



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – CBIOTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANA DO
MILHO E DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PROSPECÇÃO
DE XILANASES EM ISOLADOS BACTERIANOS

FILIPE DE CASTRO PATRICIO

JOÃO PESSOA – PB

2022

FILIPPE DE CASTRO PATRICIO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANA DO
MILHO E DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PROSPECÇÃO
DE XILANASES EM ISOLADOS BACTERIANOS**

Dissertação de mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araujo – UFPB
COORIENTADOR: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira – UEPB
COLABORADORA: Dr^a Teresa Cristina Soares de Lima Grisi

JOÃO PESSOA – PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P314e Patricio, Filipe de Castro.

Extração e caracterização de xilana do milho e da cana-de-açúcar para prospecção de xilanases em isolados bacterianos / Filipe de Castro Patricio. - João Pessoa, 2022.

72 f. : il.

Orientação: Demetrius Antonio Machado de Araujo.

Coorientação: Elquio Eleamen Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Bagaço da cana-de-açúcar. 2. Palha da cana-de-açúcar. 3. Lignocelulose. 4. Hemicelulose. 5. Resíduo industrial. 6. Bioprospecção. I. Araujo, Demetrius Antonio Machado de. II. Oliveira, Elquio Eleamen. III. Título.

UFPB/BC

CDU 664.113(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

João Pessoa, 24 de fevereiro de 2022

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da 29ª (vigésima nona) Dissertação de Mestrado do discente **FILIPE DE CASTRO PATRÍCIO** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, candidato ao título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis.

Às quatorze horas (14h) do dia vinte e quatro de fevereiro do ano de dois mil e vinte e um (24/02/2022), no endereço eletrônico <https://meet.google.com/ucb-oqtf-ffq>, divulgado na página eletrônica do Programa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o discente Filipe de Castro Patrício candidato ao título de Mestre em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores Elquio Eleamen Oliveira (Coorientador e presidente, Universidade Estadual da Paraíba), Adna Cristina Barbosa de Sousa (membro interno, Universidade Federal da Paraíba) e Itácio Queiroz de Mello Padilha (membro externo, Faculdade Nova Esperança). Dando início aos trabalhos, o presidente da banca professor Elquio Eleamen Oliveira, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato, quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANA DO MILHO E DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PROSPECÇÃO DE XILANASES EM ISOLADOS BACTERIANOS**”. Após discorrer sobre o referido tema, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, a Banca Examinadora procedeu à avaliação e julgamento do candidato em caráter secreto, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO**. Em face da aprovação, declarou o presidente achar-se o candidato Filipe de Castro Patrício legalmente habilitado a receber o Título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de secretária, lavrei a presente ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Coorientador e presidente)

Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa

de Sousa (examinadora interna)

Digitally signed by Itacio Padilha

DN: cn=Itacio
Padilha, c=BR,
o=Laureate
Educational Inc,
ou=HR Brazil,
email=itacio.
padilha@fcp.edu.br

Date: 2022.02.24 17:18:25 -03'00'

Prof. Dr. Itácio Queiroz de Mello Padilha (examinador externo)

Emitido em 24/02/2022

ATA N° 01/2022 - PGBiotecM (11.01.44.05)
(N° do Documento: 1)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 25/02/2022 08:28)
IAN PORTO GURGEL DO AMARAL
COORDENADOR DE CURSO
2016711

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/>
informando seu número: **1**, ano: **2022**, documento (espécie): **ATA**, data de emissão:
25/02/2022 e o código de verificação: **ea17233697**

DEDICATÓRIA

A minha avó Denise de Castro Ferreira,
mãe Janaina de Castro Ferreira e
tia avó Silvia Pereira da Costa, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda força que ele me deu para continuar batalhando pelos meus objetivos pessoais e profissionais. A batalha foi e está sendo longa e dolorosa, porém é ele que me dá sabedoria e força para continuar.

Dedico este trabalho a minhas avós, a minha mãe e minha família, por acreditarem no meu potencial, por me dar toda a assistência necessária para continuar nessa carreira de pesquisa, que não é fácil.

Agradeço ao meu orientador prof. Demetrius Araújo, por te me aceitado no seu laboratório, me dando assistência necessária para minha formação como mestre. Ao meu coorientador prof. Elquio Eleamen, por me incentivar a continuar na pesquisa. Um muito obrigado.

Agradeço imensamente a minha queridíssima orientadora (não oficial), coorientadora (não oficial) e amiga, Teresa Cristina (Tcris), por todo suporte necessário para conclusão deste trabalho, um muito obrigado por participar da minha formação, obrigado por toda dedicação, sei que essa trajetória foi muito estressante, porém foi muito mais fácil tendo sua companhia, paciência, sabedoria, seu companheirismo e dedicação. Você não sabe o quanto sou grato por tudo, obrigado por fazer parte da minha história.

Agradeço aos meus professores, colegas do mestrado e colegas do laboratório LBCM e LSVM, obrigado por toda ajuda, incentivo, dedicação e compartilhamento de conhecimento, guardarei todos no meu coração.

Agradeço aos meus amigos pesquisadores, em especial a Toni, Helena, Camila Melo, Izabele, Gabriella, Gabi, Louise, Jessyca, Camila de Castro, Nívea e Anderson Santos. Vocês são incríveis no que fazem.

Agradeço aos meus amigos que não são da área, mas tem toda paciência para me escutar, em especial a Gledson, Will, Lulinha, Darlan, Elisa, Leydson e Nicole. Amo vocês de coração.

Agradeço a Universidade Estadual da Paraíba, Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Biotecnologia e ao CNPq, pelo suporte, apoio financeiro e tecnológico.

Também deixo as minhas condolências a todas as famílias que perderam seus familiares neste ano difícil de pandemia, meus sinceros pêsames. E apesar do triste ano, espero que as pessoas comecem a valorizar a ciência e educação, pois nesse momento vimos que somos frágeis. Viva a ciência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da xilana.....	18
Figura 2 – Sabugo do milho A) resíduo não peneirado, B) resíduo peneirado, C) xilana do milho e D) xilana no recipiente para armazenamento.....	31
Figura 3 – Palha da cana-de-açúcar A) resíduo não peneirado, B) resíduo peneirado, C) xilana da palha e D) xilana no recipiente para armazenamento.....	32
Figura 4 – Bagaço da cana-de-açúcar A) resíduo não peneirado, B) resíduo peneirado, C) xilana do bagaço e D) xilana no recipiente para armazenamento.....	33
Figura 5 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) da xilana do bagaço da cana-de-açúcar (A) e palha da cana-de-açúcar (B).....	35
Figura 6 - Curvas de DSC das amostras de xilana da palha da cana-de-açúcar (verde), xilana do bagaço da cana (azul), xilana do sabugo do milho (vermelho) e xilana comercial (preto).....	37
Figura 7 - Termograma das amostras de xilana comercial, xilana do sabugo do milho, xilana do bagaço e palha da cana-de-açúcar.....	39
Figura 8 - Atividade xilanolítica do isolado JS19 em meio ágar LB/Xilana: (A) xilana do sabugo, (B) xilana do bagaço, (C) xilana da palha e (D) xilana comercial.....	41
Figura 9 - Atividade xilanolítica do isolado JS20 em meio ágar LB/Xilana Comercial....	42
Figura 10 – Coloração de Gram (100X): (A) JS19 – cocobacilo, Gram-positivo; (B) JS20 – bacilo, Gram-positivo.....	45
Figura 11 – Coloração de Gram (100X): JS26 – bacilo, Gram-negativo.....	46
Figura 12 – Zimograma para visualização das xilanase em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE – 8%), adicionado de bagaço de cana-de-açúcar (2%); 1 – sobrenadante do cultivo LB/xilana sabugo, 2 - sobrenadante do cultivo LB/xilana palha e 3 - sobrenadante do cultivo LB/xilana bagaço. M – Marcador de proteínas (<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker – Thermo Fisher Scientific, EUA</i>)	49
Figura 13 – DNA genômico dos isolados: 1 – JS19; 2 – JS20 e M – Marcador de peso molecular 1 kb (<i>Fermentas, Thermo Fisher Scientific, EUA</i>)	50
Figura 14 - Produtos da PCR 16S rRNA das cepas: 1 – JS19 e 2 – JS20; M – Marcador de peso molecular 1 kb (<i>Fermentas, Thermo Fisher Scientific, EUA</i>)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extração da xilana de cada resíduo industrial.....	33
Tabela 2 - Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria da xilana comercial, xilana do sabugo do milho, do bagaço e palha da cana-de-açúcar.....	37
Tabela 3 - Isolados produtores de xilanases para xilanas dos resíduos e xilana comercial.....	40
Tabela 4 - Índice Enzimático (IE) dos isolados produtores de xilanases.....	44
Tabela 5 - Caracterização morfológica dos isolados produtores.....	45
Tabela 6 - Quantificação das atividades xilanolíticas dos isolados bacterianos JS19 e JS20.....	47
Tabela 7 - Identificação molecular dos isolados JS19 e JS20 a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com as sequências contidas no banco de dados <i>GenBank</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Min – Minutos

Nm – Nanômetros

pH – Potencial hidrogeniônico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

CMC – Carboximetilcelulose

H – Hora

16S rDNA – 16S ácido desoxirribonucleico ribossomal

LB – Luria Bertani

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SDS-PAGE – Sódio Dodecil Sulfato Poliacrilamida Gel de Eletroforese

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

μL – Microlitros

Ng – Nanograma

SM – Sabugo de Milho

PC – Palha da Cana-de-açúcar

BC – Bagaço da Cana-de-açúcar

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

°C – Grau Celsius

Mg – Miligrama

M – Molar

mM – Milimolar

mm – Milímetro

TBE – Tris-Borato-EDTA

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

mA – Miliampére

V - Volts

kDa – Kilodaltons

RESUMO

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais tem sido o foco de diversas pesquisas, principalmente no campo da biotecnologia, devido à biomassa desses resíduos serem ricas de polímeros que possuem um alto valor agregado, como é o caso da xilana. A xilana é a principal hemicelulose, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante, a mesma possui diversas aplicabilidades na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica, podendo ser utilizada na prospecção enzimática utilizando microrganismos, como bactérias. Este trabalho teve como objetivo extrair a xilana do sabugo do milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar para bioprospecção de xilanases utilizando isolados bacterianos provenientes de amostras do solo da Usina Japungu Agroindustrial S/A, localizada no município de Santa Rita – Paraíba. Como resultados da etapa de extração da xilana dos resíduos da cana-de-açúcar foi obtido um rendimento de 4,62g para palha e 3,80g para o bagaço, partindo de 30g de resíduo. Para caracterização das xilanas obtidas utilizou-se o método de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), no qual apresentaram as principais bandas características da xilana. Para prospecção de xilanases foram selecionadas 16 isolados do banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, no qual para produção enzimática, os isolados foram adicionados em placas de Petri contendo o meio ágar/Luria Bertani, adicionado 0,4% xilana do sabugo do milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar e xilana comercial (*Beechwood*), separadamente. As cepas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 72 h, e após este período, utilizou-se a coloração com vermelho congo (0,1%), para observação do halo de degradação e determinação do índice enzimático (IE). Entre as cepas positivas para xilanase (11 no total), 5 cepas foram positivas para os 4 tipos de xilanas utilizados e 6 cepas positivas apenas para xilana comercial. Para produção enzimática foram selecionadas as cepas JS19, que apresentou $IE \geq 2$, em todos os meios testados e JS20, que apresentou produção enzimática apenas no meio contendo xilana comercial. As cepas foram cultivadas em caldo nutriente adicionado 0,5% do resíduo industrial, sabugo do milho, palha e bagaço da cana-de-açúcar, e incubadas em shaker (150 rpm), 37° C, por 72 h, para avaliação da atividade enzimática (U/mL), pelo método de açúcares redutores (ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS). Os resultados mostraram que a cepa JS19 apresentou uma maior produção enzimática, variando de 0,74 a 0,92 (U/mL), em relação a cepa JS20 (0,12 a 0,30 U/mL). As bandas das xilanases visualizadas em gel de poliacrilamida (Zimograma) se apresentaram em torno de 60-66,2 kDa. Foi realizado o sequenciamento dos isolados JS19 e JS20 utilizando o 16S rRNA, no qual ambas foram identificadas no nível de Gênero, *Bacillus* e *Priestia* respectivamente. O isolado JS19 foi depositado no *GenBank* como *Bacillus* sp., JS19 sob código (OM759815). Estes dados preliminares mostram que o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais, como milho e cana-de-açúcar, são promissores para obtenção de xilanas, bem como, para bioprospecção enzimática utilizando microrganismos como bactérias isoladas do solo.

Palavras-chave: Bagaço da cana-de-açúcar; palha da cana-de-açúcar; lignocelulose; hemicelulose; resíduo industrial; bioprospecção.

ABSTRACT

The reuse of agro-industrial residues has been the focus of several researches, mainly in the field of biotechnology, due to the biomass of these residues being rich in polymers that have a high added value, such as xylan. Xylan is the main hemicellulose, being the second most abundant polysaccharide, it has several applications in the food, pharmaceutical and biotechnological industry, and can be used in enzymatic prospecting using microorganisms, such as bacteria. This work aimed to extract xylan from three agricultural municipalities, corn cob, sugarcane bagasse and sugarcane straw for bioprospecting of xylanases used isolated from soil bacteria from Usina Japungu Agroindustrial S/A, located in Santa Rita – Paraíba. As a result of the xylan extraction step from sugarcane residues, a yield of 4.62g for straw and 3.80g for bagasse was obtained, starting from 30g of residue. To characterize the xylans obtained, the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) method was used, which showed the main characteristic bands of xylan. For xylanase prospection, 16 isolates were selected from the microorganism bank of the Laboratory of Cellular and Molecular Biotechnology, in which for enzymatic production, the isolates were added in Petri dishes containing the agar/Luria Bertani medium, added 0.4% xylan from the cob from corn, bagasse and sugarcane straw and commercial xylan (Beechwood), separately. The strains were incubated in a bacteriological oven at 37°C for 72 h, and after this period, staining with Congo red (0.1%) was used to observe the degradation halo and determine the enzymatic index (IE). Among the xylanase positive strains (11 in total), 5 strains were positive for the 4 types of xylans used and 6 strains were positive only for commercial xylan. For enzymatic production, strains JS19, which presented $IE \geq 2$, in all tested media, and JS20, which presented enzyme production only in the medium containing commercial xylan, were selected. The strains were cultivated in nutrient broth added with 0.5% of industrial residue, corn cob, straw and sugarcane bagasse, and incubated in a shaker (150 rpm) at 37°C for 72 h to evaluate the enzymatic activity (U/mL), by the reducing sugar method (3,5-dinitrosalicylic acid - DNS). The results showed that strain JS19 had a higher enzyme production, ranging from 0.74 to 0.92 (U/mL), compared to strain JS20 (0.12 to 0.30 U/mL). The xylanase bands visualized in polyacrylamide gel (Zymogram) were around 60-66.2 kDa. The sequencing of isolates JS19 and JS20 was performed using the 16S rRNA, in which both were identified at the level of Genus, *Bacillus* and *Priestia* respectively. Isolate JS19 has been deposited with GenBank as *Bacillus* sp., JS19 under code (OM759815). These preliminary data show that the reuse of agro-industrial residues, such as corn and sugar cane, are promising for obtaining xylans, as well as for enzymatic bioprospecting using microorganisms such as bacteria isolated from the soil.

Keywords: Sugarcane bagasse; sugarcane straw; lignocellulose; hemicellulose; industrial waste; bioprospecting.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Biomassa lignocelulósica.....	17
2.2 Hemicelulose.....	17
2.3 Xilana.....	18
2.4 Enzimas Xilanolíticas.....	19
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Extração da xilana do sabugo do milho e da cana-de-açúcar.....	24
4.2 Caracterização das xilanas.....	25
4.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	25
4.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG).....	25
4.3 Isolamento bacteriano.....	25
4.4 Caracterização morfofisiológica dos isolados bacterianos.....	26
4.5 Triagem das bactérias produtoras de xilanases.....	26
4.5.1 Análise qualitativa da atividade xilanolítica.....	26
4.5.2 Determinação enzimática das cepas xilanolíticas.....	26
4.6 Produção e quantificação enzimática.....	27
4.6.1 Cultivo dos isolados para produção da xilanases.....	27
4.6.2 Análise quantitativa das atividades enzimáticas.....	27
4.6.3 Quantificação enzimática.....	28
4.6.4 Curva padrão da xilose.....	28
4.6.5 Zimograma.....	29
4.7 Caracterização moleculares dos isolados bacterianos.....	29
4.7.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	29
4.7.2 Amplificação do gene 16S rRNA.....	29
4.7.3 Visualização, purificação e quantificação dos produtos da PCR 16S rRNA..	30

4.7.4 Obtenção e análise das sequências do gene 16S rRNA.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Extração das xilanas.....	31
5.2 Caracterização das xilanas.....	34
5.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	34
5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA)	36
5.3 Isolados bacterianos produtores de xilanase.....	40
5.4 Índice enzimático dos isolados xilanolíticos.....	42
5.5 Caracterização morfofisiológica dos isolados bacterianos.....	45
5.6 Análise quantitativa das atividades xilanolíticas.....	46
5.7 Análise das enzimas pela técnica eletroforética zimograma.....	48
5.8 Caracterização molecular dos isolados bacterianos.....	50
6. CONCLUSÕES.....	53
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	54
ANEXOS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica, como sabugo de milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar são matérias-primas baratas, abundantes e renováveis que podem ser empregadas na produção sustentável de biocombustível, bioenergia e várias biomoléculas que tem seu valor agregado (JAYPAL et al., 2013; SANTOS et al., 2019; ÁVILA et al., 2019).

Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são 10-25% de lignina, 20-30% de hemiceluloses e 40-50% de celulose (OKEKE et al., 2015). A matriz complexa desses componentes mantém alta força mecânica o que resiste à hidrólise (ANWAR et al., 2014).

Após a colheita, normalmente essa biomassa lignocelulósica é queimada, podendo causar acúmulo e impacto ambiental (ALOKIKA; SINGH, 2019). O reaproveitamento desses resíduos, gerando produtos com valor agregado como a xilana, pode ser uma das alternativas viáveis para a indústria agrícola.

A xilana é a principal hemicelulose presente nas plantas, sendo um polímero composto por uma estrutura principal β - (1, 4) -D-xilose, com diferentes cadeias laterais, especialmente unidades de α -L-arabinosil e α -D-glucuronosil (Khusro et al. 2016). Este polímero está presente em grande quantidade em madeiras de lei (15-30%), madeiras macias (7-10%) e plantas anuais (<30%) (Yang et al. 2019). O milho e a cana-de-açúcar são fontes apropriadas para produção de xilana e xilitol (ÁVILA et al., 2019).

A xilanase é um importante grupo de enzima hidrolítica que cliva a estrutura β - (1, 4) glicosídica da xilana, sendo responsável por gerar produtos como xilose e xilobiose, como xilooligossacarídeos (IRFAN et al., 2016). Diferentes enzimas com múltiplos modos de ação e especificades são necessárias para a decomposição completa da xilana devido a sua complexa estrutura química e diversidade (ALOKIKA; SINGH, 2019), desta forma, diferentes endo e exoxilanases são importantes no processo de degradação da xilana (VERMA; SATYANARAYANA 2012a,b), sendo encontrado em diversos microrganismos presentes no solo, responsáveis pela biodegradação da matéria orgânica (BURLACU et al., 2016).

Bactérias, fungos e leveduras são usados para produção de xilanases sob fermentação em estado sólido e submersa (BURLACU et al., 2016). Uma variedade de materiais lignocelulósicos, como palha e bagaço da cana-de-açúcar, palha de arroz, farelo

de arroz, palha e farelo de trigo e espiga de milho são usados como fontes alternativas de produção enzimática (BURLACU et al., 2016).

As aplicações biotecnológicas das xilanases podem ser diversas, como pré-branqueamento de celulose, melhoria da digestibilidade de rações para animais, bioconversão de material lignocelulósico e agro-resíduos para produção do bioetanol, entre outros (KUMAR et al., 2018; SHARMA et al., 2020).

As xilanases produzidas por bactérias são mais estáveis, atuando em uma ampla faixa de pH e em geral estão livres de celulasas, aspectos vantajosos nos processos industriais (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999), outros estudos estão sendo realizado utilizando as xilanases como agente de digestão com aplicabilidade na área de saúde (BUDNIK et al., 2017).

Partindo dessas considerações, o presente estudo tem como objetivo principal destinar os resíduos descartados da indústria agrícola, como o sabugo do milho e cana-de-açúcar, para extração de xilana, com a finalidade de prospecção de xilanases, em isolados bacterianos.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa de lignocelulose é um material vegetal que pode ser derivado de plantas como madeiras macias, madeiras duras e gramíneas (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Essa biomassa é composta principalmente por três polímeros, que é a celulose, lignina e hemicelulose (LEE, 1997), porém outros polímeros como pectina, proteína, cera e extrativos podem ser encontrados na sua composição (KUMAR et al., 2009).

As quantidades de cada um dos constituintes presentes variam em espécie de planta e também na idade da planta (KUMAR et al., 2009; VERARDI et al., 2012). De acordo com Isikgor e Becer (2015), o polímero mais abundante na biomassa lignocelulósica é a celulose, seguida de hemicelulose e lignina. A hemicelulose presente no sabugo do milho varia de 31,9 a 36% e na cana-de-açúcar varia de 28 a 32% (ISIKGOR; BECER, 2015).

2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses representam entre 15 a 35% da composição da biomassa lignocelulósica (LIMAYEM; RICK, 2012). Diferente da celulose, os vários tipos de hemiceluloses não são cristalinos, possuem cadeias mais curtas e são ramificadas (CUNHA; GANDINI, 2010; MUSSATO; TEIXEIRA, 2010). Assim como a celulose, as hemiceluloses são constituídas por resíduos de β -D-piranol ligados na posição 1,4, tais como glicose, manose e xilose (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018).

A quantidade e os tipos de ramificação (grupos funcionais) são variáveis, dependendo da fonte que a mesma for obtida (LIMAYEM; RICK, 2012). A hemicelulose é um heteropolímero formado por monossacarídeos como pentose, hexose, açúcares acetilados e ácidos urônicos (MUSSATO; TEIXEIRA, 2010).

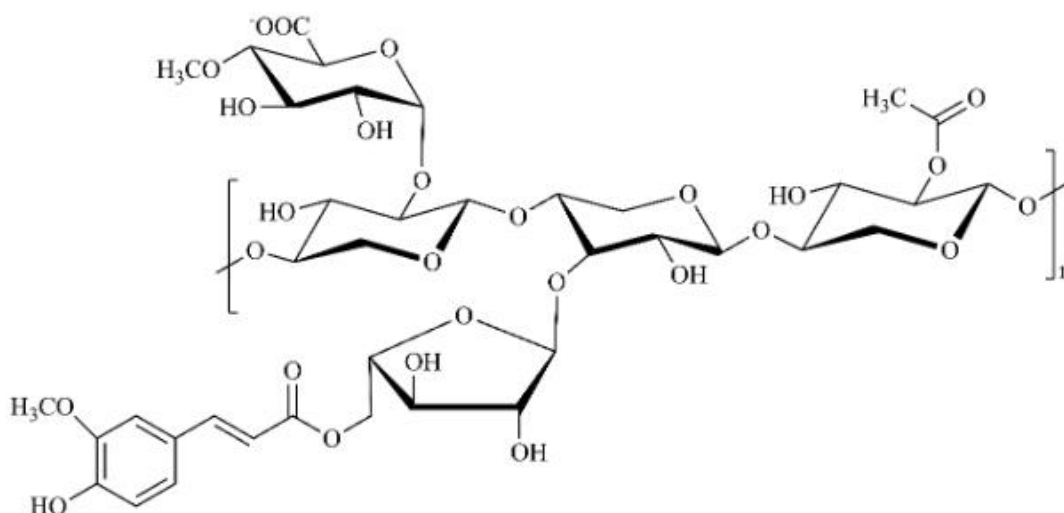
Devido a essas características químicas, as hemiceluloses tem recebido considerável interesses, sua bioatividade, biocompatibilidade e biodegradação os tornam interessante em diversos campos da indústria, como produção de embalagens de alimentos, engenharia de tecidos, dispositivos e sistemas de distribuição de fármacos (ZHANG et al., 2016; SABELLE et al., 2017; URTIGA et al., 2020a).

2.3 Xilana

A xilana é a hemicelulose de maior abundância na natureza, ela pode ser extraída de diversos produtos agrícolas, tais como a palha de trigo, espigas de milho, sorgo, palha e bagaço de cana-de-açúcar (KAYSERILIOĞLU et al., 2003; URTIGA et al., 2020a).

A xilana (Figura 1) possui sua estrutura variada de acordo com a fonte de obtenção e método de extração utilizado (URTIGA et al., 2020a). No entanto, as xilanas de plantas apresentam uma estrutura comum, de D-xilopirranose no qual estão ligadas por ligações β - (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas (OLIVEIRA et al., 2010; KISHANI et al., 2019). Outros grupos que podem se ramificar da estrutura principal são arabinose, ácidos glicurônico e ácido acético (KOUKIEKOLO et al., 2005).

Figura 1 – Estrutura química da xilana



Fonte: SILVA et al., 2012

Dependendo da sua composição, a xilana pode ser subdivida em homoxilano, arabinoxilano, glucuronoxilano e xiloglucano (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018).

A homoxilana é a forma da xilana que consiste apenas em resíduos de xilose, que podem ser lineares ou ramificados (CHAKDAR et al., 2016). As ligações glicosídicas dos resíduos de xilose podem ser β -1-4 ou β -1-3 no material de origem, porém pode haver mistura de ambas (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; EBRINGEROVÁ, 2005; ZHOU et al., 2016). A homoxilana só pode ser encontrada em algas marinhas (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000).

A arabinoxilano possui na sua estrutura arabinose como o principal grupo lateral, que está ligado na posição 2 ou 3 do carbono de xilose que formam a cadeia principal da

xilana (EBRINGEROVÁ, 2005; ZHOU et al., 2016). As unidades de arabinose podem ser mono ou dissubstituídas em uma unidade de xilose (EBRINGEROVÁ, 2005). Esses compostos são encontrados em grãos de cereais (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018).

O glucuronoxilanos (O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano) possui na sua estrutura uma cadeia principal de substituição em cada 10 unidades de xilose por ácido 4-O-metil-D-glucurônico (GRÖNDAHL et al., 2003), a estrutura da xilose também é parcialmente acetilada no carbono 2 e/ou 3, sendo o grau de acetilação variável em diferentes plantas (GRÖNDAHL et al., 2003). Essa hemicelulose é encontrada em madeiras duras, sendo constituintes de 15 a 30% do peso da massa seca (GRÖNDAHL; TELEMAN; GATENHOLM, 2006; HILPMANN et al., 2016).

O xiloglucano são constituídas por uma cadeia principal semelhante à celulose consistindo em resíduos de glicose ligado a ligação β -1-4, com resíduos de xilose ligados à posição 6 (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Além disso, eles são altamente ramificado com até 75% de ramificação (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Arabinose e galactose podem ser ligado às unidades de xilose que estão ligadas a cadeia principal para formar di ou cadeias laterais de triglicosil (GÍRIO et al., 2010). O xiloglucano é mais abundante na maioria das plantas não gramináceas, compreendendo até 20% da massa seca da parede celular (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018).

A estrutura da xilana foi estudada, juntamente com suas propriedades biológicas, sendo verificado efeitos imunomoduladores e inibitórios na taxa de crescimento de tumores (OLIVEIRA et al., 2010; SUN et al., 2013; URTIGA et al., 2020a), atividade antioxidante (MAITY et al., 2019), prebióticos (PAESANI et al., 2020), na indústria alimentícia (ZHANG et al., 2021) e na indústria farmacêutica (SILVA et al., 2013; MARCELINO et al., 2015; URTIGA et al., 2020b).

2.4 Enzimas Xilanolíticas

Devido a heterogeneidade e complexidade da xilana, a hidrólise completa requer uma grande variedade de enzimas de ação sinérgica, na qual inclui endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), endo-1,3- β -D-xilanses (EC 3.2.1.32), β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) e enzimas auxiliares de desramificação, tais como α -D-glucuronidases, α -L-arabinofuranosidases e acetilxilano esterases, que servem como removedores de grupos laterais (ALOKIKA; SINGH, 2019; CAO et al., 2021).

As xilanases são enzimas hemicelulolíticas responsáveis pela desestruturação das ligações cruzadas entre a celulose e hemicelulose (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2000), elas clivam a ligação β -1,4 glicosídica da estrutura da xilana, o que forma produtos utilizáveis como xilose e xilobioses (ALOKIKA; SINGH, 2019). Essas enzimas são classificadas com base em algumas características como peso molecular, ponto isoeletrico, propriedades cinéticas e especificidade do substrato (BALA; SINGH, 2019).

Existem diversas enzimas, das quais as principais são:

- (1) Endo-1,4- β -xilanases – Essa enzima cliva a ligação β -1,4-glicosídica interna da estrutura da xilana e produz pequenas frações de xilooligossacarídeos como xilose, xilobiose e xilotriose (BURLACU et al., 2016). As ligações que são hidrolisadas não são atacadas aleatoriamente, sendo dependentes do grau de ramificação, do comprimento da cadeia e da presença de substituintes na molécula do substrato (ALOKIKA; SINGH, 2019);
- (2) β -xilosidades – Essa enzima cliva a extremidade não redutora dos xilooligossacarídeos, como resíduos de xilose. Geralmente, a xilobiose é seu melhor substrato pois a β -xilosidade purificada não hidrolisa a xilana. Elas podem ser monoéricas, diméricas ou tetraméricas. Devido a β -xilosidades hidrolisarem mais ligações glicosídicas do que qualquer outra hemicelulase, a mesma é usada em escala industrial, podendo ser combinada com outras enzimas, como a β -xilonases para destintamento de papel reciclado, melhoramento da digestão de ração animal e refinamento das propriedades de panificação na massa do pão, também pode ser misturadas com celulasas e outras hemicelulasas em processamento da biomassa lignocelulósica em monossacarídeos para fermentação de biocombustíveis, como butanol e etanol (JORDAN; WAGSCHAL, 2010);
- (3) α -Glucuronidases – Essa enzima cliva a ligação α -1,2 glicosídica entre o ácido D-glucurônico e a extremidade não redutora do xilopiranosil de pequenos xilooligossacarídeos (POLIZELI et al 2005). Apesar do substrato diferir para todas as fontes de obtenção, algumas glucuronidases são capazes de clivar o polímero intacto, sendo também relatado que os grupos acetil perto dos substituintes glucuronosil pode obstruir parcialmente a atividade enzimática (POLIZELI et al., 2005; ALOKIKA; SINGH, 2019).

- (4) α -L-Arabinofuranosidades – São enzimas conhecidas por hidrolisar os resíduos terminais α -1,2; α -1,3 e α -1,5 da arabinofuranosil de diferentes oligossacarídeos e polissacarídeos, como arabinoxilano e arabinanos com modos de ação endo e exo (TOPAKAS et al., 2007; CONTESINIA et al., 2017). Elas foram descritas como algumas das famílias de glicosídeo hidrolase (GHs), isto é, GH30, GH43, GH51, GH54 e GH62 (CARTMELL et al., 2011; ALOKIKKA; SINGH, 2019).

Diversos organismos são capazes de produzir xilanases, tais como bactérias, fungos, algas marinhas, leveduras, protozoários, crustáceos e insetos (ALOKIKKA; SINGH, 2019), no qual podem ser usados para produção dessas enzimas.

A produção industrial de xilanases depende de diversos fatores, como meio de cultura, presença do indutor e microrganismos produtores, podendo ser utilizados fungos, bactérias e leveduras (DIAZ-GODINEZ et al., 2016). As xilanases bacterianas têm pH ideal em neutro e/ou alcalino, o que os tornam aplicáveis em diversos ramos industriais, já as xilanases fúngicas requer etapas adicionais de extração e purificação, o que inviabiliza a produção em grande escala (CAO et al., 2021).

Os principais gêneros bacterianos são *Micrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Rodothermus*, *Pseudoxanthomonas* (ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2016).

A utilização industrial das xilanases utilizando microrganismos, consiste na chamada tecnologia limpa e sustentável. Essas xilanases são empregadas na produção de biocombustíveis, celulose, indústria de papel, indústria alimentícia e indústria farmacêutica (GOSWAMI; RAWAT, 2015; KUMAR et al., 2017).

Existem dois métodos de produção de xilanase, a maioria são produzidas por fermentação submersa (SF) representando 90% das produções totais, porém tem sido observado que a produtividade enzimática por meio da fermentação em estado sólido (FES) é normalmente muito maior (DIAZ-GODINEZ et al., 2016).

O uso da FES é interessante devido aos baixos riscos de contaminação, estabilidade da enzima e custo relativamente mais vantajoso, a técnica consiste na simulação do *habitat* natural utilizando um substrato específico o que aumenta a atividade enzimática dos microrganismos utilizados (DIAZ-GODINEZ et al., 2016).

A escolha do substrato é de grande importância na seleção do processo de fermentação e, portanto, efetua a produção bem-sucedida de xilanases, a xilana

purificada, quando usada como substrato é geralmente excelente devido ao seu baixo peso molecular que ajuda a indução de xilanases. No entanto, para processos de grande escala, alternativas devem ser consideradas devido ao alto custo dos substratos purificados (OTERO, 2015).

