

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

***Caulobacter crescentus*: CARACTERIZAÇÃO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E**
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO GENE *celA*

LARISSA BUSSLER

Cascavel – Paraná – Brasil

2019

LARISSA BUSSLER

***Caulobacter crescentus*: CARACTERIZAÇÃO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO GENE *ceIA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Garcia Simão

Cascavel – Paraná – Brasil

Fevereiro - 2019

Bussler, Larissa

Caulobacter crescentus: CARACTERIZAÇÃO, EXPRESSÃO
HETERÓLOGA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO GENE *cela* /
Larissa Bussler; orientador(a), Rita de Cássia Garcia
Simão, 2019.

117 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Exatas e
Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Agrícola, 2019.

1. Engenharia Genética. 2. Celulase. 3. Resíduos
Agrícolas. 4. Biopolimento. I. Simão, Rita de Cássia
Garcia. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BIOGRAFIA

Larissa Bussler, nascida em 14 de março de 1992 em Santa Helena, Paraná, Brasil. É graduada em Tecnologia em Gestão Ambiental no ano de 2012, pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Medianeira - PR, trabalhando na área de ecologia de ecossistemas e taxonomia de microalgas. Especialista em educação, com métodos de interdisciplinaridade, pela Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas, CELER/FACISA no ano de 2012. Mestre em Recursos Naturais, ênfase na linha de pesquisa de Materiais e Métodos Aplicados aos Recursos Naturais, na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, em 2014. Em 2015 foi docente dos cursos de técnico em Segurança no Trabalho e Técnico em Alimentos do Senai/Toledo. Doutoranda em Engenharia Agrícola com ênfase em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental na UNIOESTE, com pesquisa desenvolvida nas áreas de Bioquímica e Biotecnologia ambiental.

*Cada descoberta nova da
ciência é uma porta nova pela qual
encontro mais uma vez Deus, o autor
dela.*

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, minha fortaleza.

E a vocês, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, Sandra e Milton.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai Todo Poderoso, pelo dom da vida, por sempre ter iluminado o meu caminho e por nunca ter me deixado desistir. Amém!

À minha mãe Sandra e ao meu pai Milton, pela força, motivação, apoio e ao incentivo nessa fase do meu curso e durante toda minha vida. Amo vocês!

Ao Thalys, meu noivo, um agradecimento especial pela compreensão nos momentos ausentes. Eu te amo!

À Débora, minha AMIGA, companheira de bancada, mais que especial obrigada pelos momentos de convivência, apoio e suporte. Você foi muito importante nessa trajetória. Sem você e sua dedicação em me ajudar, nada disso teria sido possível. Devo muito a você! Obrigada pela paciência, por enxugar minhas lágrimas e me segurar no colo tantas vezes. E também, por não me deixar desistir, me encorajar e me mostrar que sou capaz. Saiba que essa amizade é amor e pra sempre te levarei comigo como exemplo de irmã. Te amo muito.

À Juliana, que ao longo dessa caminhada se tornou uma grande amiga. Obrigada por todo auxílio nos experimentos, horas de consolo e por estar sempre me apoiando.

Ao Fernando (noivo e futuro esposo da Débora), obrigada pelas horas dedicadas a me ajudar com a estatística desse processo.

Ao Paulo, pelas horas de estudos *on-line*, sugestões e acima de tudo a amizade.

Aos meus amigos da Bioquímica, que estão e já passaram pelo laboratório, parceiros de todas as horas, muito obrigada pelo apoio e ajuda, pela compreensão nas horas de estresse e pelas risadas dentro e fora do laboratório. Vocês estarão pra sempre no meu coração.

Quel, obrigada por todas as orações e pela força que me deu nessa caminhada. Mesmo longe, você se fez perto de mim e do meu coração. “Deus é bom o tempo todo!!!”. Ter uma amizade como a sua é como nossa música, é Raridade!

Enfim, a todos os amigos que conquistei até aqui, só tenho uma coisa a dizer: amizade se faz com pessoas assim como vocês!

Professor Alexandre, o meu muito obrigada pelas horas de estudo e explicações, pela disponibilidade em me ajudar quando precisei, dando-me sugestões e me conduzindo no decorrer desse trabalho.

Professor José Luis e Professora Marina, obrigada pelas horas de conversa, risadas e o tradicional cafezinho.

Professora Rita, esses anos de trabalho ao seu lado foram muito valiosos, você nos ensinou a crescer, ser persistentes, vencer as dificuldades e também a superá-las. Obrigada por me proporcionar chegar até aqui, pela paciência, atenção e amizade.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, por disponibilizar os laboratórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de fomento.

Caulobacter crescentus*: CARACTERIZAÇÃO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO GENE *celA

RESUMO

Nos últimos anos, muitos estudos têm avançado para melhorar a expressão de enzimas de interesse biotecnológico em bactérias. Inúmeras enzimas envolvidas nos mecanismos de biodegradação de materiais lignocelulósicos são produzidas por *Caulobacter crescentus*. Trata-se de uma bactéria aquática, gram-negativa, que sobrevive em ambientes oligotróficos e possui um único gene denominado *celA*, codificante de celulase (CelA) (E.C. 3.4.2.1). Assim, o gene *celA* (CCNA: 02310) de *C. crescentus* foi clonado e superexpresso em *Escherichia coli*. A proteína recombinante produzida foi purificada por meio de cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel-Sepharose. Em seguida, a proteína foi submetida à caracterização bioquímica e a aplicações industriais na hidrólise de resíduos agrícolas e no biopolimento de tecido denim. Com o propósito de induzir a celulase da cepa parental de *C. crescentus* (NA1000), a bactéria foi crescida em meio mínimo (M2) suplementado com 1% (p/v) de palha de milho (PM) ou sabugo de milho (SM). A maior atividade celulásica de 6,44 U.mL⁻¹ foi verificada na presença de PM, após 18 h de ensaio e 1,81 U.mL⁻¹ em SM. Na PM, a atividade celulásica se manteve alta até 48 h, com 3,84 U.mL⁻¹, cerca de 12 vezes superior à observada com adição de SM, no qual a atividade foi considerada nula a partir das 24 h de ensaio. O sequenciamento do gene *celA* clonado confirmou homologia de 99% para uma celulase de *C. crescentus* pertencente família 9 de glico-hidrolases (GH), segundo CAZy. De acordo com os resultados, a proteína predita codifica 625 aminoácidos e apresenta um peso molecular de 73 kDa. A superexpressão foi analisada em gel de SDS-PAGE e a proteína pura apresentou uma banda única no tamanho esperado, confirmado pela visualização de um halo de ação celulásica no gel de atividade-PAGE. A caracterização bioquímica da proteína purificada apresentou pH ótimo em 5,5, e estabilidade ao pH em 6,0, apresentando um pI teórico de 6,0. A temperatura ótima foi obtida a 40 °C e termoestabilidade da celulase apresentou um tempo de meia vida de 1 hora na temperatura ótima. Em 35 °C, a enzima perdeu cerca de 20% da sua atividade até 240 min de ensaio. A especificidade ao substrato confirmou que a enzima é CMCCase preponderante, ao apresentar afinidade pela carboximetilcelulose (CMC), a qual pode ser representada pela celulose amorfa. No ensaio de efeito de compostos, a adição de MnCl₂ (2 mM), levou a um aumento da atividade da celulase em 70%, em contraste, em contato com o HgCl₂ e AgCl₂ (2 mM), a enzima reteve 50 e 40% da atividade, respectivamente. A cinética da celulase para CMC, apresentou um K_M de 0,66 mg.mL⁻¹ e V_{Max} de 2,41 U.mg.mL⁻¹ e um K_{cat} de 2,94 s⁻¹. Para a cinética na presença do MnCl₂, na concentração de 5 mM, o K_M foi de 1,20 mg.mL⁻¹ e V_{Max} de 3,11 U.mg.mL⁻¹, e um K_{cat} de 3,78 s⁻¹. A enzima purificada em suas condições otimizadas, apresentou uma maior taxa de hidrólise da PM, produzindo 2,62 μmol.mL⁻¹, 2,5 vezes mais que em contato com o SM, em que produziu 1,02 μmol.mL⁻¹ de açúcares redutores em 24 h de ensaio. A aplicação da celulase no biopolimento de tecido denim, mostrou resultados importantes ao remover fibrilas, pelos e penugens salientes de celulose das fibras do tecido, a 40 °C em pH 5,5 durante 12 h. A ação da enzima gerou uma perda de peso mínima (> 3%), de 2,43% e produziu 2,17 μmol.mL⁻¹ de açúcar redutor no processo. As mudanças morfológicas do denim foram observadas pelas imagens de MEV (aumento de 5x), que confirmaram a ação celulásica no tecido tratado. A enzima foi caracterizada com sucesso, sendo o primeiro relato na literatura sobre celulase de *C. crescentus*. A aplicação da CelA nos resíduos agrícolas confirmou que a PM é uma fonte de carbono interessante para produção de açúcares fermentescíveis, pois contribui para a cadeia de produção do bioetanol. A ação no tecido denim, confirma o potencial da enzima no biotratamento de tecidos à base de algodão, sendo interessante substituto de lavagens químicas, melhorando o acabamento e qualidade de tecidos de forma econômica e ambientalmente favorável.

Palavras-chave: Engenharia Genética; Celulase; Açúcares Redutores; Resíduos Agrícolas; Biopolimento.

***Caulobacter crescentus*: CHARACTERIZATION, HETEROLOGE EXPRESSION AND BIOTECHONOLOGICAL APPLICATION OF *celA* GENE**

ABSTRACT

In recent years, studies have advanced to improve in biotechnological interest the enzymes expression in bacteria. Numerous enzymes involved in the metabolism of lignocellulosic materials are produced by *Caulobacter crescentus*, a Gram-negative aquatic bacterium that survives in oligotrophic environments and has a single gene called *celA* encoding cellulase (E.C. 3.4.2.1). Thus, the *celA* gene (CCNA: 02310) from *C. crescentus* was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*, the recombinant protein produced, was purified by affinity chromatography using nickel-Sepharose resin. The protein was then subjected to biochemical characterization and industrial applications in the hydrolysis of agricultural residues and in the Denim fabric biopolymerization. In order to induce cellulase parental strain *C. crescentus* (NA1000), the bacteria were cultivated in minimal medium (M2) supplemented with 1% (w/v) corn stover (CS) or corn cob (CC). The highest cellulase activity of 6.44 U.mL⁻¹ was verified in the presence of CS after 18 h of assay and 1.81 U.mL⁻¹ in CC. In CS, the cellulase activity remained higher to 48 h with 3.84 U.mL⁻¹, about 12 times higher than observed with the addition of CC, in which the activity was considered null after 24 h of assay. Sequencing of cloned *celA* gene confirmed 99% homology to cellulase of *C. crescentus*, belonging to glycohydrolases (GH) family 9, according to CAZy. The predicted protein encodes 625 amino acids and has a weight mass of 73 KDa. Overexpression was analyzed by the SDS-PAGE gel, which protein purification showed a single band at the expected height, confirmed by viewing a halo of activity on the PAGE-activity gel. Biochemical characterization of the purified protein showed optimum pH and stability pH 5.5 and 6.0, respectively, with a pI of 6.0. The optimum temperature was obtained at 40 °C, and thermostability of CelA showed a half-life time of 1 hour at optimum temperature. At 35 °C, the enzyme lost about 20% of its activity within 240 minutes of assay. Substrate specificity confirmed that the enzyme is an CMCase, having affinity to carboxymethylcellulose (CMC), represented by amorphous cellulose. The addition of MnCl₂ (2 mM) led to an increased cellulase activity by 70%. In contrast, contact HgCl₂ and AgCl₂ (2 mM) the enzyme retained only 50 and 40% activity respectively. The kinetics of CelA for CMC presented a K_M of 0.66 mg.mL⁻¹ and V_{Max} of 2.41 U.mg.mL⁻¹, and K_{cat} 2.94 s⁻¹. For the kinetics in the presence of the MnCl₂ ion, at the 5 mM concentration, the K_M was 1.20 mg.mL⁻¹ and V_{Max} of 3.11 U.mg.mL⁻¹, and K_{cat} 3.78 s⁻¹. The enzyme purified under optimized conditions, presented a higher rate of hydrolysis of CS, producing 2,62 μmol.mL⁻¹, around 2,5 times greater in contact with CC produced 1.02 μmol.mL⁻¹ of reducing sugars in 24 hours assay. The application of CelA to Denim fabric bio-polishing showed interest results for the removal of fibrils, fuzz and cellulose pills from the Denim fabric at 40 °C at pH 5.5 for 12 hours. The action of the enzyme generated a minimal weight loss (> 3%) of 2.43% and 2.17 μmol.mL⁻¹ reducing sugar in the process. The morphological changes of Denim were observed by SEM images (increase in 5x), which confirmed the cellulase action in the treated fabric. The enzyme was successfully characterized, making this the first report in literature about cellulase *C. crescentus*. The enzyme cellulase application in agricultural waste confirmed that PM is an interesting carbon source for production of fermentable sugars, contributing to the bioethanol chain. The enzyme's action in the Denim fabric confirms the potential for bio-treatment of cotton-based fabric, being an interesting substitute for chemical washes, improving the finishing and quality of fabric in an economical and environmentally friendly manner.

Keywords: Genetic Engineering; Cellulase; Agricultural Waste; Fermentable Sugars; Bio-polishing.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 <i>Caulobacter crescentus</i>	4
3.2 Síntese heteróloga: proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	7
3.3 Resíduos agroindustriais como fontes de celulose	9
3.3.1 Estrutura da celulose.....	13
3.3.2 Despolimerização de resíduos agroindustriais para acesso das celulasas	16
3.4 O papel das celulasas e sua atuação nos resíduos celulósicos.....	18
3.5 Celulasas na indústria têxtil	23
REFERÊNCIAS	27
ARTIGO 1 - EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA ÚNICA CELULASE CODIFICADA PELO GENE <i>celA</i> DE <i>Caulobacter crescentus</i>35	
4 INTRODUÇÃO	36
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Cepas bacterianas, condições de crescimento e plasmídeo.....	38
5.2 Produção de celulase de <i>C. crescentus</i> em diferentes substratos	38
5.3 Construção da proteína de fusão.....	39
5.4 Superexpressão e purificação da proteína recombinante CelA	40
5.5 Gel de atividade PAGE.....	40
5.6 Dosagem de proteínas e atividade enzimática	41
5.7 O efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da CelA	41
5.8 Especificidade ao substrato.....	42

5.9	Efeito de diferentes compostos na atividade de CelA.....	42
5.10	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	42
5.11	Hidrólise de diferentes fontes de carbono pela enzima CelA de <i>C. crescentus</i>	43
5.12	Análise estatística	43
6	RESULTADOS.....	44
6.1	Efeito de substratos na produção de celulase por <i>Caulobacter crescentus</i>	44
6.2	Clonagem, expressão e purificação do gene <i>celA</i>	45
6.3	Caracterização bioquímica da proteína recombinante CelA	48
6.3.1	Determinação de pH e temperatura.....	48
6.3.2	Especificidade ao substrato.....	50
6.3.3	Efeito de compostos	51
6.3.4	Constante cinética para a celulase CelA	52
6.3.5	Hidrólise dos resíduos PM e SM.....	52
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ARTIGO 2 - COMUNICAÇÃO BREVE (SHORT COMMUNICATION): APLICAÇÃO DA CELULASE ÁCIDA CODIFICADA PELO GENE <i>celA</i> DE <i>Caulobacter crescentus</i> NO PROCESSO DE BIOPOLIMENTO DO JEANS DENIM	68
1	INTRODUÇÃO	69
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1	Enzima	70
2.2	Biopolimento do tecido denim (jeans).....	70
2.3	Análise do jeans denim biotratado com a CelA.....	70
2.4	Análise morfológica do jeans denim por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	71
3	RESULTADOS.....	72
4	DISCUSSÃO	74
5	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79

ANEXOS	81
ANEXO A - NORMAS DA REVISTA BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY – ELSEVIER	82
ANEXO B - NORMAS DA REVISTA <i>PROCESS BIOCHEMISTRY</i> – ELSEVIER	90

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

Figura 1	Esquema do ciclo celular de <i>C. crescentus</i>	4
Figura 2	Representação circular do genoma de <i>C. crescentus</i> (cepa CB15).	6
Figura 3	Estrutura química da lignocelulose: (a) unidades da lignina; (b) unidades de xilose da hemicelulose; (c) celulose.	11
Figura 4	A estrutura padrão de celulose.	13
Figura 5	Ilustração das pontes de hidrogênio presentes na celulose.	14
Figura 6	Esquema com as regiões amorfas (mais suscetíveis à hidrólise) e cristalinas da celulose.	14
Figura 7	Organização estrutural da parede da célula da planta. Estruturas de microfibrilas da celulose, celulose paracristalina e cristalina.	15
Figura 8	Esquema do pré-tratamento em materiais lingocelulósicos.	17
Figura 9	Sítios de ação das celulasas no polímero da celulose.	20
Figura 10	Ilustração esquemática de hidrólise da celulose por $\text{exo-}\beta\text{-1,4-gluconase}$ e $\text{endo-}\beta\text{-1,4-gluconase}$	21
Figura 11	Mecanismo de ação da celulase no tecido denim. durante o processo de bioacabamento: (a) Tecido denim sem tingimento/índigo; (b) Tecido denim após tingimento (índigo); (c) Ação da endogluconase (representada por tesouras) nas fibras salientes do tecido denim e xilanase, atuando no revestimento de sementes e outras impurezas; (d) Tecido denim biotratado.	25

ARTIGO 1

Figura 1	Produção de celulase por <i>C. crescentus</i> (NA1000) na presença de palha de milho (barras pretas) e sabugo de milho (barras brancas). Células em fase estacionária de <i>C. crescentus</i> diluídas para $\text{D.O.}_{\lambda=600\text{nm}}$ de 0,150 e crescidas a 30 °C durante 48 h sob agitação a 120 rpm em meio mínimo (M2) suplementado com 0,2% de glicose e PM e SM. Nos tempos indicados, alíquotas do	
-----------------	--	--

sobrenadante da cultura foram coletadas e usadas para dosagem de atividade celulásica. As letras representam as diferenças significativas no teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$) entre os tempos em cada variável substrato, individualmente. 44

Figura 2 Eletroforese em gel de agarose evidenciando a clonagem do gene *celA* de *C. crescentus* no vetor de expressão pTrcHisA digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Hind*III, resolvido em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético glacial, EDTA), visualizado em transiluminador UV. (1) Marcador de peso molecular 1Kb DNA *ladder* (GE); (2) Confirmação da subclonagem do gene *celA* após a digestão do DNA plasmidial na orientação *Bam*HI/*Hind*III, que gerou um fragmento de DNA com 4,4 Kb correspondente ao plasmídeo pTrcHisA e outra banda de 1,9 Kb correspondente ao gene *celA*..... 46

Figura 3 Representação esquemática da proteína CelA de *C. crescentus* predita, codificada pelo gene *celA* contendo 1878 aminoácidos. CelD_N representa um domínio *Ig*-like (imunoglobulina) na região N-terminal associado ao domínio de celulase, o qual não tem função definida, mas geralmente está associado à estabilidade da melhor conformação enzimática. O domínio E_Set_Celulase_N, está associado ao domínio catalítico de celulase na região N-terminal. O domínio GH 9 corresponde ao da família 9 das glico-hidrolases de acordo com o CAZy e o PLN00119, se refere ao domínio para endoglucanase. 47

Figura 4 Gel de eletroforese SDS – PAGE 9%, mostrando as etapas de indução e purificação da CelA recombinante de *C. crescentus* e PAGE 10% mostrando a atividade celulásica. (1) Marcador de peso molecular para proteínas (GE); (2) Proteínas totais de *E.coli* (DH5 α), contendo a construção pTrcHisA-*celA* na ausência de IPTG; (3) 1 mM de IPTG, após 4 h de indução a 37 °C; (4) CelA purificada da resina de níquel-Sepharose com tampão fosfato (20 mM), contendo imidazol (500 mM); (5) Gel não desnaturante (PAGE 10%), mostrando a atividade celulásica da CelA recombinante..... 47

Figura 5 pH ótimo e efeito do pH na atividade CelA de *C. crescentus*. (A) pH ótimo e (B) estabilidade ao pH em vários valores de pH. A atividade celulásica foi verificada incubando-se a CelA pura com CMC 1% em tampão McIlvaine em diferentes pH (4-8) durante 10 min a 50 °C. Paralelamente, alíquotas da enzima purificada foram incubadas a 4 °C por 24 h nos mesmos tampões. Em seguida, a atividade da celulase foi novamente mensurada para cálculo de estabilidade. A atividade enzimática para o pH ótimo foi expressa em porcentagem (atividade relativa) considerando o pH 5,5 como 100%. A estabilidade em diferentes pH foi expressa como a atividade residual tendo como referência o valor da atividade enzimática obtida em tempo de incubação zero. 49

- Figura 6** Avaliação da atividade de CelA em diferentes temperaturas de incubação. (A) A CelA foi incubada nas temperaturas 20 a 80 °C por 10 min, e sua atividade mensurada no pH ótimo a 40 °C na presença do substrato CMC a 1% (p/v). (B) O teste de estabilidade térmica foi conduzido nas três melhores temperaturas determinados no ensaio de temperatura ótima. As temperaturas foram 35 °C (quadrado fechado), 40 °C (círculo aberto) e 45 °C (círculo fechado). Os dados apresentados em A e B são representativos de experimentos independentes, e os erros padrão são mostrados como barras verticais. 50
- Figura 7** Hidrólise do resíduo da palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM) pela ação da enzima recombinante CelA de *C. crescentus*. Palha de milho (barras pretas) e sabugo de milho (barras brancas) (1% p/v, em pH 5,5) foram incubados por 24 h a 40 °C com a CelA purificada. Amostras da reação foram coletadas e utilizadas para a determinação de açúcares redutores nos tempos de 1, 4, 12 e 24 horas de incubação. Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes e o erro padrão é demonstrado como barras verticais. As letras representam a diferença entre os tempos de cada grupo de substrato, entre si ($p < 0,05$). 53

ARTIGO 2

- Figura 1** Microscopia eletrônica de varredura dos tecidos denim. (A e B) Jeans denim tratado com tampão citrato de sódio pH 5,5 sem adição da CelA (controle); (C e D) Jeans denim tratado com a CelA de *C. crescentus*. 73

LISTA DE TABELAS

REVISÃO

Tabela 1	Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina na composição de diferentes materiais lignocelulósicos (em base seca).....	10
Tabela 2	Quantidade dos diferentes açúcares nos materiais lignocelulósicos.....	12
Tabela 3	Classificação das hidrolases responsáveis pela degradação da celulose.....	19

ARTIGO 1

Tabela 1	Purificação da celulase de <i>C. crescentus</i> , utilizando o substrato CMC 1%, em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5 a 50 °C.....	48
Tabela 2	Especificidade ao substrato pela CelA, em contato com CMC, avicel e papel de filtro	51
Tabela 3	Efeito de diferentes compostos na a atividade da CelA	51
Tabela 4	Constantes cinéticas da CelA recombinante de <i>C. crescentus</i> na presença e ausência de MnCl ₂ (5 mM)	52

ARTIGO 2

Tabela 1	Efeito da CelA de <i>C. crescentus</i> na liberação de açúcares redutores e perda de peso do jeans denim.....	72
-----------------	---	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α	– Alfa
ANOVA	– Análise de variância
3D	– Tridimensional
BLAST	– <i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	– Albumina de soro bovino
β	– Beta
CAZy	– Carbohydrate Active Enzymes (Enzimas Ativas Carboidratadas)
CB15	– Cepa de <i>Caulobacter crescentus</i> (selvagem)
CBM	– <i>Carbohydrate Binding domain</i> (Domínio de ligação ao carboidrato)
CCNA	– Número de acesso <i>Caulobacter crescentus</i>
<i>celA</i>	– Gene de <i>Caulobacter crescentus</i> que codifica para celulase
CelA	– Celulase recombinante de <i>Caulobacter crescentus</i>
CESAs	– Enzimas de síntese de celulose
CMC	– Carboxi-metil-celulose
DC	– Domínio catalítico
DH5 α	– Cepa de <i>Escherichia coli</i>
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
DNS	– Ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTPs	– Desoxirribonucleotídeos
D.O.	– Densidade óptica
E.C.	– <i>Enzyme commission</i> (Classe enzimática)
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
GH	– Glico-hidrolase
<i>Ig-like</i>	– Módulo Imunoglobulina
IPTG	– Isopropil- β -D-Galactopiranosídeo
Kb	– Kilobase
K _{cat}	– Número de renovação enzimática
kDa	– KiloDaltons
KEGG	– Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.
K _M	– Constante de Michaelis-Menten
LB	– Luria Bertani
LBA	– Meio de cultura LB com ampicilina
M2	– Meio mínimo de para <i>Caulobacter crescentus</i>
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
mL	– Mililitro
mM	– Mili molar
NA1000	– Cepa de <i>Caulobacter crescentus</i> (experimental)
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	– Nanogramas
nm	– Nanômetro
pb	– Pares de bases
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
pH	– Potencial hidrogeniônico

pI	– Ponto isoelétrico
PM	– Palha de milho
Primers	– Oligonucleotídeos
pTrcHisA	– Plasmídeo de expressão
PYE	– Meio de cultura completo contendo: Peptona e extrato de levedura
RNA	– Ácido ribonucléico
rpm	– Rotação por minuto
SDS-PAGE	– Dodecil Sulfato Sódio - “Polyacrilamide gel electroforesis” (Eletroforese desnaturante para proteínas)
SE	– <i>Secondary electron</i> – Elétron secundário
SM	– Sabugo de milho
TAE	– Tris Ácido Acético e EDTA
TE	– Tris e EDTA
V_{Max}	– Velocidade máxima
U	– Unidade
$U.mg^{-1}$	– Unidades por miligramas
$U.mL^{-1}$	– Unidade por mililitros
UNIOESTE	– Universidade Estadual do Oeste do Paraná
USP	– Universidade de São Paulo
μ	– Micro
μL	– Microlitro
μmol	– Micromolar
λ	– Lambda

1 INTRODUÇÃO

Celulases são complexos enzimáticos que atuam sinergicamente na despolimerização da cadeia da celulose. Elas são classificadas em: endoglucanases (E.C. 3.2.4.1), que clivam a cadeia da celulose na região amorfa, em oligômeros de cadeia menor, para que as exoglucanases (E.C. 3.2.1.91) possam atuar nas extremidades da cadeia, liberando celobiose, que é o substrato para atuação das β -glicosidades (E.C. 3.2.1.21), que resulta na produção de glicose como produto final (CANO-RAMÍREZ et al., 2016). A importância das celulases se deve ao fato de atuarem de forma eficiente na cadeia da celulose, liberando açúcares fermentescíveis com baixo custo e alto rendimento.

Essas enzimas estão reunidas em grupo de glico-hidrolases (GHs), uma classe enzimática que serve para classificar hidrolases que atuam na hidrólise das ligações glicosídicas entre um ou mais carboidratos. A família GH 9 compreende grande parte das celulases conhecidas; é o segundo maior grupo dessas enzimas, contendo, principalmente, endocelulases. Grande parte das enzimas desse grupo contêm domínios catalíticos que podem atuar na degradação da celulose amorfa e cristalina, como o mais conhecido módulo de ligação a carboidratos (CBM, do inglês) e o pouco explorado *Ig-like* (imunoglobulina) que, geralmente, está associado à manutenção da conformação do domínio catalítico da enzima (RAVACHOL et al., 2014).

As celulases podem ser sintetizadas na natureza por microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Comercialmente, as celulases fúngicas são as mais encontradas, porém, as de origem bacteriana estão se destacando devido à alta especificidade de glico-hidrolases, rápida obtenção e capacidade de habitar diferentes nichos industriais, entre outras vantagens (SRIARIYANUN et al., 2016). A importância das celulases se deve ao fato de atuarem de forma eficiente na cadeia da celulose, liberando açúcares fermentescíveis com baixo custo e alto rendimento.

A celulose é um polímero formado por monômeros de glicose ligados entre si, por ligações do tipo β -1,4, sendo a maior fonte de carbono orgânico encontrado na natureza. Por isso, é considerada uma rica fonte de glicose natural, o que tem feito da sua hidrólise um objeto de estudo interessante na área industrial, com intensas pesquisas para produção de bioetanol de segunda geração.

Este polímero é encontrado em resíduos agroindustriais, os quais são considerados uma importante fonte de biomassa lignocelulósica, originados pelo processamento de plantas. O Brasil contribui consideravelmente na geração deste tipo de resíduo, pois tem sua economia baseada na produção agrícola, como grãos, frutas cítricas, madeira (papel e

celulose) e outras monoculturas, que são processadas nas agroindústrias, gerando grandes quantidades de resíduos. O que vem a ser uma preocupação para o setor, por representar um prejuízo ambiental e econômico, devido à falta de destino apropriado, tratamento e aproveitamento adequado.

Assim, interesses voltados para estudar a melhor eficiência e o desempenho da degradação dos compostos lignocelulósicos para disponibilizar glicose para conversão em bioprodutos, se faz uma importante vertente na área biotecnológica. Neste contexto, há um esforço permanente de pesquisadores que trabalham para melhoramento de enzimas capazes de hidrolisar resíduos lignocelulósicos de forma mais eficaz, as quais podem também ser aplicadas em outros processos industriais.

Atualmente, as celulasas são aplicadas principalmente nas indústrias de bioetanol de segunda geração, indústria têxtil (lavanderia), ração animal, papel e celulose, sucos, entre outras aplicações. Por essas razões, a biotecnologia vem desenvolvendo ferramentas a fim de aprimorar os processos industriais, visando benefícios econômicos e ambientais. Dentre as vertentes a serem destacadas tem-se a engenharia genética, a qual, por meio da tecnologia de DNA recombinante, obtém o melhoramento das capacidades metabólicas de enzimas microbianas, produzindo-as em larga escala para aplicações industriais (SINGH et al., 2016).

A bactéria aquática *Caulobacter crescentus* é um importante microrganismo que possui seu genoma completamente elucidado (NIERMAN et al., 2001). É uma bactéria gram-negativa, oligotrófica e possui diversos genes que codificam enzimas capazes de acessar a parede vegetal de plantas e metabolizar compostos lignocelulósicos (MARKS et al., 2010).

Dos genes envolvidos com o complexo xilanolítico, quatro já foram caracterizados: *xynA1*, *xynB1*, *xynB2* e *xynB5*. Ainda, a maquinaria genética da *C. crescentus* apresenta um único gene que codifica para uma celulase (CelA), ainda não explorado, que será o objeto de estudo nesta pesquisa.

