, 2016.

BALUSU, R. et al. Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3025–3030, 2005.

BRAS, J. L. A. et al. Structural insights into a unique cellulase fold and mechanism of cellulose hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 13, p. 5237–5242, 2011.

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

CEVIK, A. Unified formulation for web crippling strength of cold-formed steel sheeting using stepwise regression. **Journal of Constructional Steel Research**, v. 63, n. 10, p. 1305–1316, 2007.

CHEN, Y. et al. Ensemble and enhanced PM10 concentration forecast model based on stepwise regression and wavelet analysis. **Atmospheric Environment**, v. 74, p. 346–359, 2013.

DAR, M. A. et al. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 98, p. 73–80, 2015.

DAR, M. A.; PAWAR, K. D.; PANDIT, R. S. Prospecting the gut fluid of giant African land snail, *Achatina fulica* for cellulose degrading bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 103–111, 2018.

DASARI, V. R. R. K.; DONTIREDDY, S. R. R.; NIKKU, M. Y.; GARAPATI, H. R. Optimization of medium constituents for Cephalosporin C production using response surface methodology and artificial neural networks. **Journal of Biochemical Technology**, 1(3), 69-74, 2009.

DE FIGUEIREDO, F. C. et al. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 164–170, 2017.

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

GIORDANO, P. C.; BECCARIA, A. J.; GOICOECHEA, H. C. Significant factors selection in the chemical and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues by a genetic algorithm analysis and comparison with the standard Plackett–Burman methodology. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10602–10610, 2011.

GONG, G.; KIM, S.; LEE, S-M.; WOO, H. M.; PARK, T. H.; UM, Y. Complete genome sequence of *Bacillus* sp. 275, producing extracellular cellulolytic, xylanolytic and ligninolytic enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 254, p. 59-62, 2017.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. **Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 463–477, 2012.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed

biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 51-56, 2013.

HEREDIA, A.; JIMNEZ, A.; GUILLN, R. Untersuchung und -Forschung Review Composition of plant cell walls. p. 24–31, 1995.

HU, X. et al. Cellulolytic Bacteria Associated with the Gut of *Dendroctonus armandi* Larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Forests**, v. 5, n. 3, p. 455–465, 2014.

IRFAN, M. et al. Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for saccharification using response surface methodology. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

JEONG, I. J.; KIM, K. J. An interactive desirability function method to multiresponse optimization. *European Journal of Operational Research*, v. 195, n. 2, p. 412–426, 2009.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2013.

JUNG, D. U. et al. Optimization of medium composition for enhanced cellulase production by mutant *Penicillium brasilianum* KUEB15 using statistical method. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 145–150, 2015.

KHIANNGAM, S. et al. Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 4, p. 90-96, 2014.

KUMAR, S. et al. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4909-4912, 2011.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

KUPSKI, L. et al. Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, characterization, and thermal stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458-468, 2014.

LADEIRA, S. A. et al. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 110-115, 2015.

LASHKARBOLOOKI, M. et al. Investigating vapor-liquid equilibria of binary mixtures containing supercritical or near-critical carbon dioxide and a cyclic compound using cascade neural network. **Fluid Phase Equilibria**, v. 343, p. 24–29, 2013.

LIANG, Y. L. et al. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International**, ID 512497, p. 1-13, 2014.

LO, Y. C. et al. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6–7, p. 417–425, 2009.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. *Bacillus*. In: **Bergey's Manual of Systemics of Archae and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–163, 2015.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MENG, F. et al. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 306-312, 2014.

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

MOORTHY, I. M. G.; BASKAR, R. Statistical modeling and optimization of alkaline protease production from a newly isolated alkalophilic bacillus species bgs using response surface methodology and genetic algorithm. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 293–314, 2013.

NAIR, A. S. et al. Waste office paper: A potential feedstock for cellulase production by a novel strain *Bacillus velezensis* ASN1. **Waste Management**, v. 79, p. 491–500, 2018.

PADILHA, I. Q. M. et al. Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulase synthesized by *Bacillus* sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 35-42, 2015.

PAPPU, J. S. M.; GUMMADI, S. N. Modeling and simulation of xylitol production in bioreactor by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 using unstructured and artificial neural network models. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 490–499, 2016.

PAPPU, J. S. M.; VIJAYAKUMAR, G. K.; RAMAMURTHY, V. Artificial neural network model for predicting production of *Spirulina platensis* in outdoor culture. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 224–230, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.082

PANDEY, A. K.; NEGI, S. Impact of surfactant assisted acid and alkali pretreatment on lignocellulosic structure of pine foliage and optimization of its saccharification parameters using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 195, p. 115-125, 2015.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. . The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

POTPROMMANEE, L. et al. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, e0175004, 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 ed. Campinas: Cárita Editora, 2009.

SABLANI, S. S.; BAIK, O. D.; MARCOTTE, M. Neural networks for predicting thermal conductivity of bakery products. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 3, p. 299–304, 2002.

SAINI, R. et al. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 240-246, .2015.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1–17, 2004.

SEO, J. K. et al. Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 isolated from the rumen of a native Korean goat. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 50–58, 2013.

SHAJAHAN, S. et al. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 3, p. 302–310, 2017.