Portanto, os resíduos lignocelulósicos são uma excelente escolha para uso como substratos, como palha de cevada, sabugo de milho, palha ou farelo de trigo, palha e bagaço da cana-de-açúcar (GÍRIO et al., 2010; SIPOS et al., 2010; GOMES et al., 2016; ALOKIKKA; SINGH, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Utilizar os resíduos agroindustriais para extração e caracterização do polímero xilana e utilizá-lo na prospecção de xilanases, a partir de isolados bacterianos do solo.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair a xilana do sabugo do milho, da palha e do bagaço da cana-de-açúcar;
- Realizar a caracterização físico-química das xilanas obtidas;
- Produzir as xilanases a partir de isolados bacterianos do solo;
- Quantificar as atividades xilanolíticas;
- Identificar os isolados bacterianos produtores de xilanases.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO DA XILANA DO MILHO E DA CANA-DE-AÇÚCAR

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, da Universidade Estadual da Paraíba, *Campus V*, João Pessoa-PB. O sabugo foi doado pelo estabelecimento “Casa do Sertão”, João Pessoa-PB e o Bagaço e Palha da cana-de-açúcar foram doados pela Usina Japungu Agroindustrial S/A, localizada no município de Santa Rita-PB.

A xilana utilizada no experimento foi obtida através do sabugo do milho (SM), da palha da cana-de-açúcar (PC) e do bagaço da cana-de-açúcar (BC), sendo esses primeiramente triturado, após a trituração eles foram colocados em um Becker de 3L, separado para cada resíduo, na proporção de 1L de água destilada para cada 30g de material triturado. Os recipientes foram protegidos com um filme plástico mantendo o meio sob agitação continua por 24 horas com auxílio do agitador mecânico.

Ao final desta etapa, a agitação foi interrompida, para ser realizado a filtração do conteúdo utilizando o sistema de papel filtro. Após a filtragem, o sabugo, a palha e o bagaço triturados foram colocados em um recipiente separadamente e postos em estufa a 55°C para secagem, o sabugo, a palha e o bagaço triturados foram retirados, assim que estiveram secos, para prosseguir com os próximos processos da extração.

O material seco foi tratado com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,3% (v/v). Usando uma proporção de 200mL de NaClO contendo 5g de detergente neutro para cada 10g do triturado. O meio foi mantido em agitação mecânica por 1 hora e ao final deste processo, foi repetido o protocolo de secagem descrito anteriormente.

A massa do sabugo, da palha e do bagaço triturado foram pesadas para a determinação da quantidade do solvente a ser utilizado no tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) 4% (v/v) na proporção de 1:10 do resíduo. Os mesmos foram mantidos sobre agitação constante por um período de 4h. Após a filtração os resíduos foram desprezados e os filtrados foram submissos a neutralização com a adição de ácido acético glacial (CH₃COOH), o pH dos filtrados foi verificado com auxílio do pH-metro (Modelo: NI PHM, Nova Instruments,).

Após a etapa de neutralização, foi realizada a precipitação da xilana pela adição de metanol. Na proporção 1:1,5 (v/v) da solução extrativa e metanol, respectivamente.

Após a precipitação, a xilana foi então lavada quatro vezes com metanol e filtrada com o auxílio de um funil sinterizado.

Ao final, foi realizada uma lavagem com isopropanol P.A. e a xilana foi colocada em repouso por um período de 12 horas dentro da geladeira. A xilana foi filtrada novamente com auxílio de um funil sinterizado e foi realizado o processo de secagem em estufa a uma temperatura entre 55-60°C. Nesta última etapa a xilana foi dividida em frações e colocada em gral, tamisando o material a cada 5 minutos, até o mesmo estar com aspecto seco seguindo a metodologia descrita por Oliveira et al., 2010 modificado de Garcia, Ganter e Carvalho (2000).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS XILANAS

4.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Espectros de FT-IR foram obtidos em espectrofotômetro (modelo IRPrestige-21, SHIMADZU -Japão) pela técnica de refletância total atenuada (ATR) na faixa espectral de 4000 a 700 cm⁻¹. foi analisada a xilana, a fim de verificar suas características químicas.

4.2.2 Calorimetria Exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA)

As propriedades térmicas das xilanas foram analisadas em equipamento (Analisador térmico simultâneo NETZSCH STA modelo 449 F3- JUPITER) com medidas simultâneas de DSC e TG, com razão de aquecimento de 10°C/min, com intervalo de temperatura de 40 a 500 °C em atmosfera de gás nitrogênio com fluxo de 100mL/min.

4.3 ISOLAMENTO BACTERIANO

Foram utilizados vinte e um (21) isolados bacterianos que foram previamente isoladas do solo e torta de filtro, da Usina Japungu Agroindustrial S/A (07°01'37.3''S, 34°58'34.8''W), localizada no município de Santa Rita – Paraíba, que fazem parte do banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Molecular e Celular, do departamento de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, *Campus I*, João Pessoa-PB.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

A caracterização dos isolados bacterianos do solo ocorreu, primeiramente, por meio da coloração de Gram modificada por Hucker (1921) após a coloração foi observado a forma, tamanho e presença/ausência de endósporos, utilizando microscópio óptico (Taimin XS 201, invertido), no aumento 100X (imersão).

4.5 TRIAGEM DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE XILANASES

4.5.1 Análise qualitativa da atividade xilanolítica

As atividades xilanolíticas foram avaliadas repassando os isolados bacterianos de um cultivo fresco, com auxílio de palitos esterilizados para placas de Petri (90x15mm) contendo os meios: Agar/LB (Luria Bertani) (triptona - 2 g; extrato de levedura - 1 g; NaCl - 1 g; Agar - 3g; água destilada - 200 mL), acrescido de 0,4% de xilana extraído do sabugo do milho, da palha e do bagaço da cana-de-açúcar e xilana comercial *Beechwood* (Sigma - Aldrich, St. Louis, EUA).

Após 72 horas de incubação a 37°C, foram adicionados aos meios uma solução aquosa de vermelho congo (0,1%) (Difco Laboratories Inc., EUA), por 15 min. Após esse período, o corante foi descartado e as placas foram lavadas com NaCl 1 M, por 15 min para verificação dos halos de degradação.

Os halos de degradação amarelados formados ao redor das colônias indicam atividade xilanolítica positiva, assim como a ausência do halo indica atividade negativa (TEATHER; WOOD, 1982).

4.5.2 Determinação enzimática dos isolados xilanolíticos

A determinação enzimática foi expressa pelo índice enzimático (I.E.). Este índice representa as produções enzimáticas, baseadas na relação entre o diâmetro médio do halo de degradação, dividido pelo diâmetro médio da colônia (FLORENCIO; COURI; FARINAS, 2012);

Quando o I.E. é maior ou igual a dois (≥ 2), indica uma maior produção da enzima, sendo considerado um produtor potencial de enzima em meio sólido (OLIVEIRA et al., 2006).

4.6 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

4.6.1 Cultivo dos isolados para produção da xilanases

Para a produção de xilanase foram utilizados os resíduos industriais do sabugo do milho, da palha da cana-de-açúcar e bagaço da cana-de-açúcar, como fontes alternativas de carbono, os quais foram previamente secos em estufa a 50° C por 24 horas, triturados em liquidificador e peneirado (peneira plástica simples) e autoclavado duas vezes a 121° C, 15 min, quando acrescido ao meio de cultura.

Os isolados selecionados foram cultivadas em Erlenmeyers (125 mL), contendo 50 mL do meio (LB), acrescido de 0,5 % p/v de SM, PC e BC, separadamente, e incubadas a 37° C, em shaker a 200 rpm, por 72 h, para produção enzimática.

4.6.2 Análise quantitativa das atividades enzimáticas

A determinação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), com modificações (SANTOS et al., 2017), foi utilizada para quantificações das atividades xilanolíticas. A preparação do reagente DNS, de acordo com Miller (1959), está descrita no ANEXO 1.

Após cultivo dos isolados no meio LB/SM, LB/PC e LB/BC, as amostras foram centrifugadas a 3880 xg. (HERMLE Mod. Z326K), por 20 min, a temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 250 µL, de cada amostra (sobrenadante), para tubos de ensaio, e adicionados 100 µL de solução tampão fosfato de sódio (pH 6,5), contendo o substrato xilana (2%). As amostras foram incubadas a 55° C (temperatura padrão de triagem), por um tempo de 10 min. Após este período, adicionou-se 250 µL do reagente DNS a cada tubo (solução de parada da reação), misturando-se vigorosamente. Os tubos foram incubados em banho-maria (100° C), pelo tempo de 5 min. A reação foi resfriada imergindo os tubos em banho de gelo.

Foram utilizadas placas de 96 poços, onde se adicionou, para cada amostra (em duplicata), 260 µL de água destilada esterilizada e 40 µL de amostra, sendo homogeneizadas por pipetagem. Branco da amostra foi preparada com solução tampão, sem sobrenadante. A leitura foi realizada por espectrofotometria, em leitor de placa (BIOTEK, Mod. EL800), a 540 nm.

4.6.3 Quantificação enzimática

As determinações das quantificações das xilanases, foram baseadas nas concentrações de xilose, utilizando curvas padrões dos açúcares, obtenção da equação da reta e R^2 . Para os cálculos das quantificações de xilanases, utilizou-se a fórmula descrita abaixo:

$$[Enz] = \frac{OD \times F \times D \times VR}{PM \times T \times VA} \text{ U/mL}$$

Onde:

[Enz] = Concentração da enzima (U/mL)

OD = Densidade óptica

$F = \frac{1}{\text{Coeficiente angular}}$

D = Diluição da amostra

VR = Volume total da reação

PM = Peso molecular do açúcar

T = Tempo de avaliação enzimática

VA = Volume da amostra (sobrenadante)

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores equivalentes a xilose (atividade xilanolítica), por mililitro, por minuto, ($\text{U}/\text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$) ou (U/mL), nas condições de ensaio, utilizando curvas padrões de xilose. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

4.6.4 Curva padrão da xilose

Inicialmente, foram preparadas soluções-padrão de xilose, para as quais foram pesados 36 mg de xilose, ambos anidro, transferidos para balões volumétricos de 100 ml. Após dissolução, o volume foi completado com água destilada.

A partir da solução-padrão de cada açúcar (100 mg/L) foram preparadas soluções com diferentes concentrações de xilose (0,5; 1,5; 3; 4,5; 6; 7,5 e 9 ml). A partir das soluções de diferentes concentrações foram realizados os ensaios de acordo com o Anexo 2.

4.6.5 Zimograma

As atividades xilanolíticas das amostras foram avaliadas dos sobrenadantes livres de células, em gel de poliacrilamida (8%), com 1 mm de espessura, adicionado do substrato xilana do bagaço (2%). Após corrida eletroforética em sistema de mini-gel, *Mini-Protean II* (Bio-Rad, EUA), a 200 V e 400 mA, por cerca de 50 min, para verificação da atividade enzimática foi realizado incubação em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) (Anexo 3), por 15 min em temperatura ambiente, seguida de coloração com vermelho congo (0,1%) por 15 min e descoloração com NaCl (1M) por mais 15 min (Anexo 4).

4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS BACTERIANOS

4.7.1 Extração e quantificação do DNA genômico

Foi realizado extração do DNA genômico dos isolados JS19 e JS20, a extração foi realizada utilizando *illustra™ bacteria genomic PrepMiniSpin kit* (GE Healthcare, UK), conforme instruções do fabricante.

As amostras de DNA foram quantificadas utilizando aparelho NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 UV/Vis (EUA), que determinou a concentração do DNA em ng/μL no comprimento de onda de 260 nm e estabeleceu o grau de pureza da amostra, pela razão entre os valores dos comprimentos de onda 260 nm/280 nm (Anexo 5).

4.7.2 Amplificação do gene 16S rRNA

Os genes 16S rRNA dos isolados bacterianos foram amplificados via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizado o kit PCR Master Mix (PROMEGA, EUA) e os *primers* universais: **27F** (5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3') e **1525R** (5'AAG GAG GTG WTC CAR CC3').

As reações da PCR foram realizadas para um volume final de 100 μL, contendo: 10 ng de DNA genômico; 50 μL de tampão 2x; 10 μL de *primer* 27F; 10 μL de *primer* 1525R; 20 μL de água Milli-Q. A amplificação ocorreu em termociclador (Perkin Elmer Gene Amp DNA system 2400, EUA), com as seguintes etapas: 94°C por 5 min, 35 ciclos (94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min), com extensão final a 72°C por 10 min e manutenção a 4°C, por no mínimo 15 min.

4.7.3 Visualização, purificação e quantificação dos produtos da PCR 16S

rRNA

Para visualização dos produtos de PCR utilizou-se gel de agarose (1%), em tampão TBE 1% (Tris-Borato-EDTA), no qual foram adicionadas as amostras, contendo: 5 µL de cada produto de PCR, 1 µL de tampão de corrida (1X) e 1 µL do intercalante de ácidos nucleicos GelRed® Nucleic Acid Stain (Merck, Alemanha). O marcador de peso molecular 1 kb ladder (Fermentas, *Thermo Fisher Scientific*, EUA), foi utilizado de acordo com o fabricante.

A corrida eletroforética ocorreu a 100 V, 95 mA, por aproximadamente 10 min. As bandas correspondentes a aproximadamente 1500 pb foram visualizadas em Transiluminador UV (Kasvi).

A purificação dos produtos da PCR 16S RNA foi realizada utilizando kit Promega Wizard® SV *gel and PCR Clean-Up System*, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras purificadas foram quantificadas utilizando aparelho NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 UV/Vis (EUA) (Anexo 6).

4.7.4 Obtenção e Análise das sequências do gene 16S rRNA

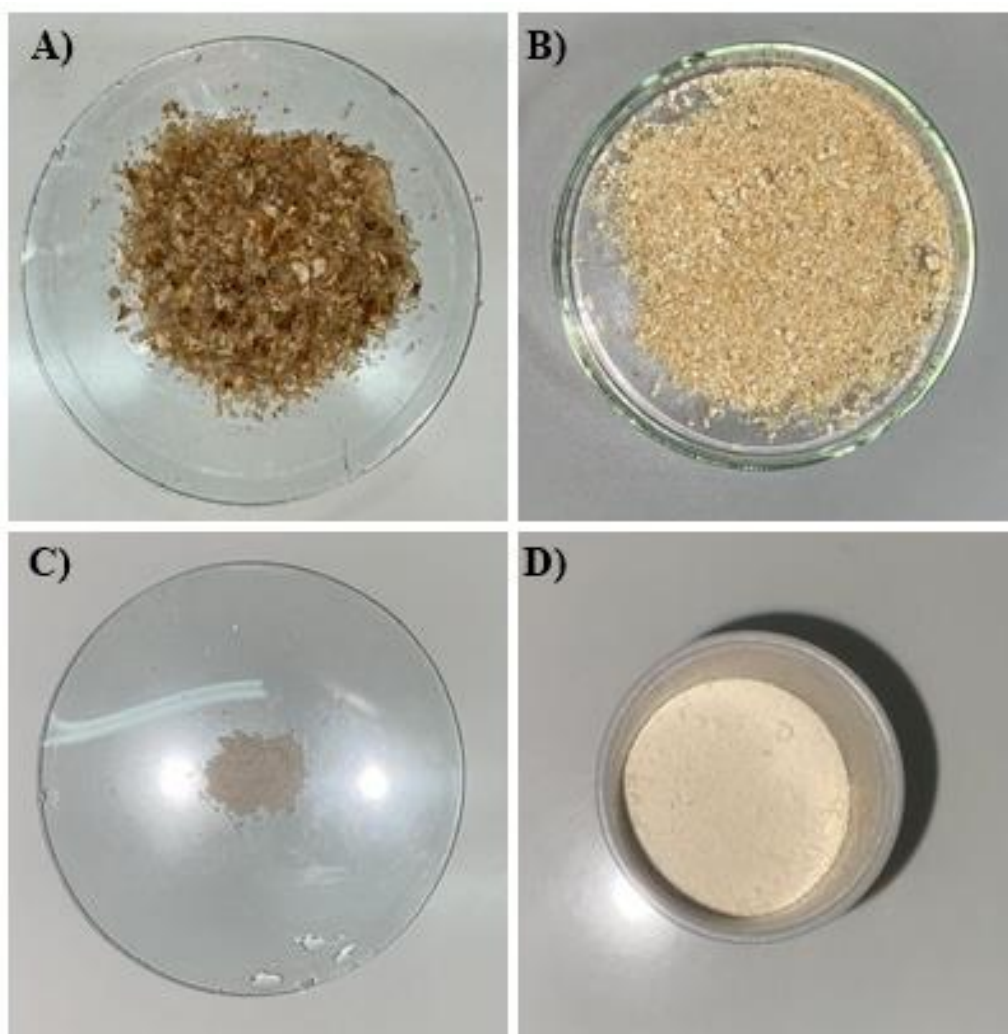
As amostras foram sequenciadas pela ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil), utilizando os *primers* 27F e 1525R separadamente, de acordo com as instruções da empresa (Anexo 7). As sequências obtidas foram analisadas quanto a sua qualidade e no formato FASTA, foram comparadas às sequências do banco de dados do NCBI, utilizando a ferramenta *Blastn*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DAS XILANAS