Assim, este trabalho relata o estudo sobre a caracterização bioquímica molecular do gene *celA* (CCNA_02310) que codifica para uma celulase (CelA) (KEGG Database E.C. 3.2.1.4) da família GH 9 de *C. crescentus*. Analisaram-se, também, suas possíveis aplicações industriais a partir da hidrólise de resíduos agroindustriais para produção de açúcares fermentescíveis, podendo futuramente contribuir com a cadeia energética do etanol de segunda geração. Bem como, no biotratamento de tecidos à base de algodão, a partir do processo de biopolimento da fibra celulósica pela ação enzimática, tornando assim, os processos industriais mais eficientes e ambientalmente corretos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Clonar o gene *celA* (CCNA_02310) que codifica uma celulase de *C. crescentus*, subclonar em vetor de expressão e obter a proteína recombinante em *E. coli*. Purificar a proteína de fusão e caracterizar bioquimicamente a enzima pura incluindo a análise de possíveis aplicações biotecnológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar o gene *celA* da *C. crescentus* (NA1000) pela técnica de *PCR* (do inglês – Reação em Cadeia da Polimerase);
- Clonagem da região codificadora de *celA* em vetor de expressão (pTrcHisA) para obtenção de uma proteína recombinante;
- Purificar e caracterizar bioquimicamente a proteína recombinante;
- Analisar a capacidade de hidrólise da celulase purificada na presença de palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM);
- Analisar a eficiência da celulase purificada no processo de biopolimento de jeans denim, por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Caulobacter crescentus*

A *Caulobacter crescentus* é uma bactéria gram-negativa que habita ambientes aquáticos oligotróficos, ou seja, pobre em nutrientes. Esse microrganismo é classificado em sua linhagem como: bactéria; *Proteobacteria*; *Alphaproteobacteria*; *Caulobacterales*; *Caulobacteraceae*; *Caulobacter*; *Caulobacter vibrioides*; *Caulobacter crescentus* (dados extraídos do banco de genomas do NCBI).

O estudo dessa bactéria emergiu como um modelo importante para a investigação da progressão do ciclo celular bacteriano, da divisão celular assimétrica e o desenvolvimento de organelas (ARELLANO et al., 2010). Isso se deve ao fato de que a *C. crescentus* é submetida a um ciclo de desenvolvimento programado, que requer redes reguladoras integradas que podem concorrer com os de células eucarióticas, sendo um excelente sistema modelo para estudar diferenciação celular, divisão assimétrica e a sua articulação com a progressão do ciclo celular (BROWN et al., 2008). Fazendo tudo isso com menos de 4.016.942 genes, permitindo estudos genômicos completos a partir de uma única célula de diferenciação (NIERMAN et al., 2001).

Ela apresenta um ciclo de vida elaborado, com alterações regulatórias na forma celular e na superfície de adesão dentro do contexto de um ciclo celular dimórfico, que culmina na divisão celular assimétrica (HUGES; JIANG; BRUN, 2005), como se observa na Figura 1.

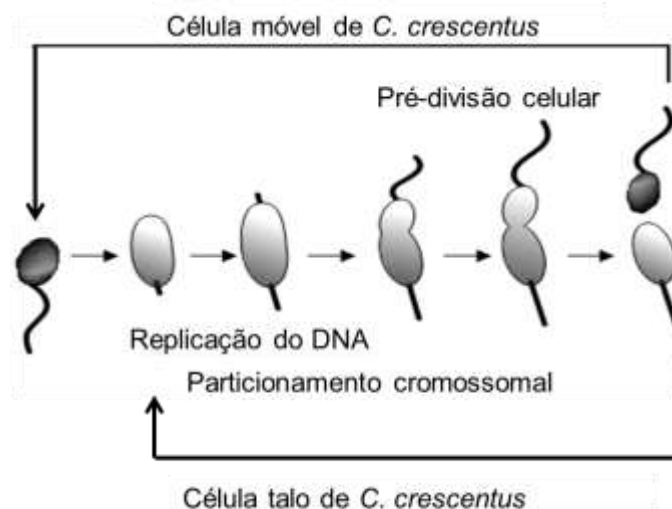


Figura 1 Esquema do ciclo celular de *C. crescentus*.

Fonte: Adaptado de England & Gober (2001).

A *C. crescentus* replica seu cromossomo antes de iniciar a divisão celular assimétrica e produz duas células filhas diferentes, uma denominada célula móvel (natatória) e uma célula talo (Figura 1), cada uma com características morfológicas distintas e com programas regulatórios específicos (BROWN et al., 2008; MCADAMS; SHAPIRO, 2009).

O ciclo celular começa com uma célula móvel quimiotática (natatória). Como mostra a Figura 1, esse tipo de célula tem um único flagelo polar que é usado para a motilidade. Nessa fase do ciclo, o cromossomo se encontra condensado, não sendo capaz de se replicar. Em resposta a sinais extracelulares, a célula móvel se modifica, perde o flagelo e torna-se uma célula talo. Durante essa transformação, o flagelo polar e as fímbrias desaparecem. Uma haste, que é um alongamento estreito da parede celular e membranas são construídas no mesmo local em que o flagelo foi desprendido. Coincidentemente com essa transição morfológica, a célula entra em estado de replicação de DNA e aumenta de tamanho. Aproximadamente na porção de 2/3 do ciclo celular, um novo flagelo é construído e fímbrias aparecem no pólo oposto do caule, agora assimétrica, a célula é denominada célula pré-divisional. Uma vez que o flagelo está completamente formado, prossegue a divisão celular, produzindo duas células filhas que são fisiológica e morfológicamente diferentes. A célula talo reinicia imediatamente uma nova fase de duplicação de DNA. A célula filha é uma célula móvel, a qual não consegue iniciar a replicação do DNA até realizar o passo de diferenciação celular. A duração do ciclo celular é de, aproximadamente, 3 horas a 30 °C em meio definido (CORRÊA, 2012; ENGLAND; GOBER, 2001; MCADAMS; SHAPIRO, 2009; SKERKER; LAUB, 2004).

Em 2001, o genoma do *C. crescentus* (cepa CB15) foi completamente sequenciado por Nierman et al. (2001), e todas as sequências estão disponibilizadas na página do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Seu genoma é circular e está representado na Figura 2. Posteriormente, o genoma de *C. crescentus* foi amplamente estudado por Marks et al. (2010), em que compararam as diferenças entre duas cepas laboratoriais, CB15 e NA1000, sendo a segunda um mutante derivativo da primeira com capacidade conjugativa e sincronizável. Os dados deste trabalho revelaram 11 polimorfismos de codificação, não-codificação e inserção/deleção entre essas duas estirpes.

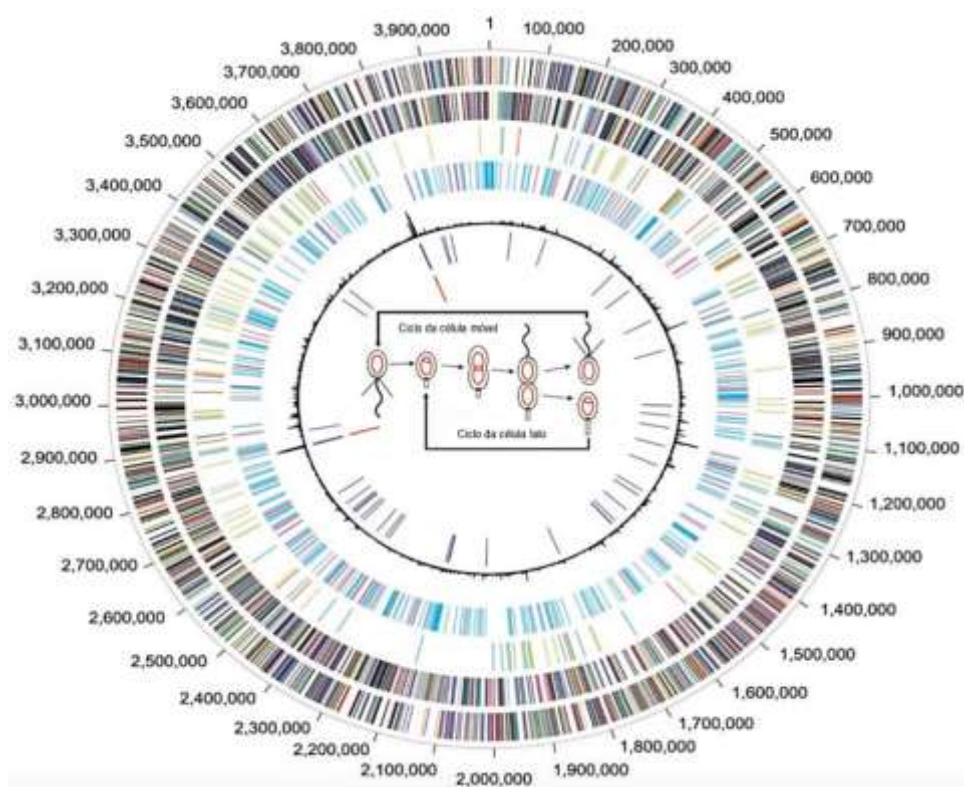


Figura 2 Representação circular do genoma de *C. crescentus* (cepa CB15).

Fonte: Nierman et al. (2001).

C. crescentus é resistente a ambientes pobres de nutrientes, sendo um organismo atraente para a aplicação como um agente de biorremediação capaz de retirar componentes tóxicos do meio ambiente (NIERMAN et al., 2001). Dados mostram que essa bactéria foi capaz de remover cerca de 99% de cádmio de ambientes aquáticos (PATEL et al., 2010).

Outra grande vantagem da *C. crescentus* é sua habilidade de metabolizar carboidratos de plantas, tais como celulose, hemicelulose, lignina, glicano, pectina e hidrocarbonetos aromáticos como benzeno e tolueno (PRESLEY et al., 2014). Possui também sistema de transporte, resultando na conversão de açúcares, sugerindo que esses polímeros provenientes de plantas são fontes para os metabolitos intermediários desse microrganismo (NIERMAN et al., 2001). Isso porque, essa bactéria é capaz de sintetizar um conjunto de enzimas envolvidas no metabolismo das paredes vegetais das plantas, entre elas uma celulase, uma α -glucosidase, quatro endo- β -xilanases e cinco β -xilosidases, sendo duas com função de α -L-arabinofuranosidase e β -glucosidase (GRACIANO, 2011; JUSTO et al. 2015).

Genes que codificam para enzimas do complexo xilanolítico, como as β -xilosidases I, II e V, já foram caracterizadas nos trabalhos de Graciano et al. (2012), Corrêa et al. (2012) e Justo et al. (2015), respectivamente. Outra enzima importante da maquinaria genética de *C. crescentus*, também já caracterizada, é a endo- β -1,4-xilanase I (GRACIANO et al., 2015).

Além de enzimas do complexo xilanolítico, a cepa de *C. crescentus* possui um gene para celulase. Por exemplo, a cepa de *Caulobacter sp.* FMC1, isolada de sedimento de lago, mesofílica e facultativa, foi capaz de induzir exoglucanase, β -1,4-glucosidase e endoglucanase em contato com celobiose e celulose em condições aeróbicas e anaeróbicas (SONG et al., 2013). Outra cepa de *C. crescentus* (CB15N) mostrou habilidades em processar celobiose e oligossacarídeos a partir da ação de β -glucosidases (PRESLEY et al., 2014).

A bactéria *C. crescentus* apresenta genes importantes que codificam enzimas que possibilitam degradação de componentes lignocelulósicos. Assim, por meio da engenharia genética, é possível selecionar genes, a fim de superexpressar e purificar proteínas recombinantes desejadas, em grande quantidade, permitindo sua caracterização bioquímica, para utilização em processos industriais, além do desenvolvimento de produtos comerciais a partir da ação enzimática (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

3.2 Síntese heteróloga: proteínas recombinantes em *E. coli*

Nas últimas décadas, a biotecnologia vem desenvolvendo ferramentas a fim de melhorar os processos industriais, visando benefícios econômicos e ambientais. Alterações genéticas que utilizam a tecnologia de DNA recombinante podem ser facilmente realizadas em células microbianas, produzindo uma elevada quantidade de enzimas para desenvolvimento científico (SINGH et al., 2016).

As enzimas são utilizadas como catalisadores em várias reações químicas e a tecnologia de DNA recombinante permitem não apenas a produção de proteínas em larga escala, mas, também, a engenharia de suas propriedades intrínsecas, como atividade, estabilidade e solubilidade (AYYADURAI et al., 2009). A produção de proteínas recombinantes como um pré-requisito para a purificação subsequente tornou-se uma técnica padrão. Aplicações importantes dessas proteínas são: (1) imunização, (2) estudos bioquímicos, (3) análise tridimensional da proteína e (4) uso biotecnológico e terapêutico (SCHUMANN; FERREIRA, 2004).

Os passos necessários para a obtenção de uma proteína recombinante são simples. Seleciona-se o gene de interesse, clona-o em qualquer vetor de expressão à disposição, posteriormente a transformação no hospedeiro de escolha e induzido. Em seguida, a proteína está pronta para purificação e caracterização (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Mas a expressão eficiente do gene recombinante depende de uma variedade de fatores, tais como sinais de expressão ótimos (tanto ao nível da transcrição e da tradução), dobra correta da proteína e características de crescimento celular (SCHUMANN; FERREIRA, 2004).

Na prática, vários processos podem dar errado, como por exemplo, pobre crescimento do hospedeiro, inatividade da proteína e até mesmo, a não obtenção de qualquer proteína (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Pode acontecer, ainda, de haver uma produção rápida de proteínas recombinantes, levando à formação de agregados insolúveis designados como corpos de inclusão (*IB* do inglês). O simples aumento da concentração das cadeias polipeptídicas pode ser suficiente para induzir sua formação, que são densos cristais de proteínas mal dobradas e não funcionais (CLARK; PAZDERNIK, 2016; SCHUMANN; FERREIRA, 2004).

Alguns dos desafios restantes, nesse campo da expressão de genes, incluem a concepção de sistemas enzimáticos eficientes para a degradação da parede celular vegetal, elucidação dos mecanismos de regulação gênica e *design* de novas funcionalidades de enzimas, por meio da engenharia de proteínas (SHALLOM; SHOHAM, 2003). Além disso, enzimas são frequentemente menos complexas do que as hidrolases glicosídicas bacterianas e, por conseguinte, podem ser mais prontamente clonadas e produzidas por recombinação num hospedeiro bacteriano de rápido crescimento, tais como *E. coli* (KADARMOIDHEEN; SARANRAJ; STELLA, 2012).

A *E. coli* é um organismo anaeróbio facultativo gram-negativo, capaz de utilizar ampla variedade de fontes de carbono orgânico – sendo a glicose a principal – para o crescimento heterotrófico, desencadeando estratégias para a produção de energia por meio da respiração ou fermentação (FÖSTER; GESCHER, 2014). A aplicação da *E. coli* na engenharia genética vem sendo bastante explorada por microbiologistas por ser o hospedeiro mais amplamente utilizado para a produção de proteínas recombinantes, uma vez que é o organismo melhor caracterizado, com muitos sistemas de expressão disponíveis (PANDEY et al., 2014).

Esse microrganismo ganha destaque por ser encontrado em todos os seres vivos e ambientes e, também, por seu genoma estar bem elucidado (RODRIGUES; CAVALETT; LIMA, 2010; GRACIANO, 2012). Além disso, essa bactéria necessita condições mínimas de crescimento, tem um ciclo de propagação do gene de forma mais acelerada, levando 20 a 30 minutos para realizar o seu ciclo, enquanto a própria *C. crescentus* leva em torno de 3 a 4 horas (IMAMOGLU; SUKAN, 2014).

Essa nova tecnologia de genes recombinantes expressos em microrganismos não-celulolíticos permite que esses microrganismos possam consumir substrato celulósico (RODRIGUES; CAVALETT; LIMA, 2010), muitas vezes com grande potencial a ser aplicado industrialmente. Nesse sentido, enzimas recombinantes vêm sendo estudadas para degradação da biomassa com maior eficiência e rentabilidade. Por exemplo, a *E. coli* possui em seu genoma um ou mais homólogos de *celA*. O papel deste homólogo ainda é desconhecido, assim, como a *E. coli* não é conhecida por degradar a celulose, esse gene pode estar envolvido em uma reação de glicosil transferase, que é comum para a síntese de

celulose e outras macromoléculas. Isso sugere um mecanismo de síntese de celulose envolvendo um ou mais intermediários (BRETT, 2000).

Desse modo, por não apresentar especificidade na degradação do complexo lignocelulósico, enzimas de interesse são expressas em seu genoma para o fim proposto. Assim, estratégias para melhorar a degradação da celulose incluem: bioprospecção de microrganismos celulolíticos, melhoramento de linhagens clássicas, engenharia proteica e metabólica, bem como a expressão heteróloga de celulases (RODRIGUES; CAVALETT; LIMA, 2010). Exemplo disso são celulases expressas utilizando a *E. coli* como hospedeiro natural, para a produção de enzimas recombinantes em larga escala.

Pandey et al. (2014) enfatizaram o potencial do sistema da *E. coli* para a produção de celulases bacterianas, a partir da clonagem e expressão de um gene que codifica para uma β -1,4-endoglucanase de *Bacillus subtilis*, isolado de solo irrigado com efluente de fábrica de papel e celulose. Em outro estudo, os genes *celB*, *celC* e *peh* de *Pectobacterium carotovorum*, que codificam celulases e poligalacturonase, foram clonados e expressos em células de *E. coli* DH5 α . Os autores concluíram que as enzimas caracterizadas apresentam potencial para produção de biocombustível e é possível a aplicação de estratégias de baixo custo para alcançar uma redução significativa no consumo de recursos naturais (IBRAHIM, 2013).

A importância do uso da *E. coli* como organismo hospedeiro é bem conhecida e intensivamente explorada para produção de celulases recombinantes. Assim, a superprodução de enzimas de interesse, como celulases, em larga escala e usando-as, por exemplo, na hidrólise da biomassa lignocelulósica, em condições experimentais otimizadas, possibilita a conversão máxima em açúcares fermentecíveis. Com isso, a clonagem e a superexpressão de genes da celulase em hospedeiros heterólogos são benéficos e de baixo custo para produzir enzimas em grandes quantidades, para sua aplicação industrial direta e em programas para a bioenergia (PANDEY et al., 2014).

Assim, a evolução biotecnológica pela melhoria da transformação de resíduos em produtos de interesse de forma biológica é a principal vertente da indústria para sanar problemas ambientais. A engenharia genética busca aprimorar e melhorar mutantes com o princípio de aproveitar de forma eficiente os resíduos, favorecendo sua degradação para conversão em produtos de interesse por meio de combinações gênicas.

3.3 Resíduos agroindustriais como fontes de celulose

Atualmente, enormes quantidades de resíduos lignocelulósicos agrícolas, industriais e municipais são eliminados por incineração ou são acumulados e/ou utilizados de forma

ineficiente, devido ao alto custo de seus processos de recuperação e aproveitamento (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; SHAHZADI et al., 2014).

No Brasil, a agricultura é uma das principais atividades econômicas e a industrialização dos produtos agrícolas gera quantidades consideráveis de biomassa como subprodutos. Resíduos com alto potencial lignocelulítico são obtidos após o processamento da cana-de-açúcar, arroz, milho e soja, sendo essas algumas das mais importantes *commodities* que contribuem para o equilíbrio da Balança Comercial Brasileira. Grande contribuição também é oriunda de indústrias de papel-celulose (SOLIMAN; EL-ZAWAHRY; EL-MOUGITH, 2013). As fontes de resíduo de biomassa provenientes da industrialização agrícola e da manufatura da madeira representam cerca de 40 toneladas de resíduos sólidos por ano (CANO; PALET, 2007), consistindo em importante fonte de biomassa lignocelulósica.

Os resíduos lignocelulósicos são materiais compostos majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados pela lignina, uma macromolécula formada por álcoois aromáticos, os quais se encontram unidos por ligações covalentes de hidrogênio (NUNES et al., 2013). Essa composição corresponde: cerca de 10% - 25% de lignina, 20% - 30% de hemicelulose e 40% - 50% celulose (SHAHZADI et al., 2014). Esses três constituintes se combinam para proteger açúcares de armazenamento de energia e dão a força e estrutura à parede celular vegetal.

A biomassa lignocelulósica apresenta em sua composição constituintes insolúveis, como a celulose e a lignina, além de componentes solúveis, como açúcar, aminoácidos e ácidos orgânicos (LIM; MATU, 2015). Na Tabela 1 está representada a distribuição de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes materiais lignocelulósicos.

Tabela 1 Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina na composição de diferentes materiais lignocelulósicos (em base seca)

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Sabugo de milho	45	35	15
Gramma	25-40	35-50	10-30
Pó de madeira	40-55	24-40	18-25
Jornal	40-55	25-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Resíduos sólidos de águas residuárias	8-15	NA	24-29
Gramíneas	45	31	12
Palha de trigo	30	50	15

Fonte: Adaptado de Gomes et al. (2015).

Nota: NA – Não avaliado

Dentre os componentes citados, há pequenas quantidades de pectina, proteínas, extrativos e cinzas que se somam para a totalidade de 100%. A composição desses constituintes pode variar de uma espécie de planta para outra e as proporções entre vários

constituintes dentro de uma única planta variam com a idade, estágio de crescimento e outras condições (BAJPAI, 2016).

A lignina é uma estrutura molecular complexa, contendo polímeros reticulados de monômeros fenólicos e complexo de fenil-propano (WYMAN; YANG, 2009). Possui três álcoois aromáticos (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico) (Figura 3a), produzidos através de um processo de biossíntese, os quais formam uma selagem de proteção em torno dos outros dois componentes: celulose e hemiceluloses (SHAHZADI et al., 2014). Presente na parede celular primária das plantas, dando suporte estrutural e resistência mecânica, capacidade impermeável e atuando como uma barreira contra o ataque microbiano (KUMAR et al., 2009).

A hemicelulose é um polímero curto e amorfo, altamente ramificado de pentoses, composto principalmente de cinco açúcares: arabinose, galactose, glicose, manose e xilose; com 50-200 unidades (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015; WYMAN; YANG, 2009) (Figura 3b). O papel da hemicelulose é proporcionar uma ligação entre a lignina e a celulose.

A celulose é o componente principal nas paredes celular de plantas recalcitrantes (VÁRNAI et al., 2014), sendo o complexo lignocelulósico mais abundante na natureza (ZHANG et al., 2007). A celulose é um grande polímero linear composto de unidades repetidas de moléculas de glicose, que são unidas entre si por ligações β -1,4 (SHAHZADI et al., 2014) (Figura 3c).

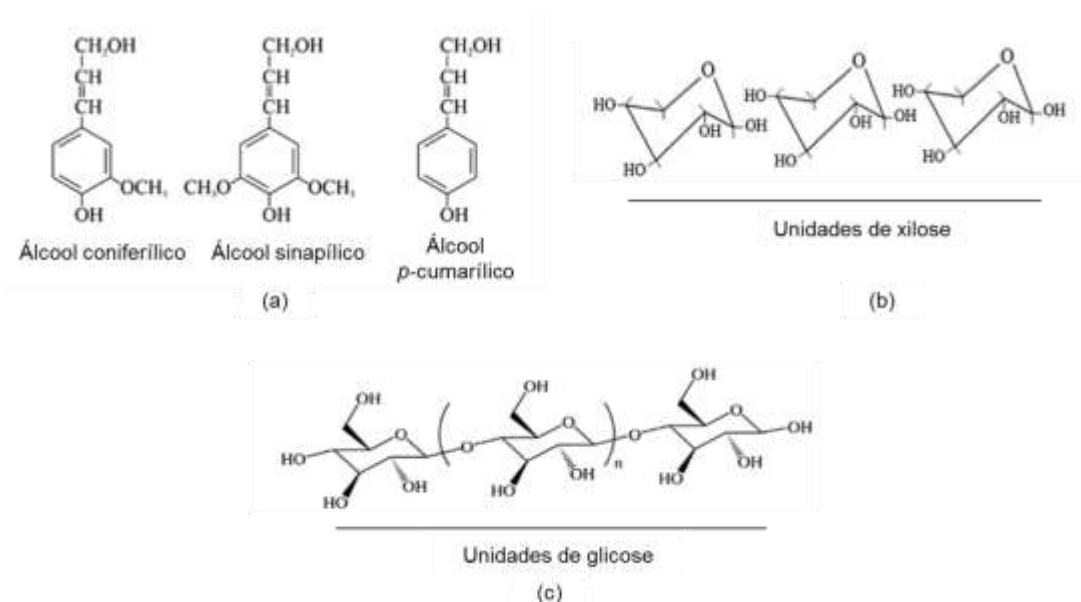


Figura 3 Estrutura química da lignocelulose: (a) unidades da lignina; (b) unidades de xilose da hemicelulose; (c) celulose.

Fonte: Adaptado de Shahzadi et al. (2014).

A celulose e a hemicelulose estão tipicamente presentes na biomassa lignocelulósica numa proporção de cerca de 3:1, com proporções menores em gramíneas (CURRIE et al.,

2014). A distribuição do conteúdo dos seus diferentes açúcares varia significativamente entre as diferentes fontes de biomassa, como se pode observar na Tabela 2, bem como a composição da lignina.

Tabela 2 Quantidade dos diferentes açúcares nos materiais lignocelulósicos

Material		Glicose ^a	Xilose ^b	Arabinose ^b	Manose ^b	Lignina
		(% do total de peso seco)				
Madeira de lei	Bétula	38,2	18,5	– ^c	1,2	22,8
	Salgueiro	43,0	24,9	1,2	3,2	24,2
Madeira macia	Asseado	43,4	4,9	1,1	12,0	28,1
	Pinus	46,4	8,8	2,4	11,7	29,4
Gramíneas	Palha de trigo	38,2	21,2	2,5	0,3	23,4
	Palha de arroz	34,2	24,5	n.d. ^d	n.d. ^d	11,9
	Palha de milho	35,6	18,9	2,9	0,3	12,3

Notas: ^a = Glicose proveniente principalmente da celulose; ^b = Xilose, arabinose e manose proveniente da hemicelulose; ^c = Abaixo da deteção limite; ^d = Não determinado.

Fonte: Adaptado de Jørgensen, Kristensen e Felby (2007).

No geral, como observado na Tabela 2, dentre todos os componentes dos resíduos de biomassa agrícola, a glicose constitui a porcentagem mais elevada. A maioria das plantas é formada por 45 a 50% de celulose (base seca). Porém, esse valor pode variar entre diferentes fontes vegetais, como 90% para algodão, até 30% em fibras de caules e talos (NAVAS; REBOREDO; GRANADOS, 2015). Ou seja, a estrutura molecular da celulose apresenta elevado grau de individualidade, dependendo da sua fonte e características da camada da parede celular ou tipo de planta (ARANTES; SADDLER, 2010).

Particularmente, a celulose, por ser um material elástico e forte que forma a parede celular de quase todas as plantas, é o maior polissacarídeo encontrado nas paredes vegetais e, por isso, é uma grande fonte de carbono orgânico, sendo um grande reservatório de energia no mundo. Podendo dessa forma, ser hidrolisada para produzir glicose, o que permite que seja utilizada como substrato para produção fermentativa de produtos que visem o bem estar humano (AJANI; AGARRY; AGBEDE, 2011).

Dessa forma, a geração de resíduos celulósicos, a partir da agricultura e da indústria de processamento de alimentos, tem chamado atenção de vários pesquisadores, principalmente por agregarem valor aos subprodutos oriundo da biomassa vegetal, visando à recuperação e à produção de proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos, lipídios, alimentos, rações e biocombustíveis, entre outros (DAS; SINGH, 2004). Assim, os resíduos agroindustriais são importantes fontes de bioconversão em subprodutos de valor agregado, devido à sua natureza renovável e ecológica.

3.3.1 Estrutura da celulose

A celulose é produzida pelas enzimas denominadas CESAs (enzimas de síntese de celulose) e é considerada como uma das principais formas de capturar carbono atmosférico, uma vez que é o principal componente da parede celular das plantas (FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007). É um polímero altamente estável, linear insolúvel formado por ligações de resíduo de glicose anidra (500-15.000 resíduos) do tipo β -1,4-glicosídicas, a qual vem sendo muito estudada, a fim de compreender sua estrutura molecular (SHAHZADI et al., 2014).

Resumidamente, a característica estrutural notoriamente dominante da celulose em plantas superiores é a presença de microfibrilas com um diâmetro de 2-10 nm, que são fibras não ramificadas compostas por cerca de 30-36 cadeias de glicose (ARANTES; SADDLER, 2010), sendo que dois grupos de finalização diferentes são encontrados em cada extremidade da cadeia da celulose (Figura 4).

Em uma das extremidades da cadeia, um grupo não-redutor ou extremidade não-redutora está presente com estrutura de anel fechado e, na outra extremidade, encontra-se um grupo redutor ou extremidade redutora com estrutura alifática e um grupo carbonila (FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007; XI; DU; ZHONG, 2013). Assim, a celulose é uma molécula polarizada e a partir da extremidade não redutora, novos resíduos de glicose são adicionados na cadeia da celulose por CESAs, os quais permitem o alongamento da cadeia (FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007).

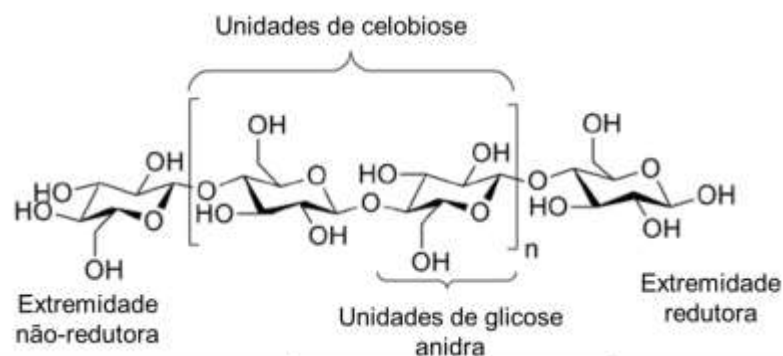


Figura 4 A estrutura padrão de celulose.

Fonte: Adaptado de Olsson e Westm (2013).

A orientação β -1,4 das ligações glicosídicas é feita por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, sendo intramoleculares e intermoleculares de forma aleatória, fazendo da celulose nativa uma estrutura altamente cristalina, insolúvel e resistente ao ataque enzimático (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015), como se observa na Figura 5.

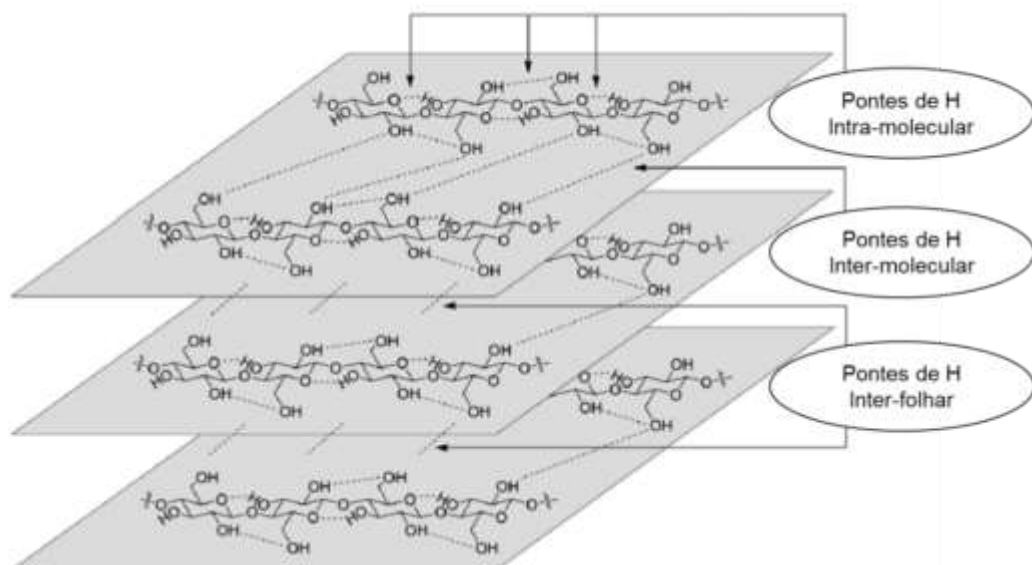


Figura 5 Ilustração das pontes de hidrogênio presentes na celulose.

Fonte: Adaptado de Murzin e Simakova (2015).