SREENA, C. P.; SEBASTIAN, D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 9-16, 2018.

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; RAY, A.; GUPTA, A.; SEN, R. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, 2884–2887, 2010. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.093

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512–526, 1993.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, Nei M, KUMAR S. 2011.MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

THOLUDUR, A.; RAMIREZ, W. F.; MCMILLAN, J. D. Mathematical modeling and optimization of cellulase protein production using *Trichoderma reesei* RL-P37. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, n. 1, p. 1–16, 1999.

VATS, S.; NEGI, S. Use of artificial neural network (ANN) for the development of bioprocess using *Pinus roxburghii* fallen foliages for the release of polyphenols and reducing sugars. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 392-398, 2013.

VILLA-VÉLEZ, H. A.; VÁQUIRO, H. A.; TELIS-ROMERO, J. The effect of power-ultrasound on the pretreatment of acidified aqueous solutions of banana flower-stalk: Structural, chemical and statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 52–61, 2015a.

VILLA-VÉLEZ, H. A. et al. Study of the specific heat capacity of biomass from banana waste for application in the second-generation ethanol industry. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 34, n. 4, p. 1221–1228, 8 jul. 2015b

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

WAEONUKUL, R. et al. Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 grown on Avicel under aerobic conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 610–614, 2009.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 259–263, 2011.

YE, W. et al. Improvement of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by high-efficient disruption of the ADH2 gene using a novel recombinant TALEN vector. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

## COVER LETTER

Para

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX,

Editor in Chief: XXXXXXXXXXXXXXXX

Caro editor,

Por favor, considere o documento de pesquisa original intitulado “Estratégias para aumentar a produção de celulase por *Bacillus* sp. V13 (MH82004) usando planejamentos experimentais e modelagem matemática” por Sales, V. H. G., Oliveira, E. M., Villa-Vélez, H. A., Guarda, E. A e Borges, W. L. para publicação no XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.

O presente trabalho apresenta o uso de ferramentas matemáticas para incrementar a produção de celulase total de um isolado de *Bacillus* sp. V13 obtido a partir de conteúdo ruminal de bovinos com capacidade de hidrolisar biomassa celulósica (bagaço de cana sem tratamento hidrolítico). Foi utilizado Plackett-Burman design e Análise de Regressão Multivariável (Stepwise) para selecionar os fatores nutricionais significativos durante o processo de produção de celulase por esse isolado. Com os fatores pré-selecionados foi aplicado Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Redes Neurais Artificiais (RNA) para otimizar a produção de celulase. O nosso trabalho apresenta estratégias de modelagem matemática para aumentar a produção de celulase de um novo isolado bacteriano potencial em degradar biomassa celulósica no processo de obtenção de etanol de segunda geração. Os autores leram e aprovaram o manuscrito submetido e assumem total responsabilidade pelo seu conteúdo. O manuscrito é um trabalho original dos autores e não foi submetido anteriormente à XXXXXXXXXXXXXXXX ou a qualquer outro periódico. Os autores declaram não haver conflitos de interesse relativos a esta pesquisa ou seu financiamento.

Atenciosamente,

Prof. Victor Hugo Gomes Sales – Instituto Federal do Amapá, Brasil,  
Estudante Doutorado em Biotechnology (BIONORTE), Universidade Federal do Tocantins,  
Palmas – TO, Brasil.

Phone: (+55) 96 3198-2150 E-mail: victor.sales@ifap.edu.br

## RESEARCH HIGHLIGHTS

- O isolado *Bacillus* sp. V13 degrada a celulose presente no bagaço de cana sem tratamento hidrolítico.
- Otimização dos fatores nutricionais do meio de cultivo em fermentação submersa para a produção de celulase.
- Utilização de redes neurais artificiais no processo de modelagem matemática do processo de produção de celulase total.
- O estudo apresentou um aumento de 2,13 vezes na produção de celulase após as estratégias propostas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. I. et al. Nutrient removal and sludge production in the coagulation flocculation process. *Water Research*, v. 36, n. 11, p. 2910-2919, 2002.

ANANDH, M. A. et al. Development and quality characteristics of extruded tripe snack food from buffalo rumen meat and corn flour. *Journal Food Science and Technology*, v. 42, n. 3, p. 263-267, 2005.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Org.). *Nutrição de ruminantes*. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 111-150.

BP p.l.c., BP Energy Outlook 2017 edition, London, United Kingdom, 2017. Disponível em: <<https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/energy-outlook-2017/bp-energy-outlook-2017.pdf>>. Acesso em: 11 de nov de 2017.

BRULC, J. M. et al. Gene-centric metagenomics of the fiber adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 6, p. 1948-1953, 2009.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p.2415-2457, 2007.

CHANDRA, R., TAKEUCHI, H., HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 3, p. 1462-1476, 2012.

CHENG, C. et al. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*, v. 12, n. 18, p. 8514-8523, 2011.

CZERKAWSKI, J. W. *An introduction to rumen studies*. 1 ed. Oxford: Pergamon Press, 1986. 236 p.

DAS, D.; VEZIROĞLUM, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, n. 1, p. 13-28, 2001.

DATAR, R. et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, n. 8, p. 932-939, 2007.