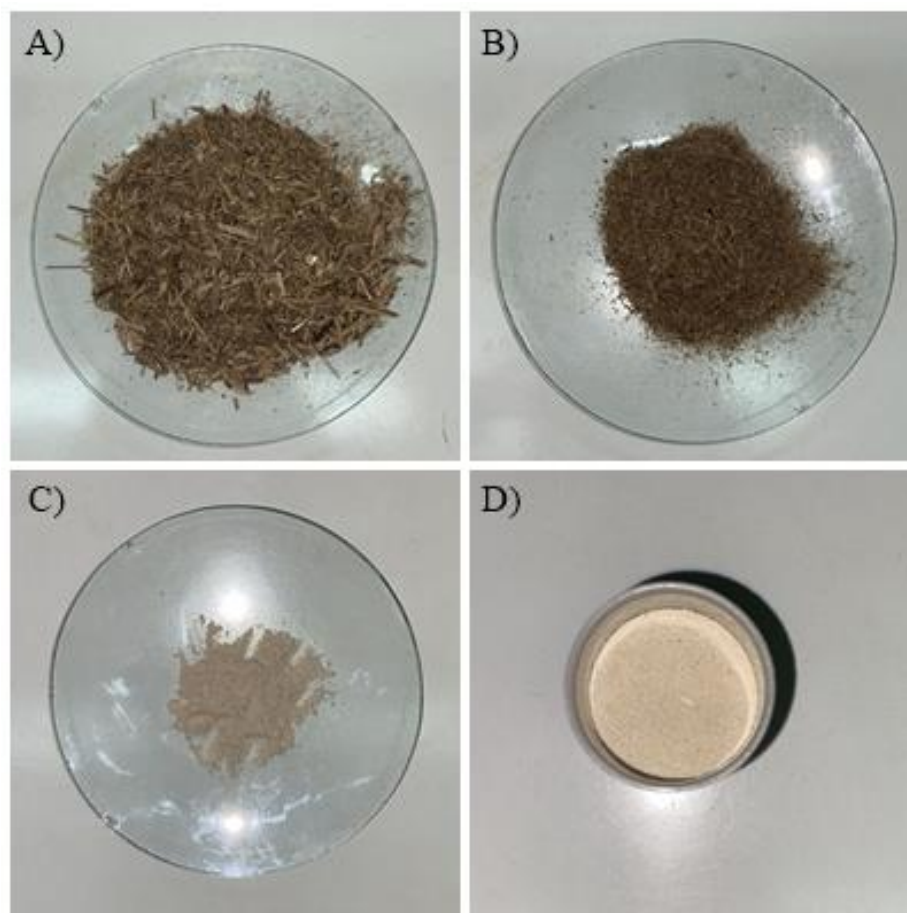
Foi realizado a extração da xilana do sabugo do milho (Figura 2), da palha (Figura 3) e do bagaço (Figura 4) da cana-de-açúcar, partindo de 10 gramas de cada resíduo seco. O rendimento para cada resíduo pode ser visualizado na tabela 1.

Figura 2 – Sabugo do milho: A) resíduo não peneirado, B) resíduo peneirado, C) xilana da palha e D) xilana no recipiente para armazenamento.



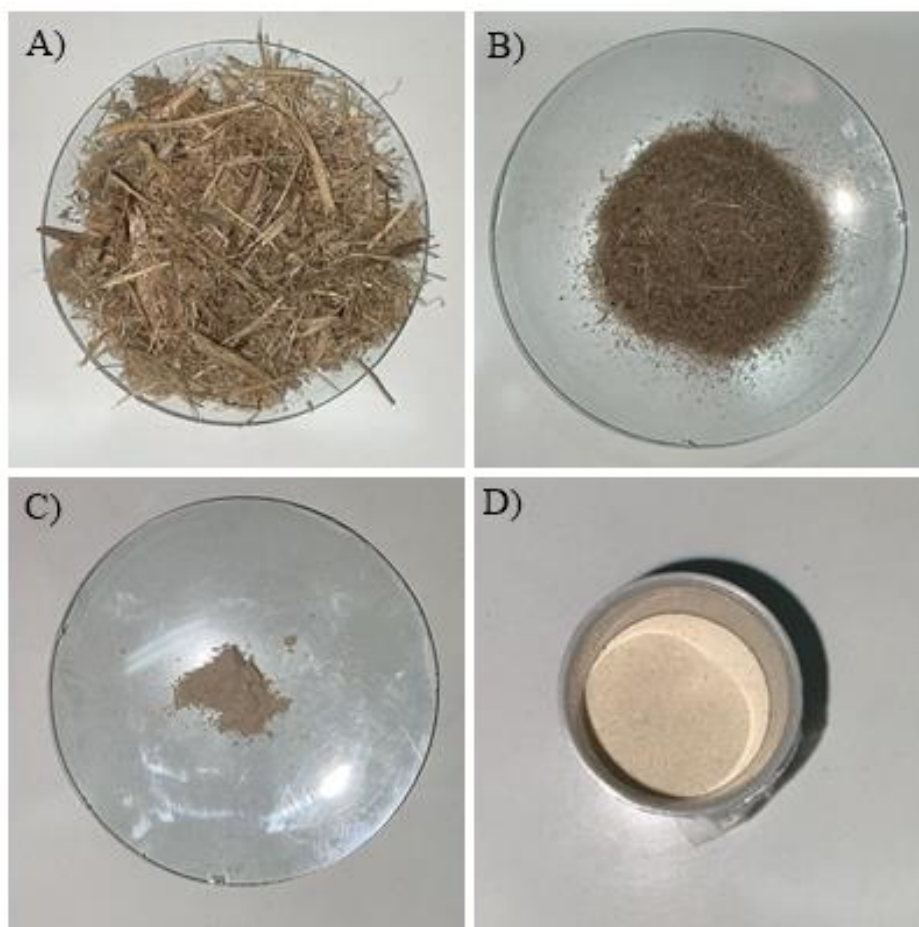
Fonte: Própria do autor

Figura 3 – Palha da cana-de-açúcar A) resíduo não peneirado, B) resíduo peneirado, C) xilana da palha e D) xilana no recipiente para armazenamento.



Fonte: Própria do autor

Figura 4 – Bagaço da cana-de-açúcar A) resíduo não peneirado, B) resíduo peneirado, C) xilana do bagaço e D) xilana no recipiente para armazenamento.



Fonte: Própria do autor

Tabela 1 - Extração da xilana de cada resíduo industrial

Resíduo	Peso do resíduo (g)	Polímero (g)
Sabugo	10	1,23
Palha	10	0,67
Bagaço	10	0,97

Fonte: Própria do autor

Sendo rendimento aproximado como foi visto por Carvalho e colaboradores (2017), no qual dependendo do modo de extração foi obtido de 3,3 a 21,7% para bagaço e 3,8 a 19,3% para palha. E xilana do sabugo do milho variou de aproximadamente 4,0 a 23,9%, como visto por Mattos (2017).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS XILANAS

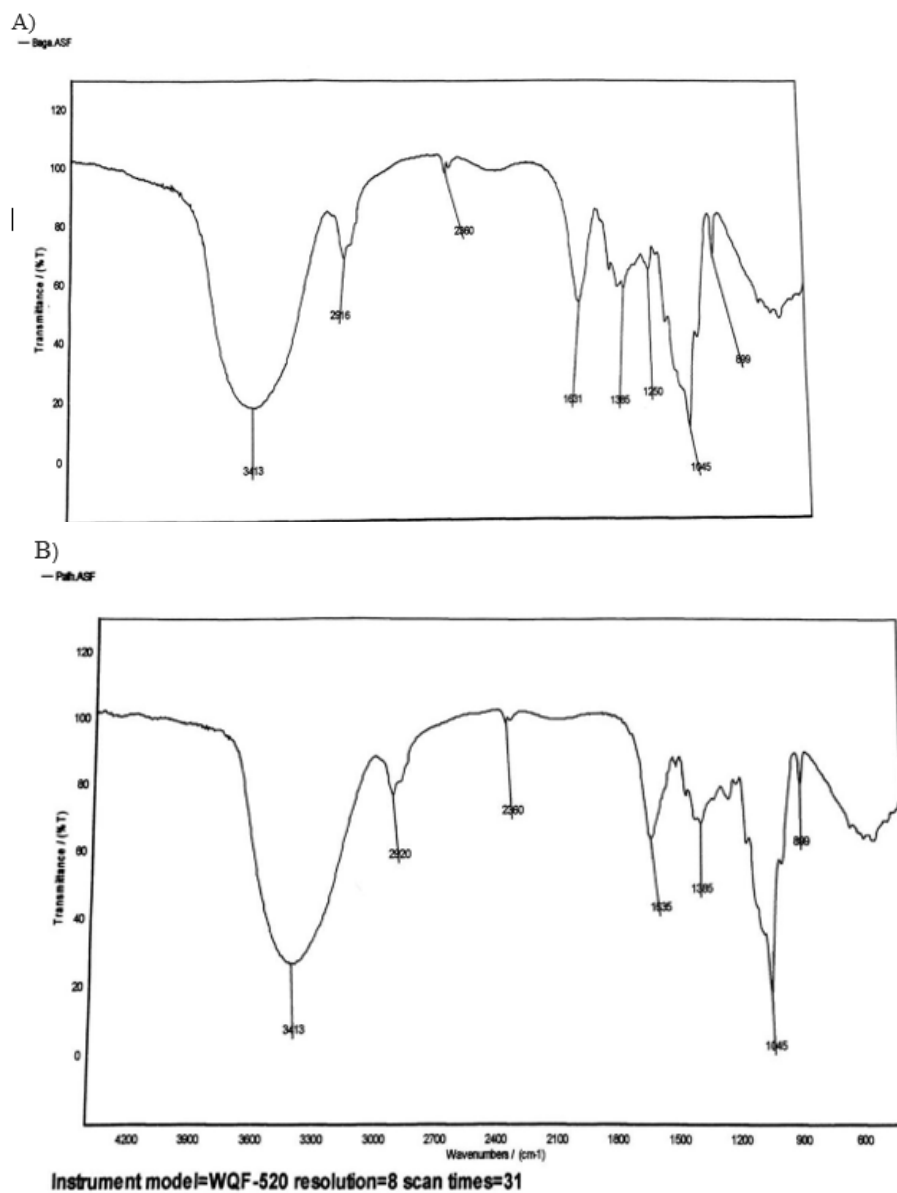
5.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia na região do infravermelho ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) é uma técnica importante na análise orgânica qualitativa e quantitativa (MANSINI, 2018), no qual fornece a informação da composição da amostra ou identificação do composto, baseando no fato de que as ligações químicas das substâncias, quando absorvem energia do feixe elétrico, modificam suas ligações, deformação axial (estiramento) e/ou deformação angular, com isso, pode-se caracterizar, pela absorção de energia, as vibrações características dos principais grupos funcionais (SILVA et al., 1998; MAGATON et al., 2008; MANSINI, 2018).

Foi realizado o espectro de FT-IR para caracterização da xilana do bagaço e da palha da cana-de-açúcar. Ambos os espectros se mostraram semelhantes quando comparados (Figura 5).

O estiramento em 3413 cm^{-1} , semelhante para ambos, está correlacionado com o alongamento de vibrações do grupo hidroxila (OH). O pico em 2916 cm^{-1} (bagaço) e 2920 cm^{-1} (palha) cm revelou o alongamento da ligação C-H. Observou-se um pico 1631 cm^{-1} (bagaço) e 1635 (palha) que pode estar relacionado à deformação angular H-O-H devido à água de hidratação. Observou-se um pico 1045 cm^{-1} , semelhante para ambos, que pode estar relacionado a vibrações do anel glicosídico, deformação angular C-OH e deformação axial C-O e C-O-C. Observou-se um pico 899 cm^{-1} , semelhante para ambos, que é um pico característico da ligação β -glicosídica entre as unidades de açúcares em hemicelulose.

Figura 5 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) da xilana do bagaço da cana-de-açúcar (A) e palha da cana-de-açúcar (B).



Fonte: Própria do autor

Esses picos encontrados no presente estudo, se assemelham com os vistos por Kakurakova e colaboradores (2000), Shi; Dong e Ding (2014), Luo e colaboradores (2015), Biely e colaboradores (2015), Corradini e colaboradores (2018) e Khaire e colaboradores (2021).

5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA)

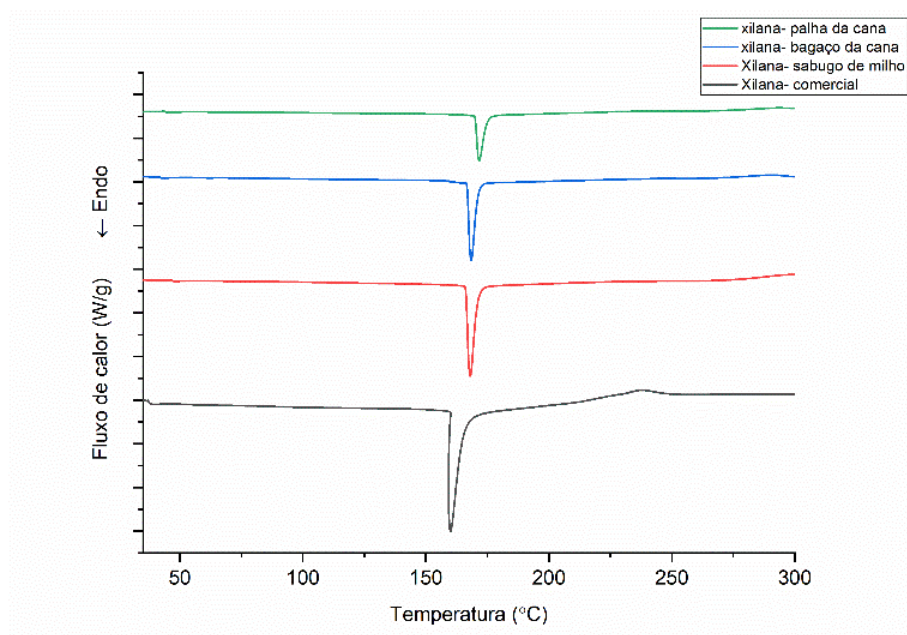
A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é um ensaio termoanalítico na qual envolve a medição da transferência de calor usando um material de referência termicamente inerte, no qual ambas são submetidas uma programação variada de temperatura (MATTOS, 2017; DRZEZDZON et al., 2019).

O DSC é utilizado na identificação de materiais poliméricos com base em suas propriedades como ponto de fusão, transição vítrea (T_g), ΔH e cristalização (DRZEZDZON et al., 2019).

A T_g é o valor médio da faixa de temperatura durante o aquecimento de um material, no qual as cadeias da fase amorfa adquirem mobilidade, passando de um estado de desordem rígido (vítreo) para um estado de desordem com cadeias poliméricas móveis (LIMA, 2016), já o ΔH , refere a energia necessária para elevar o estado de agitação molecular e levar o composto do estado sólido para o estado líquido (LIMA, 2016), a técnica de DSC é muitas vezes seguida pela termogravimetria (TGA) (DRZEZDZON et al., 2019).

A curva de calorimetria exploratória diferencial das amostras revelou pico endotérmico, sendo atribuído ao ponto de fusão do polímero. O pico endotérmico possuiu temperatura média variável para xilana do bagaço (163,10°C), xilana da palha (164,51°C), xilana do sabugo (159,90°C) e xilana comercial (159,89°C), como pode ser visualizado na Figura 6 e Tabela 2. Para xilana comercial, pode-se notar um pico exotérmico com temperatura média de 237,64°C, os dados brutos do DSC podem ser vistos no Anexo 8.

Figura 6 – Curvas de DSC das amostras de xilana da palha da cana-de-açúcar (verde), xilana do bagaço da cana (azul), xilana do sabugo do milho (vermelho) e xilana comercial (preto).



Fonte: Própria do autor

Tabela 2 - Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria da xilana comercial, xilana do sabugo do milho, do bagaço e palha da cana-de-açúcar.

Análise Térmica						
Amostra	Fenômeno	Ti/°C	Tm/°C	Tf/°C	ΔH	Massa (%)
Bagaço	Endotérmico	162,36	163,10	166,54	-184,54	85,03
Palha	Endotérmico	163,46	164,51	167,93	-126,19	83,39
Sabugo	Endotérmico	157,09	157,52	161,61	-187,51	84,51
Comercial	Endotérmico	159,89	159,90	164,56	-194,35	86,31
	Exotérmico	231,63	237,64	245,64	16,12	38,07

Ti – Temperatura inicial; Tm – temperatura média; Tf – Temperatura final;

Fonte: Própria do autor

A análise termogravimétrica (TG) é um ensaio termoanalítico onde é verificado a perda de massa da amostra em função da temperatura, o que permite a obter resultados sobre o conteúdo dos componentes voláteis e sobre o comportamento de decomposição e conteúdo de cinzas do material (MANSINI, 2018). Assim, é possível analisar o teor de matéria orgânica e inorgânica (impurezas) que há no material.

Foi realizado a termogravimetria das amostras de xilanas isoladas do sabugo do milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar, para efeito de comparação realizou-se também a análise termogravimétrica da xilana comercial da Sigma-Aldrich (*beechwod*)

A Figura 7 apresenta as curvas TG das amostras do presente trabalho. Pode-se notar que todas as curvas TG apresentam média de perda de massa em dois intervalos de temperatura, na qual o primeiro intervalo de 20 a 220°C e segundo intervalo de 230 a 300°C, porém no caso da xilana comercial, ocorreu um terceiro intervalo na faixa de temperatura 280 a 460°C.