A celulose, de forma geral, apresenta duas estruturas: a cristalina e amorfa. A região cristalina é altamente ordenada, com ligações de hidrogênio lado a lado e de cima a baixo, conforme se visualiza na Figura 6 (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014). A estrutura amorfa é desordenada, apresentando voltas e torções que alteram o arranjo ordenado, como mostra a Figura 6.

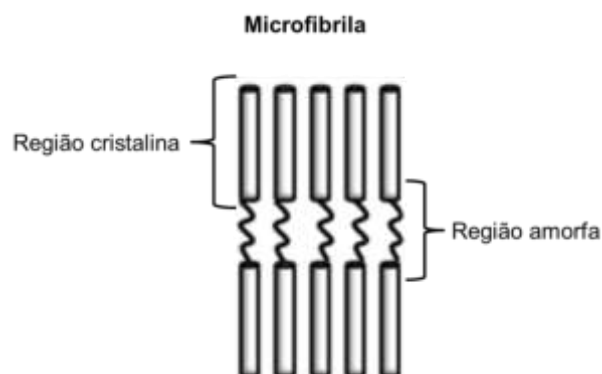


Figura 6 Esquema com as regiões amorfas (mais suscetíveis à hidrólise) e cristalinas da celulose.

Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2014).

As regiões cristalinas da celulose contribuem para a resistência à degradação, limitando a acessibilidade para as celulasas (ARANTES; SADDLER, 2010). Essas regiões cristalinas são resultantes da ação combinada da biopolimerização e cristalização da celulose comandada por processos enzimáticos. As regiões amorfas são resultado da má

formação da estrutura, devido à alteração no processo de cristalização (SILVA; ALMEIDA, 2009).

O grau de agregação fibrilar produz uma estrutura de fibra mais compacta, com menos aberturas, resultando numa menor área de superfície acessível interna. Uma característica importante das regiões altamente ordenadas ou cristalinas da celulose é que as suas cadeias são “empacotadas” tão fortemente que, mesmo pequenas moléculas como a água, não penetram nessas entidades estruturais altamente organizadas (ARANTES; SADDLER, 2010).

A densidade do empacotamento da celulose cristalina é alta, podendo conter até 80% de regiões cristalinas nas plantas. A fração restante é a celulose amorfa, a qual tem uma densidade de empacotamento inferior (NAVAS; REBOREDO; GRANADOS, 2015). Por esse fato, o componente amorfo é mais facilmente hidrolizado por enzimas celulases do que o componente cristalino (SILVA; ALMEIDA, 2009)

A agregação da cadeia de celulose é dentro de microfibrilas, formadas por arranjos cristalinos e amorfos de celulose, com várias dezenas de cadeias de β -1,4-glicano, ligados um ao outro ao longo de sua extensão, como se observa na Figura 7 (ESTELA; LUIS, 2013; LAUREANO-PEREZ et al., 2005).



Figura 7 Organização estrutural da parede da célula da planta. Estruturas de microfibrilas da celulose, celulose paracristalina e cristalina.

Fonte: Adaptado de Estela e Luis (2013).

Existem pelo menos seis diferentes formas cristalinas de celulose, mas normalmente, duas são sintetizadas por plantas superiores: $I\alpha$ e $I\beta$ oriundas da celulose I – celulose nativa -, a qual representa a maior fonte de biomassa sobre a terra e é o principal componente estrutural de todas as paredes celular de plantas (BRETT, 2000; CIOLACU;

POPA, 2011; SILVA; ALMEIDA, 2009). Em ambas as formas, as moléculas de celulose assumem uma conformação na qual, sucessivos resíduos de glicose são torcidos em 180°, ao longo da cadeia cristalina da celulose, em que o dissacarídeo celobiose GLC - β (1-4) é a unidade que mais se repete em termos espaciais (BRETT, 2000; ESTELA; LUIS, 2013).

Dessa forma, a degradação da celulose na natureza ocorre lentamente a partir das extremidades susceptíveis. Enzimas como celulasas produzidas por vários microrganismos, apresentam capacidade de catalisar a hidrólise da celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares de baixa massa molecular como a glicose e celobiose (AGUIAR, 2010).

No entanto, existem métodos de pré-tratamento que visam à deslignificação da celulose, liberando uma maior área de acesso à estrutura cristalina para a ação das enzimas, propiciando a bioconversão e a susceptibilidade da hidrólise microbiana em materiais celulósicos.

3.3.2 Despolimerização de resíduos agroindustriais para acesso das celulasas

O acesso das enzimas celulasas às cadeias de celulose dentro de microfibrilas, ainda é limitado pelas camadas de lignina e hemicelulose que recobrem a fibra vegetal (KAHAR, 2013). A partir de diferentes fontes, conseqüentemente, os resíduos agrícolas apresentam diferentes propriedades físicas e químicas, como área de superfície, lignificação, cristalinidade e outras composições químicas, que limitam a acessibilidade e a susceptibilidade de enzimas celulolíticas e outros agentes hidrolíticos de acessar a celulose por hidrólise (AJANI; AGARRY; AGBEDE, 2011).

O processo de pré-tratamento altera a estrutura e a composição da biomassa agrícola, removendo os extratos de lignina e hemicelulose, abrindo a estrutura secundária da celulose, reduzindo a cristalinidade das microfibrilas, aumentando a porosidade da celulose, removendo a interação entre as cadeias de glicose (OKAFOAGU; NZELIBE, 2006; SUN; CHENG, 2002). Assim, com a quebra da selagem da lignina – decompondo os componentes do polímero – formam-se açúcares monoméricos e torna a celulose mais acessível, aumentando a conversão enzimática por celulasas, que é o objetivo para aplicação do pré-tratamento (YAT; BERGER; SHONNARD, 2008).

Existem vários métodos de pré-tratamento, incluindo o físico (trituração e moagem, ação micro-ondas e auto-hidrólise); químico (alcalino, ácido diluído, agentes oxidantes, solventes orgânicos e líquido iônico); físico-químico (explosão de vapor, hidrotermólise, explosão de fibra com amônia, oxidação úmida e explosão com CO₂) e o biológico (realizado por meio de ação de microrganismos) (BEHERA et al., 2014; MOOD et al., 2013).

O pré-tratamento biológico é considerado o mais seguro, ambientalmente correto e com baixo consumo de energia em comparação com outros métodos de pré-tratamento.

Embora apresente baixa taxa de hidrólise, esse método precisa de melhorias para torná-lo uma proposta comercialmente viável (KUHAD et al., 2012), sendo que, o maior problema está na baixa acessibilidade à celulose, devido à associação rígida da celulose com a lignina (MOOD et al., 2013).

Os principais objetivos de um processo de pré-tratamento eficaz são: (I) formação direta de açúcares por meio de hidrólise; (II) evitar a perda e/ou degradação dos açúcares formados; (III) limitar a formação de produtos inibitórios; (IV) reduzir a demanda energética e (V) minimizar os custos (GUPTA et al., 2016).

Um processo de pré-tratamento adequado envolve: (I) quebra das ligações de hidrogênio na estrutura cristalina da celulose; (II) quebra da matriz reticulada da lignina e da hemicelulose; (III) aumento da porosidade e a área de superfície da celulose para a hidrólise enzimática subsequente (BEHERA et al., 2014; MOOD et al., 2013).

Na Figura 8 é possível observar como o pré-tratamento age nas estruturas dos materiais lignocelulósicos.

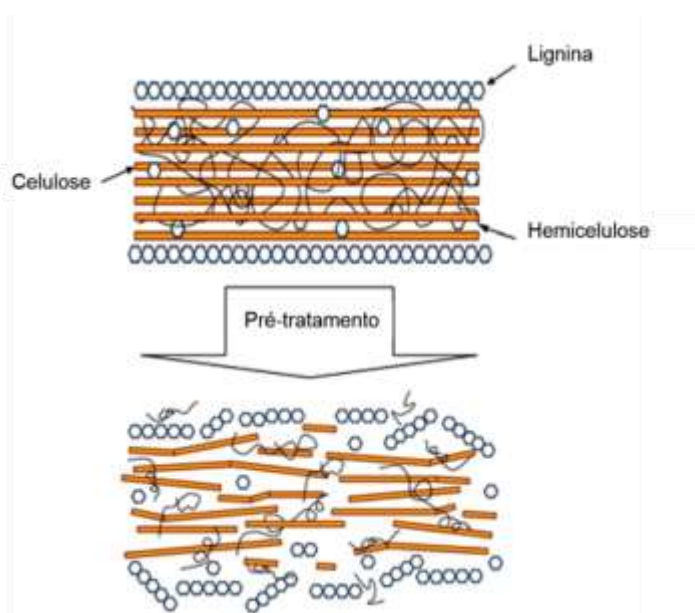


Figura 8 Esquema do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.

Fonte: Adaptado de Mood et al. (2013).

A partir de um pré-tratamento adequado, é possível uma exposição máxima da área superficial de celulose a qual pode ser hidrolisada, produzindo glicose pela ação de celulases. A hidrólise leva à produção de açúcares fermentescíveis, com o mínimo consumo de energia e uma recuperação máxima de açúcar (LIMAYEM; RICKE, 2012).

A celulose pode ser hidrolisada quimicamente por ácido sulfúrico ou outros ácidos e apresenta vantagens, devido à sua elevada taxa de conversão, não sendo necessária a etapa de pré-tratamento (BEHERA et al., 2014; MOSIER, 2005). Entretanto, a hidrólise enzimática é superior em vários aspectos: usa baixas temperaturas (45 °C - 50 °C),

condições moderadas de pH (4,8) sob pressão atmosférica, alto rendimento de açúcar fermentescível, sem formação de subprodutos, além de não haver corrosão em equipamentos (SARTORI et al., 2015).

Entretanto, para alcançar alta conversão de celulose, é necessário ter concentrações elevadas de enzimas. Assim, é muito importante o estudo de microrganismos e técnicas que levem a uma alta produtividade de celulases e processos mais eficientes (SARTORI et al., 2015).

3.4 O papel das celulases e sua atuação nos resíduos celulósicos

As enzimas que degradam a celulose são conhecidas por celulases. São complexos hidrolíticos capazes de degradar os polímeros de celulose insolúveis, responsáveis pela quebra da celulose em oligômeros de cadeia menor (CASTRO; PEREIRA-JUNIOR, 2010). As celulases estão entre as enzimas mais produzidas para fins industriais e espera-se que, em poucos anos, a sua produção aumente ainda mais, devido à sua grande viabilidade e eficiência para a conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015).

Atualmente, celulases fúngicas são os principais produtos comerciais para muitas aplicações, no entanto, as bactérias também são potenciais produtoras de celulases, apresentando várias vantagens sobre os fungos (SRIARIYANUN et al., 2016). Possuem maior taxa de crescimento, permitindo maior produção de enzimas recombinantes, as hidrolases glicosídicas bacterianas são mais complexas e muitas vezes são expressas em complexos multienzimáticos que proporcionam maior ação e sinergia, podendo habitar uma grande variedade de ambientes e nichos industriais, produzindo cepas celulolíticas que são extremamente resistentes a tensões ambientais (GOMEZ DEL PULGAR; SAADEDDIN, 2014; MAKI; LEUNG; QIN, 2009; SRIARIYANUN et al., 2016).

Celulase é um termo complexo para denominar um grupo de três enzimas: i) endo-1,4- β -glucanase (E.C. 3.2.1.4), exo-1,4- β -glucanase (E.C. 3.2.1.91) e β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21). Essas enzimas, em combinação sinérgica, são as responsáveis pela hidrólise da celulose (MENENDEZ; GARCIA-FRAILE; RIVAS, 2015). Tais enzimas precisam atuar sinérgicamente, quebrando as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 a partir da cadeia de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos (celo-oligossacarídeos), celobiose e glicose, respectivamente (HERCULANO et al., 2011; ZAFAR et al., 2014).

Cada enzima por si só não pode hidrolisar a celulose cristalina de forma eficiente, por isso deve haver a cooperação com as demais celulases, o que aumenta a taxa de hidrólise

significativamente (XI; DU; ZHONG, 2013). Na Tabela 3 estão descritas as ações de cada enzima na cadeia da celulose.

Tabela 3 Classificação das hidrolases responsáveis pela degradação da celulose

Celulases	Enzima	Classificação	Clivagem	Produto
Endoglucanase	Endo- β -1,4-glucanase	E.C. 3.2.1.4	Ligações intramoleculares β -1,4-glicosídicas	Novas extremidades da cadeia
Exoglucanase	β -glucosidase	E.C. 3.2.1.21	Extremidades da cadeia da celulose	Glicose ou celulose solúvel
	Exo- β -1,4-glucano-celobiohidrolase	E.C. 3.2.1.91	Terminações glicosídicas	Celbiose

Fonte: Adaptado de Dalmaso, Ferreira e Vermelho (2015).

A endo- β -1,4-glucanase é responsável pela quebra das ligações glicosídicas internas da cadeia da celulose, rompendo as ligações β -1,4, expondo as cadeias de polissacarídeos e formando oligossacáridos. Já a exo- β -1,4-glucanase (celobiohidrolase) pode acessar as cadeias de celulose clivadas pelas endoglucanases, que formaram os oligossacarídeos e, assim, acessar as cadeias de celulose individuais a partir da extremidade redutora ou expor a extremidade não-redutora, clivando de duas a quatro unidades de glicose de cada vez para produzir tetrassacáridos ou dissacáridos (celbioses). Já as β -glucosidases ou celobiasas hidrolisam a celbiose liberando unidades de glicose (XI; DU; ZHONG, 2013).

As celulases são enzimas que atuam especificamente nas quebras das ligações glicosídicas do tipo β -1,4- entre unidades de glicose ($C_6H_{10}O_5$) da cadeia da celulose (OGEDA; PETRI, 2010). Na Figura 9 estão ilustradas as ações das enzimas envolvidas na hidrólise da celulose e os pontos de clivagem de cada enzima na cadeia polissacarídica.

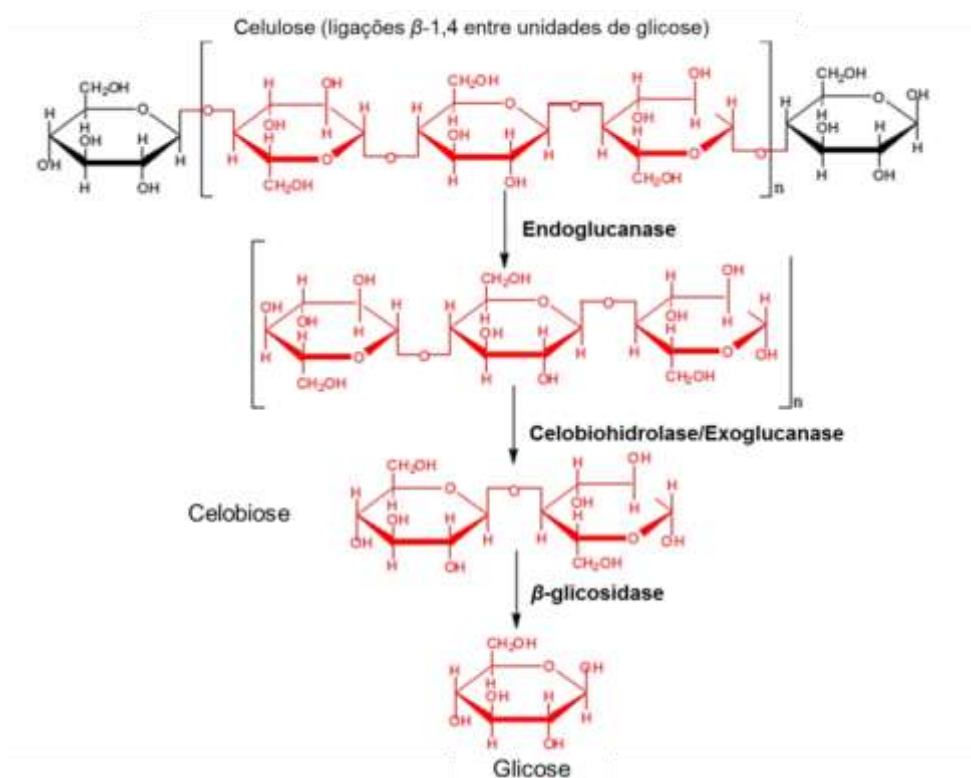


Figura 9 Sítios de ação das celulasas no polímero da celulose.

Fonte: Adaptado de Juturu e Wu (2014).

A endoglucanase (E.C.3.2.1.4) desempenha um papel importante na redução do grau de polimerização da celulose e o aumento da concentração das extremidades das cadeias glicosídicas (KURNIASIH et al., 2014). De acordo com a sua classe enzimática (E.C.s.) (www.cazy.org), ela é a responsável por quebrar a cadeia glicosídica da celulose em fragmentos menores, agindo nas ligações glicosídicas β -1,4, clivando aleatoriamente em locais amorfos internos na cadeia do polissacárido da celulose, formando celo-oligosacarídeos de diferentes comprimentos.

Consequentemente, são formadas novas extremidades da cadeia celulósica, possibilitando que as exoglucanases acessem as regiões cristalinas da celulose, liberando fragmentos de celobiose para que a β -glucosidase atue na liberação dos monômeros de glicose (LYND et al., 2002).

As enzimas responsáveis pela despolimerização de polissacarídeos vegetais, como a celulose e a xilana, são agrupadas dentro de glico-hidrolases (GHs) (RAVACHOL et al., 2014). Estas desempenham um papel importante na produção de biocombustíveis por meio de sua ampla aplicação na produção de açúcares redutores a partir de biomassa pré-tratada, formando açúcares fermentescíveis como substratos úteis para a produção de etanol e butanol (IBRAHIM, 2013).

Com base na sequência e estrutura tridimensional (3D), as endoglucanases são agrupadas, juntamente com outras enzimas, em 11 famílias de GHs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 44,

45, 48, 51, 74 e 124 (ALMEIDA et al., 2013). As exoglucanases ou celobiohidrolases são encontradas em famílias de GH 5-7 e 48 e as β -glucosidases nas famílias de GH 1, 3, 4, 17, 30 e 116 (JUTURU; WU, 2014).

A família de GH 9 é a segunda maior família de celulase, em que se encontram, principalmente, endoglucanases e algumas endoglucanases processivas (WILSON; URBANOWICZ, 2018). Endoglucanases processivas são enzimas diferenciadas que possuem a capacidade de clivar a celulose internamente, e também, digerir a celulose cristalina, liberando oligossacarídeos solúveis. A presença destas poderia explicar a capacidade de algumas endoglucanases acessarem a celulose cristalina na aparente ausência de celobiohidrolases (COHEN; SUZUKI; HAMMEL, 2005; XIE et al., 2007).

Os genes que codificam enzimas pertencentes às GHs 9 são amplamente conhecidos por serem de microrganismos celulolíticos (exceto fungos aeróbios) e plantas, sendo particularmente abundantes em bactérias anaeróbicas que produzem celossomas. As celossomas são grandes complexos extracelulares heterogêneos que degradam eficientemente a celulose e polissacarídeos relacionados à parede celular de plantas (RAVACHOL et al., 2014).

Algumas bactérias e fungos que produzem enzimas celulolíticas possuem em sua estrutura um domínio catalítico (DC) e um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) unidos por um ligante peptídico. O DC contém um local ativo da enzima que é responsável pela hidrólise da celulose cristalina, como mostra a Figura 10 (XI; DU; ZHONG, 2013).

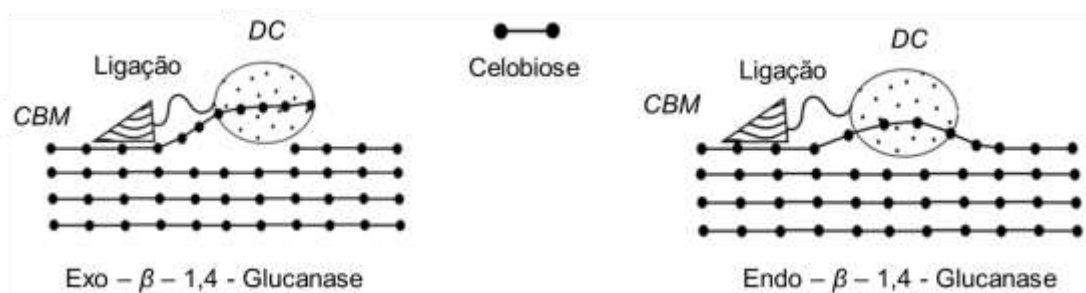


Figura 10 Ilustração esquemática de hidrólise da celulose por exo- β -1,4-glucanase e endo- β -1,4-glucanase.

Fonte: Adaptado de Xi, Du e Zhong (2013).

O CBM é um domínio que se liga ao substrato para trazer o domínio catalítico da enzima mais próximo ao substrato para realizar a sua dissociação e facilitar a catálise. Esse módulo de ligação ao carboidrato foi descoberto sugerindo facilitar a hidrólise da celulose, por perturbar fisicamente a estrutura da rede celulósica fibrosa, liberando as pequenas partículas de glicose, facilitando a entrada da água para a hidrólise. Removendo o CBM da enzima, ela diminuiu drasticamente a sua atividade enzimática (ARELLANO et al., 2010; SHOSEYOV; SHANI; LEVY, 2006).

Almeida et al. (2013) constataram que, de um modo geral, as celulases são amplas proteínas bimodulares catalíticas com um pequeno CBM ligado por uma sequência de proteína curta altamente glicosilada, rica em serina e prolina. O CBM é responsável pelo reconhecimento de superfície do substrato cristalino da celulose e na manutenção da processividade do sítio ativo (GENTA, 2000).

Duan et al. (2017) afirmaram que existem pelo menos quatro arquiteturas moleculares que classificam as endocelulases da família GH 9. Sendo, tema A: enzimas que não possuem módulo catalítico; tema B: enzimas que possuem um CBM na extremidade C-terminal do módulo catalítico GH 9; tema C: enzimas que contêm um módulo de *Ig-like* (imunoglobulina) N-terminal sem CBM; e tema D: enzimas que contêm um módulo *Ig-like* e um CBM (DUAN et al. 2017).

Na natureza, bactérias e fungos filamentosos celulolíticos produzem famílias de enzimas que hidrolisam a celulose cristalina sinergicamente a oligossacarídeos menores e, finalmente, a glicose. Compreender o papel e o mecanismo de ação dos microrganismos na solubilização da celulose tem sido alvo de intensa investigação nas últimas três décadas, podendo ser aplicado a uma gama de processos (KARNCHANATAT et al., 2008).

No cenário atual, as celulases estão sendo utilizadas em diversas aplicações industriais, principalmente, no processamento de algodão, reciclagem de papel, na agricultura, em indústria de alimentos, ração animal, lavagem têxtil, preparação de medicamentos, resinas, perfumes e no domínio da pesquisa e desenvolvimento (AHMED et al., 2003; BHAT, 2000; SHAHZADI et al., 2014). A ação das celulases na degradação de compostos celulósicos também é de grande importância nos processos de tratamento de resíduos, sejam eles agrícolas, industriais ou até em lodo de esgoto (AL-GHEETHI, 2015).

A hidrólise dos resíduos por celulase é uma ferramenta promissora do mundo moderno (YANG et al., 2011). Atualmente, o uso dos resíduos celulósicos como substrato para a produção de biocombustíveis por meio de enzimas, é uma das maiores vantagens da aplicação microbiana no processo (DESAI et al., 2015).

A grande importância da descoberta das celulases se deve ao alto desempenho na liberação de açúcares durante a decomposição de resíduos lignocelulósicos, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial e econômico, devido à possibilidade de sua conversão em bioetanol a partir desse processo (ALVES DOS SANTOS et al., 2010; CASTRO; PEREIRA-JUNIOR, 2010; NUNES et al., 2013).

A abundante conversão de biomassa lignocelulósica para produção de biocombustíveis apresenta uma opção viável para reforçar a segurança energética e reduzir as emissões dos gases de efeito estufa (KUMAR et al., 2009). A produção de bioetanol de segunda geração, usando resíduos agrícolas lignocelulósicos, aumentou nos últimos 25 anos, principalmente por ser a biomassa recurso abundante, barato, renovável e sustentável para a cadeia do bioetanol (KLEIN et al., 2016). Até então, a pesquisa sobre a utilização de

resíduos agrícolas para a produção de bioetanol de segunda geração mostrou resultados promissores em todo o mundo (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

O número de instalações de usinas de etanol de segunda geração ainda é pequeno, embora se apresentem amplamente viáveis quanto ao custo do substrato utilizado (GOMES et al., 2015). Para o bioetanol de segunda geração, empregam-se materiais celulósicos, que podem ser resíduos das plantas usadas na produção de etanol de primeira geração (cana-de-açúcar), bem como, resíduos de madeira (serraria), resíduos agrícolas, resíduos florestais, resíduos industriais ou resíduos sólidos (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUÑOZ; LÓPEZ, 2015).

Esse interesse pelo bioetanol se deve ao fato da sua obtenção envolver menores impactos ao meio ambiente e por que a sua combustão emite baixas quantidades de carbono para a atmosfera, reduzindo a emissão de gases do efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global. O bioetanol é tido como ecologicamente favorável, uma vez que libera 50% menos material particulado e 98% menos enxofre (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Dessa forma, a produção de bioetanol é uma alternativa potencial para a substituição de combustíveis fósseis, além de ser biodegradável e não tóxico.

Enfim, os avanços das pesquisas sobre celulasas ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Atualmente, mais de 500 produtos são produzidos utilizando enzimas e cerca de 150 processos industriais se beneficiam com a utilização de enzimas ou catalisadores oriundos de microrganismos. Além disso, mais de 3000 enzimas são conhecidas, cerca de 65% são hidrolases utilizadas em indústrias de detergentes, têxteis, de papel, de amido e de produção de biocombustíveis; cerca de 25% são utilizadas para o processamento de alimentos (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015).

3.5 Celulasas na indústria têxtil

Outro espaço de aplicação enzimática de celulasas é na área têxtil. A tecnologia de aplicação de enzimas no processamento de materiais têxteis não é um fenômeno novo. Das enzimas conhecidas até hoje, apenas 75 são, geralmente, usadas em vários processos da indústria têxtil, levando a um impacto positivo sobre o meio ambiente (ESFANDIARI; FIROUZI-POUYAEI; AGHAEI-MEIBODI, 2014; MOJSOV, 2015),

Celulasas são enzimas amplamente aplicadas em fibras de algodão, linho, cânhamo, rami, viscose e liocel, para melhorar o toque e a aparência. Elas são usadas para evitar a formação de bolas de algodão, desfibrilação do liocel, melhorando efeitos superficiais e maciez do tecido (ŠIMIĆ; SOLJAČIĆ; PUŠIĆ, 2015).

A maioria dos materiais utilizados na manufatura de tecidos é à base de fibras celulósicas e apresenta tendência à formar “penugem” (fibras curtas saindo da superfície) e “fiapos” (penugem solta ligada à superfície), considerados como características negativas dos tecidos celulósicos (BHAT, 2000). No entanto, usando enzimas no processo de acabamento, as fibras salientes podem ser permanentemente removidas do tecido (ESFANDIARI; FIROUZI-POUYAEI; AGHAEI-MEIBODI, 2014).

Os métodos convencionais de remoção das fibras salientes empregam um processo de queima ou tratamento químico, os quais são potencialmente tóxicos e as fibras retornam à superfície após algumas lavagens, formando a penugem (ESFANDIARI; FIROUZI-POUYAEI; AGHAEI-MEIBODI, 2014). Assim, as celulases alcançaram sucesso mundial na indústria têxtil, por sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de maneira controlada e desejada, bem como ecológica, melhorando as propriedades e a qualidade dos tecidos, gerando resistência à formação de penugens (BELGHITH; ELLOUZ-CHAABOUNI; GARGOURI, 2001; BHAT .M, 2000).

O algodão é a principal matéria-prima da indústria têxtil, composto por celulose polissacarídica, com ligações do tipo β -1,4, possuindo regiões amorfas e cristalinas. O algodão é uma fibra biológica composta por multicamadas: cutícula, parede primária e secundária e lúmen. A parede primária e secundária são as regiões em que as enzimas celulases atuam por serem compostas de celulose e possuem diferentes graus de cristalinidade: 30% e 70%, respectivamente (MOJSOV, 2014; ŠIMIĆ; SOLJAČIĆ; PUŠIĆ, 2015).

A região amorfa é geralmente responsável por formar penugem e fiapos em tecido de algodão, dessa forma, um único tipo de celulase, preferencialmente endoglucanase, pode ser suficiente para a eliminação dessas microfibrilas (ANISH; RAHMAN; RAO, 2007). Isso se deve ao fato de que celulases que exibem maior atividade de papel de filtro, ou seja, ação sobre a celulose cristalina mostrou a ação mais agressiva no algodão, principalmente em sistema agitado (CSISZÁR; URBÁNSZKI; SZAKÁCS, 2001).

Por isso, endoglucanases são enzimas preferíveis no processamento têxtil. Na Figura 11, visualiza-se a ilustração da ação da endocelulase no denim, removendo fibrilas salientes e, também, aparecem xilanases atuando em consórcio com as endoglucanases na remoção de fragmentos de revestimento de sementes e outras impurezas naturais de fibra de algodão (ANISH; RAHMAN; RAO, 2007).

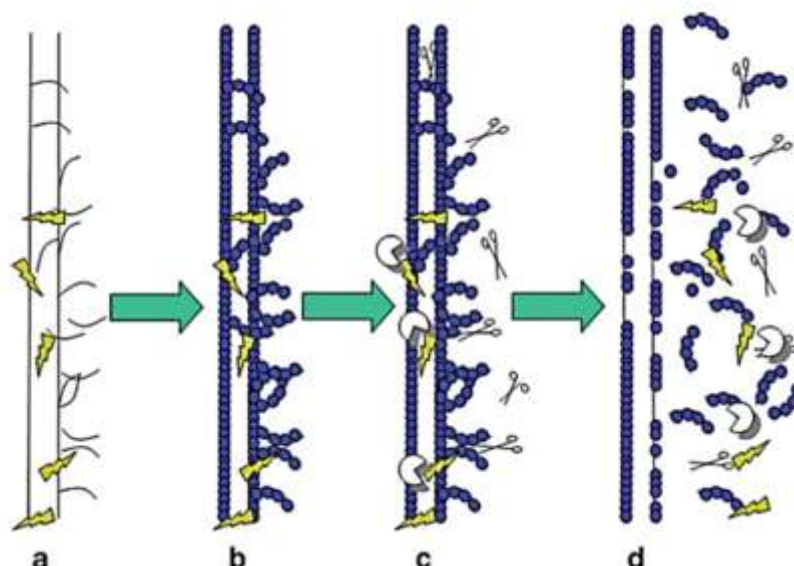


Figura 11 Mecanismo de ação da celulase no tecido denim durante o processo de bioacabamento: (a) Tecido denim sem tingimento/índigo; (b) Tecido denim após tingimento (índigo); (c) Ação da endoglucanase (representada por tesouras) nas fibras salientes do tecido denim e xilanase (☞) atuando no revestimento de sementes e outras impurezas; (d) Tecido denim biotratado.

Fonte: Adaptado de Anish, Rahman e Rao (2007).

As endoglucanases ou endo- β -1,4 celulases são enzimas que hidrolisam a cadeia de celulose aleatoriamente, nas ligações β -1,4, preferencialmente nas regiões amorfas da fibra (TAVČER, 2013) liberando monômeros de glicose. Por meio da quebra das ligações glicosídicas β -1,4 da molécula da celulose dos tecidos, os tratamentos do jeans com celulases proporciona uma textura lisa, macia e suave (KOO et al., 1994).