DATAR, R., HUANG, J., MANESS, P. C., MOHAGHEGHI, A., CZEMIK, S., CHORNET, E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process, *International Journal of Hydrogen Energy*, v.32, p. 932-939, 2007.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: Current activities and future developments. *Energy Conversion and Management*, v. 50, n. 11, p.2782-2801, 2009a.

DEMIRBAS, A. H.; DEMIRBAS, I. Importance of rural bioenergy for developing countries. *Energy Conversion and Management*, v. 48, p. 2386-2398, 2007.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy*, v. 86, s.1, p. 151-161, 2009b.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. *Tratado de anatomia veterinária*. 3ed. Traduzida. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 688 p.

EIA – Energy Information Administration. *Annuals Energy Outlook 2017 with projections to 2050*. Disponível em: <[https://www.eia.gov/outlooks/aeo/pdf/0383\(2017\).pdf](https://www.eia.gov/outlooks/aeo/pdf/0383(2017).pdf)>. Acesso em: 11 nov 2017b.

EIA – Energy Information Administration. *International Energy Outlook 2017*. Disponível em: <[https://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484\(2017\).pdf](https://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484(2017).pdf)>. Acessado em 11 de nov de 2017a.

FERBIYANTO, A.; RUSMANA, I.; RAFFIUDIN, R. Characterization and Identification of Cellulolytic Bacteria from gut of Worker *Macrotermes gilvus*. *HAYATI Journal of Biosciences*, v. 22, n. 4, p. 197–200, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.07.001>

FURLAN, V. J. M. *Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da agroindústria do arroz*. 2009. 90p., Rio Grande, RS. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

GHATAK, H. R. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, n. 8, p. 4042-4052, 2011.

HALFORD, N. G. et al. Sugars in crop plants. *Annals of Applied Biology*, v. 158, n. 1, p. 1-25, 2010.

HAMRIN, J.; HUMMEL, H.; CANAPA, R. Review of the role of renewable energy in global energy scenarios for the International Energy Agency Implementing Agreement on Renewable Energy Technology Deployment, 2007. 85 p. Disponível em: <<http://infohouse.p2ric.org/ref/42/41014.pdf>>. Acesso em: 15 jan 2017.

HENDRIKS, A. T.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HILL, J. et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings National Academy Science*, v. 103, n. 3, p. 11206-11210, 2006.

HOEKMAN, S.K.; Biofuels in the U.S.: Challenges and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 34, p. 14-22, 2009.

IEA, International Energy Agency. Disponível em: <<http://www.iea.gov>>. Acesso 11 nov 2017.

IEA, International Energy Agency. Sustainable Production of Second-Generation Biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries. 2010. Disponível em: <[https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second\\_generation\\_biofuels.pdf](https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second_generation_biofuels.pdf)>. Acesso em: 15 jan 2017.

IEA, International Energy Agency. Technology Roadmaps: Biofuels for transport. p.56. 2011. Task 42 Biorefinery. Disponível em: <<http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery.htm>>. Acesso 22 mai 2017.

IEA, International Energy Agency. Technology Roadmaps: Biofuels for transport. 2011. International Energy Agency Bioenergy. Task 42 Biorefinery. Disponível em: <<http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery.htm>>. Acesso 22 mai 2017.

INGRAM, L. O., DORAN, J. B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. *FEMS Microbiology Reviews*, v.16, p.235-241, 1995.

INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Utilização de rúmen do aparelho digestivo de ruminantes no processo do hidrosemeadura. Brasília, 2006.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, v. 89, n. 1, p. 124-134, 2005.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 77, n. 2, p. 139- 144, 2001.

KOBAYASHI, Y. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. *Animal Science Journal*, v. 77, n. 4, p. 375-385, 2006.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. *Journal of Animal Science*, v.22, n.1, p.131-138, 2009.

KRAUSE, D.O. et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, n. 5, p. 663-693, 2003.

KRAUSE, D.O.; RUSSEL, J.B. How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science*, v. 79, n. 8, p. 1467-1475, 1996.

KUMAR, N. et al. Modeling and simulation of clean fuel production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 25, p. 945-952, 2000.

KUMAR, N.; DAS, D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 29, n. 4-5, p. 280-287, 2001.

LEITÃO, V. O. Caracterização de uma bactéria anaeróbica termofílica isolada do rúmen de caprino e análise das enzimas do seu complexo celulolítico. 99 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2015.

LESNAU, G. Aparelho digestório 2. Anatomia veterinária. Disponível em: <<http://anatomiaanimaldescritiva.blogspot.com.br/2013/08/aparelho-digestorio-2.html>>. Acessado em 11 de nov 2017.

LIMA, U. A. de; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. de. Produção de Etanol. In: Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. 1. ed. v. 3, São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. 616p.

LYND, L. R. Overview and Evaluation of Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. Annual Review of Energy and the Environment, v. 21, p. 403-465, 1996.

MÁRQUEZ, A. et al. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. Biotechnology Letters, v. 33, n. 5, p.859-868, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S.; Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, n. 1, p. 17-32, 2010.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science. v.38, n.4, p.522-550, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NAIK, S. N. et al. Production of first and second-generation biofuels: A comprehensive review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

National Renewable Energy Laboratory (NREL) 2008. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/>>. Acesso 20 mai 2017.

OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. Industrialización de subproductos de origen animal. 1. ed. Zaragoza: Editora Acribia, 1994. 387 p.

OSAKI, M.R.; SELAN, B.; SELEGHIM JR., P. Cenários e perspectivas no desenvolvimento fontes renováveis de energia no brasil. Relatório de Estudos de Economias de Baixo Carbono (EBC), 2012. 26 p.

PACHECO, F. Energias renováveis: breves conceitos. Conjuntura e Planejamento, Salvador: SEI, n.149, 2006. p.4-11

PACHECO, J. W. Guia técnico ambiental de frigoríficos - industrialização de carnes (bovina e suína). São Paulo : CETESB (Série P + L), 2008.

- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 2008. 45 p.
- RAGAUSKAS, A. J. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.
- RUIZ, R. L. *Microbiologia zootécnica*. 1.ed. São Paulo: Ed. Roca, 1992. 314p.
- SANTOS, L. C. Desenvolvimento de papilas ruminais. *PUBVET*, v. 2, n. 40, 2008.
- SANTOS, M. F. R. F. dos; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. A. P. G. S. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. *Revista Economia & Energia*, n. 82, p. 14-32, 2012.
- SEDLMEYER, F. B. Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 8, p. 1891-1898, 2011.
- SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. 2010, 109p. Rio de Janeiro, RJ. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. 2010, 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.
- SIMS, R. E. H. et al. An overview of second-generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 6, p. 1570-1580, 2010.
- SINGH, J.; GU, S.; Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 9, p. 2596- 2610, 2010.
- SIQUEIRA, Guilherme Benko de Energia e Proteína na nutrição de ruminantes [livro eletrônico] Universidade Federal do Tocantins: Palmas, 2007. 2,19 MB ; ePUB. il. tab.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v.34, n.2, p.421-424, 2009.
- TONG, X.; SMITH, L. H.; MCCARTY, P. L. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, v. 21, n. 4, p. 239-255, 1990.
- WANG, Y. et al. Effect of Exogenous Fibrolytic Enzyme Application on the Microbial Attachment and Digestion of Barley Straw In vitro. *Asian – Australian Journal of Animal Science*, v. 25, n. 1, p.66-74, 2012.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Review*, Washington. v. 50, n. 1, p. 25, 1986.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, v. 25, n. 4, p. 153-157, 2007.

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

ZHANG, Y. H. P. et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology Bioengineering*. v. 97, n. 2, p. 214-223, 2007.

## **APÊNDICE I - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE**

Esta análise foi determinada de acordo com recomendações da IUPAC (GHOSE, 1987; WOOD; BHAT, 1988; ADNEY; BAKER, 1996). O objetivo foi determinar a atividade da enzima celulase como atividade de papel de filtro e expressa em FPU por volume de enzima original.

A quantificação dos açúcares liberados no meio reacional foi determinada de acordo com o método DNS descrito por MILLER (1959) e BAZÁN (1993).

### **1. Preparo do tampão citrato 0,05 M**

Para o preparo do tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8, 10,5g de ácido cítrico monohidratado foram dissolvidos em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se hidróxido de sódio até que a solução atingisse o pH de 4,3 (aproximadamente 2,5 g). O volume da solução foi completado para 50 mL e em seguida, mediu-se o pH. Quando necessário, mais hidróxido de sódio foi adicionado à solução para que o pH atingisse 4,5 e assim, obtivéssemos uma solução tampão de citrato pH 4,5 a 1 mol/L. Para obter a concentração de 0,05 mol/L, a solução de 50 mL foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, que teve seu volume aferido com água destilada. Neste momento o pH subiu para 4,8.

### **2. Preparação da solução de DNS**

O reagente DNS é preparado através da adição de 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água destilada. Após dissolução total dos sólidos, adicionou-se 306,0 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 mL de fenol (fundido) e 8,3 g de meta bissulfito de sódio sendo o volume aferido para 1416 mL com água destilada. Porém, verificou-se que deste modo o reagente sofria degradação se estocado por algum período, mesmo armazenado em frasco âmbar.

Assim, o reagente DNS passou a ser preparado segundo BAZÁN (1993). Dissolveu-se 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água. Adicionou-se a esta mistura 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de meta-bissulfito de sódio. O reagente foi guardado em um frasco âmbar para proteger da luz e nomeado como solução mãe de DNS.

Para a quantificação dos ART, foram transferidos 100 mL da solução mãe em um béquer sendo adicionados 30,6 g de tartarato de sódio e potássio, submetido a aquecimento até total

dissolução dos sólidos. Após dissolução, o volume foi aferido para 146 mL, estando assim a solução pronta para uso.

### **3. Construção da curva padrão de glicose**

Para construção de uma curva padrão, amostras com concentrações conhecidas de glicose foram preparadas e após aplicação do método DNS, lidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm.

Partiu-se de uma solução estoque de glicose 10,0 mg/mL, preparada em tampão citrato 0,05 mol/L, sendo realizada diluições de 0 a 10,0 mg/mL. As reações com DNS foram realizadas adicionando em cada tubo de ensaio 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL de cada uma das diluições de glicose previamente diluídas em tampão citrato. Foi adicionado aos tubos 3,0 mL do reagente DNS preparado segundo a metodologia descrita no item 2. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente para parar a reação.