A primeira perda de massa pode estar relacionada à desidratação do polímero e a segunda à decomposição térmica dos polissacarídeos (xilanas) como é verificado na literatura (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013; MARQUES, 2014; MANSINI, 2018; URTIGA et al., 2020b). Quando há mais perdas de massa em temperaturas mais elevadas, essas podem estar relacionadas com a decomposição dos sais, dos produtos estáveis da pirólise dos polissacarídeos ou impurezas (SILVA et al., 1998).

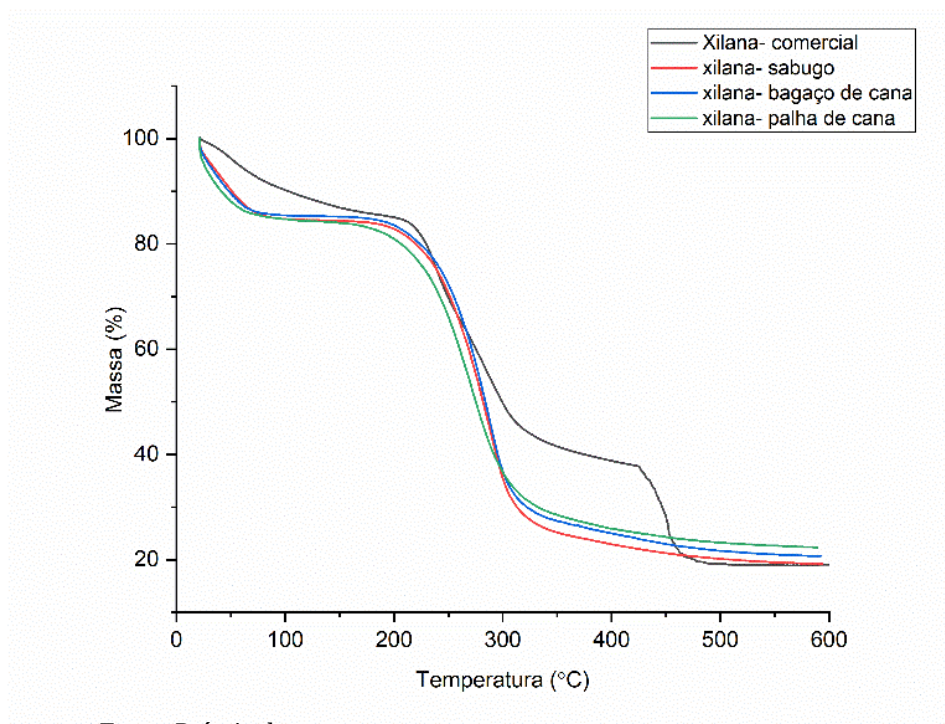
Na primeira etapa é observado a perda de água e evaporação dos compostos voláteis existentes na amostra no intervalo de temperatura de 20 a 220°C no qual corresponde para xilana comercial (13,69%), xilana do bagaço (14,97%), xilana da palha (16,61%) e xilana do sabugo (15,49%) (Tabela 2).

No segundo intervalo, com faixa de temperatura de 230 a 300°C, o evento que pode estar relacionado é a degradação dos polissacarídeos, este evento ocorreu em todas as xilanas. A xilana comercial diferiu na temperatura do segundo estágio, que foi de 230 a 400°C, sendo verificado também a presença de um terceiro estágio de perda de massa, nas temperaturas de 400 a 470°C, este terceiro estágio pode ser correlacionado com o evento exotérmico, visto no DSC, podendo evidenciar impureza e instabilidade térmica, o que não foi visto na xilana do presente estudo.

Esta maior pureza da xilana do presente estudo pode estar relacionada ao método de extração, visto que as amostras passaram por lavagens com metanol, o que permite a retirada de sais, como foi verificado por Mansini (2018).

A massa final de cada amostra após os eventos de massa foi de 20,71% para o bagaço da cana-de-açúcar, 19,39% para o sabugo do milho, 22,93% para palha da cana-de-açúcar e 19,01% para xilana comercial.

Figura 7 - Termograma das amostras de xilana comercial, xilana do sabugo do milho, xilana do bagaço e palha da cana-de-açúcar.



Fonte: Própria do autor

5.3 ISOLADOS BACTERIANOS PRODUTORES DE XILANASE

Dos vinte e um (21) isolados selecionados, dezesseis (16) cresceram em meio ágar LB e foram testadas nos ensaios de atividade xilanolítica, utilizando meio ágar LB adicionado de xilanas, provenientes dos resíduos agroindustriais e comercial.

Dos dezesseis (16) isolados testados para atividade xilanolítica, seis (6) foram positivas apenas quando se utilizou a xilana comercial e cinco (5) cepas (quatro (4) isoladas nesse trabalho e uma (1) padrão xilanse positiva) foram positivas em todas as xilanas testadas, como observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Isolados produtores de xilanases para xilanas dos resíduos e xilana comercial

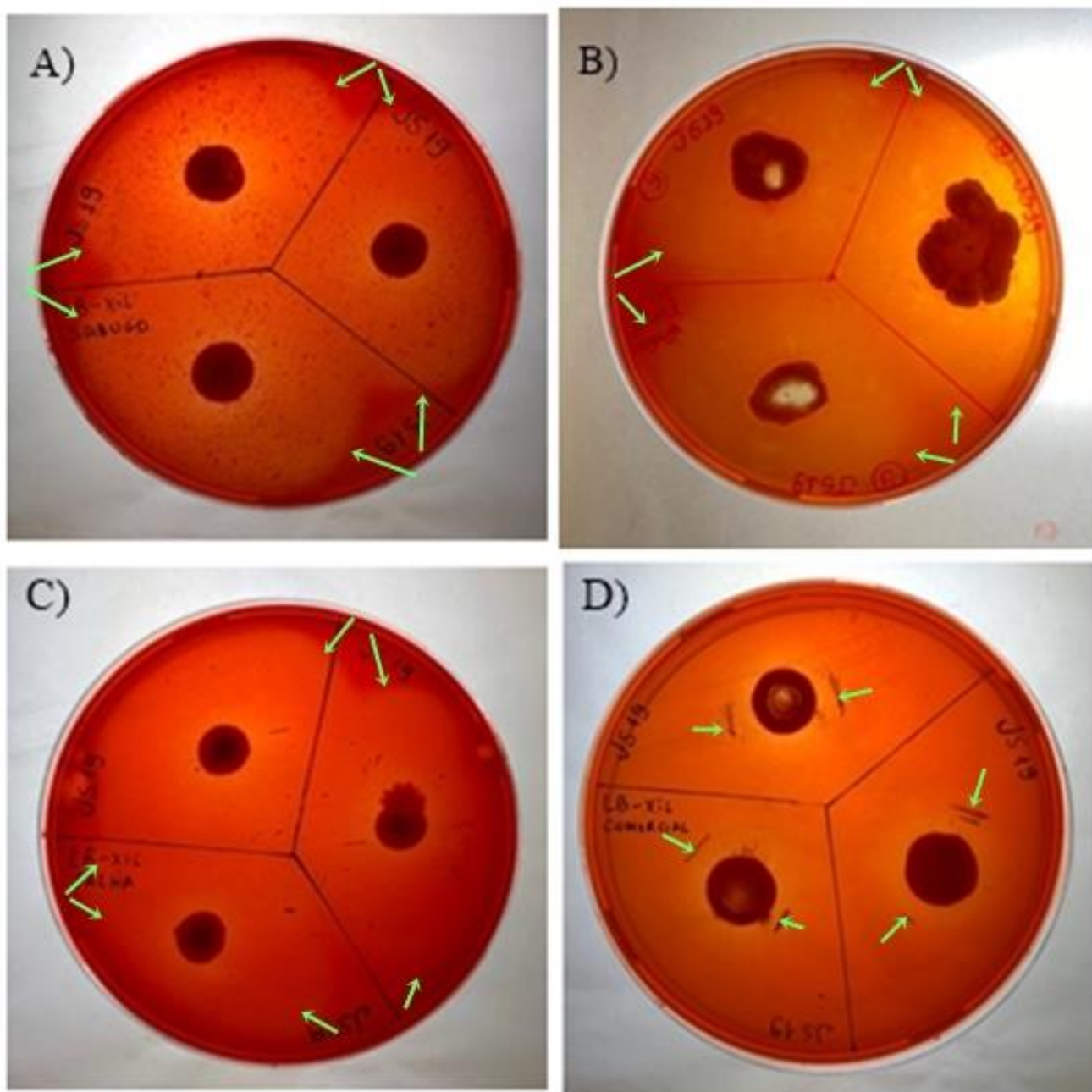
	Atividade xilanolítica	Atividade xilanolítica	Atividade xilanolítica	Atividade xilanolítica
Cepa	Sabugo	Palha	Bagaço	Comercial
JS11	-	-	-	+
JS15	-	-	-	+
JS19	+	+	+	+
JS20	-	-	-	+
JS21	+	+	+	+
JS23	-	-	-	+
JS25	-	-	-	+
JS26	+	+	+	+
JTF17	-	-	-	+
S1J2	+	+	+	+
CC02	+	+	+	+

(+) xilanase positiva; (-) xilanase negativa/Fonte: Própria do autor

Isolamento de bactérias em amostras de solo produtoras de xilanases foram verificadas em diversos estudos como Heck e colaboradores (2002), Azeri e colaboradores (2010), Grisi (2011) e Padilha (2014), quando os meios eram enriquecidos de xilana e sua produção era evidenciado pelos halos de degradação.

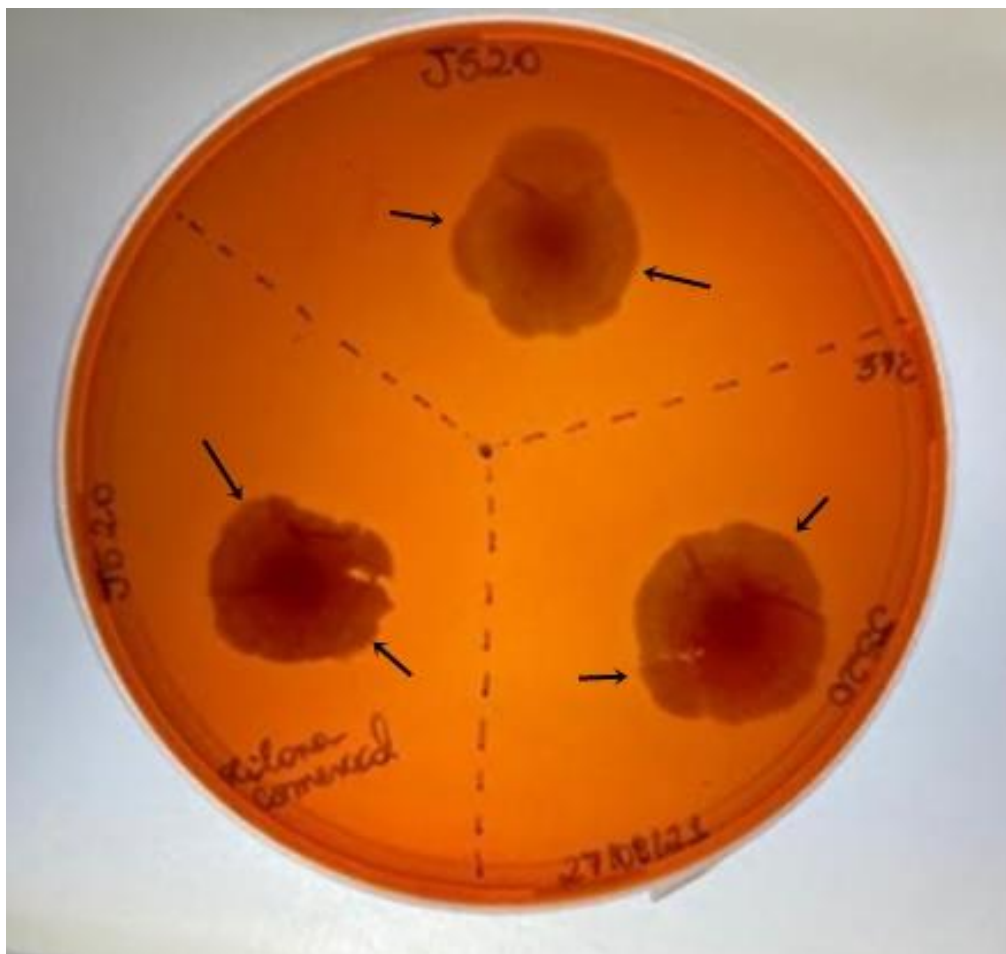
Entre os isolados positivos para as atividades xilanolíticas, foram selecionados dois isolados (JS19 e JS20), para quantificação enzimática, devido a cepa JS19 apresentar maior facilidade de crescimento, bem como alta produção de xilanases, quando se utilizou as xilanas extraídas dos resíduos, observado pelo halo de degradação em meio sólido (Figura 8) e quantificação enzimática (Tabela 5). O isolado JS20 foi selecionada por apresentar facilidade de crescimento nos meios utilizados e ser exclusiva na produção de xilanase comercial, apesar de não ser a maior produtora (Figura 9).

Figura 8 - Atividade xilanolítica do isolado JS19 em meio ágar LB/Xilana: (A) xilana do sabugo, (B) xilana do bagaço, (C) xilana da palha e (D) xilana comercial, as setas verdes indicam o halo de degradação.



Fonte: Própria do autor

Figura 9 - Atividade xilanolítica do isolado JS20 em meio ágar LB/Xilana Comercial



Fonte: Própria do autor

5.4 ÍNDICE ENZIMÁTICO DOS ISOLADOS XILANOLÍTICOS

Na Tabela 4 estão apresentados os Índices Enzimáticos (I.E.) de todas as cepas que foram positivas para xilanase, no qual representam produções enzimáticas indiretas baseadas na relação entre o diâmetro médio do halo de degradação, dividido pelo diâmetro médio da colônia (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998).

Com intuito de comparar o potencial enzimático das cepas do presente estudo, foi estabelecido um índice enzimático, conforme Lealem e Gashe (1994), no qual o I.E. maior ou igual a dois (≥ 2), indica que as cepas possuem potencial como produtoras enzimáticas (OLIVEIRA et al., 2006).

Como observado na Tabela 4, foi encontrado uma variação nos valores do I.E. produzidos pelos isolados. O tipo do substrato e a composição do meio de cultivo podem

ser fatores determinantes na produção das xilanases por bactérias (SILVA, 2015). Além do substrato servir como fonte de carbono, ele pode agir como indutor ou inibidor de produção, o que pode induzir em uma cepa, pode inibir em outra (KULKARNI et al., 1999). O presente estudo utilizou a xilana extraída do sabugo do milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar, assim como a xilana comercial (*beechwood*).

As cepas apresentaram I.E. variando de 1,37 a 7,66 Tabela 4. Todas as cepas que foram xilanase positiva para xilana do sabugo, palha e bagaço, possuíram I.E. ≥ 2 , já para xilana comercial, foi verificado 3 cepas com I.E. ≥ 2 , que foram as cepas JS26, JTF17 e S1J2. Quando comparado com os valores encontrados na literatura, os resultados das cepas do presente estudo podem ser considerados promissores.

Sousa et al. (2018) isolaram cepas do solo, que apresentaram índice enzimático máximo de 3,02. Omar et al. (2017), isolaram cepas de um manguezal, no qual as mesmas apresentaram índice enzimático máximo de 3,35. Sipriyadi et al., (2016) obtiveram 8 cepas, das 35 isoladas do solo de uma floresta, no qual o I.E. máximo foi de 3,25. Estes dados têm valores próximos ao encontrado nesse trabalho.

Baratto et al. (2011) isolaram 6 cepas do solo e 5 da madeira, no qual dos 6 isolados do solo, 5 possuíram I.E. ≥ 2 e dos isolados da madeira, 2 apresentaram I.E. ≥ 2 . Indicando o solo como fonte promissora de microrganismos produtores de xilanases, assim como o presente estudo.

Silva (2015) isolou quarenta e quatro (44) cepas bacterianas, do manguezal, dentre as quais, quarenta e três (43) cepas que apresentaram atividade xilanolítica com I.E. variando de 1,2 (*Bacillus sp.* FJAT-21913) e 10,9 (*Bacillus megaterium*).

Singh et al (2014) isolaram bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*, no qual o I.E. variaram de 1 a 4,5 mm. Os autores consideraram estes isolados promissores para utilização em escala industrial, tendo em vista que a cepa JS19, selecionada para os próximos ensaios possui I.E. superior aos citados acima, a mesma pode ser considerada promissora para aplicação biotecnológica.