Biolavagem e o biopolimento são as mais conhecidas aplicações têxteis de celulases (BHAT, 2000). Durante as duas últimas décadas, as celulases foram amplamente utilizadas no processamento de tecidos úmidos, sendo a biolavagem de tecidos denims para alcançar a aparência desgastada e o biopolimento de tecidos de algodão para eliminar a penugem (YU et al., 2013).

O biopolimento é importante tratamento biológico realizado durante a etapa de processamento úmido do tecido têxtil, que utiliza endocelulases, principalmente ácidas (pH 3,8 - 5,8) e a grande finalidade do processo é remover fibras e microfibrilas salientes que se projetam da superfície do tecido (BHAT, 2000; MOJSOV, 2014).

Esse processo requer temperatura de 40 a 55 °C e, para essa etapa, as endocelulases são importantes, pois não acessam com facilidade o interior das fibras. Operando principalmente nas superfícies, o que leva à hidrólise de fibrilas superficiais de celulose, com menor perda de peso do material (ŠIMIĆ; SOLJAČIĆ; PUŠIĆ, 2015).

A remoção de fibras superficiais ou fibrilas e a resistência à formação de penugens ou bolas de algodão no tecido estão diretamente relacionadas a uma perda de peso ideal,

que não deve exceder 3 - 5%, durante o biotratamento enzimático (UDDIN, 2015). Pois altas cargas enzimáticas, longos períodos de tratamento e altas temperaturas podem levar a danos à fibra e perda de resistência.

O principal objetivo dessa etapa é proporcionar uma superfície mais limpa, melhorar a textura, as propriedades hidrofílicas, maciez, aparência, brilho e intensidade das cores do tecido, bem como, reduzir a tendência à formação de fiapos, dando maior resistência à fibra (BHAT, 2000; MOJSOV, 2014, 2015). Esse processo também é conhecido como bioacabamento de tecidos celulósicos que melhora a qualidade final do tecido (ESFANDIARI; FIROUZI-POUYAEI; AGHAEI-MEIBODI, 2014; ŠIMIĆ; SOLJAČIĆ; PUŠIĆ, 2015).

Dessa forma, as técnicas de engenharia genética e manipulação do DNA e enzimas recombinantes de microrganismos permitem a manipulação de genes de celulases, sendo possível obter novas enzimas-alvo, que podem ser otimizadas para efeitos específicos em certos tipos de tecidos e aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. M. **Utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***, 2010, 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo - PR, 2010.
- AHMED, S.; QURRAT-UL-AIN; ASLAM, N.; NAEEM, S.; SAJJAD-UR-RAHMAN; JAMIL, A. Induction of Xylanase and Cellulase Genes from *Trichoderma harzianum* with Different Carbon Sources. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Paquistão, v. 6, n. 22, p. 1912–1916, 2003.
- AJANI, A.; AGARRY, S.; AGBEDE, O. A Comparative Kinetic Study of Acidic Hydrolysis of Wastes Cellulose from Agricultural Derived Biomass. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, Nigéria, v. 15, n. 4, p. 531–537, 2011.
- AL-GHEETHI, A. A. S. Recycling of sewage sludge as production medium for cellulase by a *Bacillus megaterium* strain. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, Jordânia, v. 4, n. 2, p. 105–119, 2015.
- ALMEIDA, M. N.; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; RAMOS, H. J. O.; VISSER, E. M.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; DE REZENDE, S. T. Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource Technology**, Brasil, v. 143, p. 413–422, 2013.
- ALVES DOS SANTOS, J. R.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em shf e em ssf de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, Brasil, v. 33, n. 4, p. 904–908, 2010.
- ANISH, R.; RAHMAN, M. S.; RAO, M. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* in biopolishing of denims. **Biotechnology and Bioengineering**, Índia, v. 96, n. 1, p. 48–56, 2007.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Paquistão, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, Califórnia, v. 3, p. 4, 2010.
- ARELLANO, B. H.; ORTIZ, J. D.; MANZANO, J.; CHEN, J. C. Identification of a dehydrogenase required for lactose metabolism in *Caulobacter crescentus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Califórnia, v. 76, n. 9, p. 3004–3014, 2010.
- AYYADURAI, N.; NEELAMEGAM, R.; NAGASUNDARAPANDIAN, S.; EDWARDRAJA, S.; PARK, H. S.; LEE, S. J.; YOO, T. H.; YOON, H.; LEE, S. G. Importance of expression system in the production of unnatural recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Coreia, v. 14, n. 3, p. 257–265, 2009.
- BAJPAI, P. Structure of Lignocellulosic Biomass. In: **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Feedstocks for Biofuel Production**, p. 7–12, 2016.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Índia, v. 36, p. 91–106, 2014.

BELGHITH, H.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GARGOURI, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. **Journal of Biotechnology**, Tunísia, v. 89, n. 2–3, p. 257–262, 2001.

BHAT, M. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology (Review). **Biotechnology Advances**, Ucrânia, v. 18, p. 355–383, 2000.

BRETT, C. T. Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. In: **International Review of Cytology**. Reino Unido, v. 199, p. 161–199. 2000.

BROWN, P. J. B. HARDY, G. G.; TRIMBLE, M. J.; BRUN, Y. V. Complex Regulatory Pathways Coordinate Cell-Cycle Progression and Development in *Caulobacter crescentus*. In: **Advances in Microbial Physiology**. Estados Unidos da América: Elsevier Masson SAS, v. 54, p. 1–101. 2009.

CANO, À.; PALET, C. Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS. **Journal of Membrane Science**, Espanha, v. 291, n. 1–2, p. 96–105, 2007.

CANO-RAMÍREZ, C.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; RIVERA-ORDUÑA, F. N.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ZÚÑIGA, G.; HIDALGO-LARA, M. E. Expression, purification and characterization of an endoglucanase from *Serratia proteamaculans* CDBB-1961, isolated from the gut of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytinae). **AMB Express**, México, v. 6, n. 1, p. 63, 2016.

CASTRO, A. M.; PEREIRA-JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, Brasil, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CIOLACU, D.; POPA, V. Cellulose allomorphs: Structure, accessibility and reactivity. **Environmental Engineering and Management Journal**, Nova York, v. 10, n. 3, p. 467–468, 2011.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Recombinant Proteins. In: **Biotechnology**. 2. ed, Illinois, EUA: Elsevier, 2016. p. 335–363.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, União Soviética, v. 71, n. 5, p. 2412–2417, 2005.

CORRÊA, J. M. **Análise da expressão da β -Xilosidade II da bactéria aquática *Caulobacter crescentus* e seu papel no aproveitamento de resíduos agroindustriais**, 2012, 84 f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, 2012.

CORRÊA, J. M.; GRACIANO, L.; ABRAHÃO, J.; LOTH, E. A.; GANDRA, R. F.; KADOWAKI, M. K.; HENN, C.; SIMÃO, R. D. C. G. Expression and characterization of a GH39 β -xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Brasil, v. 168, n. 8, p. 2218–2229, 2012.

CSISZÁR, E.; URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, Hungria, v. 11, n. 4–6, p. 1065–1072, 2001.

CURRIE, D. H.; GUSS, A. M.; HERRING, C. D.; GIANNONE, R. J.; JOHNSON, C. M.; LANKFORD, P. K.; BROWN, S. D.; HETTICH, R. L.; LYND, L. R. Profile of secreted hydrolases, associated proteins, and SlpA in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* during the degradation of hemicellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos da América, v. 80, n. 16, p. 5001–5011, 2014.

DALMASO, G.; FERREIRA, D.; VERMELHO, A. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. **Marine Drugs**, Brasil, v. 13, n. 4, p. 1925-1965, 2015.

DAS, H.; SINGH, S. K. Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry - A Critical Appraisal. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Índia, v. 44, n. 2, p. 77–89, 2004.

DESAI, S. H.; RABINOVITCH-DEERE, C. A.; FAN, Z.; ATSUMI, S. Isobutanol production from cellobionic acid in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, Estados Unidos da América, v. 14, n. 1, p. 52, 2015.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A.; LÓPEZ, R. A. Production of Bioethanol from agro-industrial wastes. **Fuel**, México, v. 149, p. 85–89, 2015.

DUAN, C. J.; HUANG, M. Y.; PANG, H.; ZHAO, J.; WU, C. X.; FENG, J. X. Characterization of a novel theme C glycoside hydrolase family 9 cellulase and its CBM-chimeric enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, China, v. 101, n. 14, p. 5723–5737, 2017.

ENGLAND, J. C.; GOBER, J. W. Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. **Current opinion in microbiology**, Estados Unidos da América, v. 4, n. 6, p. 674–80, 2001.

ESFANDIARI, A.; FIROUZI-POUYAEI, E.; AGHAEI-MEIBODI, P. Effect of enzymatic and mechanical treatment on combined desizing and bio-polishing of cotton fabrics. **Journal of the Textile Institute**, Irã, v. 105, n. 11, p. 1193–1202, 2014.

ESTELA, R.; LUIS, J. Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. In: CHANDEL, A. (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. Londres, Reino Unido: InTech, 2013, p. 119-155.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brasil, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2007.

FÖSTER, A. H.; GESCHER, J. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Alemanha, v. 2, n. May, p. 16, 2014.

GENTA, F. A. **Purificação e caracterização de β -glucanas digestivas de *Periplaneta Americana* (Blattodea)**. 2000. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo-USP, 2000.

GOMES, D.; RODRIGUES, A. C.; DOMINGUES, L.; GAMA, M. Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Portugal, v. 99, n. 10, p. 4131–4143, 2015.

GOMEZ DEL PULGAR, E. M.; SAADEDDIN, A. The cellulolytic system of thermobifida fusca. **Critical Reviews in Microbiology**, Espanha, v. 40, n. 3, p. 236–247, 2014.

GRACIANO, L. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização da β -Xilosidase I da bactéria aquática *Caulobacter crescentus***, 2011, 85f, Dissertação de mestrado

(Engenharia Agrícola), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, 2012.

GRACIANO, L.; CORRÊA, J. M.; GANDRA, R. F.; SEIXAS, F. A. V.; KADOWAKI, M. K.; SAMPAIO, S. C.; DA CONCEIÇÃO SILVA, J. L.; OSAKU, C. A.; SIMÃO, R. de C. G. The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus* β -Xylosidase I. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Brasil, v. 28, n. 9, p. 2879–2888, 2012.

GRACIANO, L.; CORRÊA, J. M.; VIEIRA, F. G. N.; BOSETTO, A.; LOTH, E. A.; KADOWAKI, M. K.; GANDRA, R. F.; SIMÃO, R. C. G. Cloning and Expression of the *xynA1* Gene Encoding a Xylanase of the GH10 Group in *Caulobacter crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Brasil, v. 175, n. 8, p. 3915–3929, 2015.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO E. X. F.; EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, Irlanda, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.

HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; PINTO, G. A. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F. Cellulase Production by *Aspergillus japonicus* URM5620 Using Waste from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) Under Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Brasil, v. 165, n. 3–4, p. 1057–1067, 2011.

HUGHES, V.; JIANG, C.; BRUN, Y. *Caulobacter crescentus*. **Society**, Londres, v. 187, n. 2, p. 544–553, 2005.

IBRAHIM, E. Molecular Cloning and Expression of Cellulase and Polygalacturonase Genes in *E. coli* as a Promising Application for Biofuel Production. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, Egito, v. 04, n. 03, 2013.

IMAMOGLU, E.; SUKAN, F. V. The effects of single and combined cellulosic agrowaste substrates on bioethanol production. **Fuel**, Turquia, v. 134, p. 477–484, 2014.

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

JUSTO, P. I.; CORRÊA, J. M.; MALLER, A.; KADOWAKI, M. K.; DA CONCEIÇÃO-SILVA, J. L.; GANDRA, R. F.; SIMÃO, R. de C. G. Analysis of the *xynB5* gene encoding a multifunctional GH3-BglX β -glucosidase- β -xylosidase- α -arabinosidase member in *Caulobacter crescentus*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, Brasil, v. 108, n. 4, p. 993–1007, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Singapura, v. 33, p. 188–203, 2014.

KADARMOIDHEEN, M.; SARANRAJ, P.; STELLA, D. Effect of Cellulolytic Fungi on the Degradation of Cellulosic Agricultural Wastes. **International Journal of Applied Microbiology Science**, Índia, v. 1, n. 2, p. 13–23, 2012.

KAHAR, P. Synergistic Effects of Pretreatment Process on Enzymatic Digestion of Rice Straw for Efficient Ethanol Fermentation. In: **Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications**, Londres, Reino Unido: InTech, 2013, p. 65-86.

KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPUKIEW, J.; WHALLEY, A. J. S.; REYNOLDS, C. D.; GADD, G. M.; SIHANONTH, P. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**, Tailândia, v. 42, n. 5, p. 404–413, 2008.

- KLEIN, M.; GRIESS, O.; PULIDINDI, I. N.; PERKAS, N.; GEDANKEN, A. Bioethanol production from *Ficus religiosa* leaves using microwave irradiation. **Journal of Environmental Management**, Israel, v. 177, p. 20–25, 2016.
- KOO, H.; UEDA, M.; WAKIDA, T.; YOSHIMURA, Y.; IGARASHI, T. Cellulase Treatment of Cotton Fabrics. **Textile Research Journal**, Japão, v. 64, n. 2, p. 70–74, 1994.
- KUHAD, R. C.; THAKUR, S.; SHRIVASTAVA, B.; GUPTA, A.; INGALE, S. Degradation and selective ligninolysis of wheat straw and banana stem for an efficient bioethanol production using fungal and chemical pretreatment. **3 Biotech**, Índia, v. 3, n. 5, p. 365–372, 2012.
- KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Califórnia, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.
- KURNIASIH, S. D.; ALFI, A.; NATALIA, D.; RADJASA, O. K.; NURACHMAN, Z. Construction of individual, fused, and co-expressed proteins of endoglucanase and β -glucosidase for hydrolyzing sugarcane bagasse. **Microbiological Research**, Indonésia, v. 169, n. 9–10, p. 725–732, 2014.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Michigan, v. 124, p. 1081–1099, 2005.
- LIM, S. F.; MATU, S. U. Utilization of agro-wastes to produce biofertilizer. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, Matu, v. 6, n. 1, p. 31–35, 2015.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, Estados Unidos da América, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nova York, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.
- MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, Canadá, v. 5, n. 5, p. 500–516, 2009.
- MARKS, M. E.; CASTRO-ROJAS, C. M.; TEILING, C.; DU, L.; KAPATRAL, V.; WALUNAS, T. L.; CROSSON, S. The Genetic Basis of Laboratory Adaptation in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, Chicago, v. 192, n. 14, p. 3678–3688, 2010.
- MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. System-level design of bacterial cell cycle control. **FEBS Letters**, Califórnia, v. 583, n. 24, p. 3984–3991, 2009.
- MENENDEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; RIVAS, R. Biotechnological applications of bacterial cellulases. **AIMS Bioengineering**, Espanha, v. 2, n. 3, p. 163–182, 2015.
- MOJSOV, K. Biopolishing Enzymes and their applications in textiles: a review. **Tekstilna industrija**, Macedônia, v. 61, n. 2, p. 20–24, 2014.
- MOJSOV, K. Trends in bio-processing of textiles: A review. **Savremene tehnologije**, Macedônia, v. 3, n. 2, p. 135–138, 2015.
- MOOD, H. S.; HOSSEIN GOLFESHAN, A.; TABATABAEI, M.; SALEHI JOUZANI, G.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy**

Reviews, Irã, v. 27, p. 77–93, 2013.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Estados Unidos da América, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MURZIN, D.; SIMAKOVA, O. **Biomass Sugars for Non-Fuel Applications**. Finlândia, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015.

NAVAS, C. S.; REBOREDO, M. M.; GRANADOS, D. L. Comparative Study of Agroindustrial Wastes for their use in Polymer Matrix Composites. **Procedia Materials Science**, Argentina, v. 8, p. 778–785, 2015.

NIERMAN, W. C.; FELDBLYUM, T. V.; LAUB, M. T.; PAULSEN, I. T.; NELSON, K. E.; EISEN, J.; HEIDELBERG, J. F.; ALLEY, M. R. K.; OHTA, N.; MADDOCK, J. R.; POTOCKA, I.; NELSON, W. C.; NEWTON, A.; STEPHENS, C.; PHADKE, N. D.; ELY, B.; DEBOY, R. T.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GWINN, M. L.; HAFT, D. H.; KOLONAY, J. F.; SMIT, J.; CRAVEN, M. B.; KHOURI, H.; SHETTY, J.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; TRAN, K.; WOLF, A.; VAMATHEVAN, J.; ERMOLAEVA, M.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; VENTER, J. C.; SHAPIRO, L.; FRASER, C. M. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Canadá, v. 98, n. 7, p. 4136–4141, 2001.

NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; VALDÉS SERRA, J. C.; ALVES MARTINS, Á. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, Brasil, v. 14, n. 22, p. 135–150, 2013.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, Brasil, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OKAFOAGU, C. U.; NZELIBE, H. C. Effect of acid hydrolysis of *Garcinia kola* (bitter kola) pulp waste on the production of CM-cellulase and glucosidase using *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 5, n. 10, p. 819–822, 2006.

OLSSON, C.; WESTM, G. Direct Dissolution of Cellulose: Background, Means and Applications. In: **Cellulose - Fundamental Aspects**. Londres - Reino Unido: InTech, 2013. p. 143–178.

PANDEY, S.; KUSHWAH, J.; TIWARI, R.; KUMAR, R.; SOMVANSHI, V. S.; NAIN, L.; SAXENA, A. K. Cloning and expression of β -1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. **Microbiological Research**, Índia, v. 169, n. 9–10, p. 693–698, 2014.

PATEL, J.; WILSON, G.; MCKAY, R. M. L.; VINCENT, R.; XU, Z. Self-immobilization of recombinant *Caulobacter crescentus* and its application in removal of cadmium from water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos da América, v. 162, n. 4, p. 1160–1173, 2010.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. D. O. Use of agroindustrial residues in biotechnological processes as perspective for reduction of environmental impact. **Journal of Technology Management & Innovation**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 118–127, 2007.

PEREIRA, F. V.; DE PAULA, E. L.; DE MESQUITA, J. P.; DE ALMEIDA LUCAS, A.; MANO, V. Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofição. **Química Nova**, Brasil, v. 37, n. 7, p. 1209–1219, 2014.

PRESLEY, G. N.; PAYEA, M. J.; HURST, L. R.; EGAN, A. E.; MARTIN, B. S.; PERIYANNAN, G. R. Extracellular gluco-oligosaccharide degradation by *Caulobacter*

- crescentus*. **Microbiology**, Estados Unidos da América, v. 160, n. Pt_3, p. 635–645, 2014.
- RAVACHOL, J.; BORNE, R.; TARDIF, C.; DE PHILIP, P.; FIEROBE, H.-P. Characterization of All Family-9 Glycoside Hydrolases Synthesized by the Cellulosome-producing Bacterium *Clostridium cellulolyticum*. **Journal of Biological Chemistry**, França, v. 289, n. 11, p. 7335–7348, 2014.
- RODRIGUES, A. L.; CAVALETT, A.; LIMA, A. O. S. Enhancement of *Escherichia coli* cellulolytic activity by coproduction of beta-glucosidase and endoglucanase enzymes. **Electronic Journal of Biotechnology**, Brasil, v. 13, n. 5, p. 1–9, 2010.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, Argentina, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.
- SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, Índia, v. 5, n. 4, p. 337–353, 2015.
- SARTORI, T.; TIBOLLA, H.; PRIGOL, E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*. **BioMed Research International**, Brasil, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, Alemanha, v. 27, n. 3, p. 442–453, 2004.
- SHAHZADI, T.; MEHMOOD, S.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AFROZ, A.; ZEESHAN, N.; RASHID, U.; SUGHRA, K. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Paquistão, v. 05, n. 03, p. 246–251, 2014.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, Israel, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.
- SHOSEYOV, O.; SHANI, Z.; LEVY, I. Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Israel, v. 70, n. 2, p. 283–295, 2006.
- SILVA, D. J.; ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose (Cellulose whiskers). **O papel**, Brasil, v. 70, n. 7, p. 34–52, 2009.
- ŠIMIĆ, K.; SOLJAČIĆ, I.; PUŠIĆ, T. Application of Cellulases in the Process of Finishing Uporaba celulaza v procesu plemenitenja. **Scientific Review/Pregledni znanstveni članek**, Croácia, v. 58, n. 1, p. 47–56, 2015.
- SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, Índia, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.
- SKERKER, J. M.; LAUB, M. T. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. **Nature reviews. Microbiology**, Estados Unidos da América, v. 2, n. 4, p. 325–37, 2004.
- SOLIMAN, S. A.; EL-ZAWAHRY, Y. A.; EL-MOUGITH, A. A. Fungal Biodegradation of Agro-Industrial Waste. In: **Cellulose - Biomass Conversion**. InTech, 2013. p. 1–28.
- SONG, N.; CAI, H.-Y.; YAN, Z.-S.; JIANG, H.-L. Cellulose degradation by one mesophilic strain *Caulobacter* sp. FMC1 under both aerobic and anaerobic conditions. **Bioresource**

Technology, China, v. 131, p. 281–287, 2013.

SRIARIYANUN, M.; TANTAYOTAI, P.; YASURIN, P.; PORNWONGTHONG, P.; CHEENKACHORN, K. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp. isolated from rice paddy field soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, Tailândia, v. 19, n. 1, p. 23–28, 2016.

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

TAVČER, P. F. Effects of cellulase enzyme treatment on the properties of cotton terry fabrics. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, Slovênia, v. 21, n. 6, p. 100–106, 2013.

UDDIN, M. G. Effects of biopolishing on the quality of cotton fabrics using acid and neutral cellulases. **Textiles and Clothing Sustainability**, Bangladesh, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2015.

VÁRNAI, A.; MÄKELÄ, M. R.; DJAJADI, D. T.; RAHIKAINEN, J.; HATAKKA, A.; VIIKARI, L. Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases. In: **Advances in Applied Microbiology**. Noruega, v. 88 p. 103–165. 2014.

WILSON, D. B.; URBANOWICZ, B. **Glycoside Hydrolase Family 9**, 2018. Disponível em: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_9. Acesso em: 22 de dezembro de 2018

WYMAN, C. E.; YANG, B. Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuel needs. **California Agriculture**, Califórnia, v. 63, n. 4, p. 185–190, 2009.

XI, J.; DU, W.; ZHONG, L. Probing the Interaction Between Cellulose and Cellulase with a Nanomechanical Sensor. In: **Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications**. Estados Unidos da America: InTech, 2013. p. 125-140.

XIE, G.; BRUCE, D. C.; CHALLACOMBE, J. F.; CHERTKOV, O.; DETTER, J. C.; GILNA, P.; HAN, C. S.; LUCAS, S.; MISRA, M.; MYERS, G. L.; RICHARDSON, P.; TAPIA, R.; THAYER, N.; THOMPSON, L. S.; BRETTIN, T. S.; HENRISSAT, B.; WILSON, D. B.; MCBRIDE, M. J. Genome Sequence of the Cellulolytic Gliding Bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos da America, v. 73, n. 11, p. 3536–3546, 2007.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.-Y.; WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, Estados Unidos da America, v. 2, n. 4, p. 421–449, 2011.

YAT, S. C.; BERGER, A.; SHONNARD, D. R. Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. **Bioresource Technology**, Estados Unidos da America, v. 99, n. 9, p. 3855–3863, 2008.

YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X.; NI, X.; WANG, P.; CUI, L. Cellulase immobilization onto the reversibly soluble methacrylate copolymer for denim washing. **Carbohydrate Polymers**, China, v. 95, n. 2, p. 675–680, 2013.

ZAFAR, M.; AHMED, S.; IMRAN, M.; KHAN, M.; JAMIL, A. Recombinant expression and characterization of a novel endoglucanase from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. **Molecular Biology Reports**, Paquistão, v. 41, n. 5, p. 3295–3302, 2014.

ZHANG, R.; EL-MASHAD, H. M.; HARTMAN, K.; WANG, F.; LIU, G.; CHOATE, C.; GAMBLE, P. Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, Estados Unidos da America, v. 98, n. 4, p. 929–935, 2007.

ARTIGO 1 - EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA ÚNICA CELULASE CODIFICADA PELO GENE *celA* DE *Caulobacter crescentus*

Bussler, L¹; Jacomini, D²; Simão, RCG².

¹Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas; ²Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel-PR.

rita.simao@unioeste.br

Artigo formatado para submissão de acordo com as normas da revista: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* – Elsevier (Anexo A)

ISSN: 1878-8181; Fator de impacto: 2,19

DESTAQUES DA PESQUISA

- A CelA é uma GH9 e única em *Caulobacter crescentus*.
- A CelA mostrou pH ótimo igual a 5,5 e temperatura ótima de 40 °C.
- A Celulase foi ativada pelo íon Mn²⁺ com aumento do K_{cat}.
- CelA hidrolisa eficientemente resíduos agroindustriais liberando açúcar redutor.

Resumo: *Caulobacter crescentus* (cepa NA1000) é uma bactéria aquática, gram negativa e não patogênica que possui inúmeros genes para enzimas que degradam a hemicelulose. Neste trabalho, o gene *celA* (CCNA_02310) de 1.878 pb que codifica a única celulase (E.C. 3.2.1.4) da família 9 de glico-hidrolases de *C. crescentus* foi isolado por PCR e clonado em vetor de expressão, que fornece uma fusão de tradução com uma cauda amino terminal de histidina. A CelA pura apresentou o peso molecular de 73 kDa em gel de SDS-PAGE, mostrando uma banda evidente no gel de atividade-PAGE de mesma massa molecular. A CelA mostrou um pH ótimo igual a 5,5 e maior estabilidade nos pHs de 5,0 a 6,0. A temperatura ótima da enzima foi a 40 °C e a termoestabilidade a 35 °C. A especificidade ao substrato mostrou que a proteína é uma CMCase preponderante por apresentar afinidade ao CMC. As constantes cinéticas para o substrato CMC apresentaram valores de K_M e V_{Máx} de 0,66 mg.mL⁻¹ e 2,41 U.mg.min⁻¹, respectivamente; na presença de MnCl₂ (5 mM), os valores de K_M e V_{Máx} foram de 1,20 mg.mL⁻¹ e 3,11 U.mg.min⁻¹, respectivamente. A enzima se mostrou eficiente na hidrólise da PM, sendo capaz de liberar 2,62 μmol.mL⁻¹ de açúcar redutor e no SM apenas 1,02 μmol.mL⁻¹ de açúcar redutor em 24 h. Este trabalho é pioneiro no estudo de celulase de *C. crescentus* e serve como referências para estudo de celulases bacterianas, bem como aplicações desta enzima na degradação de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: Celulase; Celulose; Hidrólise; Palha de milho; Engenharia Genética.

4 INTRODUÇÃO

A celulose é o bio-recurso mais abundante no planeta e é uma importante fonte de energia renovável e economicamente viável (Pandey et al., 2014; Zafar et al., 2014). É um polímero composto por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, e para sua bioconversão em açúcar solúvel, é necessária a ação de celulasas (Sahin et al., 2016). Endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolase ou exoglucanase (E.C. 3.2.1.91 e E.C. 3.2.1.176) e β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) são enzimas celulolíticas que atuam sinergicamente, catalisando a degradação da celulose (Juturu e Wu, 2014; Phitsuwan et al., 2013; Vijayaraghavan e Vincent, 2012).

As endoglucanases são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas internas (β -1,4) da cadeia da celulose (Zafar et al., 2014). A família 9 de Glico-hidrolases (GHs) é o segundo maior grupo de famílias de celulasas e compreende, principalmente, endocelulasas. Historicamente, é uma das primeiras famílias de celulasas descobertas (Smith et al., 2017).

Endocelulasas pertencentes ao grupo de GH 9 são enzimas interessantes para aplicações que requerem hidrólise da celulose, por possuírem domínios catalíticos e muitas apresentam módulos/domínios auxiliares, que mantêm a conformação e estabilidade enzimática (Ravachol et al., 2014). Existem pelo menos quatro arquiteturas moleculares que as classificam: tema A, não possuem módulo catalítico; tema B, possuem um CBM na extremidade C-terminal do módulo catalítico GH 9; tema C, contém um módulo *Ig-like* (imunoglobulina) N-terminal sem CBM; tema D, contém um módulo *Ig-like* e um CBM (Duan et al., 2017).

Enzimas celulolíticas têm atraído atenção na área da pesquisa e interesse comercial por seu enorme potencial para aplicações biotecnológicas e industriais (Teng et al., 2010). Tradicionalmente, elas são aplicadas na produção de alimentos e cervejarias, processamento de ração animal, produção de detergente e lavanderia, processamento têxtil, papel e celulose, produção de bioetanol, extração de sucos de frutas e vegetais, bem como na área de pesquisa e desenvolvimento (Annamalai et al., 2013; Juturu e Wu, 2014; Sahin et al., 2016).

Fungos e bactérias têm sido fortemente explorados por suas habilidades de produzir uma grande variedade de celulasas e hemicelulasas (Annamalai et al., 2013; Kim et al., 2009). No entanto, as bactérias apresentam várias vantagens sobre os fungos, principalmente, no que se refere a sua alta taxa de crescimento e uma grande diversidade de GHs, devido às suas habilidades de habitarem nichos extremos (Sriariyanun et al., 2016).

Nesse sentido, a *C. crescentus* é uma bactéria gram-negativa, capaz de habitar ambientes oligotróficos (Poindexter, 1981) e análises genômicas mostram a presença de genes envolvidos na degradação de polissacarídeos vegetais, incluindo celulose, xilana, lignina, glicano e pectina (Nierman et al., 2001). Genes envolvidos diretamente na degradação do complexo xilanolítico já foram estudados, sendo três β -xilosidases: *xynB1* (Graciano et al., 2012), *xynB2* (Corrêa et al., 2014, 2012) e *xynB5* (Justo et al., 2015) e uma endo- β -1,4-xilanase (*xynA1*) (Graciano et al., 2015). Além desses, a *C. crescentus* apresenta um único gene que codifica para uma celulase (CelA) ainda não investigado.

No presente estudo, realizou-se a caracterização bioquímica do único gene de celulase de *C. crescentus* através da superexpressão do gene *celA* (CCNA_02310) em *Escherichia coli*, que codifica para uma celulase da família GH 9. Portanto, este é o primeiro registro da caracterização enzimática e potencial aplicação na hidrólise de resíduos agroindustriais do gene *celA*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas, condições de crescimento e plasmídeo

A cepa de *C. crescentus* (NA1000) utilizada para isolar o gene *celA*, foi mantida a 4 °C e crescida a 30 °C em meio complexo PYE (bacto-peptona 0,2%, extrato de levedura 0,1%, MgSO₄ 0,2 g.L⁻¹, CaCl₂ 0,5 mM) (Poindexter, 1964). Esta cepa NA1000 de *C. crescentus* é um mutante derivativo da cepa CB15 (Evinger e Agabian, 1977).

Para subclonagem do gene *celA*, foi utilizada a cepa DH5 α de *E. coli*, que foi crescida a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5), contendo ampicilina (Sigma[®]) (100 μ g.mL⁻¹) como marca de seleção presente no plasmídeo de expressão pTrcHisA (Invitrogen[®]).