Vale ressaltar que ao preparar um novo reagente DNS, uma nova curva-padrão era construída.

### **4. Determinação da atividade enzimática FPU nos extratos obtidos a partir da fermentação submersa.**

Na sequência, foram organizados cinco conjuntos de tubos. No conjunto 1, destinado à construção da curva padrão para quantificar os açúcares redutores, foi adicionado 1,0 mL de tampão de citrato. No conjunto 2, destinado à medida da atividade enzimática de cada solução de enzima, adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL de enzima diluída. No conjunto 3, denominado controle de enzima e destinado a identificar interferências advindas da enzima, foi adicionado 1,0 mL de tampão de citrato e 0,5 mL da enzima diluída. Para cada diluição de enzima foi preparado um controle com sua respectiva diluição. No conjunto 4, denominado controle de substrato e destinado a identificar interferências advindas do substrato, adicionaram-se 1,5 mL de tampão de citrato. Por fim, no conjunto 5, denominado branco do espectro e destinado a servir como referência na análise espectrofotométrica, foram adicionados 1,5 mL de tampão de citrato. Na sequência, os tubos foram agitados e incubados em banho termostático a 50 °C e, depois de atingido equilíbrio térmico, foram adicionados 0,5 mL dos padrões de glicose em cada tubo do conjunto 1 e uma tira de papel filtro Whatman nº1, de dimensão equivalente a 50 mg (aproximadamente 1,0 x 6,0 cm), em cada tubo do conjunto 2

de forma que a tira ficasse totalmente submersa em solução. Em resumo, os conjuntos de tubos foram preparados da seguinte maneira:

**Conjunto 1** - Padrões de glicose: 1,0 mL de tampão + 0,5 mL de padrão de glicose.

**Conjunto 2** - Amostras: 1,0 mL de tampão + 0,5 mL de solução de enzima + papel de filtro;

**Conjunto 3** - Branco da enzima: 1,0 mL de solução tampão + 0,5 mL de solução de enzima;

**Conjunto 4** - Branco do substrato: 1,5 mL de solução tampão + papel de filtro; e

**Conjunto 5** - Branco do espectro: 1,5 mL de solução tampão.

Cada conjunto permaneceu incubado em banho termostático a 50°C por exatamente 60 min depois de atingido equilíbrio térmico. Após o término do tempo de incubação adicionouse 3,0 mL de reagente de DNS, agitou-se e colocou os tubos em banho fervente por 5 minutos, para desativação da enzima. Em seguida os tubos foram colocados em banho de gelo até atingirem temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se água até o volume reacional de 25mL do tubo e agitou-se até completa homogeneização. As amostras então foram conduzidas para medida de absorvância em comprimento de onda 540 nm em espectrofotômetro.

## 6. Cálculo

Com os dados obtidos pela leitura da absorvância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorvância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas.

De posse das leituras das absorvâncias obtida após hidrólise enzimática do papel filtro e utilizando a equação obtida através da curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. Assim, traçou-se uma reta onde se relaciona a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL dessa enzima diluída, determinando assim a atividade enzimática da Equação V-1.

$$\frac{FPU}{ml} = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 \times [enzima\ diluída])} \mu mol. min^{-1}. mL^{-1}$$

$$\frac{FPU}{ml} = \frac{0,37}{[enzima\ diluída]} \mu mol. min^{-1}. mL^{-1}$$

Para a celulase, uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é,  $2,0/0,18016 \mu\text{mol}$  de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação.

## 6. Referências

ADNEY, B., BAKER, J. Measurement of cellulase activities. Chemical analysis and testing task – laboratory analytical procedure. National Renewable Energy Laboratory (NREL), LAP-006, 1996.

BAZÁN, JUAN HERALDO VILOCHE. Estudo de produção enzimática da dextrana clínica. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1993.

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

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

WOOD, T. M., BHAT, K. M. (1988). Methods for measuring cellulase activities, pp. 87-116. In: W. A. Wood and S. T. Kellog (eds.), *Methods in enzymology*, Vol. 160. Academic Press, San Diego, CA.

## APÊNDICE II – MEIOS DE CULTURAS UTILIZADOS

Meios de culturas utilizados nos procedimentos experimentais.

### AGAR E CALDO NUTRIENTE

Meios de culturas utilizados no procedimento inicial de prospecção de bactérias produtoras de celulase em amostras de conteúdo ruminal bovino, e também no procedimento de isolamento (técnica de esgotamento) e na manutenção das mesmas para posteriores análises.

#### Agar Nutriente

Reagentes	Quantidade*
Extrato de levedura	3,0 g
Peptona bacteriológica	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl)	3,0 g
Agar bacteriológico	13,0 g
Nistatina 300.000 UI/mL (Antifúngico)	4 mL

\* Relação dos reagentes para a preparação de 1L de meio de cultura

#### Caldo Nutriente

Reagentes	Quantidade*
Extrato de levedura	3,0 g
Peptona bacteriológica	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl)	3,0 g
Nistatina 300.000 UI/mL (Antifúngico)	4 mL

\* Relação dos reagentes para a preparação de 1L de meio de cultura

### AGAR BHM/CMC

Meio de cultura utilizado no procedimento de revelação das bactérias capazes de degradar o carboximetilcelulose, indicando a produção de enzimas celulasas.

Reagentes	Quantidade*
Carboximetilcelulose (CMC)	10,0 g
Hidrogeno fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ )	1,0
Dihidrogeno fosfato de Potássio ( $KH_2PO_4$ )	1,0
Sulfato de Magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,2
Nitrato de Amônia ( $NH_4NO_3$ )	1,0
Cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )	0,05
Cloreto de Cálcio ( $CaCl_2$ )	0,02
Agar bacteriológico	20,0 g

\* Relação dos reagentes para a preparação de 1L de meio de cultura

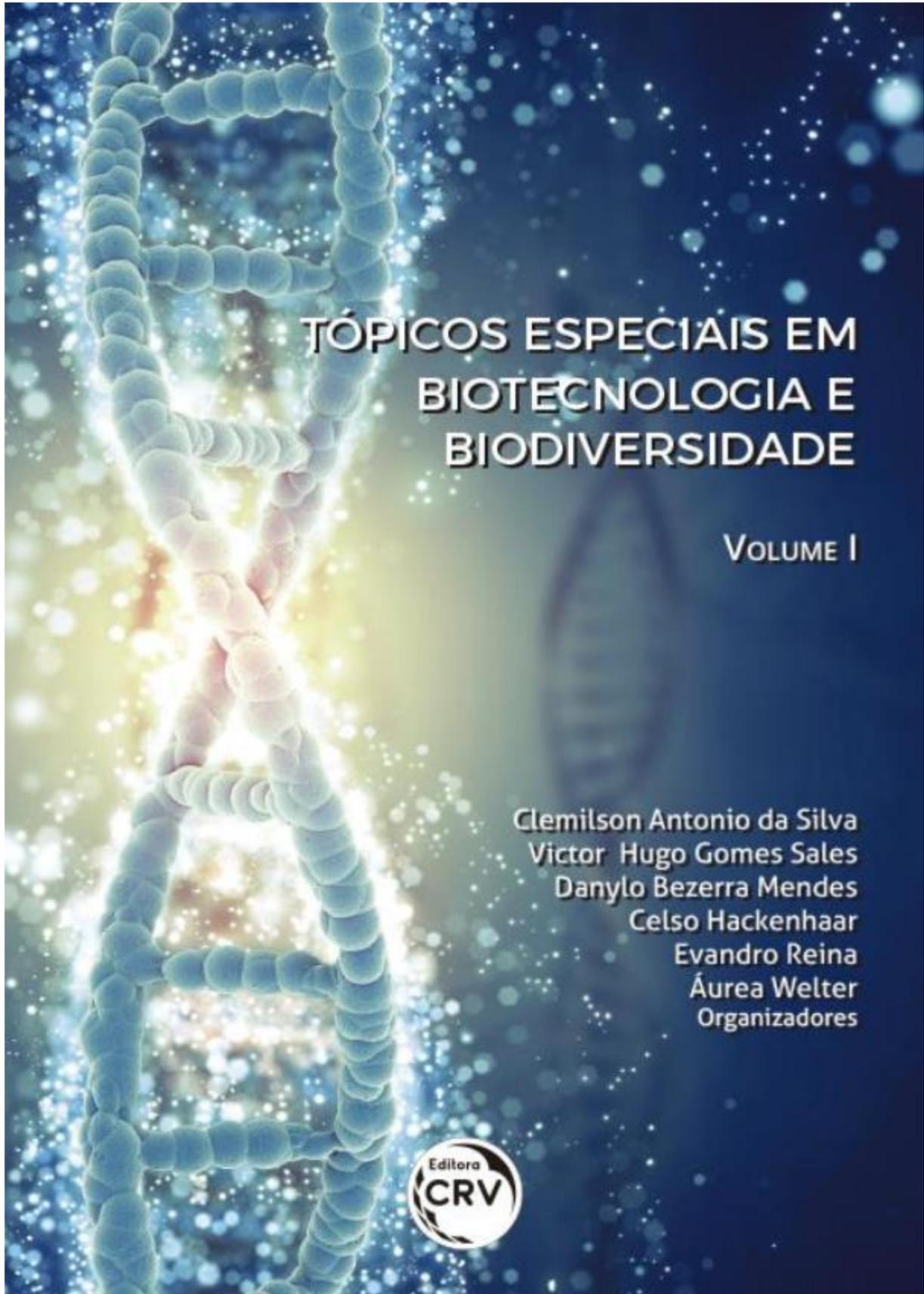
## MEIO MINERAL SUPLEMENTADO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRE TRATADO

Meio de cultura utilizado no procedimento de fermentação submersa para a produção dos extratos enzimáticos das bactérias isoladas que apresentaram capacidade celulolítica em meio BHM/CMC com vermelho congo (0,25%).

Reagentes	Quantidade*
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,00g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,40g
Peptona bacteriológica	1,00g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,30g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,30g
Extrato de levedura	0,25g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,00mg
$\text{CoCl}_2$	2,00mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,00 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,60mg
Tween 80	0,30 mL
Biomassa (Bagaço de cana pre tratado)	1% (m/v)

\* Relação dos reagentes para a preparação de 1L de meio de cultura

**ANEXO 1 – INFORMAÇÕES DA PUBLICAÇÃO DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  
EM FORMA DE CAPÍTULO DE LIVRO**



Clemilson Antonio da Silva  
Victor Hugo Gomes Sales  
Danylo Bezerra Mendes  
Celso Hackenhaar  
Evandro Reina  
Áurea Welter  
(Organizadores)

# TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

Volume 1

EDITORA CRV  
Curitiba - Brasil  
2017

Copyright © da Editora CRV Ltda.  
**Editor-chefe:** Railson Moura  
**Diagramação e Capa:** Editora CRV  
**Revisão:** Os Autores

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
 CATALOGAÇÃO NA FONTE

T673

Tópicos especiais em biotecnologia e biodiversidade – Volume 1 / Clemilson Antonio da Silva, Victor Hugo Gomes Sales, Danylo Bezerra Mendes, Celso Hackenhaar, Evandro Reina, Áurea Welter (Orgs.). – Curitiba: CRV, 2017.

146 p. (Coleção Tópicos especiais em biotecnologia e biodiversidade, v. 1)

Bibliografia

ISBN COLEÇÃO 978-85-444-2150-5

ISBN VOLUME 978-85-444-2151-2

DOI 10.24824/978854442151.2

1. Biotecnologia 2. Biodiversidade I. Silva, Clemilson Antonio da. org. II. Sales, Victor Hugo Gomes. org. III. Mendes, Danylo Bezerra org. IV. Hackenhaar, Celso. org. V. Reina, Evandro. org. VI. Welter, Áurea. org. VII. Título VIII. Série.

CDU 606

CDD 660.6

Índice para catálogo sistemático  
 1. Biotecnologia 660.6

ESTA OBRA TAMBÉM ENCONTRA-SE DISPONÍVEL EM FORMATO DIGITAL.  
 CONHEÇA E BAIXE NOSSO APLICATIVO!



2017

Foi feito o depósito legal conf. Lei 10.994 de 14/12/2004

Proibida a reprodução parcial ou total desta obra sem autorização da Editora CRV

Todos os direitos desta edição reservados pela: Editora CRV

Tel.: (41) 3039-6418 - E-mail: [sac@editoracrv.com.br](mailto:sac@editoracrv.com.br)

Conheça os nossos lançamentos: [www.editoracrv.com.br](http://www.editoracrv.com.br)

## **Conselho Editorial: Comitê Científico:**

- |   |  |
|---|--|
| <p>Aldira Guimarães Duarte Dominguez (UNB)<br/>           Andréia da Silva Quintanilha Sousa (UNIR/UFRN)<br/>           Antônio Pereira Gaio Júnior (UFRRJ)<br/>           Carlos Alberto Vilar Estêvão (UMINHO - PT)<br/>           Carlos Federico Dominguez Avila (UNIEURO)<br/>           Carmen Tereza Velanga (UNIR)<br/>           Celso Conti (UFSCar)<br/>           Cesar Gerónimo Tello (Univer. Nacional<br/>           Trés de Febrero - Argentina)<br/>           Eduardo Fernandes Barbosa (UFMG)<br/>           Elione Maria Nogueira Diogenes (UFAL)<br/>           Elsio José Corá (UFFS)<br/>           Elizeu Clementino (UNEB)<br/>           Fernando Antônio Gonçalves Alcoforado (IPB)<br/>           Francisco Carlos Duarte (PUC-PR)<br/>           Gloria Fariñas León (Universidade de La Havana – Cuba)<br/>           Guillermo Arias Beatón (Universidade de La Havana – Cuba)<br/>           Jailson Alves dos Santos (UFRJ)<br/>           João Adalberto Campato Junior (UNESP)<br/>           Josania Portela (UFPI)<br/>           Leonel Severo Rocha (UNISINOS)<br/>           Lídia de Oliveira Xavier (UNIEURO)<br/>           Lourdes Helena da Silva (UFV)<br/>           Maria de Lourdes Pinto de Almeida (UNICAMP)<br/>           Maria Lília Imbiriba Sousa Colares (UFOPA)<br/>           Maria Cristina dos Santos Bezerra (UFSCar)<br/>           Paulo Romualdo Hernandez (UNICAMP)<br/>           Rodrigo Pratte-Santos (UFES)<br/>           Sérgio Nunes de Jesus (IFRO)<br/>           Simone Rodrigues Pinto (UNB)<br/>           Solange Helena Ximenes-Rocha (UFOPA)<br/>           Sydione Santos (UEPG)<br/>           Tadeu Oliver Gonçalves (UFPA)<br/>           Tania Suely Azevedo Brasileiro (UFOPA)</p> | <p>Claudio Lorenzo (Université de Sherbrooke, USherbrooke, Canadá)<br/>           Dirceu Bartolomeu Greco (UFMG)<br/>           Dora Porto (UNB)<br/>           Eduardo Rueda (Colômbia)<br/>           Flávio Rocha Lima Paranhos (UNB)<br/>           Helena Carneiro Leão (PUC/SP)<br/>           J. M. de Barros Dias (Universidade de Evora/Portugal)<br/>           Jose Eduardo Siqueira (PUC/PR)<br/>           José Roque Junges (UNISINOS)<br/>           Mario Antônio Sanches (PUC/PR)<br/>           Marlene Braz (FIOCRUZ)<br/>           Regina Ribeiro Parizi Carvalho (UNESCO)<br/>           Sergio Ibiapina Ferreira Costa (ICF)<br/>           Sérgio Rogério Azevedo Junqueira (Universitá<br/>           Pontificia Salesiana di Roma, UPS, Itália)<br/>           Susana Vidal (UNESA)<br/>           Thiago Rocha da Cunha (UNB)<br/>           Volnei Garrafa (UNESP)</p> |
|---|--|

Este livro foi avaliado e aprovado por pareceristas *ad hoc*.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	9
<i>Victor Hugo Gomes Sales</i>	
CAPÍTULO I	
USO BIOTECNOLÓGICO DOS GÊNEROS	
<i>BRADYRHIZOBIUM SP E AZOSPIRILLUM SP</i>	
EM ASSOCIAÇÃO COM PLANTAS DE VALOR AGRÍCOLA.....	11
<i>Evandro Reina</i>	
<i>Joenes Mucci Peluzio</i>	
<i>Daisy Parente Dourado</i>	
<i>Weder Ferreira dos Santos</i>	
CAPÍTULO II	
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL	
E A CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	23
<i>Danylo Bezerra Mendes</i>	
<i>Danyel Bezerra Mendes</i>	
<i>Fabiane Fernandes da Silva</i>	
<i>Emerson Adriano Guarda</i>	
CAPÍTULO III	
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA RESIDUAL	
DE FRIGORÍFICO DE BOVINOS COMO MATÉRIA-PRIMA	
EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	49
<i>Victor Hugo Gomes Sales</i>	
<i>Elisa Maria de Oliveira</i>	
<i>Emerson Adriano Guarda</i>	
<i>Wardsson Lustrino Borges</i>	
CAPÍTULO IV	
PRODUTIVIDADE TÉCNICA E ECONÔMICA DE CULTIVARES	
DE SOJA EM FUNÇÃO DE DOSES DE POTÁSSIO E ÉPOCA	
DE SEMEADURA NA REGIÃO DA AMAZÔNIA LEGAL.....	73
<i>Celso Hackenhaar</i>	
<i>Joenes Mucci Peluzio</i>	
<i>Warley Gramacho da Silva</i>	
<i>Maria Dilma de Lima</i>	
<i>Neusa Hackenhaar</i>	

<b>CAPÍTULO V</b> <b>BIOMASSA LIGNOCELULÓGICA NA PRODUÇÃO</b> <b>DE CELULASES .....</b>	<b>97</b>
<i>Áurea Welter</i> <i>Emerson Adriano Guarda</i>	
<b>CAPÍTULO VI</b> <b>PROCESSAMENTO BIOTECNOLÓGICO DOS RESÍDUOS</b> <b>AGROINDUSTRIAIS DA CULTURA DA MANDIOCA .....</b>	<b>115</b>
<i>Clemilson Antonio da Silva</i> <i>Fernanda Pereira da Silva</i> <i>Caroline Roberta Freitas Pires</i> <i>Abraham Damian Giraldo Zuniga</i>	
<b>SOBRE OS AUTORES .....</b>	<b>139</b>

# Capítulo III

## **Biomassa lignocelulósica residual de frigorífico de bovinos como matéria-prima em processos biotecnológicos**

---

Victor Hugo Gomes Sales

Elisa Maria de Oliveira

Emerson Adriano Guarda

Wardsson Lustrino Borges

*Neste capítulo apresentaremos informações que permitirão ao leitor conhecer sobre o consumo energético nos próximos anos, bem como os conceitos de biorrefinaria, principais matérias-primas e plataformas. Apresentar a matéria-prima residual como uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis de segunda geração e/ou prospecção de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas, verificando o seu potencial para uso em diversos processos biotecnológicos.*

## ANEXO 2 – CADASTRO DO PROJETO DE PESQUISA NO SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº ADAD04C**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **ADAD04C**  
 Usuário: **Embrapa**  
 CPF/CNPJ: **00.348.003/0001-10**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

### Espécie

**Bacillus sp.**  
**Microbacterium sp.**  
**Ochrobactrum sp.**  
**Klebsiella sp.**  
**Stenotrophomonas sp.**

Título da Atividade: **Prospecção de micro-organismos produtores de celulasas a partir de biomassa lignocelulósica residual**

### Equipe

<b>Wardsson Lustrino Borges</b>	<b>Embrapa Amapá</b>
<b>Emerson Adriano Guarda</b>	<b>Universidade Federal do Tocantins (UFT)</b>
<b>Victor Hugo Gomes Sales</b>	<b>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do A</b>
<b>Elisa Maria de Oliveira</b>	<b>Universidade do Estado do Amapá (UEAP)</b>

Data do Cadastro: **29/08/2018 12:12:25**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:12** de **29/08/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**