Tabela 4 - Índice Enzimático (IE) dos isolados produtores de xilanases

Cepa	Xilanase Sabugo (mm)			Xilanase Bagaço (mm)			Xilanase Palha (mm)			Xilanase Comercial (mm)		
	MDC ¹	MHD ²	IE ³	MDC	MHD	IE	MDC	MHD	IE	MDC	MHD	IE
JS11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19,43	26,72	1,37
JS15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19,48	30,59	1,57
JS19	10,66	51,13	4,79	8	42	5,25	9,35	52,39	5,6	12,21	20,49	1,67
JS20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,32	27,59	1,29
JS21	10,81	27,93	2,58	12	27	2,25	14,07	40,92	2,9	12,83	25,02	1,95
JS25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25,67	30,35	1,18
JS26	7,97	42,4	5,31	8	32	4	8,03	38,27	4,76	5,75	33,35	5,80
JTF17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	34,49	7,66
S1J2	5,2	16,17	3,1	7	20	2,85	4,12	17,33	4,2	6,42	36,42	5,67
CC02	9,95	28,16	2,83	9	22	2,44	11,43	28,45	2,48	14,65	25,83	1,76

¹ - Média do diâmetro da colônia; ² - Média do diâmetro do halo de degradação; ³ - Índice Enzimático; mm – milímetros; (-) ausência de halo de degradação.

Fonte: Própria do autor

5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Todas as dez cepas xilanase positiva foram parcialmente caracterizadas quanto à sua morfologia celular, por coloração de Gram, forma, presença ou ausência de endósporos, as quais nove cepas foram Gram positivas (Figura 10) e uma Gram negativa (Figura 11), já a presença de endósporos, central e/ou subterminal foi presente em apenas duas cepas como pode ser visto na Tabela 5.

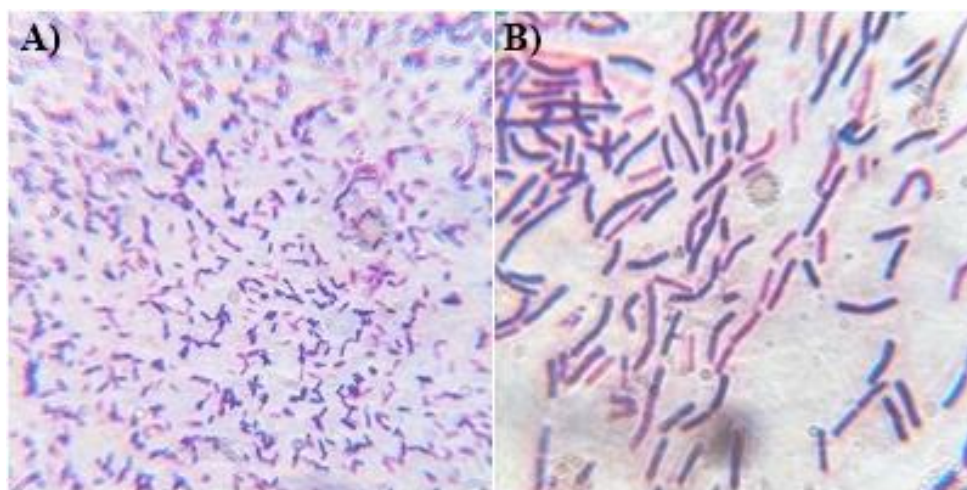
Tabela 5 – Caracterização morfológica dos isolados produtores

Cepa	Gram	Forma	Endósporo
JS11	+	Bacilo	Ausente
JS15	+	Bacilo	Ausente
JS19	+	Cocobacilo	Ausente
JS20	+	Bacilo	Ausente
JS21	+	Bacilo	(T/C)
JS25	+	Bacilo	Ausente
JS26	-	Bacilo	Ausente
JTF17	+	Bacilo	(C)
S1J2	+	Bacilo	Ausente
CC02	+	Bacilo	Ausente

(+) Gram positiva; (-) Gram negativa; (C) endósporo Central; (T) endósporo Terminal

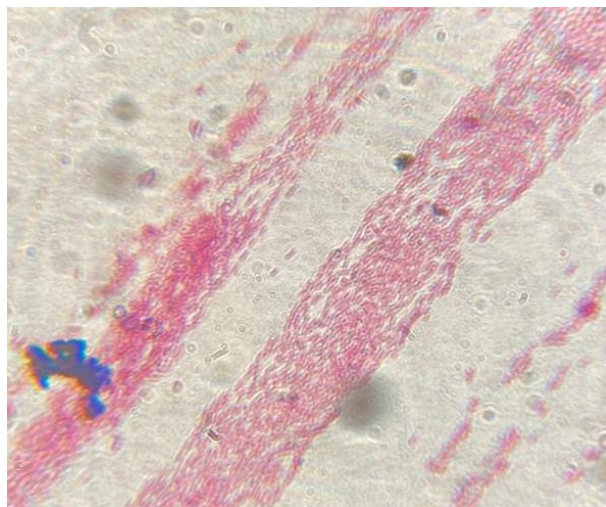
Fonte: Própria do autor

Figura 10 – Coloração de Gram (100X): (A) JSJ9 – cocobacilo, Gram positivo; (B) JS20 – bacilo, Gram positivo.



Fonte: Própria do autor

Figura 11 – Coloração de Gram (100X): JS26 – bacilo, Gram negativo.



Fonte: Própria do autor

Grande número de bactérias provenientes do solo são bacilos Gram positivos, pertencente aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, entre os quais, várias espécies são produtoras de bioprodutos, como enzimas e polímeros, de interesse biotecnológico (LAMA et al., 2004; CHAKDAR et al., 2016; LÓPEZ-MONDÉJAR; ALGORA e BALDRIAN, 2019).

5.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ATIVIDADES XILANOLÍTICAS

Para uma produção eficiente e de alto rendimento, a escolha de um substrato apropriado constitui o primeiro passo na otimização do processo (GRISI, 2011). O substrato além de ser fonte de carbono, fornece para os microrganismos diversos compostos que auxiliam na indução, propiciando uma extensão da fase de produção que pode resultar num aumento da produtividade do processo (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999).

Foram selecionadas as cepas com maior I.E. para o ensaio de atividade xilanolítica em meio líquido, para xilana extraída dos resíduos, a que apresentou maior I.E. foi a JS19, como controle, foi selecionado as cepas JS20, JS26, JTF17 e S1J2, porém a JS20 foi a única que cresceu em meio líquido.

As cepas JS19 e JS20 foram testadas quanto às atividades xilanolíticas extracelulares, nos sobrenadantes livres das células, após cultivos em meio específicos por 10 minutos de ação enzimática (Tabela 6).

A cepa JS19 apresentou uma boa atividade xilanolítica, podendo evidenciar a atividade que foi visualizada dos halos de degradação em placa (Figura 2), a quantificação variou de 0,55 U/mL no meio de cultivo LB/Palha, usando a xilana comercial como substrato, a 0,92 U/mL, no meio de cultivo LB/Bagaço usando a xilana do bagaço como substrato (Tabela 6).

Por outro lado, a cepa JS20 que apresentou apenas atividade de degradação em placa para xilana comercial, foi visto uma baixa atividade, principalmente para o substrato da xilana comercial, que variou de 0,12 U/mL no meio de cultivo LB/Sabugo e 0,14 U/mL no meio de cultivo LB/Palha e LB/Bagaço (Tabela 6).

Tabela 6 – Quantificação das atividades xilanolíticas dos isolados bacterianos JS19 e JS20

Cepa	Meio de Cultivo	Substrato	U/mL
JS19	LB/Sabugo	Xil (1)	0,78
JS19	LB/Sabugo	Xil (4)	0,74
JS19	LB/Palha	Xil (2)	0,77
JS19	LB/Palha	Xil (4)	0,55
JS19	LB/Bagaço	Xil (3)	0,92
JS19	LB/Bagaço	Xil (4)	0,77
JS20	LB/Sabugo	Xil (1)	0,30
JS20	LB/Sabugo	Xil (4)	0,12
JS20	LB/Palha	Xil (2)	0,18
JS20	LB/Palha	Xil (4)	0,14
JS20	LB/Bagaço	Xil (3)	0,30
JS20	LB/Bagaço	Xil (4)	0,14

Xil (1) – xilana do sabugo do milho; Xil (2) – xilana da palha da cana-de-açúcar;

Xil (3) – xilana do bagaço da cana-de-açúcar; Xil (4) – xilana de *Beechwood* (comercial)

Fonte: Própria do autor

Como esperado e evidenciado em outros estudos do nosso grupo (GRISI, 2011; PADILHA et al., 2014), a cepa JS19 apresentou um comportamento produtivo alto quando cultivado em meio LB/Bagaço, porém foi verificado nesse trabalho que os resíduos palha e sabugo também servem como fontes alternativas de carbono para produção de enzimas. Este fato mostra que a JS19 exibe potencial de produção de xilanase, dependendo do substrato e o tipo de xilana que será utilizado.

De acordo com Castro e Pereira Jr. (2010), os tipos de enzimas produzidos pelos microrganismos irão atuar de maneira diferenciada, a partir das diferentes fontes de

carbono disponíveis nos meios de cultivo, visto que a xilana de *Beechwood* é proveniente de diferentes espécies de árvores do gênero Faguas (faia), o que apresenta características distintas quanto à natureza da xilana, o que pode influenciar no processo de degradação pelas enzimas bacterianas, como foi visto neste trabalho e outros (VIIKARI et al., 1994);

Em geral, a xilana de *Birchwood* é mais utilizado nos meios de cultivo líquidos para os testes de atividade enzimática, assim como substrato na determinação da atividade pelos métodos de açúcares redutores. Azeri; Tamer e Oskay (2010) utilizaram o xilano de *Birchwood* na avaliação da atividade xilanolítica e obtiveram um maior rendimento entre 2,5 e 3,3 U/mL, em relação aos observados no nosso trabalho. Igualmente, Heck; Hertz e Ayus (2002), Park e Cho (2010) e Sanghi et al. (2010) utilizaram o xilano de *Birchwood* para avaliação da atividade xilanolítica, com rendimentos variáveis.

Amore et al. (2015) isolaram bactérias do gênero *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Streptomyces* com atividades xilanolíticas que variavam de 0,4 a 0,6 U/mL, porém, quando alteradas as condições de cultivo, dois deles atingiram atividades máximas de 9,4 e 10,5 U/mL, desta forma, fica evidente que variações no processo de cultivo devem ser avaliados, como pH, temperatura, agitação, substrato otimiza a produção enzimática (GUPTA et al., 2013; SILVA, 2015).

Os resultados obtidos neste trabalho quanto à produção enzimática utilizando sabugo do milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar, apresentam perspectiva futura de sua utilização como fonte alternativa de carbono de baixo custo, o que poderá contribuir para redução de gastos nos processos industriais.

5.7 ANÁLISE DAS ENZIMAS PELA TÉCNICA ELETROFORÉTICA ZIMOGRAMA

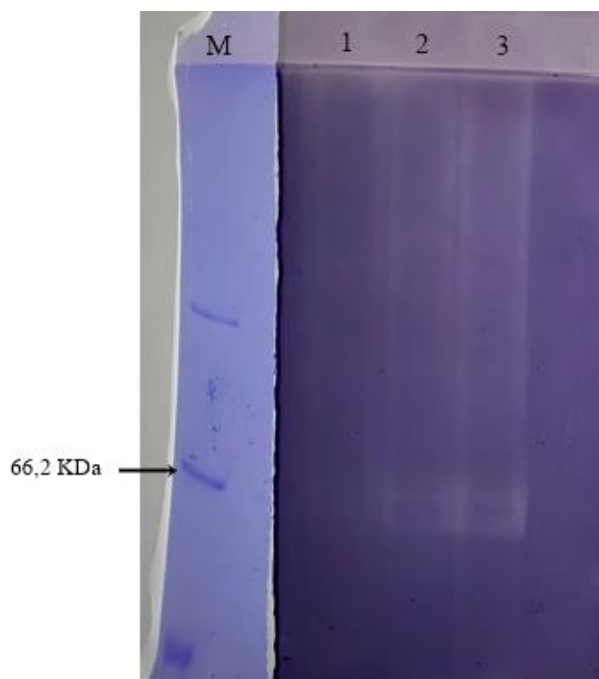
As enzimas xilanolíticas produzidas pela cepa bacteriana JS19 foram visualizadas em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corados com vermelho Congo, conforme o protocolo ver Anexo 4.

Na Figura 12 são visualizadas as xilanases produzidas pela cepa JS19, no gel que foi acrescido de xilana do bagaço utilizando os sobrenadantes dos cultivos LB/xilana sabugo (1), LB/xilana palha (2) e LB/xilana bagaço (3) recém processados.

As xilanases visualizadas na Figura 12 se apresentaram com, pelo menos, dois tamanhos de bandas distintas, variando em torno de 60 a 66,2 kDa. Segundo Wong e colaboradores (1998) as xilanases possuem dois grupos de classificação de acordo com

suas características físico-químicas, um grupo de xilanases com peso molecular <30 kDa e outro grupo com xilanases com peso molecular >30 kDa.

Figura 12 – Zimograma para visualização das xilanases em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE – 8%), adicionado de bagaço de cana-de-açúcar (2%); 1 – sobrenadante do cultivo LB/xilana sabugo, 2 - sobrenadante do cultivo LB/xilana palha e 3 - sobrenadante do cultivo LB/xilana bagaço. M – Marcador de proteínas (*Unstained Protein Molecular Weight Marker* – Thermo Fisher Scientific, EUA)



Fonte: Própria do autor

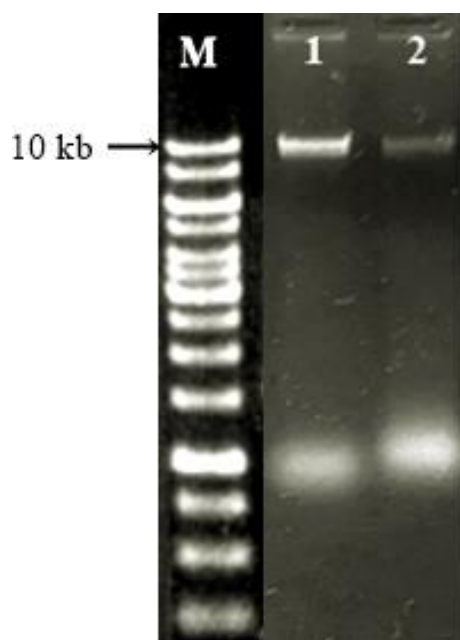
Alguns pesquisadores também relataram enzimas com peso molecular semelhantes ao encontrado neste trabalho, hemicelulases produzidas por *Aeromonas caviae* W61 (VIET et al. 1991), xilanases produzidas por *Bacillus polymyxa* CECT 153 (MORALES et al. 1993), β -1,4-xilanases produzidas por *Staphylococcus* sp. SG 13 (GUPTA; BHUSHAM; HOONDAL, 2000) e β -xilosidases produzidas por *Selenomonas* sp. GA192 (JORDAN et al., 2010).

Liu e colaboradores (2021) utilizaram *Bacillus subtilis* para prospecção enzimática, no qual foi encontrado uma enzima multifuncional BSGH13 com atividade de α -amilase, endoglucanase e xilanase, essa enzima possui peso molecular de 66,5 kDa.

5.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS BACTERIANOS

A caracterização molecular dos isolados ocorreu após a extração dos DNAs genômicos (Figura 13), os quais foram utilizados nas amplificações dos genes 16S rRNA.

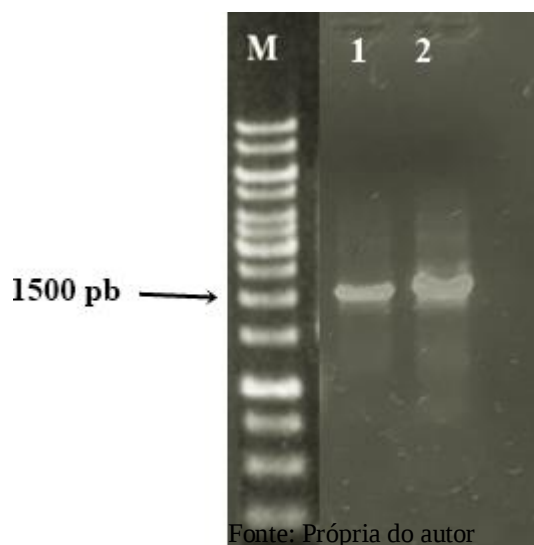
Figura 13 – DNA genômico dos isolados: 1 – JS19; 2 – JS20 e M – Marcador de peso molecular 1 kb (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific, EUA*).



Fonte: Própria do autor

Os amplicons correspondentes ao gene 16S rDNA, geraram fragmentos com aproximadamente 1500 pb (Figura 14), como esperado. Os produtos de PCR 16S purificados foram utilizados na reação de sequenciamento para identificação dos isolados JS19 e JS20, as sequências obtidas estão apresentadas no Anexo 9.

Figura 14 - Produtos da PCR 16S rRNA das cepas: 1 – JS19 e 2 – JS20; M – Marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas *Thermo Fisher Scientific*, EUA).



Os resultados das reações de sequenciamento de identificação dos isolados JS19 e JS20 estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Identificação molecular dos isolados JS19 e JS20 a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com as sequências contidas no banco de dados *GenBank*.