5.2 Produção de celulase de *C. crescentus* em diferentes substratos

Para a análise de atividade celulásica global por *C. crescentus*, a metodologia seguiu o indicado em Corrêa et al. (2014) e Graciano et al. (2015). As células bacterianas foram crescidas na presença de 1% (p/v) palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM), os quais já foram evidenciados pela eficiente produção de xilanase pela mesma cepa da bactéria *C. crescentus* por Graciano et al. (2015). Os resíduos foram obtidos em propriedades agrícolas da região Oeste do Paraná – Brasil, onde essa agricultura é intensiva. Todos os resíduos foram secos a 50 °C por 2 h, triturados e peneirados em quatro peneiras variando de 12 a 48 mesh, pesados e diluídos em água ultrapura na concentração de 2% (p/v) (Corrêa et al., 2012). Na sequência, foram esterilizados (121 °C, 1 atm por 20 min) e resfriados a 4 °C, como método de pré-tratamento simples para hidrólise parcial da hemicelulose e celulose e melhorar a homogeneidade dos compostos, como descrito por Corrêa et al. (2012, 2014). Os sais de meio mínimo para *C. crescentus* (M2) (Na₂HPO₄ 18 mM, NH₄PO₄ 8 mM, NH₄Cl 9 mM, FeSO₄ 10 μ M, MgSO₄ 2mM, CaCl₂ 0,5 mM, glicose 0,2%) (Ely, 1991) foram esterilizados por filtração a vácuo, devido à presença da glicose.

A produção de celulase pela *C. crescentus* foi proposta por Corrêa et al. (2012) e Graciano et al. (2015), em meio contendo 2% (p/v) dos diferentes resíduos como fonte de carbono que, em seguida, foram diluídos para a concentração final de 1% (p/v) em M2

suplementado com 0,2% de glicose (p/v). O pré-inóculo de *C. crescentus* foi feito em meio de crescimento celular contendo PYE, durante 12 h a 30 °C e 120 rpm. Os meios contendo os resíduos agrícolas com o M2 foram utilizados para diluir o inóculo das células de *C. crescentus* na fase estacionária para um valor de densidade óptica ($D.O_{\lambda = 600 \text{ nm}}$) igual a 0,150. As culturas foram incubadas a 30 °C e 120 rpm, durante 48 h. Alíquotas de 1 mL de crescimento celular foram coletadas nos tempos de 6, 18, 24, 30 e 48 h, centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi reservado e mantido em gelo para a análise da celulase extracelular por meio de dosagem padrão de açúcar redutor, utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Como a bactéria aquática *C. crescentus* apresenta um único gene que codifica para celulase, a enzima é então excretada e a dosagem enzimática foi realizada com o extrato extracelular.

5.3 Construção da proteína de fusão

O DNA genômico da *C. crescentus* foi extraído de acordo com a técnica descrita por Chen e Kuo (1993). O isolamento de DNA plasmidial, digestão, PCR, ligação, transformação e demais técnicas da biologia molecular seguiram metodologias de Sambrook et al. (1989).

Os oligonucleotídeos com seus respectivos sítios de restrição em destaque, *celA*-Met/*Bam*HI (5' **aaaggatcc**atggaggaagcgctcgatg 3') e *celA*-Stop/*Hind*III (5' **aaa**aaagcttctaacgcgcggtgtcgtc 3') foram sintetizados de acordo com a sequência de DNA do gene *celA* (CCNA: 02310) a partir do genoma da *C. crescentus* disponibilizado no *GenBank* na plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A amplificação da região de interesse foi obtida por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de 50 µL, contendo 50 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,5 µg de DNA total de *C. crescentus*, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM e 1,5 U DNA Taq polimerase (Invitrogen®). A PCR foi iniciada a 95 °C para desnaturação completa do DNA por 3 min. A amplificação foi realizada com 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s para anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 2 min para polimerização a partir da cadeia de DNA molde.

O produto de PCR obtido foi analisado por gel de agarose 1%, com tampão TAE 1X (Tris-Base; Ácido Acético glacial e EDTA). Em seguida, a banda do produto de PCR correspondente ao tamanho de 1,9 kDa foi purificada e digerida com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Hind*III (Invitrogen®) para produzir extremidades coesivas e clonar o vetor de expressão pTrcHisA. Este plasmídeo fornece uma proteína fusionada a uma cauda de seis histidinas, quando superexpressa com isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG).

A identidade do gene pTrcHisA-*celA* foi confirmada por sequenciamento de DNA e todas as reações foram realizadas por PCR, utilizando o método de Sanger com o kit Big

Dye Terminator v.2.2 (Life Technologies®). Os produtos gerados foram sequenciados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ, USP, São Paulo, SP). Em seguida, confirmados com a identidade do gene *celA* de *C. Crescentus* com o uso do algoritmo NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e comparando os dados disponibilizados da Enciclopédia de Kyoto de genes e genomas (KEGG *Database*) (<https://www.genome.jp/kegg/>) e *UniProt database* (www.uniprot.org).

5.4 Superexpressão e purificação da proteína recombinante CelA

Para induzir a expressão da proteína de fusão recombinante, células de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo recombinante pTrcHisA-*celA* foram crescidas a 37 °C em meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a 120 rpm, durante 12 h. Quando as células de *E. coli* atingiram a fase estacionária, a cultura foi diluída 100 vezes em meio 2xTY (bacto-triptona 1,6%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,5%, pH 7,0), contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) até $\text{D.O.}_{\lambda 600\text{nm}} = 0,1$, e novamente submetida a crescimento nas mesmas condições até fase $\log \text{D.O.}_{\lambda 600\text{nm}} = 0,4-0,6$. A cultura foi então induzida com 1 mM de IPTG (Sigma®) por 4 h.

Após esse período, a cultura foi centrifugada a 8.000 rpm, por 10 min a 4 °C. As células sedimentadas foram lisadas com Reagente de lise celular (Fast Break) 10X (Promega®) com 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ lisozima (Sigma®); 2 U DNase e 2 mM de inibidor de protease (Sigma®), em temperatura ambiente a 50 rpm por 40 min. Após, realizou-se uma nova centrifugação a 8.000 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante da lise foi transferido para uma coluna contendo resina de níquel-Sepharose (GE Healthcare®), previamente equilibrada com tampão fosfato (20 mM pH 7,4 e 500 mM de NaCl) para purificação da proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade (protocolo do fabricante). As proteínas adsorvidas foram eluídas com tampão fosfato contendo 500 mM de imidazol. A eluição da proteína purificada foi analisada por eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecilsulfato de sódio a 9% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

5.5 Gel de atividade PAGE

Para a análise qualitativa da atividade da celulase foi utilizado um gel em condições não desnaturantes PAGE 10% (Davis, 1964). Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma solução contendo substrato carboximetilcelulose (CMC) (Sigma®) 1%

(p/v) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 e incubado a 50 °C durante 2 h. O gel foi corado com solução de vermelho Congo 0,02% durante 20 min e descorado com NaCl 2%. A atividade da celulase foi observada como uma zona clara contra o fundo vermelho. Em seguida, a proteína purificada foi submetida à caracterização bioquímica.

5.6 Dosagem de proteínas e atividade enzimática

As concentrações de proteína foram medidas usando o reagente de Bradford, que utiliza como padrão a albumina de soro bovino (BSA – Bio-Rad®) de 0 - 20 mg.mL⁻¹ (Bradford, 1976). As reações para verificar a atividade da celulase foram realizadas utilizando CMC 1% (p/v) em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,5) como substrato, seguido de incubação a 40 °C por 10 min. Os açúcares redutores foram medidos utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A atividade da celulase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por mL por min nas condições do ensaio (U.mL⁻¹).

5.7 O efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da CelA

Após a determinação do pH ótimo e a estabilidade ao pH, a celulase purificada foi incubada em tampão McIlvaine entre os pHs 4 – 8, a estabilidade seguiu-se pela incubação a 4 °C por 24 h. Em ambos ensaios, a atividade da proteína foi verificada de acordo com o protocolo padrão (item 2.6), porém a 50°C.

Para determinar a temperatura ótima, alíquotas da proteína purificada foram incubadas em várias temperaturas (20-80 °C), e a atividade celulásica foi testada no pH ótimo. Para o efeito de termoestabilidade, a celulase foi incubada em seu pH ótimo, encontrado nas três melhores temperaturas definidas previamente no ensaio de temperatura ótima, sendo 35, 40 e 45 °C, durante 240 min. A atividade foi mensurada a cada 30 min e a atividade da proteína foi verificada de acordo com o protocolo padrão (item 2.6). Os ensaios de pH e a temperatura ótimos foram expressos como a atividade relativa à maior atividade encontrada (100%). A estabilidade ao pH e a termoestabilidade foram expressas em atividade enzimática residual.

5.8 Especificidade ao substrato

A atividade CMCase foi estimada incubando a celulase purificada em CMC 1% (p/v) e a atividade Avicelase em avicel (Sigma ®) 1% (p/v), em tampão citrato de sódio, 50 mM, pH 5,5 a 40 °C durante 10 min. A atividade do papel de filtro (FPase) foi determinada medindo os açúcares redutores produzidos a partir da incubação da enzima purificada em papel de filtro do tipo Whatman nº 1 (0,5 × 0,5 cm; ~10mg), imersos em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, durante dois períodos de tempo: 10 min e 1 h. Essa metodologia seguiu protocolo adaptado de Ghose (1987). A atividade da celulase foi determinada por método padrão (item 2.6), e a maior atividade foi expressa em atividade relativa definida como 100%.

5.9 Efeito de diferentes compostos na atividade de CelA

O efeito de diferentes compostos sobre a atividade da celulase foi realizado diluindo a enzima na presença dos seguintes compostos: $MnCl_2$, $SnCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$, Fe_2Cl_3 , $CaCl_2$, $MgCl_2$, KCl , NH_4NO_3 , $PbCl_2$, $CuSO_4$, $EDTA$, $AgNO_3$, $HgCl_2$ e DTT , na concentração de 2 mM, seguido de incubação por 15 min a 4 °C. Após incubação, realizou-se o ensaio da atividade enzimática nas condições ótimas pelo ensaio padrão (item 2.6). Os resultados foram expressos em atividade residual comparada com o controle, sendo a ausência dos compostos.

5.10 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da CelA recombinante foram determinados ao analisar o efeito do substrato CMC na ação da enzima com e sem a presença de $MnCl_2$ [5 mM], variando as concentrações de CMC de 0,05 a 40 $mg \cdot mL^{-1}$ em tampão citrato de sódio pH 5,5 a 40 °C por 10 min, seguido pela dosagem padrão (item 2.6). Os parâmetros cinéticos, como a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a taxa máxima de reação (V_{Max}), foram calculados pelo método do duplo recíproco (Lineweaver e Burk, 1934) e também o número de renovação (K_{cat}).

5.11 Hidrólise de diferentes fontes de carbono pela enzima CelA de *C. crescentus*

A hidrólise dos resíduos utilizando a enzima celulase foi conduzida com os mesmos resíduos descritos no ensaio de indução do gene *celA* de *C. crescentus*, sendo a palha de milho e sabugo de milho e preparados, pesados e esterilizados, conforme metodologia já descrita (item 2.2), na concentração de 2% (p/v) em água ultrapura. Em seguida, os resíduos foram diluídos para a concentração final de 1% (p/v) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,5 e adicionou-se 1 U.mL⁻¹ de celulase purificada, incubando durante 24 h a 40 °C. As coletas foram realizadas nos tempos de incubação de 1, 4, 12 e 24 h. Durante o ensaio foi desconsiderada a quantidade de açúcar já presente no resíduo (de forma natural ou que foi gerada em decorrência da esterilização), pela normalização ao controle sem a adição da enzima.

5.12 Análise estatística

Para evitar a inconsistência das análises, todos os ensaios foram realizados em triplicatas, cujas réplicas foram utilizadas para validar os dados. Os dados obtidos para o efeito de diferentes substratos na produção de celulase por *C. crescentus* e dados obtidos na degradação dos resíduos palha de milho e sabugo de milho, pela celulase purificada, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à comparação múltipla das médias, pelo teste *post hoc* de Tukey, com 95% de significância, com auxílio do *software* estatístico R (R Development Core Team, 2018).

6 RESULTADOS

6.1 Efeito de substratos na produção de celulase por *Caulobacter crescentus*

Com o objetivo de verificar se resíduos agroindustriais são capazes de induzir a atividade celulásica em *C. crescentus*, células de bacterianas foram crescidas em meio mínimo M2 contendo 1% (p/v) de palha de milho (PM) ou sabugo de milho (SM) como fonte de carbono e as atividades celulásicas determinadas. Uma maior atividade foi obtida na presença de PM (Figura 1). No tempo de 6 h os açúcares oriundos do M2 e dos resíduos, supõe-se que não foram completamente consumidos pela bactéria, por isso, a atividade celulásica na PM e SM ($0,54$ e $0,45$ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente) foi baixa nas horas iniciais do ensaio. A produção global de celulase extracelular foi maior com a PM ($6,44$ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) seguido pelo SM ($1,81$ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), no tempo de 18 h. Após este período, a produção de celulase ainda manteve-se relativamente alta na PM, quando comparada à produção no SM, com $5,9$ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, $4,54$ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $3,85$ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, em 24, 30 e 48 h, respectivamente, enquanto o SM apresentou uma queda significativa, mantendo a atividade praticamente nula ($0,32$ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), até as 48 h de ensaio (Figura 1).

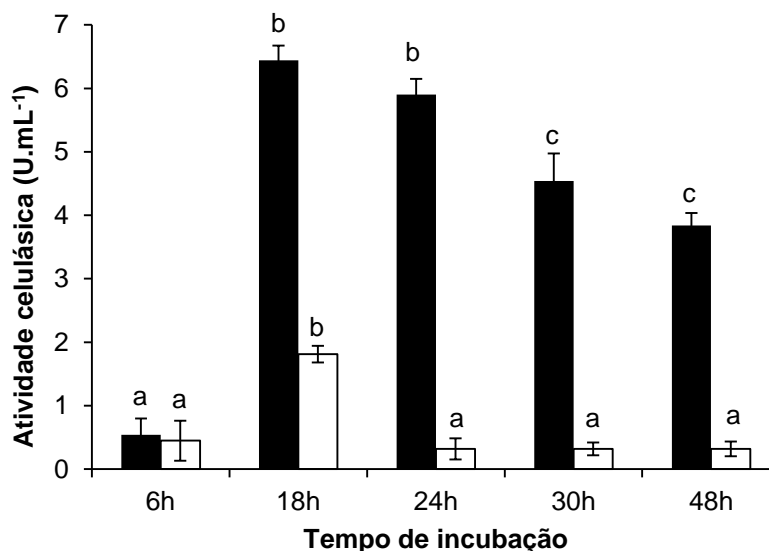


Figura 1 Produção de celulase por *C. crescentus* (NA1000) na presença de palha de milho (barras pretas) e sabugo de milho (barras brancas). Células em fase estacionária de *C. crescentus* diluídas para $\text{D.O.}_{\lambda=600\text{nm}}$ de 0,150 e crescidas a 30°C durante 48 h sob agitação a 120 rpm em meio mínimo (M2) suplementado com 0,2% de glicose e PM e SM. Nos tempos indicados, alíquotas do sobrenadante da cultura foram coletadas e usadas para dosagem de atividade celulásica. As letras representam as diferenças significativas no teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$) entre os tempos em cada variável substrato, individualmente.

A maior atividade celulásica foi verificada nos tempos de 18 e 24 h na presença de PM. Embora as médias de atividades tenham se apresentado estatisticamente iguais (ANOVA – $p > 0,05$), observa-se que existe uma tendência de queda entre os tempos analisados, reduzindo progressivamente. Observou-se ainda, que a partir do tempo de 30 h a produção de celulase decaiu na presença da PM, porém, manteve-se com médias estatisticamente iguais ($p > 0,05$), até às 48 h de ensaio. Entretanto, na presença de SM houve uma indução claramente transitória de atividade celulásica, tendo um pico de produção em 18 horas de incubação, seguido de uma queda drástica após esse período, sendo destacado no gráfico entre 24 a 48 horas, tempos nos quais as médias de atividades foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) ao tempo de 6 h (Figura 1).

6.2 Clonagem, expressão e purificação do gene *celA*

O fragmento de DNA de 1.878 pb (aproximadamente 1,9 kb), correspondente ao gene *celA* que codifica a Celulase (Cela) de *C. crescentus* (NA1000), foi amplificado por PCR utilizando o DNA genômico extraído da *C. crescentus* e os primers *celA*-Met/*Bam*HI e *celA*-Stop/*Hind*III. O produto de PCR gerado foi digerido e ligado nos sítios *Bam*HI/*Hind*III do vetor de expressão pTrcHisA, o qual forneceu uma fusão de tradução com uma cauda de 6 histidinas amino-terminais. A confirmação da clonagem foi realizada pela digestão com as mesmas enzimas de restrição *Bam*HI/*Hind*III e os produtos de digestão resolvidos em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Figura 2, canaleta 2).

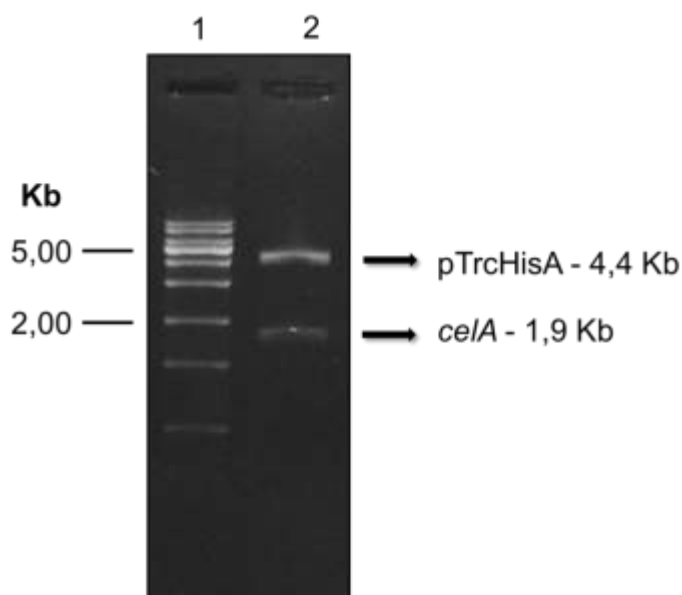


Figura 2 Eletroforese em gel de agarose evidenciando a clonagem do gene *celA* de *C. crescentus* no vetor de expressão pTrcHisA digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Hind*III, resolvido em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético glacial, EDTA), visualizado em transiluminador UV. (1) Marcador de peso molecular 1Kb DNA *ladder* (GE); (2) Confirmação da subclonagem do gene *celA* após a digestão do DNA plasmidial na orientação *Bam*HI/*Hind*III, que gerou um fragmento de DNA com 4,4 Kb correspondente ao plasmídeo pTrcHisA e outra banda de 1,9 Kb correspondente ao gene *celA*.

A construção recombinante pTrcHisA-*celA* foi sequenciada e a proteína predita apresentou 99% de identidade com a glico-hidrolase da família GH 9 de *C. crescentus*, uma celulase (E.C. 3.2.1.4) (KEGG database CCNA: 02310), que codifica 625 aminoácidos e leva a produção de uma estrutura enzimática de aproximadamente 73 kDa. A partir da análise dos domínios conservados da proteína predita, verificou-se que CelA possui um domínio para imunoglobulina na região N-terminal (*Ig*-like) e um domínio para celulase (CelD_N) comuns nas endoglucanases da família GH9. Em adição, a enzima possui ainda um domínio da superfamília 9 de glico-hidrolases e um domínio específico para endoglucanase (Figura 3).

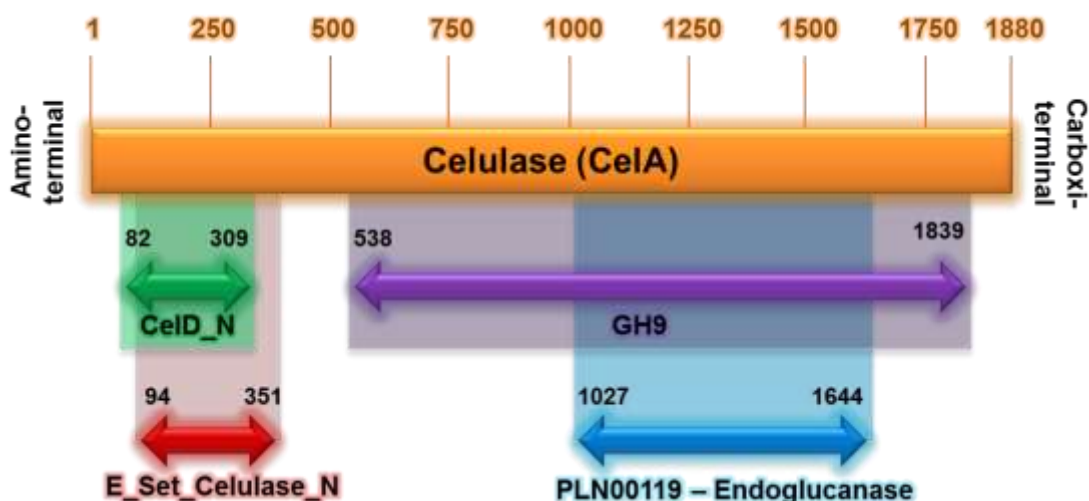


Figura 3 Representação esquemática da proteína CelA de *C. crescentus* predita, codificada pelo gene *celA* contendo 1878 aminoácidos. CelD_N representa um domínio *Ig*-like (imunoglobulina) na região N-terminal associado ao domínio de celulase, o qual não tem função definida, mas geralmente está associado à estabilidade da melhor conformação enzimática. O domínio E_Set_Celulase_N, está associado ao domínio catalítico de celulase na região N-terminal. O domínio GH 9 corresponde ao da família 9 das glico-hidrolases de acordo com o CAZy e o PLN00119, se refere ao domínio para endoglucanase.

Os extratos celulares obtidos nos tempos de 0 e 4 h de indução com IPTG (1 mM), foram analisados por eletroforese em gel SDS-PAGE 9% (Figura 4, canaletas 2 e 3). A banda majoritária correspondente à proteína purificada foi revelada no gel de eletroforese com uma massa molecular de 73 kDa (Figura 4, canaletas 4). A função biológica da proteína CelA foi analisada em gel de atividade, em condições não desnaturantes-PAGE, incubando o gel contendo CMC 1% (p/v), 5 U.mL⁻¹ de enzima em tampão citrato de sódio 50mM, pH 5,0 a 50 °C durante 2 h. O gel foi corado com vermelho de Congo 0,02% (Figura 4, canaletas 5), em uma única banda com atividade celulásica evidenciada.

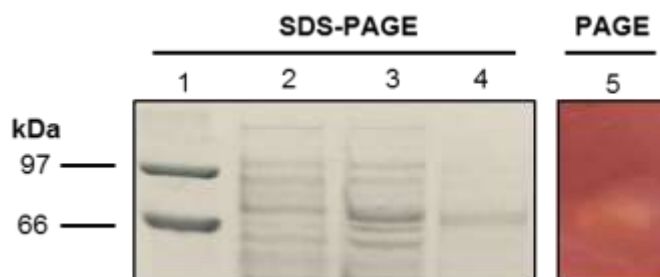


Figura 4 Gel de eletroforese SDS – PAGE 9%, mostrando as etapas de indução e purificação da CelA recombinante de *C. crescentus* e PAGE 10% mostrando a atividade celulásica. (1) Marcador de peso molecular para proteínas (GE); (2) Proteínas totais de *E.coli* (DH5 α), contendo a construção pTrcHisA-*celA* na ausência de IPTG; (3) 1 mM de IPTG, após 4 h de indução a 37 °C; (4) CelA purificada da resina de níquel-Sepharose com tampão fosfato (20 mM), contendo imidazol (500 mM); (5) Gel não desnaturante (PAGE 10%), mostrando a atividade celulásica da CelA recombinante.

As etapas de purificação com o substrato CMC 1% para o extrato bruto e a enzima purificada estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1 Purificação da celulase de *C. crescentus*, utilizando o substrato CMC 1%, em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5 a 50 °C

Purificação	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)*	Fator de purificação (x)
Extrato bruto	50	165	170	1,03	100	1
Enzima Purificada	4	7,80	17,88	2,29	10,52	2,22

Nota: * Recuperação da atividade enzimática: (atividade enzimática recuperada/atividade enzimática inicial) *100.

6.3 Caracterização bioquímica da proteína recombinante CelA

6.3.1 Determinação de pH e temperatura

O pH ótimo para a CelA pura de *C. crescentus* foi 5,5 (Figura 5A). O ensaio para o teste da estabilidade da CelA frente aos diferentes pHs testados (Figura 5B), mostrou que a atividade celulásica residual diminuiu cerca de 60% em pH 5,5 após 24 h de incubação. Em adição, CelA mostrou uma maior estabilidade em pH 6,0. A proteína predita a partir do gene *celA* apresenta ponto isoelétrico teórico (pI) de 6,0 (isoelectric.ovh.org).

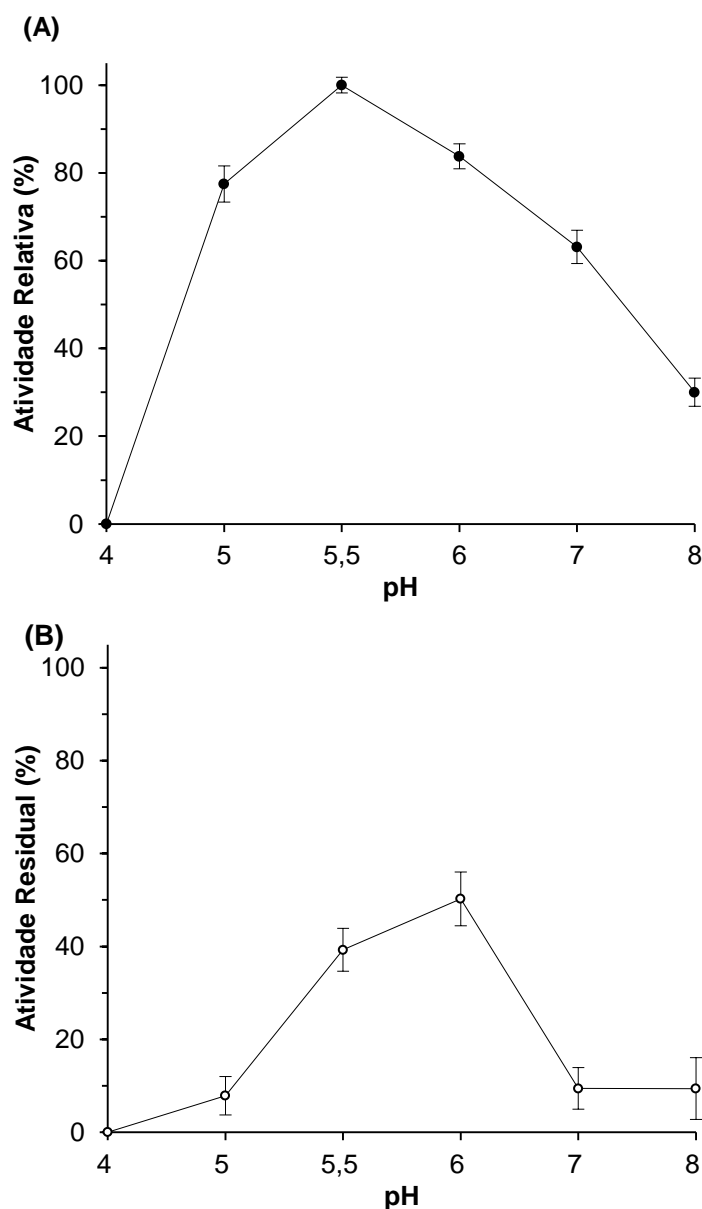


Figura 5 pH ótimo e efeito do pH na atividade CelA de *C. crescentus*. (A) pH ótimo e (B) estabilidade ao pH em vários valores de pH. A atividade celulásica foi verificada incubando-se a CelA pura com CMC 1% em tampão McIlvaine em diferentes pH (4-8) durante 10 min a 50 °C. Paralelamente, alíquotas da enzima purificada foram incubadas a 4 °C por 24 h nos mesmos tampões. Em seguida, a atividade da celulase foi novamente mensurada para cálculo de estabilidade. A atividade enzimática para o pH ótimo foi expressa em porcentagem (atividade relativa) considerando o pH 5,5 como 100%. A estabilidade em diferentes pH foi expressa como a atividade residual tendo como referência o valor da atividade enzimática obtida em tempo de incubação zero.

A temperatura ótima da proteína recombinante foi 40 °C (Figura 6A). Porém, reteve mais que 50% da atividade celulásica em uma ampla faixa de temperatura, entre 30 a 50 °C.

A celulase recombinante apresentou maior estabilidade térmica a 35 °C, temperatura na qual perdeu menos que 20% da atividade até 240 min de incubação. Em 40 °C, a enzima manteve 50% de sua atividade nos 60 min iniciais de ensaio e em 45 °C a enzima perdeu 60% da sua atividade nos primeiros 30 min de incubação (Figura 6B).

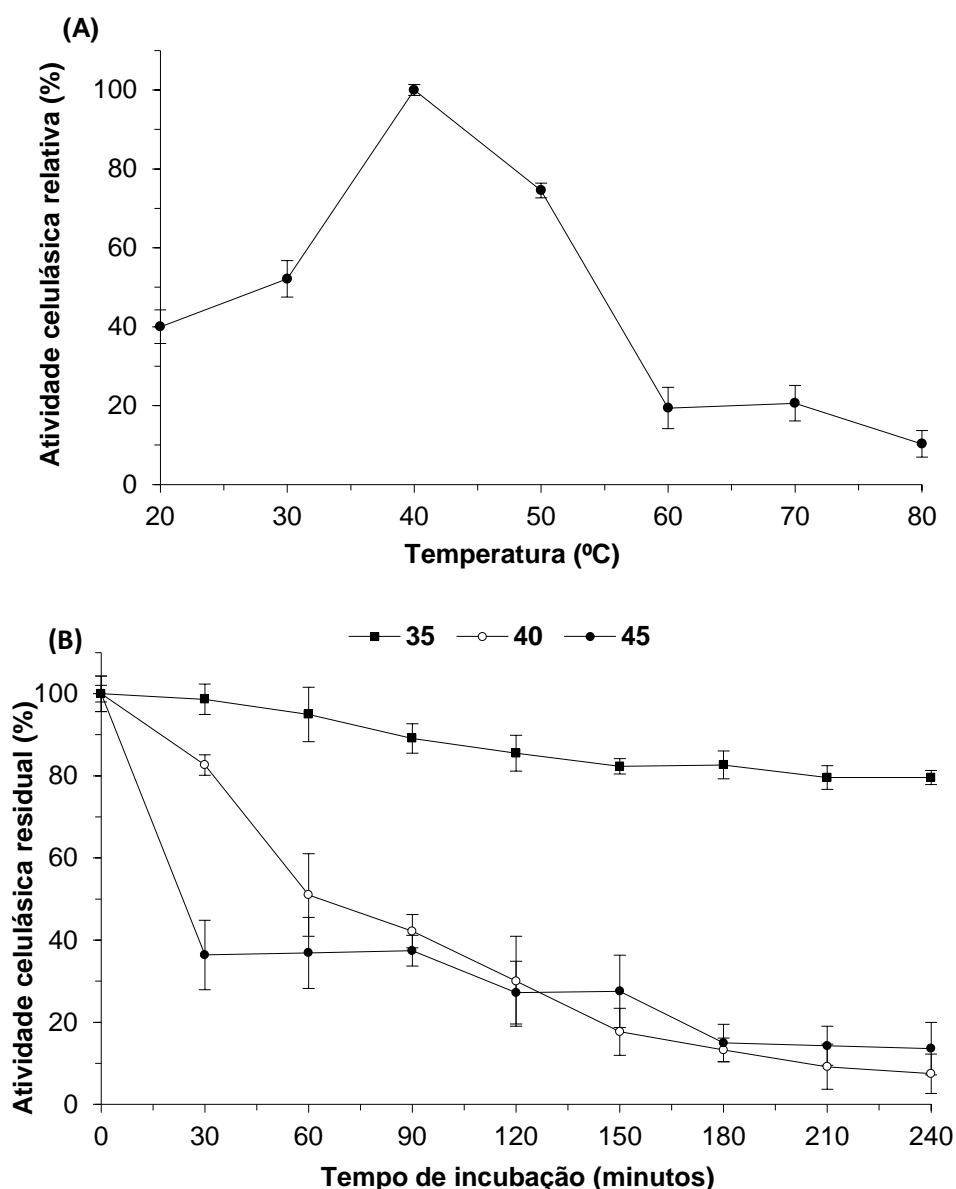


Figura 6 Avaliação da atividade de CelA em diferentes temperaturas de incubação. (A) A CelA foi incubada nas temperaturas 20 a 80 °C por 10 min, e sua atividade mensurada no pH ótimo a 40 °C na presença do substrato CMC a 1% (p/v). (B) O teste de estabilidade térmica foi conduzido nas três melhores temperaturas determinados no ensaio de temperatura ótima. As temperaturas foram 35 °C (quadrado fechado), 40 °C (círculo aberto) e 45 °C (círculo fechado). Os dados apresentados em A e B são representativos de experimentos independentes, e os erros padrão são mostrados como barras verticais.