Cepa	Gênero	Espécie	Query Cover	E-value*	Max. Ident.**	Código identificação GenBank
JS19	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>	100%	0.0	100%	KC692196.1
JS19	<i>Bacillus</i>	<i>B. safensis</i>	100%	0.0	99,86%	MT133347.1
JS19	<i>Bacillus</i>	<i>B. australimaris</i>	100%	0.0	99,86%	MN752434.1
JS20	<i>Priestia</i>	<i>P. megaterium</i>	100%	0.0	100%	CP045272.1
JS20	<i>Priestia</i>	<i>P. qingshengii</i>	100%	0.0	100%	MT353876.1
JS20	<i>Priestia</i>	<i>P. aryabhatai</i>	100%	0.0	100%	MN062938.1

* O valor do e-value sugere que quanto mais próximo do zero, mais confiável é o alinhamento das sequências; ** Índice de similaridade: 0-100%

Fonte: Própria do autor

Os dois isolados bacterianos (JS19 e JS20) utilizados no presente estudo puderam ser identificadas no nível de gênero, porém apresentando especificidade entre três espécies distintas para cada uma.

O isolado JS19 depositada no *GenBank* como *Bacillus* sp., JS19 sob código (OM759815), possui alta identidade do gene 16S com sequências de *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis* e *Bacillus australimaris*, variando de 100 a 99,86% e e-value 0 (Tabela 7).

O isolado JS20 se apresentou como o gênero *Priestia*, no qual possui alta identidade do gene 16S com sequências de *Priestia megaterium*, *Priestia qingshengii* e *Priestia aryabhatai*, com identidade de 100% e *e-value* 0 (Tabela 7). O gênero *Priestia* por ser uma reclassificação do gênero *Bacillus*, com alta similaridades entre os gêneros, se tornando necessário adicionar formas complementares de classificação, além da utilizada pelo gene 16S utilizada neste trabalho.

No início da década de 90 a comunidade científica revisou a relação filogenética deste gênero de microrganismos, devido a sua heterogeneidade, algumas espécies que eram consideradas do gênero *Bacillus* foram reclassificadas em mais de dez diferentes gêneros, como por exemplo, *Priestia*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* (ASH; PRIEST; COLLINS, 1993; HELGASON et al., 2000; SILVA, 2015) o que dificultou a classificação das espécies das cepas JS19 e JS20 utilizando o gene 16S.

O gênero *Bacillus*, pertencente à família *Bacillaceae*, no qual a cepa JS19 foi identificada, é composta por mais de 200 espécies que possuem a forma de bacilo, geralmente apresentam endósporo, são aeróbicos ou facultativos e são encontradas em diversos ecossistemas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Dentro do domínio Bacteria, o gênero *Bacillus* é o grupo de maior importância biotecnológica para aplicação industrial (LUBKOWSKA et al., 2021). Diversas enzimas hidrolíticas pertencentes a este gênero estão sendo caracterizadas, com destaque para xilanase (NAGAR et al., 2010; SHARMA; KUMAR, 2013; KUMAR; NAVARRO; SHUKLA, 2016; VERMA, 2021).

Em 2020, Gupta e colaboradores mostraram que muitas espécies de *Bacillus*, constituem um total de 17 novos gêneros individuais, surgindo assim novos gêneros, assim como *Priestia*, contendo as antigas espécies, *B. megaterium*, *B. abyssalis*, *B. aryabhatai*, *B. endophyticus* entre outras (GUPTA et al., 2020).

Bactérias do gênero *Bacillus* podem ser encontradas em diversos habitats como água marinha (XU et al., 2014), plantas e solo (DOBZANSKI et al., 2018). No qual seu metabolismo é adaptado a uma variedade de fontes de carbono, incluindo a xilose (subproduto da hemicelulose xilana) (JESUS et al., 2016). Com isso, esse gênero vem se destacado na indústria biotecnológica para produção enzimática (ZHENG et al., 2012; GUPTA et al., 2020; BIEDENDIECK et al., 2021).

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho pode-se concluir que:

- Os resíduos agroindustriais como sabugo de milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar são fontes promissoras para obtenção de polímeros com alto valor agregado, como a xilana, tendo rendimento favorável
- Os resíduos utilizados no presente estudo possuíram rendimentos favoráveis para execução do trabalho, assim como verificado na literatura;
- Os ensaios como FT-IR e a análise térmica evidenciaram que o polímero obtido neste trabalho tem grande similaridade físico-química com a xilana;
- A xilana extraída no presente trabalho pode ser utilizada como fonte de produção de xilanase, em meio sólido;
- A cepa JS19, utilizando o gene 16S, foi identificada pertencente ao gênero *Bacillus*;
- A cepa JS19 se apresentou como promissora na produção de xilanases, apresentando facilidade no crescimento e degradação de resíduos industriais tanto em meio sólido, como em meio líquido;

Por fim, os resíduos sabugo de milho, bagaço e palha da cana-de-açúcar podem ser utilizadas como fonte alternativa de carbono, para produção de xilanases, aumentando o valor agregado do produto e contribuindo para uma provável diminuição dos custos de produção, sendo fontes promissoras de polímeros com alto valor agregado, como visto neste trabalho, a xilana.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALOKIKA; SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 21, p. 8763-8784, 2019.

ÁLVAREZ-CERVANTES, J. et al. Mycosphere Essay 10: Properties and characteristics of microbial xylanases. **Mycosphere**, v. 7, n. 10, p. 1600-1619, 2016.

AMORE, A. et al. Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 573-581, 2015.

ASH, C.I; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van leeuwenhoek**, v. 64, n. 3, p. 253-260, 1993.

ÁVILA, P. F. et al. Xylooligosaccharides production from a sugarcane biomass mixture: Effects of commercial enzyme combinations on bagasse/straw hydrolysis pretreated using different strategies. *Food Research International*, v. 128, p. 108702, 2020.

BALA, A; SINGH, B. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production. **Renewable energy**, v. 130, p. 12-24, 2019.

BARATTO, C. M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência, Joaçaba**, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.

BIEDENDIECK, R. et al. The “beauty in the beast”—the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 14, p. 5719-5737, 2021.

BURLACU, A. et al. Microbial xylanase: a review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335-342, 2016.

CAO, L. et al. Biotechnological Aspects of Salt-Tolerant Xylanases: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 31, p. 8610-8624, 2021.

CHAKDAR, H. et al. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-15, 2016.

COLLINS, T; GERDAY, C; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

CUNHA, A. G; GANDINI, A. Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates. **Cellulose**, v. 17, n. 6, p. 1045-1065, 2010.

- DÍAZ-GODÍNEZ, G. et al. Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an airlift reactor. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 4186-4200, 2016.
- DOBRZANSKI, T. et al. *Bacillus megaterium* strains derived from water and soil exhibit differential responses to the herbicide mesotrione. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0196166, 2018.
- DRZEŹDŹON, J. et al. Characterization of polymers based on differential scanning calorimetry based techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 51-56, 2019.
- EBRINGEROVÁ, A; HEINZE, Thomas. Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular rapid communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000.
- EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In: **Macromolecular symposia**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2005. p. 1-12.
- GARCIA, R. B.; GANTER, J. LMS; CARVALHO, R. R. Solution properties of D-xylans from corn cobs. **European Polymer Journal**, v. 36, n. 4, p. 783-787, 2000.
- GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- GOMES, A. F. S. et al. Substrate and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 4, 2016.
- GOSWAMI, G. K.; RAWAT, Seema. Microbial Xylanase and their applications-A review. **Int J Curr Res Aca Rev**, v. 3, n. 6, p. 436-450, 2015.
- GRISI, T. C. S. L. et al. Diversidade de Bacteria e Archaea do solo do Cariri paraibano e prospecção de celulasas e xilanases em clones metagenômicos e isolados bacterianos. 2011.
- GRÖNDAHL, M.; TELEMAN, Anita; GATENHOLM, Paul. Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 4, p. 359-366, 2003.
- GRÖNDAHL, M.; GUSTAFSSON, Anna; GATENHOLM, Paul. Gas-phase surface fluorination of arabinoxylan films. **Macromolecules**, v. 39, n. 7, p. 2718-2721, 2006.
- GUPTA, S.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G. S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus sp.* SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 325-334, 2000.

- GUPTA, G; SAHAI, V; GUPTA, R. K. Optimization of xylanase production from *Melanocarpus albomyces* using wheat straw extract and its scale up in stirred tank bioreactor. 2013.
- GUPTA, R. S. et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 2020.
- HELGASON, Erlendur et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.
- HILPMANN, G. et al. Acid hydrolysis of xylan. **Catalysis Today**, v. 259, p. 376-380, 2016.
- HUCKER, G. J. A new modification and application of the Gram stain. **Journal of Bacteriology**, v. 6, n. 4, p. 395-397, 1921.
- ISIKGOR, F. H.; BECER, C. Remzi. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.
- JAYAPAL, N. et al. Value addition to sugarcane bagasse: xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 14-24, 2013.
- JESUS, D. A. et al. Simultaneous biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substance (EPS) from crude glycerol from biodiesel production by different bacterial strains. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 180, n. 6, p. 1110-1127, 2016.
- JORDAN, D. B.; WAGSCHAL, K. Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1647-1658, 2010.
- KAYSERLIOĞLU, B. Ş. et al. Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. **Bioresource technology**, v. 87, n. 3, p. 239-246, 2003.
- KISHANI, S. et al. Experimental and theoretical evaluation of the solubility/insolubility of spruce xylan (Arabino glucuronoxylan). **Biomacromolecules**, v. 20, n. 3, p. 1263-1270, 2019.
- KOUKIEKOLO, R. et al. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3504-3511, 2005.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M.. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, V; NAVARRO, Ja; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 34, 2016.

KUMAR, D. et al. Xylanases and their industrial applications: a review. **Biochem Cell Arch**, v. 17, n. 1, p. 353-360, 2017.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.

LIMA, R.R.S. Síntese e aplicação de aditivos provenientes de material lignocelulósico residual em fluidos de perfuração de poços e petróleo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química. UFRN. Natal. 68p. 2016.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in energy and combustion science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LIU, Zhaoxing et al. A multifunctional α -amylase BSGH13 from *Bacillus subtilis* BS-5 possessing endoglucanase and xylanase activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, p. 166-176, 2021.

LÓPEZ, A. C.; ALIPPI, A. M. Diversity of *Bacillus megaterium* isolates cultured from honeys. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 212-219, 2009.

LUBKOWSKA, Beata et al. Bacteriophages of Thermophilic ‘*Bacillus* Group’ Bacteria—A Review. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1522, 2021.

MAGATON, A. S.; PILÓ-VELOSO, Dorila; COLODETTE, Jorge Luiz. Characterization of O-acetil-(4-O-methylglucurono) xylans from *Eucalyptus urograndis*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1085-1088, 2008.

MAITY, G. N. et al. Structural and antioxidant studies of a new arabinoxylan from green stem *Andrographis paniculata* (Kalmegh). **Carbohydrate polymers**, v. 212, p. 297-303, 2019.

MANSINI, L. H. A. **Extração de xilanas de polpa kraft branqueada de eucalipto**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MARCELINO, H. R. et al. Leads from physical, chemical, and thermal characterization on cytotoxic effects of xylan-based microparticles. **Polymers**, v. 7, n. 11, p. 2304-2315, 2015.

MARQUES, A. I. F. **Isolamento de xilanas por precipitação com antisolventes**. 2014. Tese de Doutorado. Dissertation, Técnico Lisboa, p 141.

MATTOS, N. R. Extração alcalina e carboximetilação de xilanas da fibra de grão de milho. 2017.

MORALES, P. et al. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. **Enzyme and microbial technology**, v. 17, n. 5, p. 424-429, 1995.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. **Ufla, Lavras**, 2006.

MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. 2010.

NAGAR, A. et al. Widespread occurrence of the Southern Hemisphere ascidian *Corella eumyota* Traustedt, 1882 on the Atlantic coast of Iberia. **Aquatic Invasions**, v. 5, n. 2, p. 169-173, 2010.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 179, p. 28-41, 2018.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, Shankar. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 149, n. 3, p. 229-243, 2008.

OLIVEIRA, E. E. et al. Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5402-5406, 2010.

OMAR, S. M. et al. Verrucosipora sp. K2-04, potential xylanase producer from *Kuantan Mangrove* Forest sediment. **International Journal of Food Engineering**, v. 3, n. 2, p. 165-168, 2017.

OTERO, D. M.. Isolamento, seleção e cultivo de leveduras com potencia biotecnológico para a produção de endo-xilaneses. 2015.

PADILHA, I. QM et al. A glucuronoxylan-specific xylanase from a new *Paenibacillus favisporus* strain isolated from tropical soil of Brazil. **International Microbiology**, 2014, vol. 17, num. 3, p. 175-184, 2014.

PAESANI, C. et al. Soluble arabinoxylans extracted from soft and hard wheat show a differential prebiotic effect in vitro and in vivo. **Journal of Cereal Science**, v. 93, p. 102956, 2020.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

SABALE, V. et al. Characterization of natural polymers from jackfruit pulp, calendula flowers and tara seeds as mucoadhesive and controlled release components in buccal tablets. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 321-330, 2017.

SANGHI, A. et al. One-step purification and characterization of cellulase-free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ash. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 467-476, 2010.

SANTOS, M. P. et al. On-site produced and commercially available alkali-active xylanases compared for xylan extraction from sugarcane bagasse. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, p. 101081, 2019.

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.

SHARMA, M; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **Biotechnology Journal International**, p. 1-28, 2013.

SHARMA, Diksha et al. Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101604, 2020.

SILVA, Simone S. et al. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, p. 25-33, 1998.

SILVA, Acarília Eduardo et al. Xylan, a promising hemicellulose for pharmaceutical use. **Products and Applications of Biopolymers**, p. 61-84, 2012.

SILVA, A. E. et al. Producing xylan/Eudragit® s100-based microparticles by chemical and physico-mechanical approaches as carriers for 5-aminosalicylic acid. **Journal of microencapsulation**, v. 30, n. 8, p. 787-795, 2013.

SILVA, M. Calciolari Pinheiro da. **Bioprospecção de xilanase e α -amilase por meio de métodos independentes e dependentes de cultivo microbiano em um solo de manguezal**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015.

SINGH, S. et al. Multifarious activities of cellulose degrading bacteria from Koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces. **Journal of animal science and technology**, v. 57, n. 1, p. 1-6, 2015.

SIPOS, B. et al. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 347-364, 2010.

- SIPRIYADI, S. et al. Exploration of Potential Actinomycetes from CIFOR Forest Origin as Antimicrobial, Antifungus, and Producing Extracellular Xylanase. **Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education**, v. 8, n. 1, p. 96-104, 2016.
- SOUSA, J. et al. EFEITO DA ANTROPIZAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DA ENZIMA XILANASE EM ACTINOBATÉRIAS. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 15, n. 28, 2018.
- STAMFORD, T. L. M; ARAÚJO, J. Magali; STAMFORD, N. Pereira. Enzymatic activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Food Science and Technology**, v. 18, p. 382-385, 1998.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 183, n. 1, p. 1-7, 2000.
- SUN, X. et al. Hemicellulose-based pH-sensitive and biodegradable hydrogel for controlled drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1357-1366, 2013.
- URTIGA, S. C. C. et al. Xylan in drug delivery: A review of its engineered structures and biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 151, p. 199-208, 2020a.
- URTIGA, S. C. C. et al. Xylan microparticles for controlled release of mesalamine: Production and physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, p. 116929, 2020b.
- VERARDI, A. et al. Hydrolysis of lignocellulosic biomass: current status of processes and technologies and future perspectives. In: **Bioethanol**. Rijeka: InTech, p. 95-122, 2012.
- VERMA, D. Extremophilic prokaryotic endoxylanases: Diversity, applicability, and molecular insights. **Frontiers in Microbiology**, p. 2489, 2021.
- VIET, D. N. et al. Purification and properties of β -1, 4-xylanase from *Aeromonas caviae* W-61. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 2, p. 445-449, 1991.
- XU, H. et al. Characterization and site-directed mutagenesis of an α -galactosidase from the deep-sea bacterium *Bacillus megaterium*. **Enzyme and microbial technology**, v. 56, p. 46-52, 2014.
- WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, John N. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 3, p. 305-317, 1988.
- ZHANG, W. et al. Reducing the heterogeneity of xylan through processing. **Carbohydrate polymers**, v. 150, p. 250-258, 2016.
- ZHANG, M. et al. Molecular modification, structural characterization, and biological activity of xylans. **Carbohydrate Polymers**, p. 118248, 2021.

ZHENG, H. et al. Overexpression of a *Paenibacillus campinasensis* xylanase in *Bacillus megaterium* and its applications to biobleaching of cotton stalk pulp and saccharification of recycled paper sludge. **Bioresource technology**, v. 125, p. 182-187, 2012.

ZHOU, X. et al. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, v. 5, n. 1, p. 52-79, 2017.