6.3.2 Especificidade ao substrato

A fim de avaliar a especificidade ao substrato da CelA, a enzima foi incubada com diferentes substratos e a atividade celulásica estimada (Tabela 2). A maior atividade

celulásica obtida foi na presença de 1% (p/v) CMC e os valores considerados como 100%. Na presença de Avicel[®], a enzima apresentou uma atividade de 37% e, para o papel de filtro, durante 10 min e 1 hora, a atividade foi 5% e 2%, respectivamente.

Tabela 2 Especificidade ao substrato pela CelA, em contato com CMC, avicel e papel de filtro

Susbratos	Atividade relativa (%)
CMC	100 ± 0,54
Avicel [®]	37 ± 0,61
Papel de Filtro 10min	5 ± 3,96
Papel de Filtro 1h	2 ± 1,71

6.3.3 Efeito de compostos

O efeito dos diferentes compostos na atividade celulásica da CelA de *C. crescentus* foi mensurado, na concentração de 2 mM e os valores de atividades estão expressos na Tabela 3. Na presença do íon Mn^{2+} , a enzima apresentou um forte aumento na atividade de 170%, comparado ao controle sem a presença do íon (100%). Os íons bivalentes Sn^{2+} , Co^{2+} e o agente redutor DTT também apresentaram significativa ativação da celulase. Os íons Hg^{2+} e Ag^{3+} atuaram como fortes inibidores enzimáticos, retendo cerca de 50 e 40% da atividade da enzima, respectivamente.

Tabela 3 Efeito de diferentes compostos na a atividade da CelA

Compostos (2mM)	Atividade residual (%) ^a
Controle	100 ± 2,42
$MnCl_2$	170 ± 2,84
$SnCl_2$	149 ± 1,31
$CoCl_2$	146 ± 1,42
DTT	145 ± 1,31
$BaCl_2$	109 ± 2,31
Fe_2Cl_3	98 ± 0,96
$CaCl_2$	96 ± 3,25
$MgCl_2$	95 ± 3,12
KCl	93 ± 2,04
NH_4NO_3	90 ± 3,75
$PbCl_2$	88 ± 2,01
$CuSO_4$	73 ± 3,05
EDTA	71 ± 3,73
$AgNO_3$	62 ± 1,88
$HgCl_2$	51 ± 0,83

Nota: ^a Os resultados foram expressos como a atividade residual considerando o valor obtido no controle como 100%.

O resultado sugere que MnCl_2 apresentou maior afinidade com o sítio catalítico da enzima. Assim, foi realizado o ensaio para definir qual a concentração do íon (1, 5 e 10 mM) que melhor induz a enzima em suas condições otimizadas, utilizando CMC 1% como substrato. A celulase apresentou atividade relativa de 148% na presença do MnCl_2 na concentração de 1 mM, 248% em 5 mM e 209% em 10 mM quando comparados ao controle sem o íon (atividade residual 100%). Assim, na presença de 5mM de MnCl_2 houve um aumento de quase 2,5 vezes na atividade da CelA, sendo essa concentração a usada para análise dos parâmetros cinéticos posteriores.

6.3.4 Constante cinética para a celulase CelA

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada para a CelA sem adição de íon na presença do substrato CMC (0,05 a 40 mg.mL^{-1}), os valores obtidos nos ensaios foram: K_M de 0,66 mg.mL^{-1} , V_{Max} de 2,41 U.mg.min^{-1} e um K_{cat} de 2,94 s^{-1} . Os dados cinéticos também foram averiguados na presença do substrato CMC (0,05 a 40 mg.mL^{-1}), associado ao MnCl_2 (5 mM), e os resultados foram: K_M e V_{Max} de 1,20 mg.mL^{-1} e 3,11 U.mg.min^{-1} , respectivamente, e um K_{cat} de 3,78 s^{-1} . Essa comparação está detalhada na Tabela 4.

Tabela 4 Constantes cinéticas da CelA recombinante de *C. crescentus* na presença e ausência de MnCl_2 (5 mM)

Substrato	K_M (mg.mL^{-1})	V_{Max} (U.mg.mL^{-1})	K_{Cat} (s^{-1})
CMC	0,66	2,41	2,94
CMC+ MnCl_2	1,20	3,11	3,78

6.3.5 Hidrólise dos resíduos PM e SM

A hidrólise dos resíduos agroindustriais pela CelA pura foi mais eficiente usando PM como substrato (Figura 7). Ao longo deste ensaio, a enzima atuou de forma eficiente a 40 °C, em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5. Em 1 h, a enzima hidrolisou a PM e produziu 1,69 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de açúcar redutor, enquanto em SM CelA hidrolisou 8,5 vezes menos, ou seja 0,20 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Em 24 horas, a produção de açúcar redutor a partir da PM foi de 2,62 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, 2,5 vezes superior do que na presença de SM, em que a liberação de açúcar redutor foi de 1,02 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Observa-se ainda que a hidrólise inicial da PM em 1 h (1,69 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$) foi maior que a hidrólise a partir do SM em 24h (1,02 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de açúcar

reductor). A incubação com a enzima por um período prolongado foi eficiente para ambos os substratos hidrolisados, embora os níveis de açúcares redutores liberados tenham sido superiores na presença de PM do que em SM.

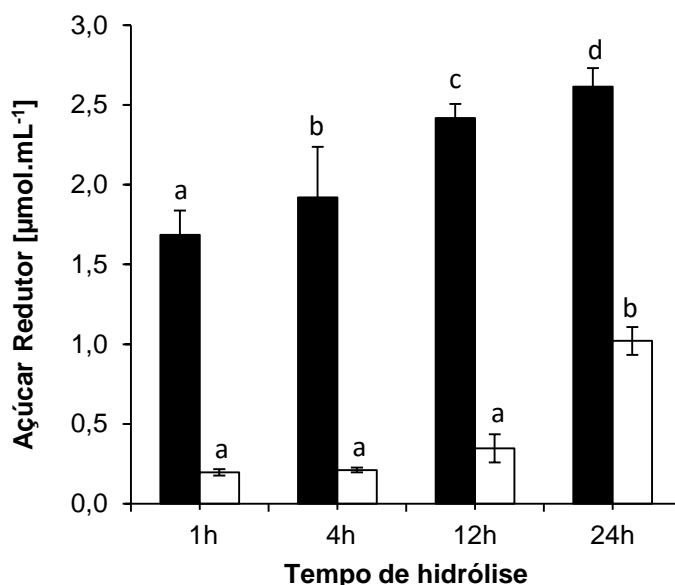


Figura 7 Hidrólise do resíduo da palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM) pela ação da enzima recombinante CelA de *C. crescentus*. Palha de milho (barras pretas) e sabugo de milho (barras brancas) (1% p/v, em pH 5,5) foram incubados por 24 h a 40 °C com a CelA purificada. Amostras da reação foram coletadas e utilizadas para a determinação de açúcares redutores nos tempos de 1, 4, 12 e 24 horas de incubação. Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes e o erro padrão é demonstrado como barras verticais. As letras representam a diferença entre os tempos de cada grupo de substrato, entre si ($p < 0,05$).

Houve diferença significativa entre os tempos no substrato PM, em que a concentração de açúcar redutor aumentou de forma crescente até as 24 horas de ensaio (ANOVA - $p < 0,05$). Para o substrato SM não houve diferença estatística na concentração de açúcar redutor produzida ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) até as 12 h de ensaio ($p > 0,05$), entretanto, o tempo de 24 h teve hidrólise estatisticamente maior ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

A produção de celulase por *C. crescentus*, o que é esperado, tem expressão celulásica constitutiva nas diferentes fontes de carbono na presença de glicose. Porém, a atividade enzimática foi induzida na presença de PM (Figura 1) em todos os tempos analisados. Dados similares foram obtidos para uma xilanase (*xynA1*) da mesma cepa de *C. crescentus*, no estudo de Graciano et al. (2015). Neste trabalho, a produção global de xilanase extracelular por *C. crescentus* na hemicelulose da palha de milho hidrolisada, seguido pela palha de milho bruta, foi de 5,60 U.mL⁻¹ e 3,53 U.mL⁻¹, respectivamente, em 12 h.

No presente estudo, nas 6 h iniciais de ensaio, a produção de celulase foi menor para ambos os substratos e, como o crescimento da *C. crescentus* é lento, é possível que a glicose residual proveniente do meio mínimo ainda não tenha sido completamente consumida, que é uma fonte de carbono preferível pela bactéria neste estágio de crescimento (fase log) (Madigan et al., 2016). Nessa fase, a bactéria consome primeiramente a glicose, a qual é mais acessível, produzindo pequenas quantidades de celulase na PM e no SM: 0,54 e 0,45 U.mL⁻¹, respectivamente. Esse resultado corrobora o que foi alcançado por Song et al. (2013), em que constataram que as atividades enzimáticas da exoglucanase, β -1,4-glicosidase e endoglucanase, produzidas pela linhagem FMC1 de *Caulobacter* sp., foram muito baixas com o uso de glicose como fonte de carbono (Figura 1).

No tempo de 18 h de ensaio, a atividade celulásica (U.mL⁻¹) foi alta tanto para o SM quanto para a PM. Na PM, a atividade celulásica se manteve praticamente constante até as 48 h de incubação (Figura 1).

A PM é um substrato melhor do que o SM para a indução de celulase por *C. crescentus*, provavelmente pelo fato da PM ser mais acessível, ou seja, por apresentar baixos níveis de lignina (3-13%) (Limayem e Ricke, 2012), enquanto o SM possui uma maior quantidade de lignina, variando de 15% (Gomes et al., 2015) até 16-18% (Wang et al., 2011), dependendo da origem do cultivar. No geral, a PM é uma fonte de carbono preferível pela bactéria, tanto para indução de enzimas do complexo xilanolítico como já destacado por Graciano et al. (2015) e também, como observado neste estudo, para a produção de celulase.

Ainda, no estudo de Song et al. (2013), na linhagem bacteriana FMC1 de *Caulobacter* sp., sob condições aeróbicas e anaeróbicas, a cepa foi capaz de induzir exoglucanase, endoglucanase e β -1,4-glicosidase em diferentes fontes de carbono, sendo celobiose e celulose. Ao mesmo tempo, o etanol foi produzido como o principal produto fermentativo, utilizando a celulose em condições anaeróbicas. Confirmando, assim, que a

bactéria possui habilidades de degradação da celulose por meio de expressão de celulase, podendo ser um microrganismo interessante para produção de açúcares fermentescíveis.

Considerando o potencial industrial das xilanases e celulases, um importante aspecto da pesquisa com essas enzimas envolve a sua produção em larga escala a um baixo custo (Ahmed et al., 2003). Do ponto de vista biotecnológico, é importante utilizar resíduos agroindustriais, que podem ser empregados para produção de celulase, com bom custo-benefício para bioconversão de biomassa lignocelulósica. Uma vez que, esses são substratos baratos, acessíveis e rentáveis se aproveitados com eficiência.

Outros trabalhos também foram desenvolvidos utilizando resíduos agroindustriais para indução de celulases em bactérias, como no trabalho de Kazeem et al. (2017), que induziu a produção de celulase da cepa bacteriana de *Bacillus licheniformis*, 2D55, em diferentes fontes de carbono: palha de arroz, casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e cacho de frutas. Outra cepa da mesma bactéria, MTCC 429, utilizou o bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a produção de enzimas celulases (Kumaran et al., 2015). Além dessas, a cepa HTA426 de *Geobacillus* sp. pode produzir celulase, quando cultivada em várias fontes de biomassa lignocelulósica como palha de arroz, bagaço de cana e aguapé (Potprommanee et al., 2017).

As GHs são classificadas em grupos de acordo com seu sequenciamento. Na família GH9, existem dois subgrupos: E1 e E2, e a estrutura dos membros de cada subgrupo indicaram que os pertencentes ao subgrupo E1 contêm módulo imunoglobulina (*Ig*) N-terminal, seguido por um DC, enquanto membros do subgrupo E2 não possuem (Eckert et al., 2002).

O domínio N-terminal da celulase visualizado na Figura 3 pode estar relacionado com as superfamílias da imunoglobulina (*Ig-like*) e/ou fibronectina do tipo III (*Fn3-like*). O domínio *Fn3-like* foi destacado no trabalho de Justo et al. (2015), para o gene *xynB5* de *C. crescentus*, que pode estar relacionado com a estabilidade térmica da proteína. Esses domínios estão associados a diferentes tipos de domínios catalíticos na extremidade N-terminal ou C-terminal e podem estar envolvidos em interações homodiméricas/tetraméricas/dodecaméricas (Domań-Pytka e Bardowski, 2004; Hildén e Johansson, 2004; Lee et al., 2002; Oslancová e S.Janecek, 2002; Park et al., 2002).

Domínios conservados da celulase na Figura 3, demonstraram que a enzima possui um domínio *Ig-like* na região N-terminal (formalmente conhecido como *CelD_N*), seguido por um domínio de GH 9. Semelhante ao gene *celA* em estudo, o gene *Cel9A* da bactéria termoácida *Alicyclobacillus acidocaldarius*, pertencente também à família GH 9, possui um domínio *Ig-like* na região N-terminal como o *CelD*, confirmado no estudo de Eckert et al. (2003). O domínio *Ig-like* auxilia geralmente, nas reações de hidrólise de substratos insolúveis, e a influência deste domínio na estabilidade enzimática e atividade de proteínas, têm sido ilustradas principalmente em hidrolases de celulose (Cheng et al., 2013).

Liu et al. (2010) destacaram que a função do domínio *Ig-like* não é bem definida e ele pode não estar diretamente envolvido na ligação ao carboidrato ou na biocatálise, no entanto, em estudo com o mesmo gene *Cel9A* de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, alguns dos resultados encontrados foi que a eliminação desse domínio diminui significativamente a expressão da proteína recombinante e promove a perda de atividade enzimática. Assim, a importância deste módulo é garantir que o domínio catalítico esteja conservado, auxiliando na manutenção e orientação do sítio ativo da enzima (Liu et al., 2010). Da mesma forma, Kataeva et al. (2004) confirmaram que os módulos *Ig-like* e GH 9 de uma celobiohidrolase (*CbhA*) de *Clostridium thermocellum* interagem e essas interações afetam a dobra final e a estabilidade de cada módulo, e que mutações de um ou dois resíduos de aminoácidos levaram à desestabilização e alteração do mecanismo de estabilidade térmica dos polipeptídeos da proteína.

Por outro lado, outro trabalho com o gene *Cel9A* de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, indicou que a exclusão deste domínio causa aumento simultâneo na estabilidade e na atividade da enzima truncada (Younesi et al., 2016). Estudo recente, com esse gene, também demonstrou que sua estabilidade e estrutura são dependentes do cálcio e a deleção desse domínio torna a sua estabilidade independente do metal (Pazhang et al., 2018).

O módulo *Ig-like* possui diferentes papéis, tanto na estabilidade como na conformação do sítio catalítico da enzima, e por isso, é um domínio pouco conhecido sem uma função específica definida. Porém, geralmente está associado à conformação enzimática e seus domínios. Nesse sentido, a compreensão sobre as relações entre módulos e os domínios catalítico e não catalítico das enzimas, podem fornecer informações que possibilitam uma abordagem racional, a fim de modificar as características de uma enzima para aplicação industrial (Cheng et al., 2013).

Os valores de pH para a reação enzimática, de um modo geral, sugerem que a *CelA* é mais sensível a pH alcalino do que ácido, perdendo atividade rapidamente acima de pH 6. Esse dado está de acordo com o encontrado no estudo de Scapin et al. (2017), que obtiveram um pH ótimo entre 5,5 e 7,0, para o produto do gene *AfmE1*, uma endocelulase da bactéria *Raoultella ornithinolytica*. O pH e pI da *CelA* de *C. crescentus* foram levemente ácidos, também similares às características da endocelulase de *Clostridium thermocellum*, que possui um pI de 6,72 que, por sua vez, também apresenta outras características similares, como peso de 83-94 kDa e pH ótimo em 5,2 (Ng e Zeikus, 1981).

A propriedade de atuar em pHs ácidos de algumas celulasas têm um importante papel em determinadas aplicações biotecnológicas, por exemplo, celulasas ácidas podem ser usadas como suplemento na alimentação animal, aumentando a performance digestiva (Teng et al., 2010). Ainda, no processamento da celulose para produção de etanol, a biomassa é pré-tratada, utilizando ácidos a altas temperaturas e, em seguida, celulasas ácidas podem simplificar a reação do processo e reduzir os custos de produção (Huang et

al., 2005). Outra aplicação de celulases ácidas está no processo de biopolimento de tecidos um processo industrial conduzido em pH 4,5 - 5,5 (Šimić et al., 2015).

A termoestabilidade apresentada para a celulase purificada no presente trabalho, também foi observada para β -xilosidase I (*xynB1*) de *C. crescentus* (NA1000), que apresentou uma temperatura de atuação de 45 °C (Graciano et al., 2012). De acordo com Zafar et al. (2014), celulases em geral apresentam temperatura ótima entre 30 e 55 °C.

A temperatura de atuação da enzima CelA de *C. crescentus* pode ser justificada devido a bactéria ser um microrganismo aquático, apresentando uma temperatura de crescimento de 30 °C, que impossibilita sua sobrevivência em ambientes com temperaturas elevadas.

O ensaio de estabilidade térmica da CelA de *C. crescentus* mostrou que enzima apresenta meia vida de 1 hora em temperatura 40 °C. Os dados de termoestabilidade são similares aos verificados no estudo de Zafar et al. (2014), em que a celulase recombinante de *Bacillus subtilis* se mostrou estável entre as temperaturas de 30 e 40 °C. Li et al. (2006) também relatam que a celulase (*Ba*-EGA) de *Bacillus* sp.AC-1 é estável a 30 °C. A termoestabilidade é um critério importante para a seleção de enzimas, especialmente celulases e hemicelulases com potencial para aplicações biotecnológicas (Kaur et al., 2007). Assim, esse resultado é interessante para aplicações industriais que não necessitam altas temperaturas e pouco tempo de reação, possibilitando assim, economia de energia. Como no caso de processamento têxtil, em que as etapas de biopolimento requerem temperaturas entre 40–55 °C, por um período de 30 a 60 min (Šimić et al., 2015).

A especificidade ao substrato da celulase foi encontrada para o substrato CMC. O CMC é uma forma solúvel de celulose amorfa, um excelente substrato para testar a atividade de enzimas celulolíticas (Estela e Luis, 2013). Assim, a capacidade da proteína recombinante para hidrolisar substrato contendo celulose amorfa, como o CMC, confirma que a enzima purificada é uma CMCase preponderante, assim como o observado para a celulase de *Bacillus subtilis* UMC7 (Chuan Wei et al., 2015). A CelA de *C. crescentus* mostrou pouca ou nenhuma capacidade de hidrólise contra substratos cristalinos de avicel e papel de filtro (10 min e 1 h), apresentando menos da metade da atividade (37; 5 e 2%, respectivamente) verificada na presença de CMC. Esses resultados são consistentes com o trabalho de Yin et al. (2010), em que os autores confirmaram que a celulase purificada de *Bacillus subtilis* YJ1 tem atividade CMCase preponderante, pois não obteve valores significativos de hidrólise para avicel e papel de filtro, sendo 34% e 5% de atividade relativa, respectivamente. Tais valores estão de acordo com os resultados encontrados neste estudo.

No geral, o avicel é representado pela celulose cristalina, sendo amplamente utilizado para ensaio de atividade exoglucanase, pois possui baixo grau de polimerização e acessibilidade relativamente baixa. Entretanto, algumas endoglucanases podem liberar açúcares redutores utilizando o substrato avicel (Estela e Luis, 2013).

A enzima recombinante CelA apresentou um aumento de atividade de 70% na presença do íon Mn^{2+} (Tabela 3), assim como a celulase de *Bacillus subtilis* YJ1 (Yin et al., 2010) que foi ativada em 60, 84 e 140% na presença de 1, 5 e 10 mM íon Mn^{2+} , respectivamente. Uma forte indução de atividade celulásica por Mn^{2+} também foi verificada em *Geobacillus* sp. Nesta bactéria termofílica o $MnSO_4$ (2 mM) aumentou a atividade da enzima em até 100% (Ng et al., 2009). A atividade da celulase de *Bacillus halodurans* (CAS1) foi melhorada na presença do íon Mn^{2+} em 13% e 27%, nas concentrações de 1 e 5 mM, respectivamente (Annamalai et al., 2013). A β -1,4-endoglucanase de um *Bacillus pumilus* também apresentou afinidade pelo íon Mn^{2+} (Lima et al., 2005). Supostamente, o íon manganês liga-se ao sítio ativo da celulase e aumenta a interação da ligação ao substrato, podendo também estar envolvido na estabilização da conformação catalítica ativa da enzima (Orji et al., 2016).

Outro íon que levou a um aumento na atividade enzimática de CelA foi o Sn^{2+} , o qual ativou a enzima em 49% (Tabela 3), o que é um resultado interessante, pois não há relatos na literatura desse íon como promotor de ativação enzimática para celulases bacterianas, contribuindo para futuros estudos. O Co^{2+} também atuou como ativador da enzima, em 46% (Tabela 3). O Co^{2+} diferente do Sn^{2+} é um íon que vem sendo relatado em diversos trabalhos como ativador enzimático de celulases, como por exemplo, no trabalho de Singh et al. (2004), em que o Co^{2+} na concentração de 1 mM, ativou a celulase (CMCase) de *Bacillus sphaericus* (JS1) em 57%. A endoglucanase de *Mucor circinelloides*, o Co^{2+} na concentração de 0,5 mM, ativou a enzima em 44% (Saha, 2004). O Co^{2+} (1m mM) ativou em 19% uma endoglucanase da também família GH 9, purificada da bactéria *Thermobifida halotolerans* (Zhang et al., 2011).

Como se observou nesta pesquisa, os íons bivalentes Mn^{2+} , Sn^{2+} e Co^{2+} ativaram a CelA em diferentes proporções. Talvez os distintos tamanhos dos íons sejam responsáveis pelos efeitos diferenciais na atividade da enzima (Cai et al., 2018). No entanto, embora o tamanho dos íons seja bem conhecido, relativamente poucos estudos abordam os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos destes na atividade enzimática (DasSarma e DasSarma, 2015).

O DTT é um agente redutor, protetor do grupo tiol, o qual também intensificou a atividade da enzima. Esse composto pode atuar reduzindo as ligações dissulfeto, renaturando a conformação da enzima, melhorando a sua atividade, caso ocorra a oxidação ou agregação durante a purificação e/ou armazenamento, sugerindo que a estrutura da enzima contém grupo $-SH$ (Yin et al., 2010).

Em contrapartida, os íons Hg^{2+} e Ag^{3+} atuaram como fortes inibidores da atividade da celulase em estudo. Este resultado é similar ao verificado no trabalho de Liu e Xia (2006), em que os metais pesados Hg^{2+} e Ag^{3+} , apresentaram efeito inibitório significativo ou completo na atividade da CMCase purificada a partir de *Trichoderma viride*. Essa inibição

por metais pesados pode ocorrer devido à formação de complexos com grupos reativos da enzima, impedindo que ela se ligue ao substrato (Heinen et al., 2014).

No trabalho de Gaur e Tiwari (2015), o HgCl_2 na concentração de 5 mM afetou fortemente a atividade enzimática, restando cerca de 54% da atividade da celulase de *Bacillus vallismortis* RG-07. A inibição pelo íon Hg^{2+} não está relacionada apenas à ligação dos grupos tiol, mas pode ser o resultado de interações com um ou mais resíduos de triptofano ou com grupos carboxílicos de aminoácido presentes na enzima (Annamalai et al., 2013; Gaur e Tiwari, 2015). Já o EDTA, conhecido como um quelante iônico, também diminuiu a atividade da celulase em estudo. Ou seja, sua capacidade de inibição indica que íons específicos podem estar ativamente envolvidos na reação catalítica da enzima (Liu e Xia, 2006).

A cinética enzimática para a CelA com o substrato CMC, apresentou valor de K_M baixo ($0,66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A celulase purificada de uma cepa de *Bacillus* sp. MSL2 isolada de solo de arrozal também apresentou um baixo valor de K_M , igual a $0,80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sriariyanun et al., 2016).

Para a cinética, na presença do íon Mn^{+2} (5 mM) o valor de K_M dobrou em relação à cinética realizada na ausência do íon, ou seja, a afinidade pelo substrato diminuiu. Esse comportamento sugere que, embora a atividade catalítica seja otimizada na presença do íon Mn^{+2} , a celulase em estudo passa a requerer maior concentração de substrato para atingir a sua saturação. De forma semelhante, o valor $V_{M\acute{a}x}$ e de K_{cat} também aumentaram, evidenciando por meio desse parâmetro, uma importante melhora no potencial catalítico da enzima, tanto na conversão do complexo enzima-substrato em produto, quanto na subsequente difusão dos mesmos a partir da ação da celulase.

A hidrólise da PM e SM realizada pela CelA pura foi mais eficiente em contato com a PM, a qual foi hidrolisada com melhores rendimentos de açúcar redutor desde as primeiras horas de ensaio (Figura 7). A palha de milho também foi eficiente em promover a indução da atividade celulásica em células de *C. crescentus* como apresentado na Figura 1, sugerindo que a PM é um importante resíduo para bioconversão em açúcares fermentescíveis pela celulase de *C. crescentus*.

Para o ensaio de hidrólise pela CelA foi essencial selecionar um resíduo lignocelulósico típico e produzido em grandes quantidades na região Oeste do Paraná, submetido a apenas ação térmica como tratamento de pré-hidrólise. Já, o papel de filtro ou outro substrato celulósico modelo fornece uma indicação pobre da capacidade de hidrolisar a celulose na biomassa lignocelulósica (Zhou et al., 2009).

Assim, a PM é um potencial substrato para a conversão de biomassa para obtenção de açúcares fermentescíveis (Koukiekolo et al., 2005), fornecendo sustentabilidade à cadeia de produção do bioetanol, em que celulases são altamente empregadas, permitindo uma

hidrólise eficiente com o mínimo consumo de energia e uma recuperação máxima de açúcares (Limayem e Ricke, 2012).

8 CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro sobre clonagem, expressão heteróloga, caracterização enzimática e aplicação do gene *celA* que codifica uma celulase na bactéria *Caulobacter crescentus*. A produção de celulase por *C. crescentus* foi induzida na presença de sabugo de milho e palha de milho como fonte de carbono. A caracterização bioquímica da proteína recombinante mostrou que a CelA tem pH ótimo igual a pH 5,5 e estabilidade no pH 6,0, sendo considerada portanto uma enzima ácida. A temperatura ótima da CelA foi de 40 °C, mantendo uma termoestabilidade durante 4 h a 35 °C, com apenas 20% de perda da atividade e tempo de meia vida de 1 hora na sua temperatura ótima. O K_M apresentado pela enzima sugere que ela apresenta uma alta afinidade ao substrato CMC, sendo fortemente ativada pela presença do íon Mn^{2+} (5 mM), o qual elevou o potencial catalítico da enzima. A enzima em estudo demonstrou alta capacidade de hidrólise da palha de milho na temperatura de 40 °C e pH ácido (5,5), apresentando bons rendimentos na liberação de açúcares redutores em 24 h de ensaio. Desse modo, a enzima possui uma grande viabilidade para sua aplicação na hidrólise em resíduos agroindustriais, produzindo açúcares fermentescíveis a partir de fontes residuais de baixo custo. Esta é uma alternativa para a produção de bioálcoois, como bioetanol e biobutanol, bem como para outras aplicações biotecnológicas de interesse industrial.

Agradecimentos

L. Bussler foi bolsista da CAPES.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, S., Qurrat-ul-Ain, Aslam, N., Naeem, S., Sajjad-ur-Rahman, Jamil, A., 2003. Induction of xylanase and cellulase genes from *Trichoderma harzianum* with different carbon sources. *Pakistan J. Biol. Sci.* 6, 1912–1916. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.1912.1916>.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Elayaraja, S., Balasubramanian, T., 2013. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydr. Polym.* 94, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.066>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Cai, Z.-W., Ge, H.-H., Yi, Z.-W., Zeng, R.-Y., Zhang, G.-Y., 2018. Characterization of a novel psychrophilic and halophilic β -1, 3-xylanase from deep-sea bacterium, *Flammeovirga pacifica* strain WPAGA1. *Int. J. Biol. Macromol.* 118, 2176–2184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.090>.
- Chen, W.P., Kuo, T. T., 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21, 2260. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260>.
- Cheng, R., Chen, J., Yu, X., Wang, Y., Wang, S., Zhang, J., 2013. Recombinant production and characterization of full-length and truncated β -1,3-glucanase PglA from *Paenibacillus* sp. S09. *BMC Biotechnol.* 13, 105. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-105>.
- Chuan Wei, K.S., Teoh, T.C., Koshy, P., Salmah, I., Zainudin, A., 2015. Cloning, expression and characterization of the endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* UMC7 isolated from the gut of the indigenous termite *Macrotermes malaccensis* in *Escherichia coli*. *Electron. J. Biotechnol.* 18, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.007>.
- Corrêa, J.M., Graciano, L., Abrahão, J., Loth, E.A., Gandra, R.F., Kadowaki, M.K., Henn, C., Simão, R.D.C.G., 2012. Expression and characterization of a GH39 β -xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 2218–2229. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9931-1>.
- Corrêa, J.M., Mingori, M.R., Gandra, R.F., Loth, E.A., Seixas, F.A.V., Simão, R.D.C.G., 2014. Depletion of the *xynB2* gene upregulates β -Xylosidase expression in *C. crescentus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 1085–1097. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0549-8>.
- DasSarma, S., DasSarma, P., 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>.
- Davis, B.J., 1964. Disc Electrophoresis - II method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404–27. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>.
- Domań-Pytka, M., Bardowski, J., 2004. Pullulan Degrading Enzymes of Bacterial Origin. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 107–121. <https://doi.org/10.1080/10408410490435115>.

- Duan, C.-J., Huang, M.-Y., Pang, H., Zhao, J., Wu, C.-X., Feng, J.-X., 2017. Characterization of a novel theme C glycoside hydrolase family 9 cellulase and its CBM-chimeric enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5723–5737. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8320-7>.
- Eckert, K., Ernst, H.A., Schneider, E., Larsen, S., Lo Leggio, L., 2003. Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Alicyclobacillus acidocaldarius* endoglucanase CelA. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* 59, 139–141. <https://doi.org/10.1107/S0907444902018280>.
- Eckert, K., Zielinski, F., Lo Leggio, L., Schneider, E., 2002. Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC27009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 428–36. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1131-4>.
- Ely, B., 1991. Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods Enzymol.* 24, 372–384.
- Estela, R., Luis, J., 2013. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars, In: Chandel, A. (Ed.), *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. InTech, pp. 119–155. <https://doi.org/10.5772/53719>.
- Evinger, M., Agabian, N., 1977. Envelope associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J. Bacteriol.* 132, 294–301..
- Gaur, R., Tiwari, S., 2015. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnol.* 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0129-9>.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>.
- Gomes, D., Rodrigues, A.C., Domingues, L., Gama, M., 2015. Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4131–4143. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6535-z>.
- Graciano, L., Corrêa, J.M., Gandra, R.F., Seixas, F.A.V., Kadowaki, M.K., Sampaio, S.C., da Conceição Silva, J.L., Osaku, C.A., Simão, R. de C.G., 2012. The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus* β -Xylosidase I. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2879–2888. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1099-x>.
- Graciano, L., Corrêa, J.M., Vieira, F.G.N., Bosetto, A., Loth, E.A., Kadowaki, M.K., Gandra, R.F., Simão, R. de C.G., 2015. Cloning and expression of the *xynA1* gene encoding a xylanase of the GH10 group in *Caulobacter crescentus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 3915–3929. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1560-z>.
- Heinen, P.R., Henn, C., Peralta, R.M., Bracht, A., De Cássia, R., Simão, G., Luís, J., Silva, C., De Lourdes, M., Polizeli, T.M., Kadowaki, M.K., 2014. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. *African J. Biotechnol.* 13, 1047–1055. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13282>.
- Hildén, L., Johansson, G., 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnol. Lett.* 26, 1683–1693. <https://doi.org/10.1007/s10529-004-4579-8>.

- Huang, Y., Krauss, G., Cottaz, S., Driguez, H., Lipps, G., 2005. A highly acid-stable and thermostable endo-beta-glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.* 385, 581–8. <https://doi.org/10.1042/BJ20041388>.
- Justo, P.I., Corrêa, J.M., Maller, A., Kadowaki, M.K., da Conceição-Silva, J.L., Gandra, R.F., Simão, R. de C.G., 2015. Analysis of the *xynB5* gene encoding a multifunctional GH3-BglX β -glucosidase- β -xylosidase- α -arabinosidase member in *Caulobacter crescentus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108, 993–1007. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0552-x>.
- Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>.
- Kataeva, I.A., Uversky, V.N., Brewer, J.M., Schubot, F., Rose, J.P., Wang, B.C., Ljungdahl, L.G., 2004. Interactions between immunoglobulin-like and catalytic modules in *Clostridium thermocellum* cellulosomal cellobiohydrolase CbhA. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 759–769. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh094>.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Saini, H.S., 2007. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresour. Technol.* 98, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.019>.
- Kazeem, M.O., Shah, U.K.M., Baharuddin, A.S., AbdulRahman, N.A., 2017. Prospecting agro-waste cocktail: supplementation for cellulase Production by a newly isolated thermophilic *B. licheniformis* 2D55. *Appl. Biochem. biotechnol.* 182, 1318–1340. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2401-z>.
- Kim, B.-K., Lee, B.-H., Lee, Y.-J., Jin, I.-H., Chung, C.-H., Lee, J.-W., 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme Microb. Technol.* 44, 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.02.005>.
- Koukiekolo, R., Cho, H.Y., Kosugi, A., Inui, M., Yukawa, H., Doi, R.H., 2005. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3504–3511. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3504-3511.2005>.
- Kumaran, M.D.B., Kalaichelv, P.T., Santhi, R., 2015. Exploitation of agro-industrial wastes as substrates for cellulase production by *Bacillus licheniformis* MTCC 429. *Microbiol. J.* 5, 36–42. <https://doi.org/10.3923/mj.2015.36.42>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685..
- Lee, H.-S., Kim, M.-S., Cho, H.-S., Kim, J.-I., Kim, T.-J., Choi, J.-H., Park, C., Lee, H.-S., Oh, B.-H., Park, K.-H., 2002. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J. Biol. Chem.* 277, 21891–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201623200>.
- Li, Y.-H., Ding, M., Wang, J., Xu, G., Zhao, F., 2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, *Ba*-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp.AC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 430–436. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0075-x>.
- Lima, A.O.S., Quecine, M.C., Fungaro, M.H.P., Andreote, F.D., Maccheroni, W., Araújo, W.L., Silva-Filho, M.C., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 2005. Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1740-1>.
- Limayem, A., Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current

- perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 449–467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>.
- Liu, H., Pereira, J.H., Adams, P.D., Sapra, R., Simmons, B.A., Sale, K.L., 2010. Molecular simulations provide new insights into the role of the accessory immunoglobulin-like domain of Cel9A. *FEBS Lett.* 584, 3431–3435. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.041>.
- Liu, J., Xia, W., 2006. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase. *Biochem. Eng. J.* 30, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.02.005>.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2016. *Microbiologia de Brock*, 14th ed. Porto Alegre..
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Ng, I.-S., Li, C.-W., Yeh, Y.-F., Chen, P.T., Chir, J.-L., Ma, C.-H., Yu, S.-M., Ho, T.D., Tong, C.-G., 2009. A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles* 13, 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0228-4>.
- Ng, T.K., Zeikus, J.G., 1981. Purification and characterization of an endoglucanase (1,4- β -D-glucan glucanohydrolase) from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.* 199, 341–350..
- Nierman, W.C., Feldblyum, T. V, Laub, M.T., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Eisen, J., Heidelberg, J.F., Alley, M.R.K., Ohta, N., Maddock, J.R., Potocka, I., Nelson, W.C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N.D., Ely, B., DeBoy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M.L., Haft, D.H., Kolonay, J.F., Smit, J., Craven, M.B., Khouri, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Shapiro, L., Fraser, C.M., 2001. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4136–4141. <https://doi.org/10.1073/pnas.061029298>.
- Orji, F.A., Fashola, F., Lawal, A.K., Dike, E., 2016. Identification of co-factor behaviour of manganese ion on cellulase from atoxigenic *Aspergillus flavus* M15 Strain. *Niger. J. Microbiol.* 30, 3580–3586.
- Oslancová, A., S.Janecek, 2002. Oligo-1,6-glucosidase and neopullulanase enzyme subfamilies from the α -amylase family defined by the fifth conserved sequence region. *C. Cell. Mol. Life Sci. Res.* 59, 1945–1959. <https://doi.org/10.1420-682X/02/111945-15>.
- Pandey, S., Kushwah, J., Tiwari, R., Kumar, R., Somvanshi, V.S., Nain, L., Saxena, A.K., 2014. Cloning and expression of β -1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. *Microbiol. Res.* 169, 693–698. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.006>.
- Park, K.-H., Oh, B.-H., Kim, J.-W., Svensson, B., Kim, T.-J., Cheong, T.-K., 2002. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1478, 165–185. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00041-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00041-8).

- Pazhang, M., Younesi, F.S., Mehrnejad, F., Najavand, S., Tarinejad, A., Haghi, M., Rashno, F., Khajeh, K., 2018. Ig-like Domain in Endoglucanase Cel9A from *Alicyclobacillus acidocaldarius* Makes Dependent the Enzyme Stability on Calcium. *Mol. Biotechnol.* 60, 698–711. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0105-4>.
- Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K., 2013. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiol. (Praha)*. 58, 163–176. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0184-8>.
- Poindexter, J.S., 1981. The Caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol. Rev.* 45, 123–79..
- Poindexter, J.S., 1964. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol. Rev.* 28, 231–95..
- Potprommanee, L., Wang, X.-Q., Han, Y.-J., Nyobe, D., Peng, Y.-P., Huang, Q., Liu, J., Liao, Y.-L., Chang, K.-L., 2017. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. *PLoS One* 12, e0175004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175004>.
- R Development Core Team, 2018. R: a language and environment for statistical computing..
- Ravachol, J., Borne, R., Tardif, C., de Philip, P., Fierobe, H.-P., 2014. Characterization of all family-9 glycoside hydrolases synthesized by the cellulosome-producing bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *J. Biol. Chem.* 289, 7335–7348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545046>.
- Saha, B.C., 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochem.* 39, 1871–1876. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.013>.
- Sahin, S., Ozmen, I., Biyik, H., 2016. Industrial applications of endoglucanase obtained from novel and native *Trichoderma atroviride*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 30, 265–278. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2130>.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York, NY..
- Scapin, S.M.N., Souza, F.H.M., Zanphorlin, L.M., de Almeida, T.S., Sade, Y.B., Cardoso, A.M., Pinheiro, G.L., Murakami, M.T., 2017. Structure and function of a novel GH8 endoglucanase from the bacterial cellulose synthase complex of *Raoultella ornithinolytica*. *PLoS One* 12, e0176550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176550>.
- Šimić, K., Soljačić, I., Pušić, T., 2015. Application of cellulases in the process of finishing uporaba celulaza v procesu plemenitenja. *Sci. c Rev. Znan. članek* 58, 47–56. <https://doi.org/10.14502/Tekstilec2015.58.47>.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., 2004. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 51–56. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0114-0>.
- Smith, S.P., Bayer, E.A., Czjzek, M., 2017. Continually emerging mechanistic complexity of the multi-enzyme cellulosome complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 44, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.03.009>.

- Song, N., Cai, H.-Y., Yan, Z.-S., Jiang, H.-L., 2013. Cellulose degradation by one mesophilic strain *Caulobacter* sp. FMC1 under both aerobic and anaerobic conditions. *Bioresour. Technol.* 131, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.003>.
- Sriariyanun, M., Tantayotai, P., Yasurin, P., Pornwongthong, P., Cheenkachorn, K., 2016. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp. isolated from rice paddy field soil. *Electron. J. Biotechnol.* 19, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.11.002>.
- Teng, Y., Yin, Q., Ding, M., Zhao, F., 2010. Purification and characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase, AfEG22, from the giant snail, *Achatina fulica frussac*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 42, 729–734. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq083>.
- Vijayaraghavan, P., Vincent, S.G.P., 2012. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. isolated from a paddy field. *Polish J. Microbiol.* 61, 51–55..
- Wang, L., Yang, M., Fan, X., Zhu, X., Xu, T., Yuan, Q., 2011. An environmentally friendly and efficient method for xylitol bioconversion with high-temperature-steaming corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*. *Process Biochem.* 46, 1619–1626. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.004>.
- Yin, L., Lin, H., Xiao, Z., 2010. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *J. Mar. Sci. Technol.* 18, 466–471..
- Younesi, F.S., Pazhang, M., Najavand, S., Rahimizadeh, P., Akbarian, M., Mohammadian, M., Khajeh, K., 2016. Deleting the Ig-Like Domain of *Alicyclobacillus acidocaldarius* Endoglucanase Cel9A Causes a simultaneous increase in the activity and stability. *Mol. Biotechnol.* 58, 12–21. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9900-3>.
- Zafar, M., Ahmed, S., Khan, M.I.M., Jamil, A., 2014. Recombinant expression and characterization of a novel endoglucanase from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Rep.* 41, 3295–3302. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3192-8>.
- Zhang, F., Chen, J.-J., Ren, W.-Z., Nie, G.-X., Ming, H., Tang, S.-K., Li, W.-J., 2011. Cloning, expression and characterization of an alkaline thermostable GH9 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T. *Bioresour. Technol.* 102, 10143–10146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.019>.
- Zhou, J., Wang, Y.H., Chu, J., Luo, L.Z., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L., 2009. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresour. Technol.* 100, 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.068>.

ARTIGO 2 - COMUNICAÇÃO BREVE (SHORT COMMUNICATION): APLICAÇÃO DA CELULASE ÁCIDA CODIFICADA PELO GENE *celA* DE *Caulobacter crescentus* NO PROCESSO DE BIOPOLIMENTO DO JEANS DENIM

Bussler, L¹; Jacomini, D¹; Simão, RCG².

¹Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas; ²Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel-PR.

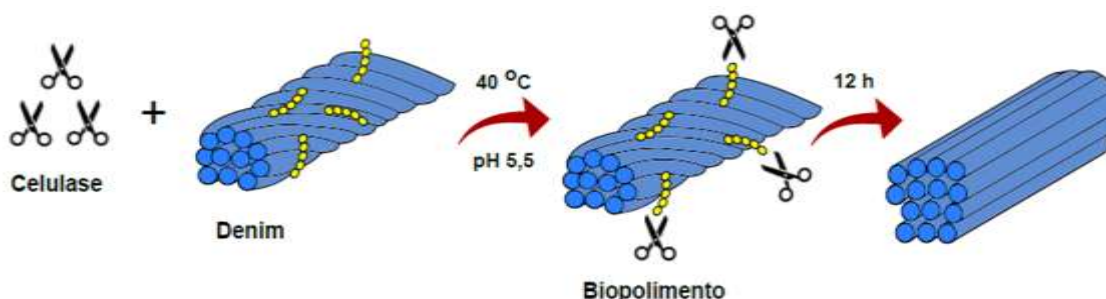
rita.simao@unioeste.br

Artigo formatado para submissão de acordo com as normas da revista: *Process Biochemistry – Elsevier (Anexo B)*
ISSN: 1359-5113; Fator de impacto: 2,61

DESTAQUES DA PESQUISA

- A celulase possui ação efetiva sobre o jeans denim sem danos a fibra.
- O processo de biopolimento foi confirmado pelas micrografias de MEV.
- A perda de peso do jeans foi inferior a 3%, com ação superficial da enzima.

RESUMO GRÁFICO



Resumo: O tratamento com celulases na indústria têxtil vem sendo empregado no biopolimento de tecidos denim, para eliminação de impurezas, penugens e fiapos, à base de algodão celulósico. A enzima *CelA* de *Caulobacter crescentus* é uma celulase ácida que atua em temperaturas amenas (40-50 °C) e foi usada neste estudo para o biotratamento de tecidos denim. Os ensaios foram realizados em sistema não agitado, aplicando 1 U.mL⁻¹ da celulase pura em tampão citrato de sódio pH 5,5, a 40 °C por 12 horas diretamente na fibra do Jeans denim. A *CelA* após 12 h levou à diminuição do peso do jeans de 2,43% e produziu 2,17 μmol.mL⁻¹ de açúcares redutores no tecido tratado, confirmando a ação celulásica nas fibras. As micrografias eletrônicas de varredura mostraram uma superfície limpa e suave das fibras em comparação ao controle sem ação enzimática. A *CelA* foi capaz de remover as microfibrilas do tecido, deixando uma superfície sem penugens e fiapos, com uma perda de peso mínima, sem causar danos à fibra.

Palavras-chave: Proteína Recombinante, Celulase, bactéria, Bioacabamento têxtil.

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos materiais utilizados na manufatura de tecidos é à base de fibras celulósicas e apresentam tendência a formar penugem (fibras curtas saindo da superfície) e fiapos (penugem solta ligada à superfície), considerados como características negativas dos tecidos celulósicos [1]. Os métodos convencionais de remoção das fibras salientes empregam um processo de queima ou tratamento químico, os quais são potencialmente tóxicos e as fibras retornam à superfície após algumas lavagens, formando a penugem [2].

As celulasas alcançaram sucesso mundial no setor têxtil por sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de maneira controlada e desejada, bem como ecológica, melhorando as propriedades e a qualidade dos tecidos, substituindo os métodos químicos [1,3]. O biopolimento é um importante tratamento biológico no qual celulasas atuam na superfície do tecido, fazendo a remoção de penugens e fiapos que se projetam da superfície [4]. O objetivo é proporcionar uma superfície limpa, melhorando a textura, as propriedades hidrofílicas, maciez, aparência, brilho e intensidade das cores, bem como, reduzir a tendência à formação de fiapos dando maior resistência a fibra [4,5].

O tecido denim (jeans) é fabricado de fios de algodão (celulose) tingidos de índigo (azul), entremeados com fios brancos [6]. A celulose amorfa é menos estruturada e de fácil acesso, geralmente responsável por formar penugens e fiapos em tecido de algodão, portanto, um único tipo de celulase, preferencialmente endoglucanase, é suficiente para a sua degradação, com uma perda de peso mínima [7]. A importância dessa enzima no biopolimento se deve ao fato de atuarem na superfície das fibras de algodão, sem acessar as fibras internas do tecido, pois essas regiões são mais ordenadas e menos acessíveis à ação dessa enzima, evitando assim, danos à qualidade do tecido [8,9]. Nesse caso, celulasas com alta atividade na região cristalina da celulose, apresentam ação mais agressiva no algodão e podem levar ao rompimento das fibras [7,10].

O biopolimento é realizado durante a etapa de processamento úmido do tecido têxtil, o qual requer enzimas endocelulasas, especialmente ácidas, com pH 4,5-5,5 e temperatura de 40-55 °C [8]. Assim, o gene *celA* (CCNA_02310), que codifica para única celulase (KEEG Database E.C. 3.2.4.1), da família 9 de glico-hidrolases de *C. crescentus*, que possui características bioquímico-cinéticas desejáveis à aplicação na indústria têxtil (Bussler et al., 2019 – artigo submetido), foi aplicada na forma pura no presente trabalho, para analisar a ação celulásica no processo de biopolimento do jeans denim. Este é o primeiro relato na literatura da aplicação da CelA em bioprocessamento na indústria têxtil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Enzima

A enzima CelA utilizada é uma celulase de *C. crescentus* da família GH 9, apresenta atividade de 4,47 U.mL⁻¹ nas condições otimizadas no pH 5,5, a 40 °C no substrato comercial carboximetilcelulose (CMC 1%), sendo considerada uma CMCase preponderante. Todo procedimento de clonagem, superexpressão e caracterização bioquímica da enzima, está descrito no trabalho de Bussler et al. (2019) (dados não publicados).

2.2 Biopolimento do tecido denim (jeans)

Tecidos de jeans denim (especificação do fabricante: 98% de algodão e 2% de elastano) foram utilizados no tamanho 1 x 1 cm (adaptado de Sahin, Ozmen e Biyik, [11]). Os tecidos denim foram submetidos ao tratamento com a enzima CelA pura (1 U.mL⁻¹), em tampão citrato de sódio pH 5,5 a 40 °C por 12 h, sem agitação. Em seguida, o tecido foi lavado com água à temperatura de 100 °C, 2 vezes para inativação da enzima, posteriormente lavado com água fria e seco à temperatura ambiente durante 48 horas [10,11]. Os tratamentos controles foram realizados nas mesmas condições, sem adição da enzima CelA.

2.3 Análise do jeans denim biotratado com a CelA

A perda de peso do tecido foi analisada como perda de peso da amostra seca (antes e após o tratamento) por gravimetria [10]. A Equação 1 foi usada para calcular a perda de peso (% em peso) [12,13]:

$$\text{Perda de Peso \%} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100 \quad (1)$$

em que: P_1 e P_2 são os pesos do tecido antes e depois do tratamento, respectivamente. O sobrenadante resultante da imersão do tecido denim, após a etapa de biopolimento foi analisado quantitativamente, de acordo com Battan et al. [14], pelo método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [15], para a dosagem de açúcares redutores, do tecido controle (sem adição da CelA) e do tecido tratado com a celulase.

2.4 Análise morfológica do jeans denim por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em equipamento da marca TESCAN[®], modelo VEGA3. Essa análise foi realizada para avaliar a morfologia da superfície do tecido denim tratado e não tratado. As micrografias foram obtidas no aumento de 5x em módulo SE (*secondary electron*), com detector de elétrons secundários.

3 RESULTADOS

A CelA de *C. crescentus* apresenta um pH ótimo em 5,5 e a estabilidade no pH 6, com temperatura ótima em 40 °C e estabilidade térmica em 35 °C, conforme (Bussler et al., 2019, dados não publicados). O jeans denim tratado somente com tampão sem ação da CelA (controle), apresentou uma perda de peso de somente 0,52%, enquanto o jeans tratado com a enzima, apresentou uma perda de peso de 2,43%. No controle não se obteve a produção de açúcares redutores. Já no jeans denim tratado com CelA, foi produzido 2,17 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ açúcar redutor em 12 h de incubação. Esses dados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Efeito da CelA de *C. crescentus* na liberação de açúcares redutores e perda de peso do jeans denim

Tratamento	Açúcar redutor ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	Perda de peso (%)
Controle	-	0,52
CelA	2,17	2,43

A visualização das imagens pós-ensaio com microscópio eletrônico (MEV) revelou mudanças da morfologia da fibra do jeans denim pela ação celulásica da CelA. As fibras do denim não tratado (Figura 1A) apresentam impurezas celulósicas, formas mais robustas, protuberâncias, imperfeições e descamações na superfície das fibras. No destaque da Figura 1B, é possível observar além dessas características, fibrilações, pequenos fiapos e fibrilas de celulose, fazendo a ligação entre as fibras do jeans. No denim tratado com a enzima CelA (Figura 1C e 1D), nota-se a superfície das fibras com faces mais polidas, lisas sem fiapos de celulose ocorrendo entre as fibras, sem imperfeições, protuberâncias e descamações. Não ocorreu o desbotamento ou destonação no tecido tratado e não tratado após o ensaio.

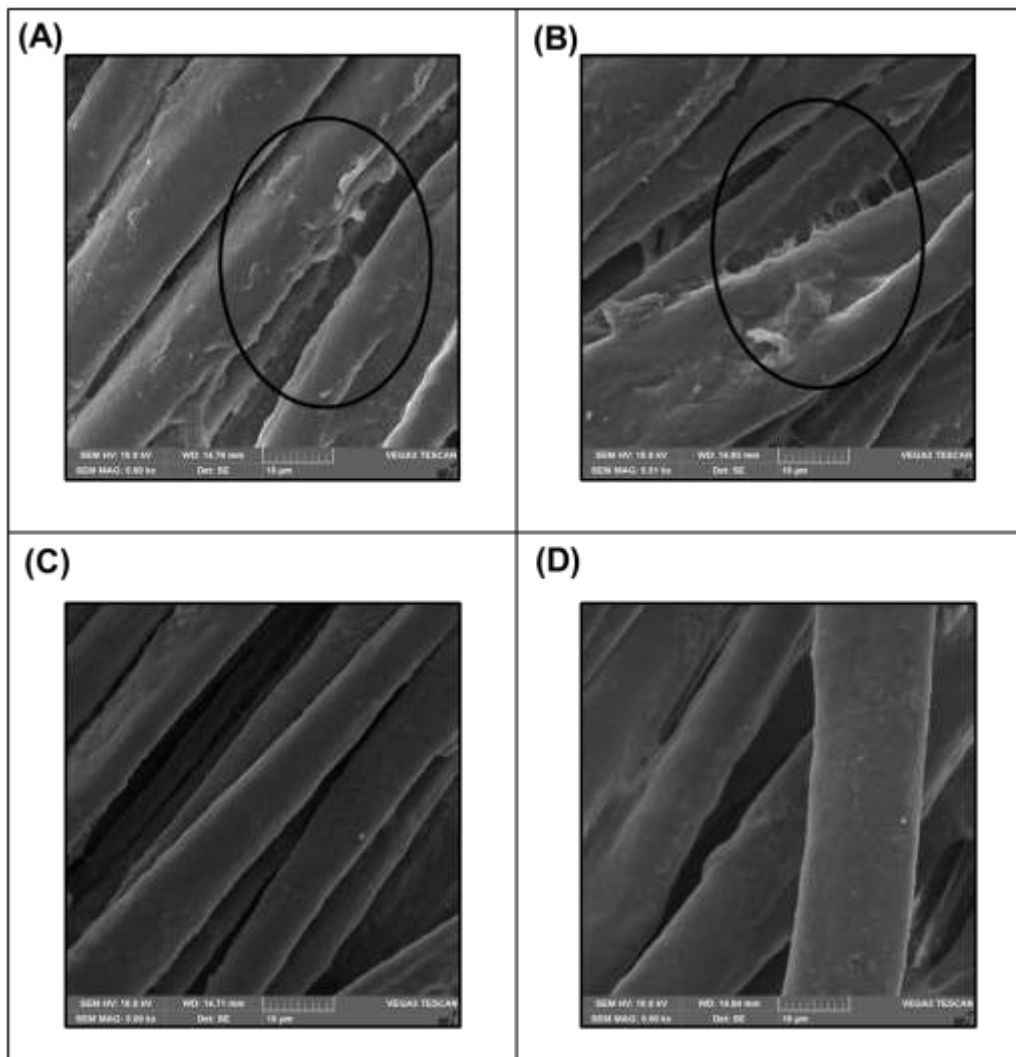


Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura dos tecidos denim. (A e B) Jeans denim tratado com tampão citrato de sódio pH 5,5 sem adição da CelA (controle); (C e D) Jeans denim tratado com a CelA de *C. crescentus*.

4 DISCUSSÃO

Os ensaios foram realizados em sistema sem agitação, pois de acordo com Esfandiari, Firouzi-Pouyaei, Aghaei-Meibodi [2], a combinação do tratamento mecânico e enzimático causam danos agressivos às fibras de algodão, resultando em maior perda de peso, hidrolisando a fibra, tornando-a frágil. Conseqüentemente, a superfície do tecido é destruída, levando a perda da qualidade do fio e a força do tecido, diminuindo o valor econômico do produto final.

A degradação enzimática do algodão é geralmente caracterizada pela perda de peso [10], sendo um dos parâmetros mais interessantes para a análise do biotratamento em tecidos. As perdas de peso nos tratamentos realizados nos tecidos denim não tratado (controle) e o tratado com a enzima a CelA foram próximas as encontradas na literatura. Csiszár, Urbánszki e Szakács [10] encontraram que o tratamento do tecido em solução tampão (sem adição de enzima) causou perda de peso do tecido de 0,5% enquanto nesta pesquisa, a perda foi de 0,52%. Nesse mesmo estudo, os autores utilizaram celulase comercial para o biotratamento do tecido, obtendo uma perda de peso inferior a 3%, seguido por uma pequena produção de açúcar redutor.

Em outro estudo, Anish, Rahman e Rao [7] obtiveram uma perda de peso inferior a 2% pela ação da endoglucanase de *Thermomonospora* sp. nas fibras de algodão. Perdas de peso menores que 3%, sugerem que fibras superficiais, pequenas fibrilas, fragmentos de revestimento de sementes e outras impurezas naturais foram degradadas e/ou eliminadas do tecido, como constatado por Anish, Rahman e Rao [7], Csiszár, Urbánszki e Szakács [10] e Jabasingh e Nachiyar [9].

Nesse caso, é importante salientar que a remoção de fibras superficiais ou fibrilas e a resistência à formação de penugens no tecido, estão diretamente relacionados a uma perda de perda de peso ideal, que não deve exceder 3 - 5% durante o biotratamento enzimático, para se obter um toque macio e um melhor aspecto superficial do tecido [8,13].

Com isso, os resultados de açúcares redutores e perda de peso representam uma estreita correlação, sugerindo que a enzima consegue acessar pequenas fibrilas de celulose superficiais do tecido, liberando-as e quebrando em pequenas cadeias de açúcares [10]. Enquanto os dados de perda de peso caracterizaram o efeito global da remoção de impurezas do tecido, os açúcares redutores nos sobrenadantes do tratamento revelam a eficácia da ação da enzima [14].

Os dados demonstrados acima são confirmados pelas análises de microscopias eletrônicas de varredura (MEV) dos tecidos com e sem tratamento da CelA de *C. crescentus*. Características como, superfície áspera, fibrilação e fiapos de algodão em

destaque nas Figuras 1A e 1B também foram observados nas imagens por MEV das fibras de tecido não tratado enzimaticamente no trabalho de El-Zawahry, Helmy e Abou-Okeil [16]. A superfície das fibras do denim tratado com a CelA (Figuras 1C e 1D), tornaram-se mais nítidas em comparação com a amostra do denim sem ação enzimática (controle), pois a celulase CelA efetivamente hidrolisou os fragmentos de celulose, fiapos e penugens presente nas fibras de algodão do tecido denim. Resultados similares foram obtidos por Sahin, Ozmen e Biyik [11], Koo et al. [17] e Saravanan et al. [18].

Ainda na Figura 1C, é possível observar uma melhor organização das fibrilas, dando aspecto de maciez e suavidade ao tecido. Como destacado por Ali et al. [19] e por El-Zawahry, Helmy e Abou-Okeil [16], as micrografias revelaram que a celulase “descasca” a celulose, o que resulta na formação de fibrilas salientes e limpas, sendo que as protuberâncias presentes nas amostras das fibras não tratadas, não são encontradas no caso de fibras tratadas com celulases, o que também foi observado nas micrografias acima (Figura 1C e 1D). Concluindo que as celulases proporcionam um melhor processo de acabamento, removendo a penugens e pelos na superfície do denim, sugerindo ainda que após o tratamento celulásico, a fibra apresenta melhora nas propriedades físicas, como resistência, maciez, suavidade, entre outros [10].

Assim, a CelA recombinante de *C. crescentus* possui todas as características ideais para aplicação em biopolimento têxtil, em adição, as imagens de MEV indicam claramente que não houve rompimento das fibras internas do jeans denim tratado. Não houve resultado para a destonação do jeans denim. Para este processo, as celulases neutras são mais importantes do que as celulases ácidas, pois levam a uma maior diminuição da coloração dos tecidos denim, como constatado por Montazer e Maryan [6].

5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato da aplicação no processo de biopolimento de jeans da única celulase (CelA) de *C. crescentus*. A enzima atuou na fibra do jeans denim de forma eficiente, removendo impurezas, fiapos e restos de penugem celulósica do tecido tratado, com uma perda de peso menor que 3%. Esse dado confirma que não houve danos significativos à fibra do jeans. A ação celulásica foi representada pela quantidade de açúcar redutor gerado no processo de biopolimento, comprovando a eficácia do tratamento utilizado. A melhora da morfologia das fibras do tecido denim polido foi confirmada por micrografias de MEV. Ainda, outras análises complementares podem ser realizadas futuramente, como índice de molhabilidade e resistência do tecido. Dessa forma, a enzima CelA pode ser aplicada no processo de biopolimento de tecidos, favorecendo à redução de custo e de impacto ambiental negativo pelo uso de lavagens químicas, além de melhorar as propriedades físicas do tecido, com uma perda de peso mínima, sem destruir a fibra celulósica, removendo compostos protuberantes da fibra, produzindo uma superfície limpa e suave e melhorando seu preço de mercado.

REFERÊNCIAS

- [1] M.K. Bhat, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 355–383. doi:10.1016/S0734-9750(00)00041-0.
- [2] A. Esfandiari, E. Firouzi-Pouyaei, P. Aghaei-Meibodi, Effect of enzymatic and mechanical treatment on combined desizing and bio-polishing of cotton fabrics, *J. Text. Inst.* 105 (2014) 1193–1202. doi:10.1080/00405000.2014.880222.
- [3] H. Belghith, S. Ellouz-Chaabouni, A. Gargouri, Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases, *J. Biotechnol.* 89 (2001) 257–262. doi:10.1016/S0168-1656(01)00309-1.
- [4] K. Mojsov, Biopolishing Enzymes and their applications in textiles: a review, *Tekst. Ind.* 61 (2014) 20–24.
- [5] K. Mojsov, Trends in bio-processing of textiles: A review, *Savrem. Tehnol.* 3 (2014) 135–138. doi:10.5937/savteh1402135M.
- [6] M. Montazer, A. Sadeghian Maryan, Influences of different enzymatic treatment on denim garment, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 2114–2128. doi:10.1007/s12010-009-8727-4.
- [7] R. Anish, M.S. Rahman, M. Rao, Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 48–56. doi:10.1002/bit.21175.
- [8] K. Šimić, I. Soljačić, T. Pušić, Application of cellulases in the process of finishing uporaba celulaz v procesu plemenitenja, *Sci. c Rev. Znan. Članek.* 58 (2015) 47–56. doi:10.14502/Tekstilec2015.58.47.
- [9] S.A. Jabasingh, C.V. Nachiyar, Process optimization for the biopolishing of jute fiberswith cellulases from *Aspergillus Nidulans* AJ SU04, *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.* 2 (2012) 12–16. doi:10.7763/IJBBB.2012.V2.60.
- [10] E. Csiszár, K. Urbánszki, G. Szakács, Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 11 (2001) 1065–1072. doi:10.1016/S1381-1177(00)00149-1.
- [11] S. Sahin, I. Ozmen, H. Biyik, Industrial applications of endoglucanase obtained from novel and native *Trichoderma atroviride*, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 30 (2016) 265–278. doi:10.15255/CABEQ.2014.2130.
- [12] A.. Aly, A. Moustafa, A. Hebeish, Bio-technological treatment of cellulosic textiles, *J. Clean. Prod.* 12 (2004) 697–705. doi:10.1016/S0959-6526(03)00074-X.
- [13] M.G. Uddin, Effects of biopolishing on the quality of cotton fabrics using acid and neutral cellulases, *Text. Cloth. Sustain.* 1 (2015) 9. doi:10.1186/s40689-015-0009-7.
- [14] B. Battan, S.S. Dhiman, S. Ahlawat, R. Mahajan, J. Sharma, Application of thermostable xylanase of bacillus pumilus in textile processing, *Indian J. Microbiol.* 52 (2012) 222–229. doi:10.1007/s12088-011-0118-1.

- [15] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428. doi:10.1021/ac60147a030.
- [16] M.M. El-Zawahry, H.M. Helmy, A. Abou-Okeil, Enzymatic treatment and its influence on finishing and dyeing properties of jute fabrics, *Res. J. Text. Appar.* 13 (2009) 34–44. doi:10.1108/RJTA-13-04-2009-B005.
- [17] H. Koo, M. Ueda, T. Wakida, Y. Yoshimura, T. Igarashi, Cellulase treatment of cotton fabrics, *Text. Res. J.* 64 (1994) 70–74. doi:10.1177/004051759406400202.
- [18] D. Saravanan, S.N. Sree Lakshmi, K. Senthil Raja, N.S. Vasanthi, Biopolishing of cotton fabric with fungal cellulase and its effect on the morphology of cotton fibres, *Indian J. Fibre Text. Res.* 38 (2013) 156–160.
- [19] H. Ali, M. Hashem, N. Shaker, M. Ramadan, B. El-Sadek, M.A. Hady, Cellulase enzyme in bio-finishing of cotton-based fabrics: effects of process parameters, *Res. J. Text. Appar.* 16 (2012) 57–65. doi:10.1108/RJTA-16-03-2012-B006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O setor industrial está em busca de maneiras eficientes de aproveitar o potencial biotecnológico dos resíduos lignocelulósicos, procurando tecnologia de baixo custo energético com menor impacto ambiental. Ao mesmo tempo, a indústria busca reaproveitar, em seu processo, o próprio resíduo gerado, evitando que se torne um potencial poluidor e utilizando essa estratégia para preservação ambiental. Dessa forma, converte-se em lucros e benefícios o que seria um resíduo, além de ser economicamente viável, devido à alta disponibilidade.

A obtenção de enzimas viáveis e com características interessantes para aplicação industrial é o grande gargalo dessa pesquisa, evidenciando enzimas com capacidades múltiplas, tanto na conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, bem como, na aplicação têxtil. Com isso, a engenharia genética avança no sentido de encontrar maneiras de melhorar o potencial das enzimas hidrolíticas, buscando o aprimoramento em aplicações biotecnológicas.

Embora poucos trabalhos sejam encontrados na literatura sobre a superexpressão e caracterização molecular de celulasas bacterianas, a área da engenharia genética de microrganismos está em constante crescimento. Atualmente, os fungos são os mais explorados, porém, as celulasas bacterianas apresentam grandes vantagens sobre os fungos, principalmente na rapidez com que são obtidas.

Assim, a *C. crescentus* é uma bactéria com potencial biotecnológico, devido aos vários genes que codificam enzimas envolvidas com o metabolismo de carboidratos da parede vegetal de plantas. Enzimas do complexo xilanolítico já foram caracterizadas e apresentaram potencial para aplicações na hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Durante o desenvolvimento deste estudo, ocorreram diversas dificuldades como, por exemplo: formação de corpos de inclusão pela proteína expressa, falta de reagentes e contratempos estruturais. No entanto, foi possível alcançar os objetivos propostos contribuindo com importantes resultados para a comunidade científica. O trabalho trata da caracterização molecular e aplicação do único gene que codifica para uma celulase CelA (KEEG E.C. 3.2.1.4), presente na maquinaria genética de *C. crescentus*.

Suas propriedades bioquímicas, como o pH, temperatura ótima e estabilidade térmica são de grande importância para aplicação industrial, como por exemplo, na hidrólise da PM, excelente matéria-prima para conversão em açúcares fermentescíveis, visando à produção de bioetanol de segunda geração. Ainda, a caracterização dessa enzima é relevante para a indústria têxtil, em que se utilizam endocelulasas ácidas, com temperaturas

de 40-55 °C para o processo de biopolimento ou biotratamento de tecidos à base de algodão.

A CelA se mostrou eficiente em ambos os processos de aplicação industrial. Os resultados obtidos contribuirão com a comunidade científica, pois este é o primeiro relato na literatura sobre a caracterização e as aplicações biotecnológicas da enzima celulase de *C. crescentus*.

ANEXOS

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY – ELSEVIER

GUIA PARA AUTORES

INTRODUÇÃO

Biocatálise e Biotecnologia Agrícola é o jornal oficial da Sociedade Internacional de Biocatálise e Biotecnologia Agrícola (ISBAB). A revista publica artigos de alta qualidade especialmente na ciência e tecnologia de biocatálise, bioprocessos, biotecnologia agrícola, biotecnologia biomédica e de outras áreas afins da biotecnologia. A revista publica artigos revisados por especialistas de pesquisa básica e aplicada, revisões autorizadas e artigos de destaque.

O escopo da revista engloba os aspectos de pesquisa, industrial e comercial da biotecnologia, incluindo as áreas de: biocatálise; bioprocessos; alimentação e agricultura; Engenharia genética; biologia molecular; cuidados de saúde e produtos farmacêuticos; biocombustíveis; genômica; nanotecnologia; meio ambiente e biodiversidade; e biorremediação.

TIPOS DE ARTIGOS

Os trabalhos de **pesquisa original** são o meio normal de publicação. Embora não haja um comprimento fixo, os artigos devem ser concisos o quanto possível, fornecendo informações suficientes para que o trabalho seja repetido e para que as alegações dos autores sejam julgadas pelos leitores.

As **Revisões** são publicadas a convite de editores ou por sugestão de autores.

Comunicações curtas não devem exceder 1.500 palavras ou espaço equivalente, incluindo figuras e tabelas. Estes devem ser breves, descrevendo trabalhos que podem ser de natureza preliminar, mas que merecem publicação imediata.

Edições especiais sobre aspectos destacados de biocatálise e biotecnologia também são publicados. Edições especiais podem conter contribuições selecionadas (palestrantes convidados) de conferências internacionais, ou uma coleção de artigos sobre um tópico específico, e podem ser compostas de artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e notas curtas.

Cartas ao Editor: Comentários sobre artigos publicados na Revista e sobre outros assuntos de interesse para pesquisadores de biocatálise e biotecnologia podem ser

publicados como Cartas ao Editor. Estes devem ter menos de 400 palavras e podem incluir uma ilustração ou tabela.

RESUMO

Um resumo conciso e factual é necessário. Para um artigo completo ou revisão, este deve ter um comprimento máximo de 250 palavras e, para uma comunicação breve, este deve ter um comprimento máximo de 150 palavras. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e principais conclusões.

Um resumo é frequentemente apresentado separado do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por esta razão, as Referências devem ser evitadas, mas se for essencial, então cite o (s) autor (es) e o (s) ano (s). Além disso, abreviações não padronizadas ou incomuns devem ser evitadas, mas, se essenciais, devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 6 palavras-chave, usando ortografia Americana, evitando termos gerais e plurais e vários conceitos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Apenas as abreviaturas firmemente estabelecidas no texto podem ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para propósitos de indexação.

DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Todos os autores devem divulgar quaisquer relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou organizações, que poderiam influenciar de forma inadequada o viés de seu trabalho. Exemplos de potenciais interesses competitivos, incluem, emprego, consultorias, propriedade de ações, honorários, testemunho de perito pago, pedidos/registros de patentes e subsídios ou outro financiamento. Os autores devem divulgar qualquer interesse em dois lugares:

1. Uma declaração sumária de declaração de interesse no arquivo na página de título ou o arquivo do manuscrito. Se não houver interesse a declarar, indique: "Declarações de interesse: nenhuma". Esta declaração sumária será finalmente publicada se o artigo for aceito.

2. Divulgações detalhadas como parte de um formulário separado de Declaração de Interesse, que faz parte dos registros oficiais da revista. É importante que interesses em potencial sejam declarados em ambos os lugares e que as informações correspondam.

ESTRUTURA DO ARTIGO

Numeração de páginas

As páginas do artigo devem ser numeradas seqüencialmente para auxiliar no processamento do artigo e no processo de arbitragem.

Subdivisão - seções numeradas

Divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas. As subseções devem ser numeradas como 1.1 (em seguida, 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração da seção). Use esta numeração também para referências cruzadas internas: não se refira apenas ao 'texto'. Qualquer subseção pode receber um breve título. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça um histórico adequado, evitando uma pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados.

Material e métodos

Forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido, com detalhes do fornecedor e do código de catálogo, quando apropriado. Os métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: somente modificações relevantes devem ser descritas.

Teoria/cálculo

Uma seção de Teoria deve estender, não repetir o plano do artigo já tratado na Introdução e lançar as bases para trabalhos futuros. Em contraste, uma seção de cálculo representa um desenvolvimento prático de uma base teórica.

Resultados

Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repetí-los. Uma seção combinada de Resultados e Discussão é geralmente apropriada. Evite citações extensas e discussão de literatura publicada.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser independente ou formar uma subseção de uma seção Discussão ou Resultados e Discussão.

INFORMAÇÕES ESSENCIAIS DA PÁGINA DE TÍTULO

- Título. Conciso e informativo. Títulos são freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evitar abreviaturas e fórmulas, sempre que possível.

- Nomes e afiliações dos autores. Por favor indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão escritos com precisão. Você pode adicionar seu nome entre parênteses em seu próprio script por trás da transliteração em inglês. Apresentar a afiliação dos autores, endereços (onde o trabalho real foi feito), abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com letras minúsculas, com a carta sobrescrita imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado.

Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o Endereço de e-mail de cada autor.

- Autor correspondente. Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as etapas da arbitragem e publicação, também pós-publicação. Esta responsabilidade inclui responder a quaisquer futuras consultas sobre Metodologia e Materiais. Assegure-se de que o endereço de e-mail seja fornecido e que os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente.

- Endereço presente/permanente. Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando no momento, um 'endereço atual' (ou 'endereço permanente') pode ser indicado como uma nota de rodapé ao nome desse autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser retido como o principal endereço de afiliação. Números árabes sobrescritos são usados para tais notas de rodapé.

Abreviaturas

Defina abreviações que não são padrão neste campo em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no resumo deve ser definido em sua primeira menção lá, bem como, em nota de rodapé. Assegure a consistência das abreviaturas ao longo do artigo.

Agradecimentos

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de título, como uma nota de rodapé no título ou de outra forma. Liste aqui as pessoas que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, no idioma, na redação e leitura do artigo, etc.).

ARTE ELETRÔNICA

Pontos gerais

- Certifique-se de usar letras e tamanhos uniformes de seu trabalho original.
- Procure usar as seguintes fontes nas suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes semelhantes.
- Numere as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
- Use uma nomenclatura lógica para seus arquivos de ilustrações.
- Forneça legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações perto das dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.

Formatos

Se sua arte eletrônica for criada em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), por favor, forneça 'as is' no formato de documento nativo.

Independentemente do aplicativo usado diferente do Microsoft Office, quando sua arte eletrônica é finalizado, por favor 'Salvar como' ou converta as imagens em um dos seguintes formatos (observe a resolução requisitos para desenhos de linhas, meios-tons e combinações de linha/meio-tom abaixo:

EPS (ou PDF): desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes usadas.

TIFF (ou JPEG): fotografias coloridas ou em tons de cinza (meios-tons), mantenha no mínimo 300 dpi.

TIFF (ou JPEG): Desenhos de linha Bitmap (pixels pretos e brancos puros), mantenha no mínimo 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): Combina a linha/meio-tom de bitmap (colorida ou tons de cinza), mantenha no mínimo 500 dpi.

Arte de cor

Certifique-se de que os arquivos de ilustrações estejam em um formato aceitável (arquivos TIFF, EPS ou MS Office) e com a resolução correta. Se, junto com o artigo aceito, você enviar valores em cores utilizáveis, a Elsevier garantirá, sem custo adicional, que esses números aparecerão em cores na Web (por exemplo, ScienceDirect e outros sites).

Legendas de figuras

Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Forneça legendas separadamente, não anexadas à figura. Uma legenda deve conter um breve título (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas próprias ilustrações no mínimo, mas explique todos os símbolos e abreviações usadas.

TABELAS

Por favor, envie tabelas como texto editável e não como imagens. Tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo, ou em página (s) separada (s) no final. Tabelas de números consecutivamente de acordo com a sua aparência no texto e coloque quaisquer notas de tabela abaixo do corpo da mesa. Poupar no uso de tabelas e garantir que os dados apresentados neles não dupliquem resultados descrito em outra parte do artigo. Por favor, evite usar regras verticais e sombreamento nas células da tabela.

REFERÊNCIAS

Citação no texto

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estejam presentes na lista de referências (e vice-versa). Quaisquer referências citadas no resumo devem ser dadas na íntegra. Resultados não publicados e pessoais as comunicações não são recomendadas na lista de referências, mas podem ser mencionadas no texto. Se estes referências estão incluídas na lista de referências devem seguir o estilo de referência padrão do revista e deve incluir uma substituição da data de publicação com 'Resultados não publicados' ou 'Comunicação pessoal'. A citação de uma referência como *'in press'* implica que o item foi aceito para publicação.

Referências da Web

No mínimo, o URL completo deve ser fornecido e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer mais informações, se conhecidas (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação de origem, etc.), também deve ser dado. Referências na Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referência) sob um cabeçalho diferente, se desejado, ou pode ser incluído na lista de referência.

Estilo de referência

Texto: Todas as citações no texto devem se referir a:

1. Único Autor: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação;
2. Dois autores: os nomes dos autores e o ano de publicação;
3. Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de "et al." e o ano da publicação.

As citações podem ser feitas diretamente (ou entre parênteses). Grupos de referências podem ser listados primeiro alfabeticamente, depois cronologicamente ou vice-versa.

Exemplos: 'como demonstrado (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan e Jones, 1999). Ou, como demonstrado (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) mostraram recentemente... '

Lista: As referências devem ser organizadas primeiro em ordem alfabética e depois classificadas cronologicamente, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras 'a', 'b', 'c' etc., colocadas após o ano de publicação.

Exemplos:

- Referência a uma publicação de periódico:
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.
- Referência a uma publicação de periódico com um número de artigo:
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.
- Referência a um livro:
Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.
- Referência a um capítulo de um livro editado:
Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.
- Referências de um site:
Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (acesso 13 Março 2003).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar, como aplicativos, imagens e clipes de som, pode ser publicado com o seu artigo para aprimorá-lo. Os itens suplementares enviados são publicados exatamente como são recebidos (os arquivos do Excel ou PowerPoint aparecerão online). Por favor, envie seu material junto com o artigo e fornecer uma legenda descritiva e concisa para cada arquivo suplementar. Se você deseja fazer alterações no material suplementar durante qualquer fase do processo, por favor, certifique-se de fornecer um arquivo atualizado.

Não anote nenhuma correção em uma versão anterior. Por favor, desligue a opção 'Track Changes' nos arquivos do Microsoft Office, pois eles aparecerão na versão publicada.

Legendas de material suplementares

Cada arquivo de material suplementar deve ter uma legenda curta que será colocada na parte inferior do artigo, onde pode ajudar o leitor e também ser usada pelos mecanismos de busca.

DADOS DE PESQUISA

Esta revista encoraja e permite que você compartilhe dados que suportam sua publicação de pesquisa quando apropriado, e permite interligar os dados com seus artigos publicados. Os dados da pesquisa referem-se aos resultados das observações ou experimentações que validam os resultados da pesquisa. Para facilitar a reprodutibilidade e reutilização de dados, este periódico também incentiva você a compartilhar seu software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados ao projeto.

Abaixo estão algumas maneiras pelas quais você pode associar dados ao seu artigo ou fazer uma declaração sobre a disponibilidade de seus dados ao enviar seu manuscrito. Se você está compartilhando dados de uma destas maneiras, incentive-os a citar os dados em seu manuscrito e lista de referências. Por favor, consulte a seção "Referências" para mais informações sobre a citação de dados. Para obter mais informações sobre como depositar, compartilhar e usar dados de pesquisa e outros materiais de pesquisa relevantes, visite a página de dados de pesquisa.

GUIA PARA AUTORES

PRINCIPAIS PONTOS DO GUIA PARA AUTORES

O texto deve ter espaço duplo, as linhas e páginas devem ser numeradas. Destaques: Use frases curtas e muito concisas. Não é recomendável mais de uma linha por item de destaque. Geralmente 3-5 itens de destaque são aceitáveis. Duas partes "Resultados" e "Discussão" que podem ser mescladas em uma parte "Resultados e discussão".

Os dados de reprodutibilidade são obrigatórios. As ilustrações devem ter alta qualidade de resolução. Todas as legendas devem ser reunidas em páginas específicas colocadas após o texto e antes das Tabelas e Figuras. Cinco *referees* de reputação internacional devem ser sugeridos, cujo trabalho é citado no trabalho submetido ou que estiveram trabalhando no(s) tópico(s). O idioma deve ser cuidadosamente verificado por um Serviço de Edição de Língua Inglesa (ou pelo menos por um colega profissional Inglês técnico é fluente).

INTRODUÇÃO

Processo Bioquímico, é uma revista de pesquisa orientada para aplicação dedicada a relatar avanços com originalidade e novidade, na ciência e tecnologia dos processos que envolvem moléculas bioativas e organismos vivos. Esses processos, dizem respeito à produção de metabólitos ou materiais úteis, ou a remoção de compostos tóxicos usando ferramentas e métodos da biologia e engenharia atuais. Suas principais áreas de interesse incluem novos bioprocessos e tecnologias capacitadoras (como nanobiotecnologia, engenharia de tecidos, evolução dirigida, engenharia metabólica, biologia de sistemas e biologia sintética) aplicáveis em alimentos (nutracêuticos), saúde (médica, farmacêutica, cosmética), energética (biocombustíveis), ambiental e biorrefinaria e seus princípios biológicos e de engenharia subjacentes.

Os principais tópicos abordados incluem, com a maioria dos possíveis aspectos e domínios de aplicação: cultura celular e fermentação, bioquímica e engenharia de biorreatores; processos de biotecnologia e seus aspectos de ciências da vida; biocatálise, engenharia enzimática e biotransformação; e processamento a jusante.

Manuscritos e dados usando metodologia de superfície de resposta (MSR), que são principalmente descritivos, sem qualquer explicação fisiológica ou sistêmica ou correlações, não são adequados para submissão à revista.

TIPOS DE ARTIGOS

Processos Bioquímicos aceita três tipos de manuscritos: artigos de corpo inteiro, comunicações breves, revisões e correspondência.

Os **artigos de corpo inteiro** não devem exceder 25 páginas de texto com espaçamento duplo (sem incluir as referências) e não devem conter mais de 15 figuras e/ou tabelas.

As **comunicações breves** não devem exceder 10 páginas de texto em espaço duplo (sem incluir as referências) e não mais que 5 figuras e/ou tabelas.

As **revisões** geralmente não devem exceder 20 páginas em espaço duplo de texto (sem incluir as referências) e não devem conter mais de 10 figuras e/ou tabelas.

Artigos de correspondência (Carta ao Editor) discutindo artigos recentemente publicados na revista ou assuntos de interesse geral para os leitores serão considerados para publicação. Autores de artigos que são objeto de comentário será dada uma oportunidade para responder. As cartas não podem exceder 800 palavras e 10 referências.

Publicações aceleradas às vezes podem ser levadas em consideração. Os autores devem explicar claramente seu pedido de tratamento acelerado na carta de apresentação.

DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Todos os autores devem divulgar quaisquer relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou organizações que possam influenciar de forma inadequada (enviesar) o seu trabalho. Exemplos de potenciais interesses competitivos, incluem: emprego, consultorias, propriedade de ações, honorários, testemunho de perito pago, pedidos/registros de patentes e subsídios ou outro financiamento. Os autores devem divulgar qualquer interesse em dois lugares:

1. Uma declaração sumária de declaração de interesse no arquivo da página de título ou o arquivo do manuscrito. Se não houver interesse a declarar, indique: "Declarações de interesse: nenhuma". Esta declaração sumária será finalmente publicada se o artigo for aceito.

2. Divulgações detalhadas como parte de um formulário separado de Declaração de Interesse, que faz parte dos registros oficiais da revista. É importante que interesses em potencial sejam declarados em ambos os lugares e que as informações correspondam.

PREPARAÇÃO

ESTRUTURA DO ARTIGO

Os textos devem ter espaço duplo com todas as linhas numeradas e ser o mais conciso possível. Todos os manuscritos devem ser submetidos no seguinte formato: Página de título; segunda página contém o resumo e palavras-chave; páginas subsequentes incluem: Introdução, Materiais e métodos, Resultados, Discussão, Agradecimento(s), Referências, Legendas de figuras, Tabelas e Figuras.

As legendas de figuras devem ser reunidas em uma página separada, seguida de tabelas e figuras com uma página separada para cada uma. Para os resultados do projeto experimental, como eles não são cientificamente utilizáveis, os números 3D são geralmente desconsiderados. Indique então apenas os dados pertinentes em diagramas 2D. A numeração de páginas começa na primeira página.

As seções de Resultados e Discussão podem ser combinadas, mas devem ser aprofundadas na discussão sobre a novidade e o impacto do trabalho submetido. Artigos sem discussão suficiente serão sistematicamente rejeitados. As legendas para tabelas e figuras devem ser completas e concisas: uma figura ou uma tabela deve ser perfeitamente compreensível com sua própria legenda, e lendas incompletas não serão aceitas. Recomenda-se a utilização de um título conciso e curto, seguido de outra(s) frase(s), incluindo detalhes específicos.

Introdução

Deve ser conciso na descrição de fundo a relacionar aos objetivos e novidades do trabalho.

Material e métodos

Forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido, incluindo as informações sobre fornecedores e números de catálogo, quando apropriado. Os métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: somente modificações relevantes devem ser descritas.

Resultados e discussão

Essas duas partes podem ser separadas como "Resultados" e "Discussão" ou combinadas em uma seção. A discussão sobre cada ponto importante dos resultados é muito importante e não deve repetir os resultados experimentais; citação geralmente de referências relacionadas é necessária.

Conclusões

Esta seção não é obrigatória e pode existir como um parágrafo curto no final da seção "Resultados e Discussão". Quando existe como uma seção, deve ser curta e concisa, mas não deve repetir o resumo. Geralmente a Conclusão não cita referências, e é diferente da discussão.

INFORMAÇÕES ESSENCIAIS DA PÁGINA DE TÍTULO

- Título. Conciso e informativo. Títulos são freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evitar abreviaturas e fórmulas, sempre que possível.

- Nomes e afiliações dos autores. Por favor indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão escritos com precisão. Você pode adicionar seu nome entre parênteses em seu próprio script por trás da transliteração em inglês. Apresentar a afiliação dos autores endereços (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com letras minúsculas, carta sobrescrita imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o Endereço de e-mail de cada autor.

- Autor correspondente. Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as etapas da revisão e publicação, também pós-publicação. Esta responsabilidade inclui responder a quaisquer futuras consultas sobre Metodologia e Materiais. Assegure-se de que o endereço de e-mail seja fornecido e que os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente.

- Endereço presente/permanente. Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando no momento, um 'endereço atual' (ou 'endereço permanente') pode ser indicado como uma nota de rodapé ao nome desse autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser retido como o principal endereço de afiliação. Números árabes sobrescritos são usados para tais notas de rodapé.

Resumo

Limites de palavras: 100-150 palavras para comunicações curtas e 150-200 palavras para artigos de corpo inteiro e comentários. Fornecer um breve histórico da pesquisa e uma descrição dos resultados sem detalhamento experimental extensivo. Resumir a importância dos resultados e não incluir citações de referência. Evitar abreviaturas incomuns.

Resumo gráfico

Um resumo gráfico é obrigatório para trabalhos de pesquisa, mas não para artigos de revisão. Deve resumir o conteúdo do artigo em uma forma concisa e projetada para capturar a atenção de um público amplo. Um resumo gráfico deve ser enviado como um arquivo

separado no sistema de submissão online. Tamanho da imagem: forneça uma imagem com um mínimo de 531 × 1328 pixels (h × w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser legível em um tamanho de 5 × 13 cm usando uma resolução de tela regular de 96 dpi. Tipos de arquivos preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office.

Destaques

Três a cinco destaques são necessários. Cada destaque pode ter no máximo 85 caracteres, incluindo espaços. Transmitir os principais resultados para dar uma visão geral do artigo. Enviar como um arquivo de origem separado no EES; por exemplo, Word .doc (NÃO um .PDF).

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 6 palavras-chave, usando ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e vários conceitos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Seja cuidadoso com abreviaturas: apenas as abreviaturas firmemente estabelecidas no texto podem ser considerados. Essas palavras-chave serão usadas para propósitos de indexação.

Abreviaturas

Abreviações para unidades devem seguir as sugestões da publicação British Standards BS 1991.

O ponto final não deve ser incluído em abreviaturas, por ex. m (não m.), ppm (não p.p.m.),% devem ser usados de preferência para 'por cento' e 'per'. Onde as abreviações são susceptíveis de causar ambiguidade ou podem não ser prontamente compreendidas por um público internacional, as unidades devem ser colocadas na íntegra.

Nomenclatura e Unidades

O sistema SI deve ser usado para todos os dados científicos e laboratoriais: se, em certos casos, é necessário citar outras unidades, estas devem ser adicionadas entre parênteses. As temperaturas devem ser dadas em graus Celsius. A unidade 'bilhões': 10^9 na América (dez na potência 9) e 10^{12} na Europa (dez na potência 12), é ambígua e não deve ser usada.

ARTE ELETRÔNICA

Pontos gerais

- Certifique-se de usar letras e tamanhos uniformes de seu trabalho original.
- Procure usar as seguintes fontes nas suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes semelhantes.

- Numere as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
- Use uma nomenclatura lógica para seus arquivos de ilustrações.
- Forneça legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações perto das dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.

Formatos

Se sua arte eletrônica for criada em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), por favor, forneça 'as is' no formato de documento nativo.

Independentemente do aplicativo usado diferente do Microsoft Office, quando sua arte eletrônica é finalizado, por favor 'Salvar como' ou converta as imagens em um dos seguintes formatos (observe a resolução requisitos para desenhos de linhas, meios-tons e combinações de linha/meio-tom abaixo:

EPS (ou PDF): desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes usadas.

TIFF (ou JPEG): fotografias coloridas ou em tons de cinza (meios-tons), mantenha no mínimo 300 dpi.

TIFF (ou JPEG): Desenhos de linha Bitmap (pixels pretos e brancos puros), mantenha no mínimo 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): Combina a linha/meio-tom de bitmap (colorida ou tons de cinza), mantenha no mínimo 500 dpi.

Arte de cor

Certifique-se de que os arquivos de ilustrações estejam em um formato aceitável (arquivos TIFF, EPS ou MS Office) e com a resolução correta. Se, junto com o artigo aceito, você enviar valores em cores utilizáveis, a Elsevier garantirá, sem custo adicional, que esses números aparecerão em cores na Web (por exemplo, ScienceDirect e outros sites).

REFERÊNCIAS

As referências devem ser citadas no ponto apropriado no texto por um número entre colchetes.

Uma lista de referências, em ordem numérica, deve aparecer no final do artigo. Todas as referências nesta lista devem ser indicadas em algum momento do texto e vice-versa. Dados não publicados ou comunicações privadas E ENDEREÇOS DO SITE não devem aparecer na lista.

Citação no texto

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto estão presentes na lista de referências (e vice-versa). Quaisquer referências citadas no resumo devem ser dadas na

íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências forem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e incluir uma substituição da data de publicação por "Resultados não publicados" ou "Comunicação pessoal". A citação de uma referência como *'in press'* implica que o item foi aceito para publicação.

Estilo de referência

- Texto: Indicar referências por número(s) entre colchetes na mesma linha com o texto. Os autores reais podem ser referidos, mas o(s) número(s) de referência deve(m) sempre ser dado(s).

Exemplo: '.....como demonstrado por [3,6]. Barnaby e Jones [8] obtiveram um resultado diferente.

- Lista: Numere as referências (números entre colchetes) na lista na ordem em que aparecem no texto.

Exemplos:

1. Referência a uma publicação de periódico:
[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.
2. Referência a uma publicação de periódico com um número de artigo:
[2] Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.
3. Referência a um livro:
[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.
4. Referência a um capítulo de um livro editado:
[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.
5. Referência a um site:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (acesso 13 Março 2003).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar, como aplicativos, imagens e clipes de som, pode ser publicado com o seu artigo para aprimorá-lo. Os itens suplementares enviados são publicados exatamente como são recebidos (os arquivos do Excel ou PowerPoint aparecerão online). Por favor, envie seu material junto com o artigo e fornecer uma legenda descritiva e concisa para cada arquivo suplementar. Se você deseja fazer alterações no material suplementar durante qualquer fase do processo, por favor, certifique-se de fornecer um arquivo atualizado.

Não anote nenhuma correção em uma versão anterior. Por favor, desligue a opção 'Track Changes' nos arquivos do Microsoft Office, pois eles aparecerão na versão publicada.

Legendas de material suplementares

Cada arquivo de material suplementar deve ter uma legenda curta que será colocada na parte inferior do artigo, onde pode ajudar o leitor e também ser usada pelos mecanismos de busca.

DADOS DE PESQUISA

Esta revista encoraja e permite que você compartilhe dados que suportam sua publicação de pesquisa quando apropriado, e permite interligar os dados com seus artigos publicados. Os dados da pesquisa referem-se aos resultados das observações ou experimentações que validam os resultados da pesquisa. Para facilitar a reprodutibilidade e reutilização de dados, este periódico também incentiva você a compartilhar seu software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados ao projeto.

Abaixo estão algumas maneiras pelas quais você pode associar dados ao seu artigo ou fazer uma declaração sobre a disponibilidade de seus dados ao enviar seu manuscrito. Se você está compartilhando dados de uma destas maneiras, incentive-os a citar os dados em seu manuscrito e lista de referências. Por favor, consulte a seção "Referências" para mais informações sobre a citação de dados. Para obter mais informações sobre como depositar, compartilhar e usar dados de pesquisa e outros materiais de pesquisa relevantes, visite a página de dados de pesquisa.