ANEXOS

ANEXO 1

MÉTODO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS)

Preparação do reagente DNS (MILLER, 1959)

O reagente DNS é composto por duas soluções preparadas separadamente, que foram posteriormente misturadas:

Solução A: adicionou-se 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico a uma solução de 200 mL de hidróxido de sódio (2 M), recém-preparada;

Solução B: adicionou-se 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio a 500 mL de água destilada, sob aquecimento e agitação constantes. Ainda nessas condições, adicionou-se a solução A sobre a solução B, até a completa dissolução do DNS.

Após resfriamento, transferir a mistura para balão volumétrico de 1.000 mL e o volume foi completado com água destilada.

O reagente foi armazenado em frasco de polipropileno, ao abrigo da luz.

A padronização deve ser feita após 10 dias do preparo.

ANEXO 2

CURVA PADRÃO DA XILOSE

Protocolo

Preparação das soluções:

- Foi pesado 36 mg de xilose e transferido para o balão volumétrico de 100 ml contendo água MilliQ;
- Após a homogeneização completa, foi transferido da solução principal (0,5; 1,5; 3; 4,5; 6; 7,5 e 9 ml) para tubos de ensaio (solução de trabalho);
- Nas soluções de trabalho, nos completamos com tampão fosfato de sódio (pH 6,5) para 10 ml;
- Da solução de trabalho, foi retirado 0,5 ml e colocado em microtubos, contendo 0,5 ml de DNS;

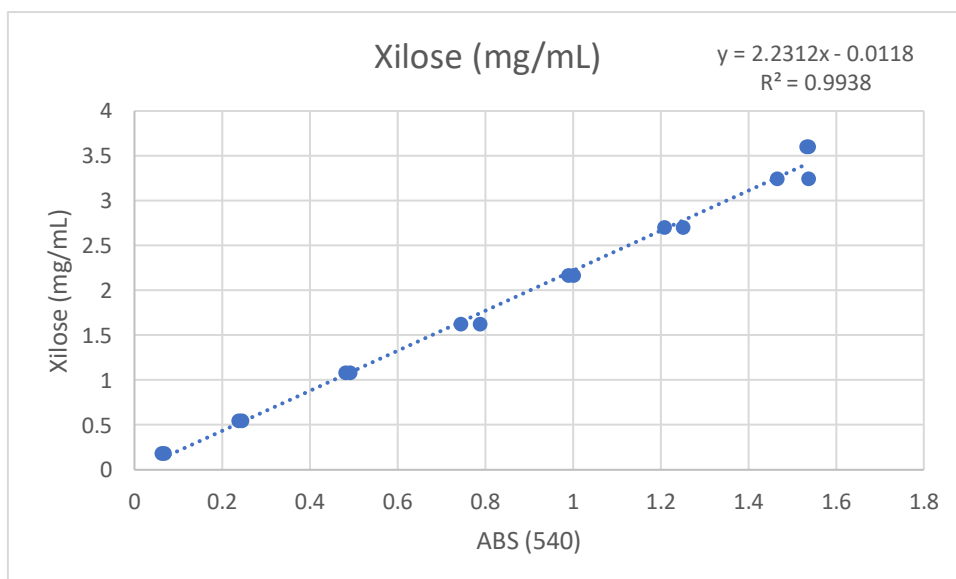
OBS: Foi feito em duplicata para cada solução de trabalho.

- Após a preparação de todas as soluções, as mesmas foram colocadas em banho-maria (100°C) por 5 minutos;
- Após os 5 minutos, os mesmos foram esfriados em banho de gelo até chegar em temperatura ambiente;

Leitura de placas de 96 poços (ELISA)

- Pegamos 260 ml de água MilliQ, distribuímos 40 microlitros de cada amostra em placa de 96 poços;
- Para solução “branca” foi colocado 0,5 ml de tampão (sem açúcar) e 0,5 ml de DNS.

Gráfico da curva padrão da xilose



ANEXO 3

- Tampão fosfato de sódio (pH 7)

Tampão fosfato de sódio 0,1M a diferentes pHs.

Solução A: Solução 0,2M de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$; PM = 138,01);

27,6g/1000 ml de água destilada.

Solução B: Solução 0,2M de fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4 ; PM = 141, 98);

28,4g/1000 ml de água destilada.

Mistura-se os volumes indicados na tabela abaixo e completando-se para 200 ml com água destilada pode-se fazer tampão fosfato de sódio 0,1M a diferentes pHs:

Sol A (ml)	Sol B (ml)	pH
92	8	5,8
90	10	5,9
87,7	12,3	6
85	15	6,1
81,5	19,5	6,2
77,5	22,5	6,3
73,5	26,5	6,4
68,5	31,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51	49	6,8
45	55	6,9
39	61	7
33	67	7,1
28	72	7,2
23	77	7,3
19	81	7,4
16	84	7,5
13	87	7,6
10,5	89,5	7,7
8,5	91,5	7,8

ANEXO 4

Metodologia SDS-PAGE – Ziomograma

- Montar a cuba;
 - Preparar o Resolving gel (ver Tabela A);
 - Aplicar o Resolving gel no aparato até o nível desejado;
 - Aplicar água Milli-Q ou álcool P.A. ou 70% para nivelar o gel;
 - Após a polimerização, retirar a água ou álcool e secar com papel;
 - Preparar o Stacking gel (ver Tabela B). Aplicar o Stacking gel e inserir o pente;
 - Esperar 15 min pela polimerização;
 - Montar o aparato de eletroforese contendo o tampão de corrida (ver Tabela C);
- OBS: Retirar a borracha seladora. Usar grampo para manusear as placas;
- OBS: Colocar sempre tampão de corrida novo no meio da cuba.
- Retirar o pente;
 - Preparar as amostras: misturar 2 volumes de amostra para cada volume do tampão da amostra (ver Tabela D);
 - Aplicar as amostras nos poços. Realizar a eletroforese a 200 V, 400 mA;

Tabela A – Resolving gel (8%) (Sambrook et al., 1989)

Reagentes	Para um gel com 5 ml
Água destilada estéril	2,3 mL ¹
Acrilamida 30% mix	1,3 mL
Tris 1,5 M (pH 8,8)	1,3 mL
SDS 10%	0,05 mL
Persulfato de amônia 10%	0,05 mL
TEMED	0,003 mL
Substrato (xilana 2%)	0,05 mL

¹ - Descontar 0,5 mL do substrato.

Tabela B – Stacking gel (5%) (Sambrook et al., 1989)

Reagentes	Para um gel com 5 ml
Água destilada estéril	1,4 mL
Acrilamida 30% mix	0,33 mL
Tris 1,5 M (pH 8,8)	0,25 mL
SDS 10%	0,02 mL
Persulfato de amônia 10%	0,02 mL
TEMED	0,003 mL

Tabela C – Tampão de corrida 10X

Reagentes	2X
Tris base	250 mM
SDS	1%
Glicina pH 8,3	2,5 M

Coloração zimograma (atividade enzimática para xilanase)

- Colocar o gel na solução de Triton 100X (2,5%) por 30 minutos, em agitador de placas (baixa rotação), após este período, descartar o Triton e passar um pouco de água destilada no gel;
- Em seguida, colocar o gel em tampão fosfato de sódio pH 6,5 (50 mM) por 30 minutos, em agitador de placas (baixa rotação), descartar e adicionar mais tampão fosfato e incubar a 15 min a 50°C;
- Descartar o tampão e corar com vermelho Congo 0,1% por 15 min, descartar e adicionar NaCl 1M por 15 min. Descartar o NaCl e adicionar ácido acético 10% para visualizar e fotografar o gel.

ANEXO 5

Quantificação do DNA – Nanodrop

Cepa	ng/ μ L	260/280	260/230
JS19	27,3	1,9	1,79
JS20	29,5	1,9	2,07

ANEXO 6

Dosagem da PCR

Dosagem feito em duplicata

Cepa	ng/ μ L	260/280	260/230
JS19	404	1,89	2,31
JS19'	519,4	1,89	2,29
JS20	428,7	1,89	2,34
JS20'	497,7	1,87	2,31

Purificação do produto da PCR

- Foi utilizado o kit Promega wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System;
- Foi retirado 50 μ L do produto da PCR e 50 μ L da *membrane binding solution*, sendo colocada na coluna, este processo durou 1 min;
- Após 1 min centrifugamos a 16.000g (12.980 rpm) por 1 minuto;
- Descartamos o liquido, após isso, realizamos a lavagem, pegamos 700 μ L da *membrane wash solution*, centrifugamos novamente por 1 minuto;
- Descartamos a solução, lavamos novamente e centrifugamos por 5 minutos;
- Descartamos novamente e centrifugamos por 1 minuto para evaporação do liquido residual;
- Descartamos o microtubo, pegamos um novo e colocamos a coluna com nossa amostra, lavamos com 50 μ L de *nuclease free water* (incubamos por 1 min) e centrifugamos por 1 min;
- Descartamos a coluna e ficamos com nosso produto da PCR purificado.

Dosagem do produto da PCR purificado

Cepa	ng/ μ L	260/280	260/230
JS19	77,1	1,92	2,09
JS20	93,9	1,90	2,24

ANEXO 7

Protocolo de envio dos DNAs para sequenciamento pela empresa ACTGene análises Moleculares Ltda.

- Com base dos valores de quantificação das amostras dos produtos de PCR, as amostras deveram conter entre 30 e 60 ng de DNA;

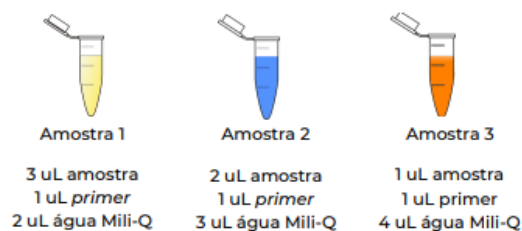
Amostras	ng/ μ L
1	17,9
2	20,4
3	45,7

Fonte: ACTGene

- x3 μ L = 53,7ng

- x2 μ L = 40,8ng

- x1 μ L = 45,7ng



Fonte: ACTGene

Diluição das amostras:

- JS19

2 μ L = 154ng + 3 μ L de água MilliQ = 51,3ng

- JS20

2 μ L = 93,9 ng + 3 μ L de água MilliQ = 62,6 ng

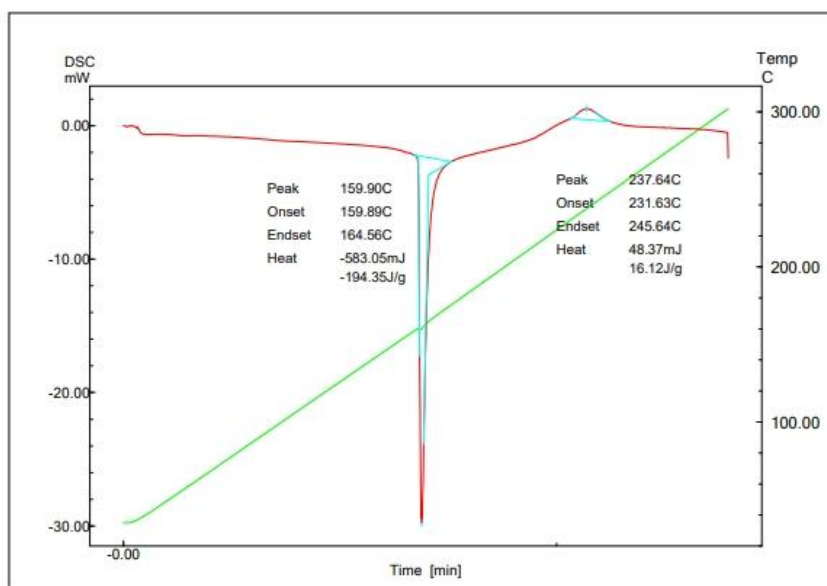
OBS: Fizemos a amostra 2 - 2 μ L da amostra – 1 μ L de *primer* e 3 μ L de água MilliQ

ANEXO 8

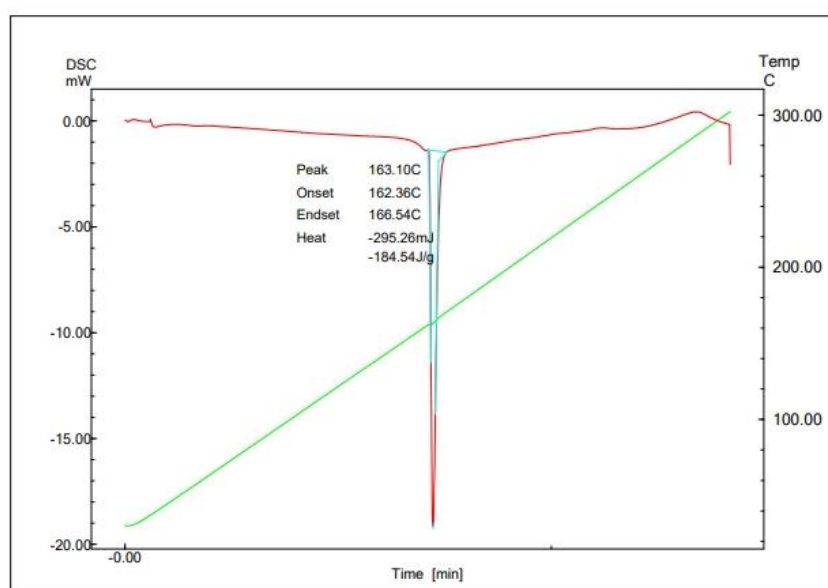
Curvas do *Differential Scanning Calorimetry* (DSC);

Peak – Temperatura Média (T_m); Onset – Temperatura Inicial (T_i); Endset – Temperatura final (T_f).

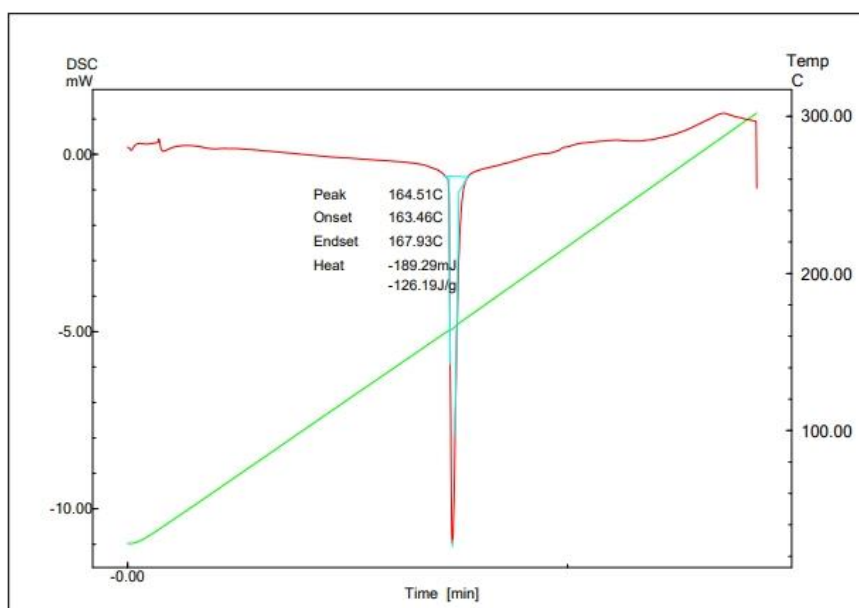
Xilana Comercial



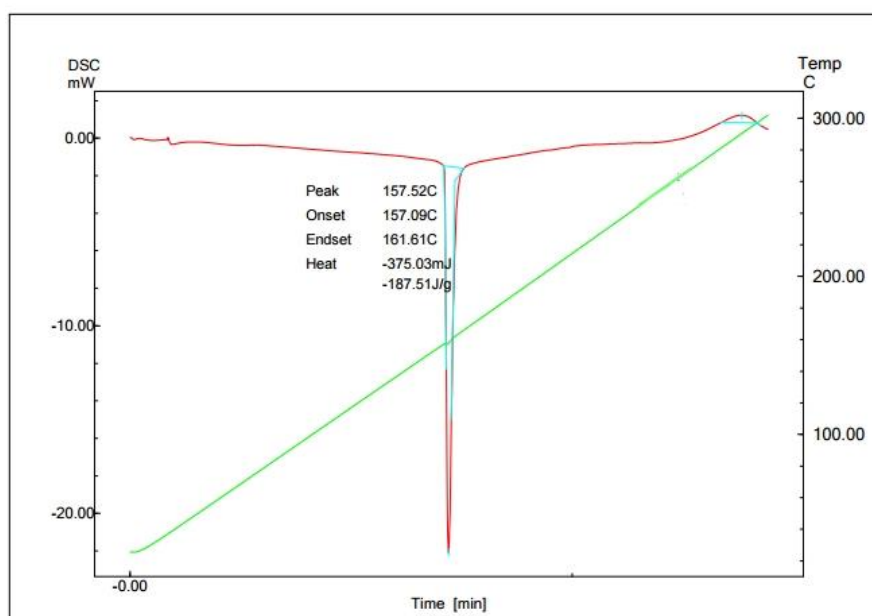
Xilana Bagaço



Xilana da Palha



Xilana do Sabugo



ANEXO 9

Sequência das cepas JS19 e JS20 após o tratamento:

JS19

>Seq19

TGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTG
AGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT
AATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTG
TCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAG
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTT
AGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTG
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAG
GTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGGAAGTC