



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia celular

Programa de pós-graduação em Biologia Microbiana

## **Bioprospecção e caracterização de bactérias anaeróbicas como fonte de enzimas industriais**

**Alonso Roberto Poma Ticona**

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliane Ferreira Noronha**

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, para obtenção do Título de Doutor

Brasília, DF

Julho de 2019



**Bioprospecção e caracterização de bactérias anaeróbicas  
como fonte de enzimas industriais**

**Alonso Roberto Poma Ticona**

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliane Ferreira Noronha**

Brasília, DF

Julho de 2019

Alonso Roberto Poma Ticona

Bioprospecção e caracterização de bactérias anaeróbicas como  
fonte de enzimas industriais

Tese apresentada à Universidade de  
Brasília, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Microbiana, para obtenção do Título de Doutor

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Betania Ferraz Quirino (UnB)

---

Profa. Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues (Embrapa)

---

Prof. Dr. Aisel Valle Garay (UnB)

---

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (UnB)  
(Suplente)

---

Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha (UnB)  
(Orientadora)

Aos meus pais, Roberto Poma e Francisca Ticona,

À minha irmã Rocio

DEDICO!

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre comigo, me dar força interior, ânimo e coragem para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

À minha família que são minha fonte de inspiração. Por acreditarem em mim e me dar a certeza de que não estou sozinho durante a caminhada.

À minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliane F. Noronha, que tem me mostrado o caminho da ciência. Pela oportunidade de aprendizado, paciência, dedicação e credibilidade depositada em mim ao longo desse período de doutorado.

Ao professor Dr. Cirano, pelo incentivo à pesquisa, orientações, bom humor e disponibilidade quando foi necessário.

A meu grupo de pesquisa do laboratório de Enzimologia, pela agradável convivência, paciência, ensinamentos e discussões de trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos, em Brasília e Goiânia, pela amizade e paciência.

A Universidade Brasília (UnB), pela infraestrutura e apoio para desenvolvimento deste trabalho.

A Capes e CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

*La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.*

***Louis Pasteur***

## SUMÁRIO

ABSTRACT .....	10
Introdução .....	11
1. A biomassa vegetal como fonte potencial de recursos renováveis .....	11
2. Características gerais da biomassa vegetal .....	14
3. Hidrólise enzimática da biomassa vegetal.....	16
4. Uso de enzimas na hidrólise de biomassa vegetal.....	20
5. Bactérias ruminais e desconstrução de biomassa vegetal .....	26
6. <i>Paenibacillus barengoltzii</i> .....	31
Objetivo geral .....	35
Objetivos específicos.....	35
CAPÍTULO 1. Isolamento, identificação e caracterização de bactérias anaeróbicas celulolíticas e amilolíticas de rúmen de bovino ( <i>Bos taurus</i> ).....	36
1. Metodologia.....	37
1.1 Coleta de amostras .....	38
1.2. Isolamento de bactérias .....	39
1.3. Análise da produção de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xilanaase e $\alpha$ -amilase pelos isolados bacterianos .....	40
1.4 Análises por eletroforese em gel SDS-PAGE e zimograma .....	41
1.5 Identificação dos isolados bacterianos .....	42
2. Resultados e discussão.....	46
CAPÍTULO 2 – Este capítulo foi submetido para publicação na revista Waste and Biomass Valorization .....	67
<i>Paenibacillus barengoltzii</i> A1_50L2 as a source of plant cell wall degrading enzymes and its use on lignocellulosic biomass hydrolysis.....	67
Abstract .....	69
Introduction.....	70
Material and Methods.....	71

Bacteria isolation and characterization .....	71
Molecular identification of isolate A1_50L2 .....	72
Production of plant cell degrading enzymes by <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2 .....	73
Enzymatic assays and protein quantification.....	74
Enzymatic characterization.....	75
Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.....	76
Statistical analysis .....	77
Results and discussion.....	78
References .....	92
Supplementary Files.....	98
Capítulo 3. Produção e caracterização parcial da atividade de $\alpha$ -amilase do sobrenadante de <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.....	102
1. Metodologia.....	103
1.1. Manutenção e cultivo do microrganismo .....	103
1.2. Efeito do pH e temperatura no crescimento de <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2	103
1.3. Curva de crescimento de <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2.....	103
1.4. Avaliação do consumo do amido e liberação de açúcar redutor .....	104
1.5. Cinética da produção de $\alpha$ -amilase .....	104
1.6. Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE e Zimograma .....	105
1.7. Efeito do pH e temperatura na atividade de $\alpha$ -amilase.....	105
1.8. Estabilidade térmica na atividade de $\alpha$ -amilase .....	105
2. Resultados e Discussão .....	106
CONCLUSÕES .....	116
PERSPECTIVAS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	118
ANEXO I.....	138
ANEXO II.....	139



## RESUMO

O mercado de enzimas industriais tem um grande impacto na economia mundial. Microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) são a fonte principal de enzimas para aplicação em diferentes processos industriais. Diferentes biomas podem ser explorados como fonte de microrganismos visando sua exploração biotecnológica, principalmente aqueles naturalmente enriquecidos para uma determinada função. Como por exemplo, o rúmen, naturalmente enriquecido com microbiota capaz de hidrolisar biomassa vegetal como lignocelulose e amido. Este trabalho teve como objetivo a prospecção e caracterização de bactérias anaeróbicas isoladas de rúmen bovino como fonte de enzimas para aplicação industrial. Amostras de conteúdo ruminal bovino foram inoculadas em meio líquido redutor contendo celulose ou amido como fonte de carbono sob atmosfera anaeróbica e posteriormente utilizadas para isolamento por cultivo a 37, 50 ou 60°C em meio sólido contendo carboximetilcelulose, celulose ou amido como fontes de carbono. Foram obtidos 46 isolados bacterianos e destes sete apresentaram valores superiores de atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase e endo-1,4- $\beta$ -xilanase, e 4 apresentaram atividade de  $\alpha$ -amilase. O isolado A1\_50L2 identificado pela sequência de 16S rDNA como da espécie *Paenibacillus barengoltzii* foi selecionado para caracterização quanto à produção de holocelulases e  $\alpha$ -amilase. *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 cresceu em meios contendo celulose, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono, e secretou celulases, xilanases, mananases e pectinases. A análise de zimograma mostrou três isoformas de endo-1,4- $\beta$ -glucanase (42, 45 e 63 kDa), seis isoformas de endo-1,4- $\beta$ -xilanase (21, 23, 43, 60, 85 e 105 kDa) e apenas 1 banda de 62 kDa com atividade de mananase. O secretoma de *P. barengoltzii* A1\_50L2 obtido pelo crescimento em farelo de trigo, (PbEC) apresentou atividade ótima de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase,  $\beta$ -glicosidase, endo-1,4- $\beta$ -xilanase e mananase na faixa de pH 4 a 7 e temperatura ótima a 50 °C. PbEC foi resistente a compostos fenólicos como ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e ácido cumárico mantendo atividade residual acima de 70 %, e 60% mesmo após 5 dias de incubação. PbEC mostrou sinergismo com a mistura comercial Viscozyme, incrementando em 72% a liberação de açúcares redutores de resíduos lignocelulósicos incluindo bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, engaço de bananeira, sabugo e palha de milho e casca de soja. Adicionalmente, a  $\alpha$ -amilase do secretoma de *P. barengoltzii* A1\_50L2 obtida pelo crescimento em amido, apresentou atividade em pH de 6 a 10 e temperatura ótima a 60°C. A análise de zimograma revelou 1 banda de 66 kDa com atividade de  $\alpha$ -amilase que manteve atividade enzimática acima de 60% a 50°C por 96 horas. Em conclusão, os resultados desse trabalho demonstraram que os 46 isolados bacterianos obtidos do rúmen bovino apresentam atividades enzimáticas que apontam sua aplicação em processos industriais de biomassa vegetal, destacando-se as enzimas amilases e holocelulases de *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 na hidrólise de amido e biomassa lignocelulósica. Essas informações podem ser utilizadas para desenvolvimento de novas misturas enzimáticas mais baratas e eficientes aplicadas à processos de biorefinaria.

**Palavras-chave:** Biomassa vegetal, enzimas industriais, bactérias ruminais, bioprospecção.

## ABSTRACT

The market for industrial enzymes has a major impact on the world economy. Microorganisms (bacteria, yeasts, and fungi) are the main source of enzymes for application in different industrial processes. Different microbiomes can be exploited as a source of microorganisms aiming biotechnological exploration, especially those naturally enriched for a given function such as the rumen, a naturally enriched microbiome capable of hydrolyzing plant biomass such as lignocellulose, and starch. This work aimed at the prospection and characterization of anaerobic bacteria isolated from bovine rumen as a source of enzymes for industrial application. Samples from bovine ruminal content were inoculated in liquid medium containing cellulose or starch as a carbon source under anaerobic atmosphere and subsequently used for isolation by culturing at 37, 50 or 60 °C on solid medium containing carboxymethylcellulose (CMC), cellulose or starch as carbon sources. A total of 46 bacterial isolates were obtained and seven of these isolates displayed highest activity of endo-1,4- $\beta$ -glucanase and endo-1,4- $\beta$ -xylanase, and four presented  $\alpha$ -amylase activity. Isolate A1\_50L2 identified as *P. barengoltzii* by the 16S rDNA sequence was selected for characterization and production of holocellulases and  $\alpha$ -amylase. *P. barengoltzii* A1\_50L2 was grown in liquid medium containing cellulose, wheat bran, sugarcane bagasse, and secreted cellulases, xylanases, mannanases and pectinases. Zymogram analysis revealed three endo-1,4- $\beta$ -glucanase isoforms (42, 45 and 63 kDa), six endo-1,4- $\beta$ -xylanase isoforms (21, 23, 43, 60, 85 and 105 kDa) and one band of 62 kDa with mannanase activity. The secretome of *P. barengoltzii* A1\_50L2 obtained by growth on wheat bran (PbEC) presented optimum activity of endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase,  $\beta$ -glucosidase, endo-1,4- $\beta$ -xylanase and mannanase in a range of pH 4 to 7 and optimum temperature at 50 °C. PbEC was tolerant to phenolic compounds such as gallic acid, ferulic acid, cinnamic acid, and coumaric acid, maintaining residual activity above 70%, and 60% after 5 days of incubation. PbEC showed synergism with commercial Viscozyme, increasing by 72% the release of the reducing sugar on lignocellulosic residues including sugarcane bagasse, wheat bran, banana stem, corncob, corn stover, and soya husk. Additionally, *P. barengoltzii* A1\_50L2  $\alpha$ -amylase obtained by starch growth culture showed activity at pH 6 to 10 and optimum temperature at 60 °C. Zymogram analysis revealed 1 band of 66 kDa with  $\alpha$ -amylase activity, and this activity was maintained above 60% at 50 °C up to 96 hours. In conclusion, the results of this work demonstrated that 46 bacterial isolates obtained from bovine rumen present enzymatic activities that indicate their application in industrial plant biomass processes, especially amylases and holocellulases from *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 on hydrolysis of starch and lignocellulosic biomass. This information can be used to develop inexpensive enzymatic mixtures for application in biorefinery processes.

**Keywords:** Plant biomass, industrial enzymes, ruminal bacteria, bioprospecting.

## **Introdução**

### **1. A biomassa vegetal como fonte potencial de recursos renováveis**

O desenvolvimento de tecnologias renováveis tem recebido mais atenção no cenário mundial como resposta a uma prioridade global de sustentabilidade ambiental (Administration 2017). A conversão de matérias primas renováveis, como a biomassa vegetal, em produtos de valor econômico é um exemplo de tecnologia renovável. Neste conceito, surgem as biorefinarias que são unidades tecnológicas que têm como objetivo a utilização completa da biomassa vegetal visando tornar o processo de produção de etanol celulósico economicamente viável e reduzir o impacto ambiental (Bhowmick, Sarmah, and Sen 2018).

A produção mundial de biomassa vegetal composta de resíduos de floresta, agricultura, agroindústria e alimentos foi estimada em  $200 \times 10^9$  toneladas por ano, representando uma das maiores fontes de carbono renovável no mundo (Bhowmick et al. 2018). O Brasil se encontra em uma situação privilegiada por ser um país de grande produção agroindustrial, gerando quantidades significativas de resíduos de biomassa durante a colheita e o processamento de produtos agrícolas, como arroz, algodão, cana-de-açúcar, milho, soja, cevada, mandioca e outros. Dentre estes, a soja e a cana-de-açúcar são particularmente importantes para a economia agroindustrial brasileira (Blácido, Maniglia, and Tosi 2017).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar respondendo por 50% da produção de açúcar no mundo e o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar. De acordo com o terceiro levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) feita em dezembro, a produção estimada na safra 2017/18, foram 615,84 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas pelas indústrias sucroalcooleiras, resultando na geração de resíduos de palha e bagaço de cana-de-açúcar. A palha é composta por folhas verdes, folhas secas e a parte superior do colmo, as quais são geradas durante o processo de colheita mecanizada, já o bagaço de cana-de-açúcar é obtido após a moagem do colmo para obtenção do suco da cana, sendo que para cada tonelada moída gera em torno de 270 a 280 kg

de bagaço (Bordonal et al. 2018). No entanto, 50% dessa biomassa gerada no processo é queimada com a finalidade de gerar bioeletricidade, o que promove a emissão de poluentes. Estima-se que, a cogeração de bioenergia através da queima da palha e bagaço de cana-de-açúcar representam 2/3 da energia total da planta (Lopes Silva et al. 2014).

Nesse contexto, os resíduos da indústria de cana-de-açúcar se destacam como fonte energética frente aos outros resíduos vegetais brasileiros, uma vez que suas características físico-químicas os tornam propícias para geração de calor, energia elétrica e etanol celulósico (Lopes Silva et al. 2014).

Um outro resíduo que merece destaque é a soja. No Brasil, este grão corresponde a 30% da produção global o que coloca o país na posição de o segundo maior produtor de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O processamento da soja destinada à alimentação humana acumula grande quantidade de resíduos como palha e casca de soja (Blácido et al. 2017). Foram estimados, na safra de 2017/2018 mais de 117 milhões de toneladas de soja processada pelas agroindústrias dedicadas à produção de óleos, grãos e farelo (Conab 2018b). Tradicionalmente, a palha de soja, composta por caule e folhas secas, tem sido utilizada em um manejo agrícola denominado cobertura morta, que consiste na permanência desta palha sobre o solo de cultivo propiciando proteção contra erosão e redução da temperatura do solo, incrementando a atividade biológica e maior disponibilidade de água, devido à diminuição da evapotranspiração (Blácido et al. 2017).

Outro produto de importância agroindustrial brasileira é a mandioca. A importância econômica da cultura está relacionada às suas raízes ricas em amido destinadas à alimentação humana como farinha e fécula de mandioca, bem como para ração animal. Só no ano de 2018, foram produzidas quase 20 milhões de toneladas de mandioca (Conab 2018a).

Considerando-se os principais tipos de processamento industrial de mandioca no Brasil, como farinha e fécula, alguns subprodutos sólidos são

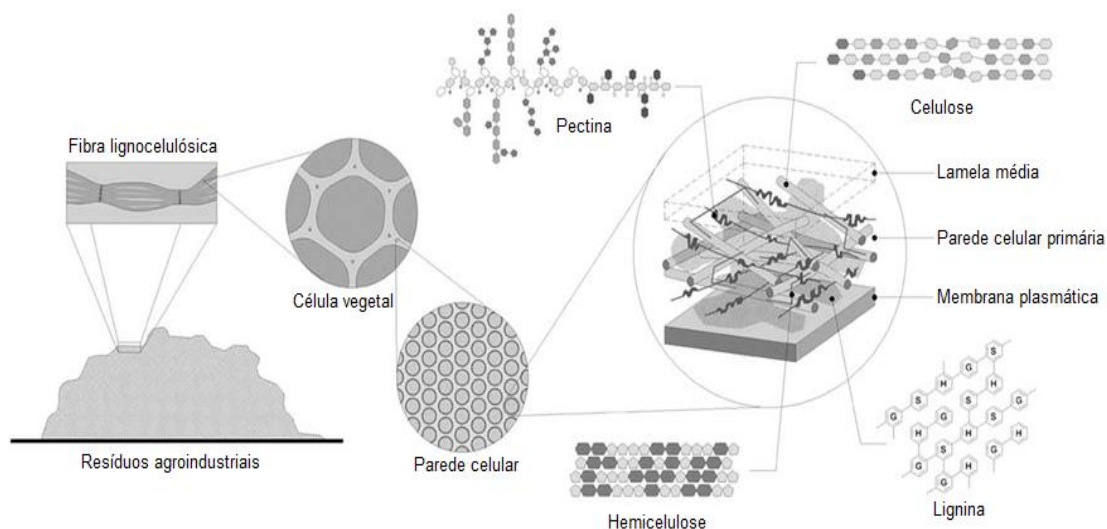
gerados sendo a casca marrom, entrecasca, descarte, crueira, fibra, farelo e a varredura, e subprodutos líquidos como a água de lavagem das raízes e manipueira. O farelo é o principal resíduo sólido produzido, e segundo Martinez e Feiden (2017), para cada tonelada de raízes de mandioca processada são produzidos cerca de 930 kg de farelo úmido com cerca de 75% de amido e 11,5% de fibras. Este material tem sido aproveitado no solo como fertilizante e também na alimentação animal; no entanto, mesmo fazendo uso destes processos, ainda continua sendo um problema para as indústrias dedicadas à processamento da mandioca (Peixoto e Resch, 2018). Diante de sua composição e da considerável quantidade gerada, diversos estudos vêm sendo realizados buscando o uso destes resíduos para geração de xarope de glicose, etanol e produtos ricos em fibras (Martinez 2016).

Resíduos de biomassa vegetal, tais como farelo de mandioca, palha de milho, de arroz, trigo, resíduos de bagaço de cana de açúcar e casca de soja, vêm sendo explorados para a produção de etanol de segunda geração, bioplásticos e produção de enzimas (Nanda et al. 2015).

Nesse sentido, o aproveitamento dos resíduos de biomassa aqui citados abre uma nova possibilidade de negócios gerando receita às indústrias, além disso, incrementa a captação de recursos de impostos reaplicados para o benefício da população, além de contribuir com a redução de contaminação ambiental e a sustentabilidade dos processos produtivos (Luft et al. 2017; Virmond et al. 2013).

## 2. Características gerais da biomassa vegetal

A biomassa lignocelulósica é o material mais abundante presente na terra, sendo constituído principalmente por celulose, hemicelulose e em menor proporção pectina, polímeros presentes na parede primária das plantas, e lignina, constituinte da parede secundária, que confere em geral proteção à planta (Bentsen, Felby, and Thorsen 2014).



**Figura 1.** Estrutura da parede celular de resíduos agroindustriais (Siqueira e Filho, 2010).

A celulose (30-40%) é o principal componente da parede celular da planta, sendo o polímero mais abundante no mundo. Em plantas, a celulose é um homopolímero altamente estável e a sua estrutura organizacional pode ser descrita em três partes: (i) a primeira refere-se à constituição linear não ramificada da celulose, formado por resíduos de glicose através de ligações do tipo  $\beta$ -1,4; (ii) a segunda diz respeito à conformação espacial das cadeias longas de celulose, formando microfibrilas, unidas por ligações de hidrogênio intramoleculares; (iii) a terceira está relacionado à associação das microfibrilas de celulose unidas por ligações de hidrogênio e Van der Waals, formando agregados de estrutura cristalina (Bajpai P. 2016). Estas fibras de celulose dispostas em cadeias espirais e unidas através de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, associadas a estruturas cristalinas conferem resistência às plantas (Anwar, Gulfranz, and Irshad 2014b). Em particular, o arranjo dessas cadeias em microfibrilas, unidas por

ligações de hidrogênio, caracteriza diferentes graus de polimerização, definindo sua estrutura cristalina (Bertoft 2017).

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante, compreendendo cerca de 20 a 30% dos carboidratos da biomassa vegetal. Apresenta uma estrutura constituída por heteropolissacarídeos com estruturas lineares ou ramificações de cadeias laterais curtas que consistem de diferentes tipos de açúcares. Estes monossacarídeos podem ser as pentoses (xilose, ramnose e arabinose), as hexoses (glicose, manose e galactose) e os açúcares ácidos (ácido 4-O-metilglucurônico, D-glucurônico e D-galacturônico).

Dessa forma, a hemicelulose é constituída por uma cadeia principal, como por exemplo xilana (xilose), manana (manose) e arabinana (arabinose) com ligações  $\beta$ -1,4, envolvidos por diversas ligações com outros compostos, como por exemplo, resíduos de arabinose unidos através de ligações  $\alpha$ -1,3 no polímero de xilana (arabinoxilana), assim como resíduos de ácido 4-O-metilglucurônico e D-glucurônico unidos através de ligações  $\alpha$ -1,2 (glucoronoxilana) e também resíduos de galactose unidos por ligações  $\alpha$ -1,6 no polímero de manana (galactomanana). Além disso, ocasionalmente outros resíduos como ramnose e frutose podem ser encontrados em menor número nessas cadeias (Bhowmick et al. 2018; Raveendran Sindhu, Binod, and Pandey 2016).

A lignina confere à planta suporte estrutural, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano e estresse oxidativo. A estrutura da lignina possui uma rede polimérica complexa, formada por polimerização de monômeros de 4-hidroxifenilpropanóide, também conhecidos como monolignóis através de ligações do tipo éter (C-O-C) e carbono-carbono (C-C). Três tipos de monolignóis são encontrados como monômeros da lignina, álcool *p*-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil e a porcentagem de cada um destes monômeros depende do tecido e espécie da planta. O teor de lignina e sua íntima associação com microfibrilas de celulose e hemicelulose são fatores responsáveis pela recalcitrância das plantas, dificultando a hidrólise enzimática e microbiana (Shrotri, Kobayashi, and Fukuoka 2017; Zeng et al. 2014).

As pectinas se encontram nas paredes primárias que circundam as células em crescimento e em divisão e na lamela média, mantendo as células adjacentes unidas. Estruturalmente, a pectina é um polissacarídeo formado por resíduos de ácido D-galacturônico unidos através de ligações  $\alpha$ -1,4, dando origem à cadeia de homogalacturonana (HG). A homogalacturonana também tem ligações  $\alpha$ -1,4 com alguns resíduos como ramnose, galactano, arabinano, ácido acérico e apiose, tem como resultado as cadeias de ramnogalacturonana I, xilogalacturonana e ramnogalacturonana II (Raveendran Sindhu et al. 2016).

Por outro lado, o amido é um polímero de glicose armazenado em organelas denominadas cloroplastos das folhas e amiloplastos de tubérculos, sementes e raízes para acumulação de amido como substância de reserva (Sarian et al. 2012). Ele está amplamente distribuído em diversas espécies vegetais tais como leguminosas (30-50% do peso seco), grãos de cereais (40-50% do peso seco), frutas imaturas (40-70% do peso seco) e tubérculos (65-85% do peso seco) (Denardin and Silva 2008).

Estruturalmente, o amido é constituído por dois tipos de polissacarídeos chamados amilose e amilopectina (Sarian et al. 2012). Amilose é um polímero linear insolúvel em água composto de 250 a 300 resíduos de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, que conferem à molécula uma estrutura helicoidal. Já a amilopectina é composta de 15 a 65 resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, ocorrendo também ligações  $\alpha$ -1,6, que conferem a ela uma estrutura ramificada (Bertoft 2017).

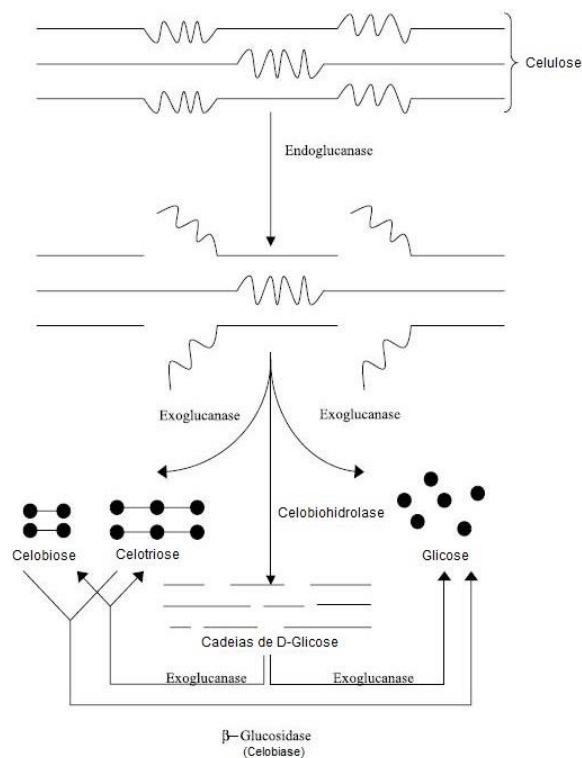
### **3. Hidrólise enzimática da biomassa vegetal**

A sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos e amiláceos com o objetivo de obter açúcares fermentescíveis para produção de bioprodutos de interesse industrial requer a ação de enzimas altamente específicas cujo produto final é principalmente a glicose. O complexo enzimático é composto por enzimas hidrolíticas como celulases, hemicelulases e pectinases que hidrolisam a estrutura completa da biomassa lignocelulósica, assim como as



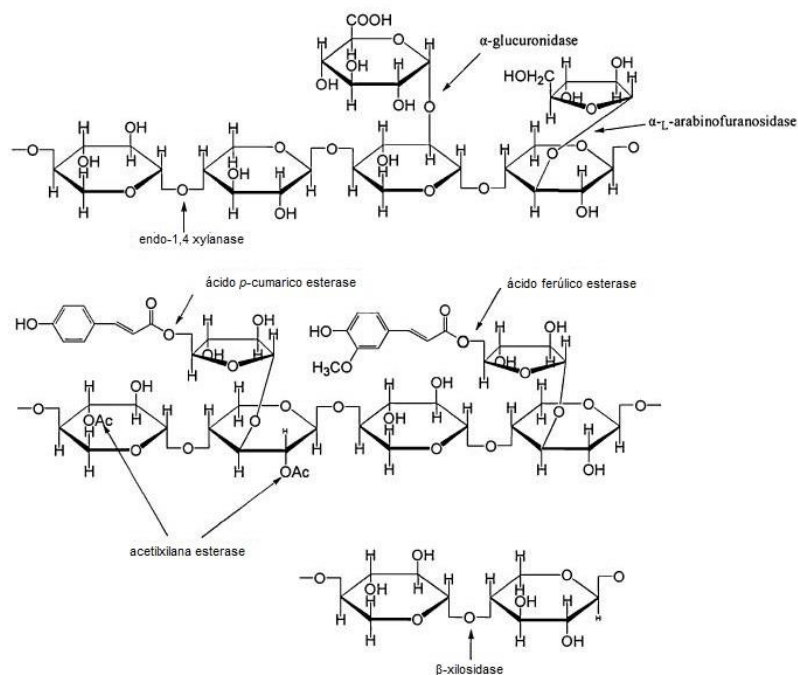
amilases que catalisam a hidrólise de resíduos de amido (Bhattacharya et al., 2015; Negi e Vibha, 2016).

A hidrólise enzimática de celulose requer a ação das endoglucanases (EC 3.2.1.4) que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4 randomicamente e internamente nas porções da celulose amorfa, liberando cadeias com extremidades redutoras e não redutoras para a ação de exoglucanases (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.74). Já as exoglucanases ou celobiohidrolases catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas a partir das extremidades da celulose liberando monômeros, dímeros e trímeros (glicose, celobiose e celotriose), atuando inclusive sobre celulose cristalina. As  $\beta$ -glicosidases catalisam a hidrólise de oligossacarídeos de cadeia pequena, como por exemplo, celobiose em duas moléculas de glicose (Shuddhodana, Gupta, and Bisaria 2018).



**Figura 2.** Hidrólise enzimática da celulose (Bajpai P. 2016).

A hidrólise enzimática da hemicelulose requer a participação sinérgica de múltiplas enzimas devido à complexidade de sua estrutura, requerendo a participação de endo  $\beta$ -1,4-xilanases (E.C.3.2.1.8), que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4 das regiões internas da cadeia polimérica de xilana. Já as  $\beta$ -xilosidades (E.C.3.2.1.37) catalisam a hidrólise de xilobiose e xilooligossacarídeos em moléculas de xilose. Outras enzimas também estão envolvidas na hidrólise da xilana, devido à natureza complexa destes polissacarídeos:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (E.C.3.2.1.55) hidrolisa as ligações  $\alpha$ -glicosídicas entre arabinose e xilose; acetil xilana esterase (E.C.3.1.1.72) remove os grupos O-acetil das posições 2 e 3 de resíduos de  $\beta$ -D-xilopiranosil; ácido feruloil esterase (E.C.3.1.1.73) catalisa a hidrólise de ligações éster entre cadeias de arabinose e ácido ferúlico; e ácido cumárico esterase hidrolisa ligações éster entre arabinose e ácido p-cumárico (Obeng et al. 2017).



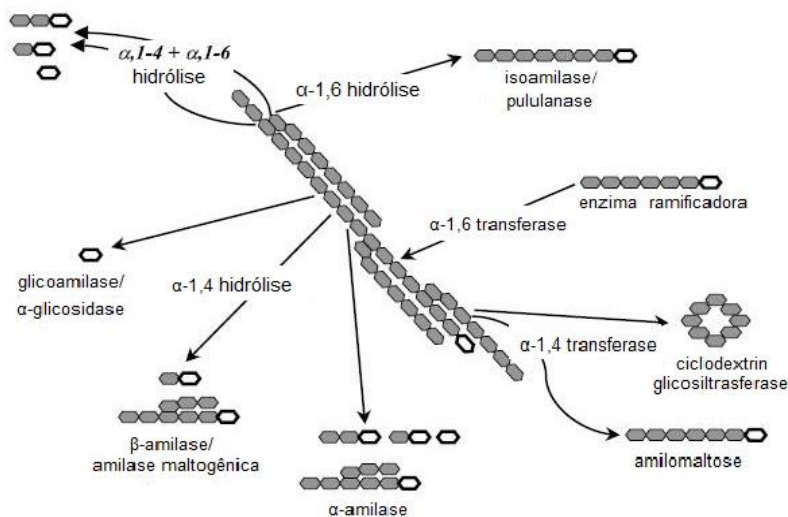
**Figura 3.** Hidrólise enzimática da hemicelulose (Wang et al. 2012).

A degradação da lignina requer a participação de enzimas como as lacases (Lac) que oxidam compostos aromáticos como aminas aromáticas e unidades fenólicas, utilizando oxigênio como aceptor de elétrons, a lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14) que catalisa a oxidação de compostos fenólicos e não-fenólicos da lignina através de várias oxidações e em sinergia com moléculas orgânicas, e manganês peroxidase (E.C. 1.11.1.13) que utiliza Mn(II), H<sup>+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substratos, gerando Mn(III) e H<sub>2</sub>O que se difundem das enzimas para a estrutura de lignocelulose (de Gonzalo et al. 2016; Janusz et al. 2017).

As principais enzimas envolvidas no processo de hidrólise de pectina estão divididas entre liases e hidrolases; dentre elas estão: a pectina metil esterase (E.C. 3.1.1.11), que catalisa a desesterificação dos grupamentos metoxil da pectina liberando homogalacturonana e metanol, as poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15) que são as principais enzimas despolimerizantes e atuam na quebra das ligações  $\alpha$ -1,4 de resíduos não metoxilados de ácido galacturônico, e a pectina liase (E.C. 4.2.2.10) e pectato liase (E.C. 4.2.2.2) que são as principais liases e atuam por mecanismo de trans-eliminação, quebrando as ligações glicosídicas de ácido pécico e ácido galacturônico (Ruiz et al. 2016; Shahid et al. 2017).

As enzimas envolvidas na hidrólise de amido são: as endoamilases, conhecidas como  $\alpha$ -amilases (EC 3.2.1.1) e catalisam randomicamente a hidrólise das ligações  $\alpha$ ,1-4 das regiões internas da cadeia de amilose e amilopectina, formando maltose, maltotriose e  $\alpha$ -dextrina limite (Negi e Vibha, 2016). As  $\beta$ -amilases (EC 3.2.1.2) e  $\alpha$ -glicosidases (EC 3.2.1.20) catalisam a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 das regiões externas da cadeia de amilose e amilopectina, produzindo glicose, maltose e  $\beta$ -dextrina limite. Outras enzimas são, ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) e a  $\alpha$ -amilase maltogênica (glicano 1,4- $\alpha$ -glicanohidrolase, EC 3.2.1.133) (Negi e Vibha, 2016).

Enzimas desramificadoras como as pululanases (EC 3.2.1.41) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 da pululana e amilopectina, enquanto que as isoamilases (EC 3.2.1.68) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina formando oligossacarídeos de cadeia longa. Outro grupo de enzimas, as transferases, hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 da molécula doador e transferem parte de um doador para um aceptor glicosídico formando uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase (EC 2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) formam novas cadeias glicosídicas  $\alpha$ -1,4, enquanto, as enzimas ramificadoras (EC 2.4.1.18) formam novas cadeias de  $\alpha$ -1,6 (Liu et al. 2016; Sarian et al. 2012; R Sindhu, Binod, and Pandey 2016).



**Figura 4.** Degradação enzimática do amido (R Sindhu et al. 2016).

#### 4. Uso de enzimas na hidrólise de biomassa vegetal

A tecnologia enzimática é um subcampo da biotecnologia que visa a aplicação de enzimas em um processo industrial por exemplo, o aproveitamento máximo da biomassa vegetal através da hidrólise enzimática a fim de gerar produtos de alto valor agregado. Os principais produtos que podem ser gerados pelo processamento da biomassa vegetal em biorefinarias são: biocombustíveis (ex. bioetanol, biodiesel, hidrogênio, biometano), ácidos orgânicos (ex. ácido láctico), solventes (ex. acetona, butanol), carvão vegetal, lignina, furfural, entre outros (Nigam, 2013).

Considerando-se que o Brasil possui uma produção agroindustrial que se destaca no cenário mundial, tem-se um ambiente favorável para que o País possa se inserir de forma representativa na área de tecnologia enzimática, que concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matéria prima renovável e a preservação ambiental. O uso de enzimas em processos industriais no Brasil é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade e de maior valor agregado, por tecnologias limpas que norteiam os processos produtivos internacionais (Vaz 2017).

Diante desse fato, a demanda por enzimas aplicadas a processos industriais está aumentando continuamente no mercado mundial. O BBC Research reporta anualmente a movimentação do mercado global de enzimas baseadas em diferentes setores industriais o qual atingiu US\$ 4,6 bilhões e US\$ 4,9 bilhões em 2014 e 2015, respectivamente. Espera-se que este mercado aumente de quase US\$ 5,0 bilhões em 2016 para US\$ 6,3 bilhões em 2021 com uma taxa de crescimento anual de 4,7% para 2016 – 2021 (BBC Research 2017).

Enzimas como, amilases, proteases, lipases, celulasas e xilanases, são comercialmente utilizadas em processos catalíticos industriais, tais como detergentes, têxtil, de papel e celulose, biocombustíveis, estas enzimas vêm crescendo consideravelmente e estima-se que deve chegar US\$ 1,5 bilhões de faturamento até 2021 (Patel, Singhanian, and Pandey 2017).

Dentre estes, as  $\alpha$ -amilases, enzimas mais versáteis no mercado, são utilizadas em diversos processos, que variam desde a conversão do amido em xaropes de açúcar à produção de ciclodextrinas. No entanto, com o aumento do espectro de aplicações, pesquisas são focadas no desenvolvimento de novas amilases com características termofílicas, termotolerantes e tolerantes ao pH, a fim de melhorar a gelatinização do amido, diminuir a viscosidade, acelerar reações catalíticas e também diminuir os riscos de contaminação bacteriana. A  $\alpha$ -amilase termoestável de *Bacillus licheniformes* é atualmente a mais utilizada em processos

industriais, podendo manter atividade mais de 1 hora a 90°C (Declerck et al. 2003).

As enzimas que mais se destacam na comercialização para o processamento industrial de papel e celulose são as xilanases que vêm em substituição aos solventes químicos. Contudo, esse setor é alvo constante de pesquisa para busca de novas enzimas resistentes aos compostos fenólicos derivados da lignina, visando incrementar o rendimento do processo industrial (Patel et al. 2017).

Além dessas aplicações, enzimas associadas à degradação da biomassa vegetal têm alcançado 18% do faturamento global de enzimas nos últimos anos, e estima-se que deve chegar a US\$ 1,0 bilhão de faturamento até 2020. Isto decorre de um incremento de plantas industriais de biorefinaria dedicadas à produção de biocombustíveis e bioquímicos como butanol, polipropileno e ácido acrílico (BBC Research 2017).

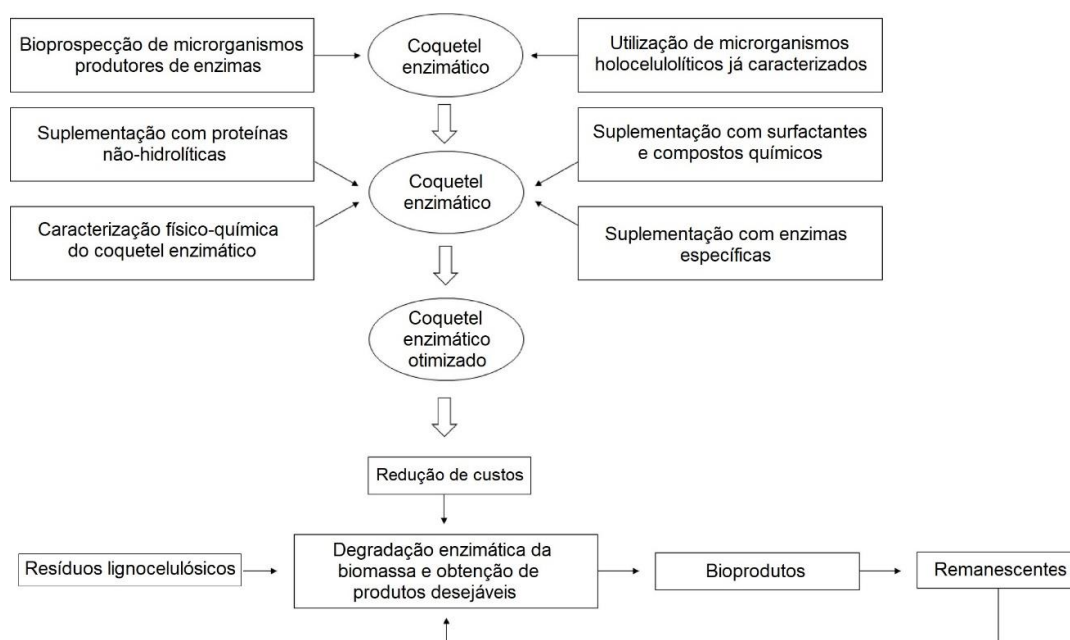
Nesse contexto, a primeira etapa na degradação da biomassa vegetal, é o pré-tratamento, que consiste na remoção de lignina e diminuição do conteúdo de hemicelulose e pectina da parede celular vegetal, deixando basicamente a celulose acessível à ação enzimática. O prétratamento considerado uma etapa indispensável para acelerar o processo de hidrólise, envolve tratamentos físicos, químicos e biológicos. O tratamento biológico pode ser realizado através de enzimas oxidativas como lacases e peroxidases, sendo estas as principais atuantes na remoção de lignina (Karimi e Taherzadeh, 2016; Raveendran Sindhu et al., 2016).

A seguinte etapa é a sacarificação que consiste na hidrólise da celulose e hemicelulose da biomassa vegetal. Neste sentido, é necessário um conjunto de enzimas que possam atuar em sinergismo como as endoglucanases, endoxilanases, arabinases,  $\beta$ -glicosidases, xilosidases,  $\alpha$ -arabinofurosidases, acetil-mamona esterases, além de outras enzimas como as pectato liases (Malgas et al. 2017).

No entanto, o grande gargalo na hidrólise de biomassa ainda está na ação enzimática ineficiente e no alto custo de produção destas enzimas

comerciais. Portanto, ainda há necessidade de desenvolver misturas enzimáticas eficientes e de baixo custo para garantir um processo economicamente competitivo (Liu and Kokare 2017).

É interessante notar que, a prospecção de novos microrganismos, bem como a utilização de microrganismos já conhecidos (ex. *Bacillus subtilis* e *Aspergillus niger*), desempenham um papel essencial na produção de enzimas para sacarificação da biomassa. Portanto, diferentes estratégias vêm sendo utilizadas para desenvolver coquetéis enzimáticos para biorefinarias. As estratégias adotadas para a otimização de coquetéis enzimáticos, podem incluir etapas como a suplementação com enzimas específicas visando hidrolisar um determinado substrato, a suplementação com proteínas não-hidrolíticas ou através de surfactantes ou produtos químicos, dessa forma, o coquetel otimizado busca reduzir os custos da hidrólise enzimática (Lopes, Ferreira Filho, and Moreira 2018) (Figura 5).



**Figura 5.** Diagrama esquemático da caracterização, otimização e aplicação de coquetéis enzimáticos em biorefinarias. Adaptado de (Lopes et al. 2018).

Atualmente, coquetéis enzimáticos para diversos fins vêm sendo comercializados por três principais empresas: a Novozymes (Dinamarca), a DuPont (Estados Unidos) e a Roche (Suíça). Produtos comerciais como Spirizyme® da Novozymes, uma mistura de glicoamilases suplementada com trealase, são capazes de hidrolisar a trealose (açúcar que não pode ser fermentado em etanol) em glicose, incrementando o rendimento de etanol nas usinas. Outro produto, Viscozyme®, uma mistura enzimática com atividade de celulase, pectinase e xilanase produzidas pelo fungo *Aspergillus aculeatus* é comercializada visando a conversão da biomassa nas biorefinarias. Adicionalmente, também visando a degradação de resíduos lignocelulósicos, a Cellic®CTec3, tenta reduzir o custo total de produção de etanol celulósico (Novozymes 2017c). Outra empresa da indústria de biocombustíveis, a DuPont, comercializa a marca Acellerase®, composto por uma mistura de celulases e enzimas acessórias, disponível em diferentes versões que trabalham com uma variedade de biomassas pré-tratadas (Liu and Kokare 2017; Lopes et al. 2018).

No entanto, o uso dessas enzimas em nível industrial ainda é limitado, devido aos substratos sintéticos utilizados na produção, e as etapas de purificação necessárias para a comercialização, o que incrementa significativamente os custos (Klein-Marcuschamer et al. 2012).

Uma outra opção mais econômica é a aplicação de extratos enzimáticos brutos obtidos a partir de fungos e bactérias cultivados em resíduos lignocelulósicos, buscando-se diminuir custos. Não obstante, extratos enzimáticos obtidos de um único microrganismo apresentam baixa eficiência na hidrólise de biomassa, principalmente por causa da carga enzimática e pela ausência de enzimas coadjuvantes. Normalmente, os coquetéis têm um pool de enzimas específicas em uma proporção adequada, uma vez que cada substrato possui características particulares e exige condições distintas para sua completa hidrólise (Malgas et al. 2017).

Microrganismos produtores de celulases e hemicelulases são principalmente fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Suas enzimas são atualmente comercializadas em diferentes



proporções de endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, sendo esta última mais baixa no caso de *Trichoderma*, e no caso do *Aspergillus*, a exoglucanase encontra-se em menor proporção. Já o *Penicillium*, as hemicelulases são secretadas em maior proporção (Bhattacharya et al. 2015; Mohanram et al. 2013). Além disso, bactérias também têm sido caracterizadas como produtoras de holocelulases, tais como aquelas dos gêneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, entre outras (Jiménez, Mares, and Salles 2018).

O rúmen de herbívoros tem sido alvo de prospecção de microrganismos devido à presença de uma microbiota bacteriana especializada em degradar fibras vegetais. Bactérias ruminais do gênero *Clostridium*, *Bacillus*, e *Fibrobacter* são capazes de solubilizar carboidratos complexos através de enzimas hidrolíticas em moléculas de cadeias mais simples como monossacarídeos e dissacarídeos (Jose et al. 2017; Pang et al. 2017).

Mohanram et al. (2013) descreveram que misturas enzimáticas provenientes de diferentes microrganismos tem mostrado um incremento na hidrólise. Por tanto, combinações de extratos enzimáticos de *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger* mostraram um rendimento de 91% na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (Lopes et al. 2018), enquanto que Bhattacharya et al. (2015) reportam coquetéis enzimáticos compostos por celulases fúngicas e hemicelulases bacterianas resultando em rendimentos de até 80% na liberação de glicose e xilose.

Estratégias de suplementação com adição de xilanases (GH11) em Celluclast 1.5L, uma celulase comercial, também mostrou incremento da hidrólise com diminuição significativa dos níveis de carga enzimática (Hu et al. 2013). Também já foi demonstrado que a suplementação de coquetéis comerciais com LPMOs pode aumentar o rendimento da conversão de celulose e reduzir a carga enzimática de enzimas acessórias (Ezeilo et al. 2017; Johansen 2016).

Independente da abordagem utilizada, a otimização de coquetéis enzimáticos mostrou a redução de custos de produção e o aumento do

rendimento da hidrólise enzimática. Contudo, diferentes fontes de enzimas ainda precisam ser avaliadas, visando o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos personalizados (Bhattacharya et al. 2015).

## **5. Bactérias ruminais e desconstrução de biomassa vegetal**

Os ruminantes são animais herbívoros que apresentam o estômago dividido em quatro compartimentos, denominados: rúmen, retículo, omaso e abomaso. A principal característica fisiológica que diferencia os ruminantes de outros animais é a capacidade de realizar fermentação microbiana de biomassa vegetal na primeira câmara digestiva, o rúmen (Walsh et al. 2017a).

O rúmen abriga microbiota ruminal extremamente diversa, compreendendo fungos, bactérias, arqueias e protozoários (Cunha et al. 2011; Huws et al. 2018). Estes microrganismos são produtores de enzimas, capazes de catalisar a hidrólise e desconstrução de materiais fibrosos vegetais, proteínas, lipídeos e açúcares em moléculas de cadeias carbônicas mais simples, como ácidos graxos, aminoácidos, acetato, butirato, entre outros, os quais, o animal consegue absorver (Nagaraja 2016).

As bactérias, mais de 200 espécies, são os microrganismos predominantes no rúmen, com uma densidade de até  $10^{11}$  células por grama de conteúdo ruminal (Nagaraja 2016). A população bacteriana no rúmen pode ser subdividida em quatro subpopulações: (a) população associada à fração líquida, composta por bactérias no líquido ruminal, consumindo componentes alimentares solúveis; (b) população associada à fração sólida, representando quase 75% da população microbiana ruminal, são fundamentais na digestão e podem estar associadas às partículas da digesta; (c) população associada ao epitélio, composta por bactérias aderidas ao epitélio que compreendem 1% da população bacteriana total, podem ser as mais diversas e estão relacionadas com as funções metabólicas do hospedeiro; (d) população associada a eucariotos,

composta por bactérias ligadas à superfície de protozoários e fungos (Huws et al. 2018; Puniya, Singh, and Kamra 2015).

Além disso, estes grupos bacterianos também se diversificaram em relação ao substrato utilizado e os seus produtos de fermentação gerados, sendo classificadas como bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, fermentadoras de carboidratos não-estruturais, proteolíticas, lipolíticas e as lácticas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais espécies bacterianas encontrados no ambiente ruminal (Puniya et al. 2015).

<b>Microrganismo</b>	<b>Principais produtos</b>
<p>Celulolíticas  <i>Fibrobacter succinogenes</i>, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>,  <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>,  <i>Clostridium lochheadii</i>, <i>Clostridium longisporum</i></p>	Succinato, acetato, formato, lactato, H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub>
<p>Amilolíticas  <i>Bacteriodes ruminicola</i>, <i>Ruminobacter amylophilus</i>,  <i>Selenomonas ruminantium</i>, <i>Succinomonas amylofílita</i>,  <i>Streptococci bovis</i></p>	Formato, acetato, succinato, propionato
<p>Lipolíticas  <i>Anaerovibrio lipolytica</i></p>	Acetato, propionato
<p>Proteolíticas  <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Ruminobacter amylophilus</i>,  <i>Clostridium bifermentans</i>, <i>Clostridium aminophilum</i>,  <i>Clostridium Sticklandii</i>, <i>Peptostreptococcus sp.</i></p>	AGCR*, acetato e butirato
<p>Pectinolíticas  <i>Treponema saccharophilum</i>, <i>Lachnospira multiparus</i></p>	Acetato, formato, lactato, H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub>
<p>Láticas  <i>Selenomonas lactilytica</i>, <i>Megasphaera elsdenii</i></p>	Acetato, succionato, propionato, butirato, H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub>

\*Ácido graxos de cadeia ramificada.

Estudos de metagenômica de microbioma rumininal estabeleceram a presença de pelo menos 26 Filos bacterianos diferentes no rúmen bovino (Nardi et al. 2016). Os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Fibrobacteres* são os predominantes e contribuem significativamente na produção de CAZymes envolvidas na degradação de carboidratos complexos (Jose et al. 2017; Neumann, Weimer, and Suen 2018; Wang et al. 2013).

Jose et al. (2017) analisaram por metagenômica o microbioma ruminal de bovinos de raça Holandês alimentados com palha de milho. Neste estudo observou-se que o filo *Bacteroidetes* predomina (65% das sequências relacionadas ao domínio *Bactéria*) sendo que, a maior proporção de espécies pertencentes a este filo é atribuída ao gênero *Prevotella* (45% das sequências relacionadas ao filo *Bacteroidetes*) com espécies como *Prevotella bryantii*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella ruminicola*, cujas principais funções no rúmen foram atribuídas à degradação e utilização do amido. Adicionalmente, podem atuar na solubilização de carboidratos estruturais como xilanas e pectinas da parede celular de plantas e na hidrólise de proteínas. O gênero *Bacterioides* representa o segundo grupo (42% das sequências relacionadas ao filo *Bacteroidetes*) pertencente a esse filo, compreendendo espécies anaeróbias como *Bacteroidetes amylophilus* e *Bacteroidetes ruminicola* relacionadas principalmente à degradação de carboidratos não estruturais como o amido, além de outros gêneros menos abundantes como *Runella* e *Parabacterioides* (Krause et al. 2003).

*Firmicutes* (26% das sequências pertencentes ao domínio *Bactéria*) é o segundo filo predominante no rúmen e neste encontra-se espécies que utilizam carboidratos complexos como resíduos lignocelulósicos e amiláceos. Dentre as espécies mais abundantes pode-se se mencionar o gênero *Clostridium* (23% do total de sequências relacionadas ao filo *Firmicutes*), amplamente caracterizadas como eficientes degradadoras de celulose, tais como *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium cellulolyticum*, e *Clostridium longisporum*. Outro gênero

encontrado foi o *Ruminococcus* (8% do total de sequências do filo *Firmicutes*), o qual apresenta espécies como *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*, cuja função é a degradação de carboidratos estruturais no rúmen (Patel et al. 2014).

O gênero *Eubacterium* (6% das sequências correspondentes ao filo *Firmicutes*), apresenta espécies que atuam na solubilização de celulose e hemicelulose, sendo as principais, *Eubacterium cellulosolvens*, *Eubacterium xylanophilum* e *Eubacterium uniformis*. Adicionalmente, o gênero *Bacillus* (6% correspondente ao filo *Firmicutes*) possui espécies como *Bacillus subtilis* com atividade celulolítica e proteolítica. Outros gêneros menos abundantes pertencentes aos *Firmicutes* são *Paenibacillus* e *Butirivibrio* (1% correspondente ao filo *Firmicutes*), cujas espécies estão associadas principalmente à degradação de carboidratos solúveis e estruturais como amido e hemicelulose (Nardi et al. 2016).

O filo *Proteobacteria* possui 8% das sequências analisadas do domínio *Bacteria* no genoma ruminal de bovinos de raça Holandesa (Jose et al. 2017). Neste filo, encontra-se uma proporção majoritária de bactérias gram-negativas que utilizam preferencialmente mono e dissacarídeos nos processos fermentativos envolvendo um conjunto de funções fenotípicas e fisiológicas. Foram mais abundantes as classes *Gammaproteobacteria* (3%), *Deltaproteobacteria* (2%), *Alfaproteobacteria* (2%) e *Betaproteobacteria* (1%), que possuem principalmente gêneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Desulfovibrio* e *Azospirillum*. No entanto, linhagens como *E. coli* e *Shigella* isoladas do rúmen têm sido reportadas como capazes de degradar e fermentar celulose e xilana em condições anaeróbicas (Pang et al. 2017; Sari et al. 2017).

O filo *Fibrobacteres* (2% das sequências pertencentes ao domínio *Bactéria*), identificado com menor predominância, inclui a bactéria *Fibrobacter succinogenes* que desempenha função importante na degradação das fibras celulose e hemicelulose no rúmen (Chen and Wang 2008).

Outro filo geralmente identificado com menor expressão é o *Actinobacteria* (1% de sequências). Neste filo encontram-se gêneros como *Streptomyces* e *Bifidobacterium*, importantes microrganismos capazes de produzir uma variedade de enzimas relacionadas à degradação de celulose, hemicelulose e lignina (Wang et al. 2013).

As bactérias ruminais secretam um repertório de enzimas fibrolíticas, incluindo pelo menos 205 diferentes famílias de enzimas carboidrato-ativas incluindo glicosil hidrolases (GH), glicosil transferases (GT), polissacarídeo liases (PL), carboidrato esterases (CE) e atividade auxiliares (AA).

Existem 96 famílias diferentes de GHs descritas como enzimas que predominam no rúmen de bovinos, correspondendo a 44% do total das enzimas ativas sobre carboidrato anotadas para este microbioma. GTs constituem o segundo grupo com maior representatividade (26%) com 40 famílias diferentes. As proteínas anotadas como CBMs são constituídas por 35 famílias e representam 20% do total de CAZymes no rúmen. As famílias CEs representam 8% e estão representadas por 13 famílias no rúmen bovino e, já em menor proporção encontram-se as PLs e AAs representando 2% e 0,5 %, respectivamente (Jose et al. 2017).

As glicosil hidrolases ativas sobre celulose identificadas no microbioma de rúmen bovino de raça Holandesa estão classificadas nas famílias GH5, GH6, GH8, GH9, GH16, GH44, GH45, GH48, GH55 e GH81, incluindo endo-1,4- $\beta$ -glucanases, celobiohidrolases,  $\beta$ -glicosidases. Enquanto aquelas ativas sobre celobiose e celo-oligosacarídeos incluem enzimas das famílias GH1, GH3, GH94 (Wang et al. 2013).

Já as glicosil hidrolases atuantes sobre hemicelulose estão classificadas nas famílias GH10, GH11, GH30, GH98, GH5, GH26, GH53 e GH76, incluindo atividades endoxilanasas, endo- $\beta$ -1,4-manosidase,  $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -1,6-mananase. Enquanto aquelas ativas sobre arabinoxilana, arabinogalactana e L-arabinana incluem enzimas das famílias GH43, GH51 e GH54 (Walsh et al., 2017).

Patel et al. (2014) estudaram o microbioma ruminal de búfalo, e reportaram glicosídeo hidrolases ativas sobre xilo-oligosacarídeos pertencentes às famílias GH3, GH39, GH31, GH43 e GH54, incluindo  $\beta$ -glicosidase,  $\alpha/\beta$ -xilosidase. No mesmo estudo, também foram descritas enzimas ativas sobre galacto-oligosacarídeos sendo classificadas nas famílias GH2, GH4, GH27, GH35, GH36 e GH42, incluindo  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -galactosidase e endo- $\alpha$ -1,4-poligalactosaminidase.

Estudos de metagenômica de microbiota ruminal de bovinos, mostraram glicosídeo hidrolases com atividade sobre pectina e estão classificados nas famílias GH28, GH67, GH78, GH88 e GH105, incluído atividades tais como,  $\alpha$ -L-ramnosidase,  $\alpha$ -glucuronidase, poligalacturanases, glucuronil hidrolase, e rhamnogalacturonil hidrolase. Enquanto aquelas ativas sobre amido são classificadas nas famílias GH13, GH57, GH65, GH77 e GH97, incluído  $\alpha$ -amilase e amilomaltase (Jose et al. 2017).

## **6. *Paenibacillus barengoltzii***

*Paenibacillus* é um gênero de bactérias em forma de bastonetes aeróbias ou anaeróbias facultativas, produtoras de esporos e anteriormente classificado como gênero *Bacillus* (grupo 3). Os resultados do trabalho de Ash et al. (1993) permitiram a reclassificação no novo gênero *Paenibacillus*, já que esses estudos mostraram a presença de uma sequência característica para os membros do grupo 3, na região variável V5 do 16S rDNA, o que permitiu diferenciá-los filogeneticamente do gênero *Bacillus*.

O gênero *Paenibacillus* contém mais de 200 espécies com genoma sequenciado, isolados a partir de diferentes ambientes tais como solo, rúmen, intestino, materiais vegetais, alimentos, efluentes industriais e ambientes aquáticos (Grady et al. 2016).

A principal característica do gênero é a produção de proteínas extracelulares, metabólitos secundários e polissacarídeos (Grady et al. 2016). *Paenibacillus profundus*, *Paenibacillus thiaminolyticus* e *Paenibacillus polymyxa* capazes de secretar peptídeos antimicrobianos de amplo espectro (bacteriocinas) contra bactérias patogênicas como

*Salmonella* (He et al. 2007). *Paenibacillus ehimensis* é capaz de produzir compostos antifúngicos inibidores do crescimento de patógenos de plantas, sendo que esta espécie é usada como biocontrolador de *Rhizoctonia solani* e *Alternaria alternata*, devido à sua capacidade em degradar quitina, o principal componente de parede celular desses fitopatógenos (Seo et al. 2016).

Outras espécies produzem enzimas oxigenases, desidrogenases e ligninases que podem ser utilizadas para descontaminar ambientes poluídos por processos industriais (petróleo, têxtil, metais pesados), como *Paenibacillus larvae*, que degrada o Indigo, um corante comumente utilizado na indústria têxtil, e é considerado um poluente importante porque tem como produto final de degradação, compostos tóxicos tais como aminas aromáticas (Ramya, Anusha, and Kalavathy 2008), *Paenibacillus poymyxa* capaz de degradar poluentes derivado do petróleo (Grady et al. 2016), *P. jamilae* e *P. macerans*, capazes de remover metais pesados da água, através de processos de floculação (Li et al. 2013). Há ainda espécies como *Paenibacillus brasilensis*, *Paenibacillus durus* e *Paenibacillus edaphicus* que habitam o solo e são importantes na fixação de nitrogênio (Grady et al. 2016).

Espécies do gênero *Paenibacillus* são capazes de utilizar fontes complexas de biomassa tais como bagaço de cana-de açúcar, palha de milho e cevada, resíduos de mandioca, entre outros (Dhawan et al. 2016; Ratanakhanokchai et al. 2013).

Como fonte de enzimas microbianas, o gênero *Paenibacillus* é bem conhecido como produtor de enzimas hidrolíticas para aplicação na indústria de conversão de biomassa (Grady et al. 2016). Em particular, as glicosil hidrolases (GHs), o grupo mais heterogêneo que participa na desconstrução da biomassa vegetal vêm sendo caracterizadas, entre elas hemicelulases (Ghio et al. 2016; Di Marco et al. 2017), celulases (Na et al. 2015; Pason, Kyu, and Ratanakhanokchai 2006), pectinases (Ko et al. 2007) e amilases (Liu et al. 2016; Na et al. 2015).



*Paenibacillus barengoltzii* é uma bactéria gram-positiva, com forma de bastonete, formadora de endósporos, anaeróbia facultativa e moderadamente termófila, pertencente ao filo *Firmicutes*.

Trabalhos iniciais de caracterização mostraram que *P. barengoltzii* é capaz de utilizar uma variedade de fontes de carbono como glicose, frutose, galactose, xilose, seguido por dissacarídeos como celobiose, maltose, lactose e alguns polímeros como amido e xilana.

Linhagens de *P. barengoltzii* já foram descritas, isoladas de diferentes ambientes, sendo a primeira ATCC BAA-1209 (SAFN-016) isolada das instalações de montagem de naves espaciais nos Estados Unidos em 2006. Posteriormente, isolados G22, J12 e CAU904, que possuem genoma sequenciado, foram isolados de solo e ambiente marinho (Fu et al. 2014; Osman, Satomi, and Venkateswaran 2006). A cepa CAU904 possui 4,7 Mpb e codificando 4.326 (Liu et al. 2016). A partir dessa análise, foram identificados e caracterizados apenas sete enzimas, sendo L-asparaginase,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase, pululanase, xilanase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase (Fu et al. 2014; Liu et al. 2016, 2017, 2018; Shi et al. 2016). Porém, esta espécie ainda tem sido pouco explorada quanto ao uso de enzimas hidrolíticas na sacarificação de complexos materiais lignocelulósicos, tendo a maior parte dos dados voltados à hidrólise de substratos puros no campo de alimentos, e apenas poucos com relação à amido e xilana (Sitdhipol et al. 2016).

Neste trabalho propomos a bioprospecção e caracterização de isolados bacterianos obtidos do rúmen de bovino de raça Holandesa. A principal meta é contribuir com a caracterização dos isolados bacterianos e avaliar o potencial de sua aplicação na hidrólise de resíduos de biomassa vegetal para produção de biomoléculas de interesse biotecnológico, e assim contribuir para o desenvolvimento da cadeia de produção na hidrólise enzimática.

A tese está dividida em 3 capítulos: o capítulo 1 apresenta os resultados dos objetivos específicos que foram cumpridos para alcançar o objetivo geral que se resume no isolamento, caracterização e identificação dos isolados bacterianos de rúmen bovino, o capítulo 2 apresenta os resultados da produção e caracterização de holocelulases de *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 e o seu uso na hidrólise de biomassa lignocelulósica, e o capítulo 3 apresenta os resultados da produção e caracterização parcial de uma  $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2.

## **Objetivos**

### **Objetivo geral**

Isolamento, identificação e caracterização de bactérias anaeróbias de rúmen de bovino como fonte de enzimas para degradação da biomassa vegetal.

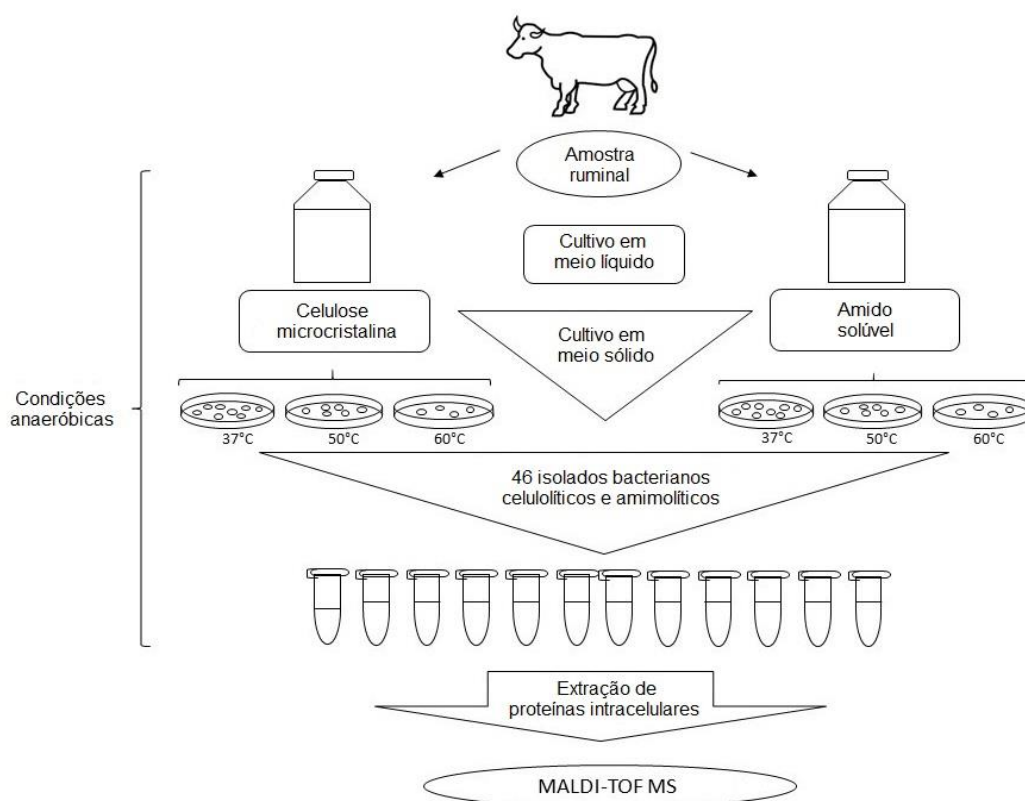
### **Objetivos específicos**

- Isolar e selecionar por cultivo em substratos celulósicos e amiláceos, bactérias anaeróbicas conversoras de biomassa vegetal.
- Analisar e agrupar os isolados bacterianos por espectrometria de massa.
- Identificar os isolados de interesse por técnicas moleculares.
- Caracterizar os isolados bacterianos quanto à produção de holocelulases e amilases e sua aplicação na hidrólise de biomassa vegetal.

**CAPÍTULO 1. Isolamento, identificação e caracterização de  
bactérias anaeróbicas celulolíticas e amilolíticas de rúmen de  
bovino (*Bos taurus*)**

## 1. Metodologia

Amostras de conteúdo ruminal de bovino, tanto da fração sólida quanto da fração líquida, foram coletadas e imediatamente inoculadas em meio líquido redutor sob atmosfera anaeróbica e contendo amido e celulose microcristalina como fontes de carbono. Estas amostras foram incubadas a 37, 50 e 60°C por três dias e posteriormente utilizadas para isolamento por cultivo em meio sólido a 37, 50 e 60°C. Os isolados bacterianos obtidos, em seguida foram cultivados individualmente em celulose e amido para avaliar a produção das atividades de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xilanase e  $\alpha$ -amilase dos sobrenadantes correspondentes a cada isolado, assim como extraídas as proteínas intracelulares para posterior análise por espectrometria de massa. Todas as etapas referentes à seção estão resumidas na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema geral de isolamento e triagem de bactérias ruminais.

## 1.1 Coleta de amostras

Foram utilizados para coleta de conteúdo ruminal, dois bovinos da raça Holandesa fistulados, pertencentes à fazenda da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás sob a responsabilidade do professor Dr. Reginaldo Ferreira. Os animais com aproximadamente 60 meses de idade foram alimentados com ração padrão composta de 50% de silagem de capim e 50% de concentrado (farelo de soja, milho e uréia), balanceada para atender as suas necessidades minerais e vitamínicas.

Para coleta das amostras de rúmen, a cânula do aparelho na fístula foi aberta e amostras foram manualmente extraídas. O conteúdo ruminal coletado foi imediatamente filtrado e o líquido resultante foi denominado como fração líquida (15 mL), enquanto que o conteúdo vegetal parcialmente digerido resultante da filtragem foi considerado a fração sólida (15 g).

Uma alíquota da fração líquida foi inoculada em seis frascos contendo 30 mL de meio líquido redutor sob atmosfera anaeróbica preparado conforme anteriormente descrito em Blume et al. (2013) contendo em g.L<sup>-1</sup> 1,5g de NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,09g de MgCl<sub>2</sub>, 5,0 mL solução mineral, 0,50 mL solução de vitaminas, 200mL NaOH (0,2M), 100µL Na<sub>2</sub>S<sub>9</sub>H<sub>20</sub>, 3g extrato de levedura e suplementado com 1% (m/v) de celulose microcristalina ou amido como fonte de carbono. A atmosfera anaeróbica do meio foi mantida pela adição dos agentes redutores de 0,125g cisteína e 100 µL sulfito de sódio, além da injeção de nitrogênio gasoso.

No caso da fração sólida, os frascos contendo o meio de cultura foram abertos, o material vegetal foi adicionado, e estes foram borbulhados com nitrogênio gasoso e novamente vedados. Dos inóculos descritos acima, 3 contendo celulose e 3 contendo amido de cada tipo de amostragem, um frasco de cada fonte de carbono foi incubado em cada uma das temperaturas, sendo 37°C, 50°C e 60°C por 3 dias e posteriormente utilizados como fonte de microrganismos na etapa de isolamento.

## 1.2. Isolamento de bactérias

Para o isolamento de bactérias, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das culturas acima descritas foi inoculada por semeadura em frascos contendo meio redutor sólido (contém em  $\text{g.L}^{-1}$ , 15g de fitagel) preparado conforme anteriormente descrito em Blume et al. (2013), sob atmosfera anaeróbica suplementado com 1% (m/v) de celulose microcristalina, carboximetilcelulose (CMC) ou amido, como fonte de carbono. Um frasco de cada inóculo foi incubado em cada uma das temperaturas correspondentes a 37, 50 ou 60  $^{\circ}\text{C}$  por 3 dias.

Após a visualização de colônias bacterianas, estas foram selecionadas de acordo com a sua morfologia, buscando diferenciá-las quanto ao tamanho, forma e cor para obtenção de isolados bacterianos diferentes entre si. As colônias bacterianas foram coletadas individualmente e re-inoculadas por semeadura em meio sólido sob atmosfera anaeróbica, repetindo este procedimento três vezes. Ao todo, foram obtidos 46 isolados bacterianos e estes foram utilizados em análises posteriores de caracterização morfológica, identificação, produção de holocelulases e amilases. Para preservação dos isolados foi adicionado a cada uma das culturas glicerol com concentração final de 20 % (v/v), e em seguida, foram guardados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

As 46 colônias obtidas foram nomeados com um código de duas letras e um número, a primeira letra corresponde ao crescimento em celulose ou amido (C ou A), o número corresponde à temperatura de crescimento (37, 50 e 60  $^{\circ}\text{C}$ ) e a última letra à origem da amostra ruminal sólida ou líquida (S ou L).

### **1.3. Análise da produção de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xilanase e $\alpha$ -amilase pelos isolados bacterianos**

#### **1.3.1. Condições de cultivo**

Para produção enzimática, cada um dos 46 isolados foram cultivados em frascos contendo 100 mL de meio líquido redutor sob atmosfera anaeróbica, preparado como acima descrito, suplementado com 1% (m/v) de celulose ou amido, e em seguida, os frascos de cada isolado contendo celulose e amido foram incubados em cada uma das temperaturas de isolamento a 37, 50 ou 60°C por 3 dias.

Após o período de incubação, as culturas foram filtradas a vácuo, o filtrado resultante correspondente a cada isolado foi centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 10 minutos e, em seguida, os 46 sobrenadantes obtidos utilizados como fonte de enzimas para avaliação de atividade endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4-  $\beta$ - xilanase e  $\alpha$ -amilase.

#### **1.3.2. Determinação de atividade enzimática e quantificação de proteínas**

As atividades enzimáticas foram determinadas pela quantificação de açúcar redutor liberado a partir dos substratos carboximetilcelulose (CMC), xilana “oat spelt” e amido solúvel de acordo com o método descrito por Miller (1959).

A atividade de endo- $\beta$ -1,4-glucanase e endo- $\beta$ -1,4-xilanase foi quantificada utilizando-se 50  $\mu$ L da amostra enzimática (correspondente a cada um dos 46 isolados) e 100  $\mu$ L de CMC ou xilana preparados na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio pH 5.0 100 mM, a 50°C por 60 minutos e a reação interrompida com 300  $\mu$ L de DNS, com posterior fervura por 10 minutos. A leitura de absorbância foi realizada a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor (glicose ou xilose), por minuto de reação.



Para detecção da atividade  $\alpha$ -amilase, foi utilizado o método descrito por Fuwa (1954), 60  $\mu$ L da amostra enzimática (pertencente a cada isolado) foram adicionados a 100  $\mu$ L de 1% de amido preparado em tampão citrato de sódio pH 5.0 100mM, os ensaios foram incubados a 50°C por 30 minutos, a reação interrompida com 200  $\mu$ L de ácido acético 1M, e aos ensaios adicionados 9,4 mL de água destilada e 200  $\mu$ L de reagente Fuwa (Sindhu et al., 2016). A leitura de absorbância foi realizada a 620 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 1 mg de amido por minuto de reação.

O método de Bradford foi utilizado para determinar a concentração de proteínas das amostras enzimáticas dos 46 isolados com a utilização do kit Quick Start do fabricante BioRad (Bio-Rad Inc, US), seguindo as instruções do fabricante. A leitura de absorbância foi realizada a 595 nm. A proteína albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

#### **1.4 Análises por eletroforese em gel SDS-PAGE e zimograma**

Após determinação da atividade de endo- $\beta$ -1,4-glucanase e endo- $\beta$ -1,4-xilanase e  $\alpha$ -amilase foram selecionados os isolados com maior atividade enzimática, sendo C1\_37L, C1\_37S, A1\_37L1, A1\_37S5, A1\_60L4, A1\_50L2, A1\_50L3 e A1\_50S2. O perfil de proteínas secretadas pelos isolados bacterianos foi inicialmente analisado por eletroforese em gel desnaturante a 12%, SDS-PAGE, e por atividade em gel.

O total de 30  $\mu$ g de proteínas de cada amostra foi aplicado em gel de poliacrilamida e todo o procedimento de preparo da amostra e corrida eletroforética, foi realizado conforme descrito por Laemmli (1970). Unstained Protein MW Marker foi utilizado como marcador de massa molecular (Thermo Scientific, USA).

Para a determinação da atividade em gel, CMC, xilana “oat spelt” ou amido na concentração final de 0,1% (m/v) foram adicionados à matriz do gel, preparado como acima descrito. A corrida eletroforética, renaturação

enzimática e revelação das bandas com atividade foram realizadas conforme descrito em Osiro et al. (2017).

### **1.5 Identificação dos isolados bacterianos**

Dos 46 isolados obtidos, 9 perderam a viabilidade A1\_37L2, A1\_37L3, A1\_37L4, A1\_37S1, A1\_37S2, A1\_37S3, A1\_37S4, A1\_50S4 e A2\_50L2. Não foi possível recuperar seu crescimento mesmo utilizando os estoques mantidos a -80 °C. Portanto, somente 37 isolados foram utilizados nas análises de identificação.

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada utilizando a sequência do 16S rDNA. A análise por espectrometria de massa foi utilizada visando estabelecer uma metodologia para triagem da coleção de isolados, uma vez que não possível diferenciá-los quanto à morfologia das colônias. Alternativamente esta técnica também foi utilizada na identificação dos isolados bacterianos.

#### **1.5.1 Análise por espectrometria de massa em MALDI-TOF**

Cada um dos 37 isolados foram cultivados em frascos contendo 100 mL de meio líquido redutor sob atmosfera anaeróbica suplementado com 1% (m/v) de celulose microcristalina ou amido e depois incubados por 4 dias nas temperaturas de crescimento já estabelecidas para cada isolado, 37 °C, 50 °C ou 60 °C.

Após 4 dias de incubação, as culturas foram filtradas e centrifugadas a 3000 x g a 4 °C durante 20 minutos. As células foram então utilizadas para a extração de proteínas intracelulares seguindo o protocolo proposto por Zbinden et al. (2013). As proteínas extraídas foram ressuspendidas com 30 µL de acetonitrila, cada amostra foi homogeneizada e centrifugada a 17000 x g por 2 minutos. Após centrifugação, aplicou-se 1 µL de cada sobrenadante em poço da placa de amostragem MALDI (Bruker Daltonics), deixando-se secar ao ar à temperatura ambiente, e em seguida, cada amostra foi coberta com 1 µL da matriz (5 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila e 2,5% (v/v)

de ácido trifluoracético), com subsequente secagem em temperatura ambiente. A placa de MALDI contendo a matriz cristalizada com cada amostra foi introduzida no espectrômetro de massas.

### **1.5.2 Aquisição e processamento dos dados**

O espectrômetro de massas utilizado foi o MALDI-TOF (Bruker Daltonics), equipado com um laser de 200 Hz. Os espectros foram registrados em modo linear positivo, na frequência máxima nos intervalos de 2000 a 20000 Daltons. Este foi calibrado utilizando-se a mistura padrão Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics). Os parâmetros utilizados foram: tensão da fonte IS1 de 20kV, tensão da fonte IS2 16,7kV e tensão de lentes de 7,0 kV. Para cada espectro bruto gerado, foram previamente realizados 2000 disparos de laser aleatórios, que foram somados e processados de modo automático pelo programa MBT\_FC (Bruker Daltonics).

O conjunto de espectros brutos foram analisados utilizando o programa MALDI Biotyper 3, seguindo etapas de normalização, suavização e subtração da linha base de picos. Este programa cria uma lista dos picos com maior significância baseado em valores de  $m/z$  e intensidade, com a relação sinal/ruído maior do que 3. Cada lista de picos gerada a partir das amostras foi comparada diretamente com a lista de picos dos espectros de proteínas ribossomais da biblioteca de referência (5302 espécies) usando um algoritmo de correspondência. Estes são realizados automaticamente por meio do algoritmo Biotyper 3 que atribui escores de classificação.

As identificações por Biotyper 3, são classificadas por valores de escores estabelecidos pelo fabricante, que variam de 0 a 3. O escore  $\geq 2$  indica a identificação confiável de espécie; os escores entre 1,9 e 2,0 indica provável identificação de gênero, mas não se pode afirmar e um escore  $<1,9$  indica que não há identificação confiável.

Os espectros gerados foram utilizados para construção de dendrograma utilizando o programa estatístico Matlab 7.0 (The MathWorks Inc.), integrado ao programa MALDI Biotyper 3. Foram utilizados parâmetros padrão: medida de distância por correlação e ligação por média, sendo

esta, normalizada entre a distância 0 (concordância total) e 1000 (sem concordância).

### **1.5.3. Identificação molecular com base na sequência do 16S rDNA**

Inicialmente, os 37 isolados bacterianos foram cultivados individualmente em 100 mL de meio redutor líquido, suplementado com 1% (m/v) de celulose microcristalina ou amido, sob atmosfera anaeróbica e incubadas em suas temperaturas de isolamento a 37, 50 ou 60°C por três dias. Após incubação, as culturas foram filtradas a vácuo e os caldos obtidos centrifugados a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e o pellet celular de cada amostra foi recuperado individualmente e ressuspendido com 50 mL de tampão TE (Tris pH 8,0 10 mM contendo 1 mM de EDTA), e depois usado na extração de DNA, utilizando o kit de purificação de DNA genômico Wizard® genomic DNA purification kit A1120 da Promega (USA). A metodologia de purificação de DNA foi realizada seguindo as instruções do fornecedor. A amplificação da sequência de 16S rDNA foi realizada utilizando primers universais 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') e 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'). A reação de amplificação foi composta de: 20 ng de DNA genômico, 2,5 µL de Tampão 10X (Phoneutria, Brazil), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria, Brazil), 10 µM de primer reverso e forward no volume final de 25 µL. As condições de temperatura e ciclagem da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 51°C por 1 minuto e 30 segundos, extensão a 72°C por 10 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Dos 37 isolados apenas 5, incluindo C1\_37L, C1\_37S, A1\_60L2, C2\_60L2 e A1\_50L2, apresentaram um produto de amplificação (1200 pb) na reação de PCR, enquanto que os 34 isolados não apresentaram nenhum produto de amplificação nesta reação.

Portanto, o DNA amplificado das 5 amostras foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Os produtos da PCR contendo

1200 pb foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o Kit de purificação de produto de PCR Gene JET PCR Purification (Thermo fisher, USA). Em seguida, os produtos purificados foram enviados à empresa Macrogen (Korea) e sequenciado pelo método de Sanger.

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa Geneious v.5.11.1.2 (<http://www.geneious.com> Biomatters, New Zealand). A trimagem de cada sequência foi realizada usando o índice de qualidade Phred. Em seguida, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências do banco de dados do “16S ribosomal RNA Database” do GenBank (National Center for Biotechnology Information), usando a ferramenta BLASTn.

## **2. Resultados e discussão**

### **2.1. Isolamento de bactérias**

As 46 colônias bacterianas que cresceram utilizando as fontes de carbono tanto de amido quanto a de celulose nas temperaturas de 37°C, 50°C e 60°C, apresentaram coloração branca, aspecto leitoso, diâmetros entre 0,5 mm e 2,5 mm, forma circular e irregular (Figura 2).

Dos 19 isolados bacterianos que cresceram em meio contendo celulose como fonte de carbono, 5 isolados (C2\_37L2, C1\_60L8, C2\_60L1, Cel1\_50S3 e Cel1\_50S4) apresentaram forma irregular e 14, forma circular: C1\_37S, C1\_37L, C2\_37S, C2\_37L1, Cel1\_37S1, Cel1\_37S2, Cel1\_37S4, C1\_60L4, C1\_60L5, C1\_60L6, C1\_60L7, C1\_60L3, C1\_60L9 e C2\_60L2. Os isolados com a mesma forma não apresentaram nenhuma característica morfológica adicional que possibilitasse a sua diferenciação (Figura 2; Tabela 1).

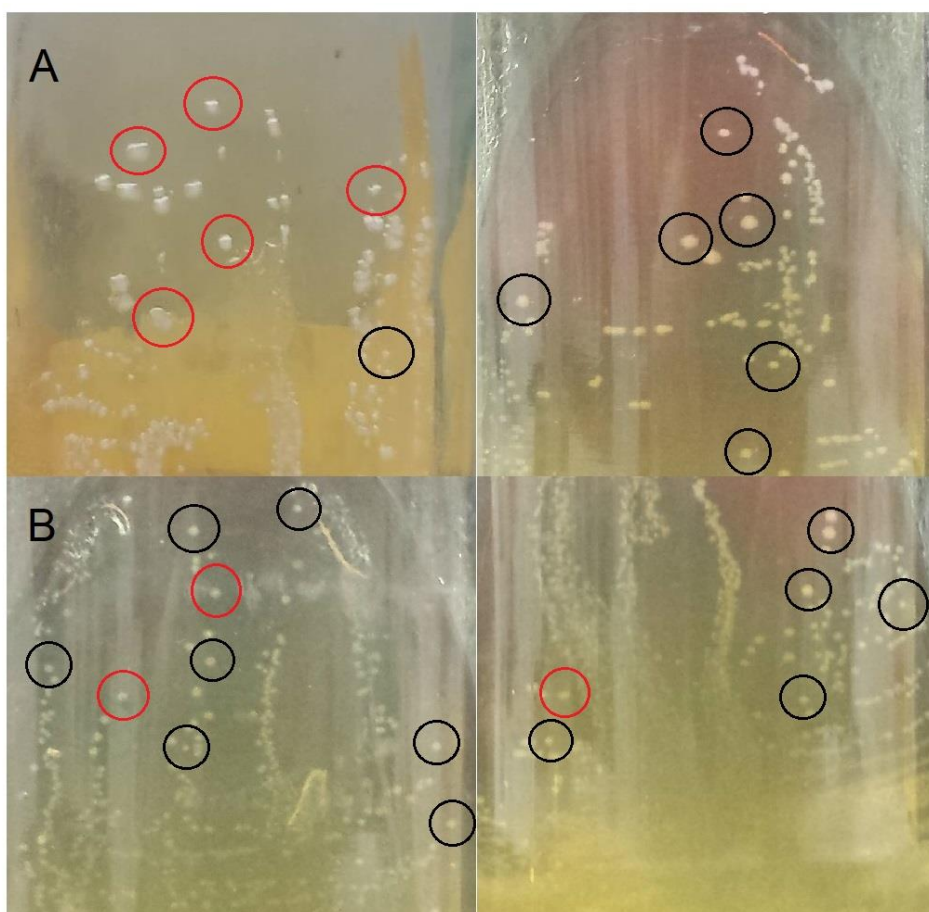
Dos isolados com forma circular, 7 isolados cresceram a 37°C, 4 isolados cresceram a 50°C e 3 isolados a 60 °C, enquanto que, dos isolados com forma irregular apenas 1 isolado foi observado a 37°C e 2 isolados a 50°C e 60°C, respectivamente (Tabela 1).

Dos 27 isolados bacterianos obtidos pelo cultivo em amido, 8 isolados (A1\_50S6, A1\_50S7, A2\_50S2, A1\_37L1, A1\_37L2, A1\_37S2, A2\_37L4, A2\_37L6) apresentaram forma irregular, e 19 isolados com forma circular incluindo A1\_60L2, A1\_60L4, A1\_60L5, A1\_37L3, A1\_37L4, A1\_37S1, A1\_37S3, A1\_37S4, A1\_37S5, A2\_37L5, A1\_50S3, A1\_50S4, A1\_50S5, A1\_50L1, A1\_50L2, A1\_50L3, A1\_50L4, A2\_50L1, A2\_50L3 (Figura 3).

Cabe ressaltar que, dos isolados bacterianos tanto da forma irregular quanto da forma circular, não foram observadas outras características de diferenciação, mesmo crescidas em meios seletivos distintos como amido e celulose. Dos isolados com forma circular, 7 isolados cresceram a 37 °C, 9 isolados cresceram a 50°C e apenas 3 isolados cresceram a 60°C. Além disso, dos isolados com forma irregular, 5 cresceram a 37°C e apenas 3 a

50°C, contudo, não foram observadas colônias com forma irregular a 60°C (Figura 3; Tabela 1).

Com base na temperatura de crescimento os isolados bacterianos foram divididos em três grupos, os mesófilos composto de 20 isolados, moderadamente termófilos (50°C) composto por 19 isolados e o grupo dos termófilos (60°C), composto por 8 isolados bacterianos, como visualizado do gráfico de pizza (Figura 3).

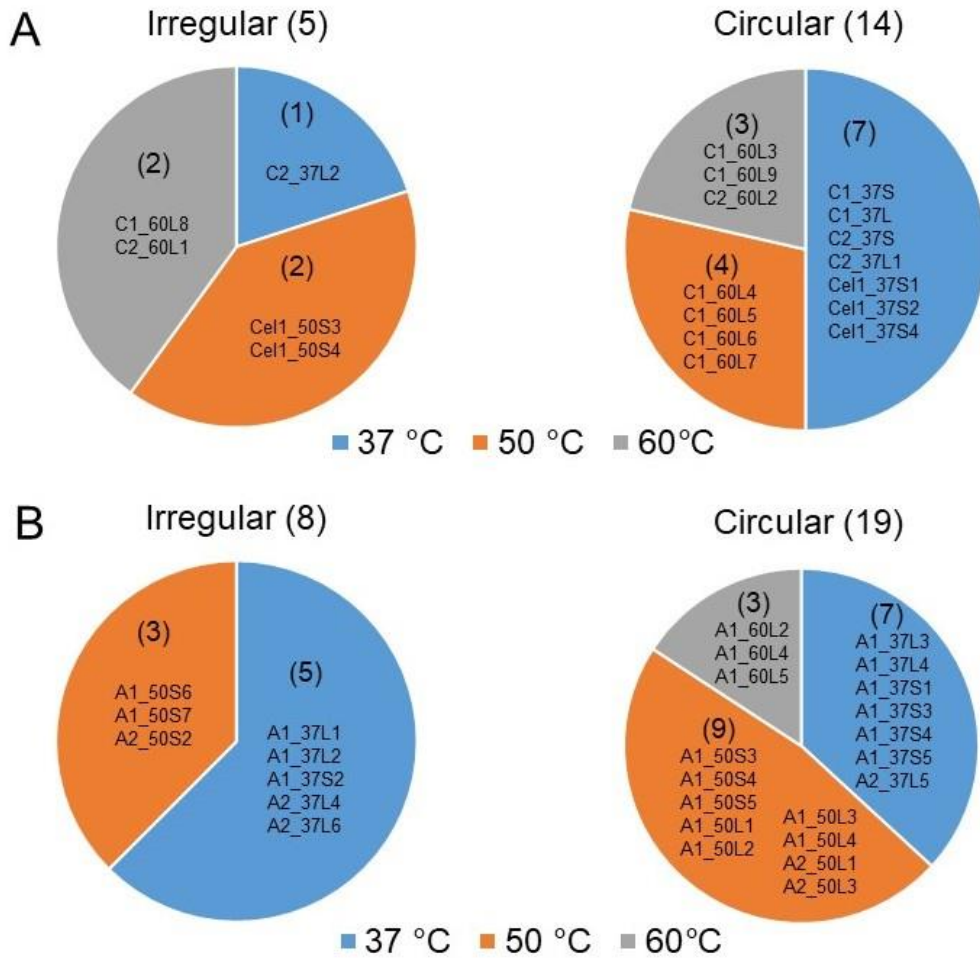


**Figura 2.** Isolamento de colônias bacterianas em meio redutor seletivo. Colônias bacterianas isoladas em meio contendo amido 1% (m/v) como fonte de carbono por cultivo a 37°C, 50°C e 60°C (A). Colônias bacterianas isoladas em meio contendo CMC 1% (m/v) como fonte de carbono por cultivo a 37°C, 50°C e 60°C (B). As culturas foram crescidas por 3 dias. Os círculos em vermelho indicam colônias com morfologia irregular e os círculos em preto, colônias com morfologia circular.

**Tabela 1.** Isolados bacterianos obtidos pelo cultivo em amido e celulose a 1% (m/v) sob atmosfera anaeróbica como fonte de carbono nas temperaturas de 37°C, 50°C e 60°C por três dias de incubação.

Isolado	Amido			Isolado	Celulose		
	Temperatura (°C)	Tamanho (mm)	Forma		Temperatura (°C)	Tamanho (mm)	Forma
A1_37L1	37	2,0	irregular	C1_37S	37	0,5	circular
A1_37L2	37	2,5	irregular	C1_37L	37	0,5	circular
A1_37L3	37	1,5	circular	C2_37S	37	1,0	circular
A1_37L4	37	1,5	circular	C2_37L1	37	0,5	circular
A1_37S1	37	1,0	circular	C2_37L2	37	1,5	irregular
A1_37S2	37	0,5	irregular	Cel1_37S1	37	0,5	circular
A1_37S3	37	1,0	circular	Cel1_37S2	37	0,5	circular
A1_37S4	37	1,0	circular	Cel1_37S4	37	1,0	circular
A1_37S5	37	2,5	circular	Cel1_50S3	50	1,0	irregular
A2_37L4	37	1,5	irregular	Cel1_50S4	50	1,0	irregular
A2_37L5	37	2,0	circular	C1_60L3	60	0,5	circular
A2_37L6	37	1,0	irregular	C1_60L4	50	0,5	circular
A1_50S3	50	1,0	circular	C1_60L5	50	0,5	circular
A1_50S4	50	1,5	circular	C1_60L6	50	1,0	circular
A1_50S5	50	0,5	circular	C1_60L7	50	0,5	circular
A1_50S6	50	1,0	irregular	C1_60L8	60	1,0	irregular
A1_50S7	50	1,0	irregular	C1_60L9	60	1,0	circular
A1_50L1	50	0,5	circular	C2_60L1	60	1,0	irregular
A1_50L2	50	1,0	circular	C2_60L2	60	0,5	circular
A1_50L3	50	0,5	circular				
A1_50L4	50	1,0	circular				
A1_50S2	50	1,5	irregular				
A2_50L1	50	1,0	circular				
A2_50L2	50	1,0	circular				
A1_60L2	60	1,0	circular				
A1_60L4	60	0,5	circular				
A1_60L5	60	0,5	circular				





**Figura 3.** Distribuição dos isolados bacterianos com morfologia circular ou irregular obtidos pelo cultivo em meio seletivo a 37°C, 50°C e 60°C. Colônias bacterianas isoladas em meio contendo CMC 1% (m/v) como fonte de carbono (A). Colônias bacterianas isoladas em meio contendo amido 1% (m/v) como fonte de carbono (B).

Tendo em consideração que a diversidade bacteriana do rúmen bovino não está ainda completamente caracterizada, a bioprospecção de bactérias celulolíticas e amilolíticas neste ecossistema permitiu o isolamento de bactérias capazes de utilizar celulose e amido como fontes de carbonos.

As estratégias de isolamento em meio seletivo, resultaram em 19 isolados celulolíticos e 27 isolados amilolíticos (Tabela 1). O filo *Bacteroidetes*, reportado por ser de maior predominância no rúmen, compreende espécies bacterianas que possuem repertório enzimático para

hidrolisar celulose e amido, incluindo espécies do gênero *Prevotella* e *Bacteroides*. Outros gêneros menos abundantes como *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Butyrivibrio*, também foram descritos por solubilizar estes polímeros (Jose et al. 2017).

Os isolados obtidos neste trabalho mostraram colônias com diâmetros e formas morfológicas irregulares e circulares a 37°C, 50°C e 60°C em concordância com a literatura.

Yanke e Cheng (1998) isolaram 27 colônias de rúmen bovino, com morfologia irregular em cultivos sólidos contendo celobiose e amido como fontes de carbono e reportaram colônias com diâmetro em torno de 0,5 mm e temperaturas de crescimento a 37°C além disso, os isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Selenomonas* e *Succinovibrio*. Em estudos mais recentes, Habu et al. (2017) isolaram colônias com morfologias circulares e irregulares em cultivos utilizando palha de arroz, palha milho e amido como fontes de carbono a 37°C e foram identificados gêneros como *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium* e *Lactobacillus*.

Já, Das e Qin (2012) isolaram 15 colônias de rúmen bovino, apresentando formas circulares, tamanhos em torno de 1,5 mm e com atividade celulolítica, pois foram isolados em meio seletivo utilizando CMC como fonte de carboidratos a 39°C. Em adição, *Actinomyces* sp. 40 foi isolado de rúmen caprino, em meio seletivo contendo amido como fonte de carbono a 39°C e apresentou morfologia circular (Min et al. 1994).

As linhagens ISO1, ISO2 identificados como *Clostridium thermocellum*, foram isolados de dejetos de caprino em cultivo sólido contendo celulose como fonte de carbono, sendo registrado crescimento a 60°C (Blume et al. 2013).

A presença de isolados incluindo C1\_60L8, C2\_60L1, C1\_60L3, C1\_60L9, C2\_60L2, A1\_60L2, A1\_60L4, A1\_60L5 crescidos a 60°C, confirmam a presença de espécies termófilas no rúmen. O ecossistema ruminal com temperatura em torno de 39 °C permite o normal crescimento e

metabolismo de espécies majoritariamente mesófilas tais como *Bacillus*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres*, entre outros, no entanto, o microbioma ruminal abriga também algumas espécies termófilas já descritas, como *Clostridium thermocellum* e *Bacillus thermoamylovoras*, capazes de degradar a biomassa vegetal em temperaturas acima de 60 °C (BLanc et al. 1995; Osiro et al. 2017).

Ao todo, a maioria das bactérias ruminais já caracterizadas na literatura incluindo as que foram mencionadas acima, têm mostrado que não é possível sua diferenciação ou identificação apenas por suas características morfológicas, já que na maioria dos casos apresentaram padrões similares quanto à forma, diâmetro e cor dificultando sua identificação e, subsequentemente, foram necessárias análises específicas como testes bioquímicos ou análises moleculares para diferenciá-las. Nesse sentido, os resultados obtidos da descrição morfológica (Figura 3; Tabela 1), apenas permitiu agrupá-los de acordo com sua forma (irregular e circular), temperatura de crescimento e utilização de fonte de carbono.

## **2.2. Análise da produção de endo-1,4-β-glucanase, endo-1,4-β-xilanase e α-amilase pelos isolados bacterianos**

Com relação à determinação das atividades enzimáticas dos isolados bacterianos, foram detectadas 9 amostras que se destacaram quanto à atividade de endo-1,4-β-xilanase e endo-1,4-β-glucanase, sendo de maior atividade, os isolados C1\_37L, C1\_37S, A1\_37L1, A1\_37S5, A1\_50L1, A1\_50L2, A1\_50L3, A1\_60L4 e A1\_50S2 (Figura 4).

Dentre estas, as amostras A1\_50L1, A1\_50L2, A1\_50L3 e A1\_50S2 apresentaram maior atividade específica de endo-1,4-β-xilanase com valores em U/mg de 5,71, 7,59, 5,60 e 4,94, respectivamente (Figura 4B).

Na avaliação da atividade de α-amilase, as amostras C2\_60L1, A1\_50L2, A1\_60L2 e A1\_50S2 apresentaram maior atividade, tendo como destaque a amostra A1\_50L2 com atividade específica de 18,15 U/mg (Figura 4C). Cabe ressaltar que, os maiores valores de atividades foram detectados para o isolado A1\_50L2, com atividades de endo-1,4-β-

glucanase (4,29 U/mg), endo-1,4- $\beta$ -xilanase (7,59 U/mg) e de  $\alpha$ -amilase (18,15 U/mg).

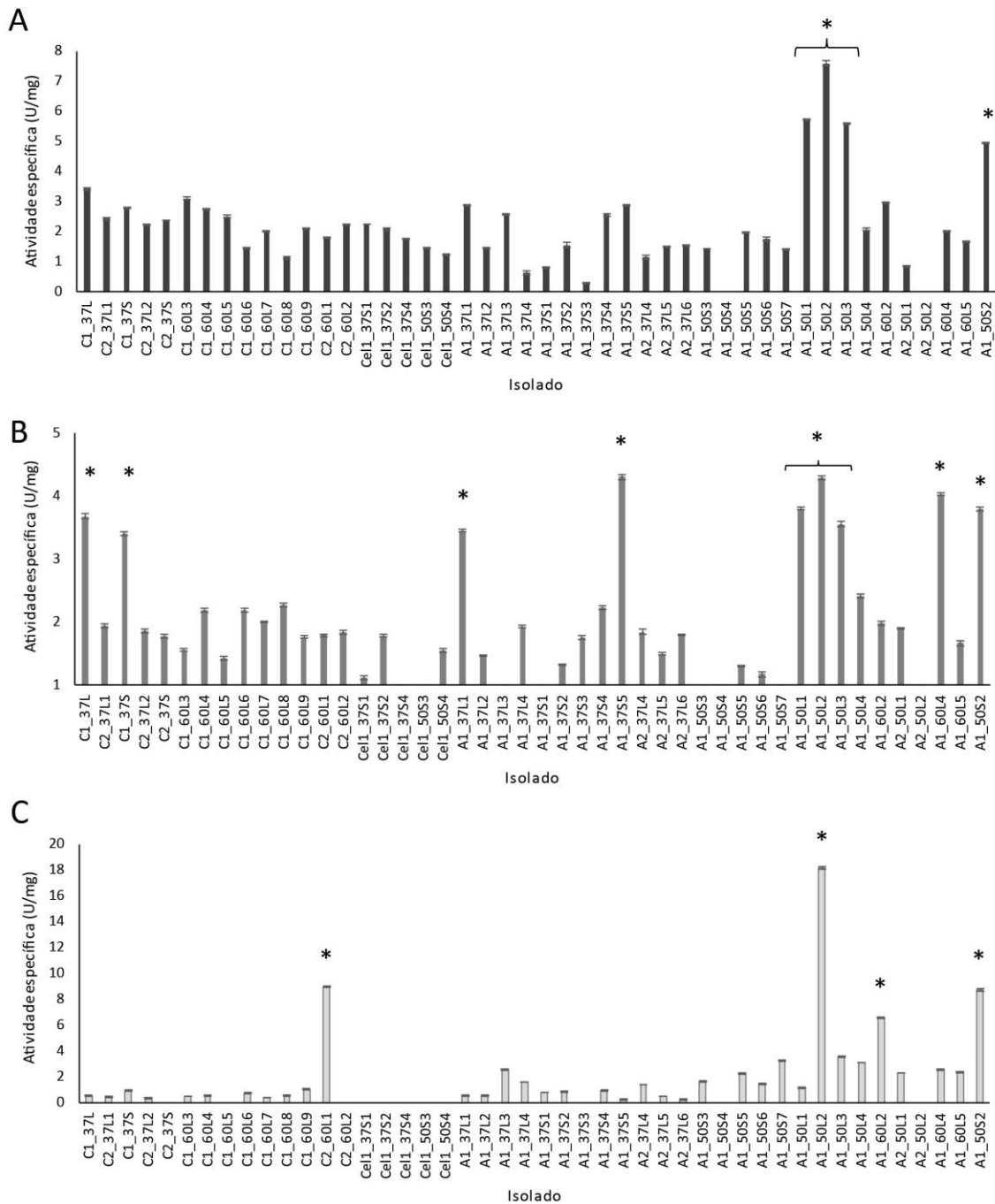
Bactérias ruminais são conhecidas por sua habilidade para solubilizar a parede celular vegetal das plantas através da secreção de enzimas ativas, tais como holocelulases (Snelling and Wallace 2017). Nesse contexto, a partir da caracterização enzimática dos sobrenadantes das culturas dos 46 isolados bacterianos, foi possível verificar atividades de endo-1,4- $\beta$ -xilanase e endo-1,4- $\beta$ -glucanase em 95% dos sobrenadantes, assim como atividade  $\alpha$ -amilase em 76% dos sobrenadantes dos isolados (Figura 4).

Foi constatado que os 4 sobrenadantes dos isolados com maior atividade xilanolítica e celulolítica (A1\_50L1, A1\_50L2, A1\_50L3 e A1\_50S2) exibiram mesmas características já anteriormente descritas, tais como morfologia circular e crescimento a 50°C (Figura 3B), sugerindo que estes isolados poderiam apresentar alguma relação de semelhança taxonômica. No entanto, os isolados A1\_50L2 e A1\_50S2 apresentaram diferenças significativas quando comparado à produção de  $\alpha$ -amilase dos isolados A1\_50L1 e A1\_50L3, indicando que existem diferenças no perfil enzimático quanto à utilização de amido entre estes isolados (Figura 4).

Por outro lado, dentre os sobrenadantes dos isolados mesófilos (37°C) com maior atividade celulolítica, o isolado A1\_37L1 diferenciou-se dos isolados C1\_37L, C1\_37S e A1\_37S5 por exibir colônias com forma irregular.

Quanto à produção de  $\alpha$ -amilase, o isolado A1\_50L2 apresentou maior atividade (18,15 U/mg) e está de acordo com os obtidos em outros isolados de rúmen tais como *Bacteroides amylophilus* (19,67 U/mg) e *Streptococcus bovis* (15,63 U/mg) (Anderson 2002; Satoh et al. 1993). Além disso, já foram relatados outros isolados com menor atividade incluindo *Bacteroides ruminicola* 23 (0,28 U/mg), *Butirivibrio fibrisolvens* A38 (2,87 U/mg), *Selenomonas ruminantium* (0,25 U/mg) (Puniya, Singh, and Kamra 2013).

Ao todo, o isolado A1\_50L2, apresentou maior atividade enzimática nos três substratos, tornando-se um potencial candidato para pesquisa, já que enzimas, obtidas de bactérias termófilas, vêm sendo investigadas em função principalmente, das indústrias de base tecnológica emergentes (Chakdar et al. 2016).



**Figura 4.** Determinação da atividade de endo-1,4- $\beta$ -xilanase, endo-1,4- $\beta$ -glucanase e  $\alpha$ -amilase nos sobrenadantes das culturas dos isolados bacterianos selecionadas pelo crescimento em amido e celulose. A figura (A) representa atividade de endo-1,4- $\beta$ -xilanase, a figura (B), atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase e a figura (C), atividade de  $\alpha$ -amilase. O cultivo dos isolados foi realizado por 4 dias em meio contendo 1% (m/v) de celulose microcristalina ou amido como fonte de carbono sob atmosfera anaeróbica. A barra de erro representa o desvio padrão de replicatas técnicas, (\*)  $p \leq 0,05$

### **2.3 Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE e Zimograma**

Após a determinação da atividade enzimática, o perfil protéico das amostras incluindo C1\_37L, C1\_37S, A1\_37L1, A1\_37S5, A1\_50L2, A1\_50L3, A1\_60L4 A1\_50S2, C2\_60L1 e A1\_60L2, foi comparado em gel SDS-PAGE. Observando os géis, verificou-se que o perfil protéico dos sobrenadantes dos isolados C1\_37L, C1\_37S, A1\_60L4 e A1\_50S2 cultivados em meio líquido contendo celulose apresentaram variação entre as amostras analisadas, entretanto, foi observado acentuada similaridade entre os sobrenadantes A1\_37L1 e A1\_37S5, assim como os sobrenadantes A1\_50L2 e A1\_50L3 (Figura 5B).

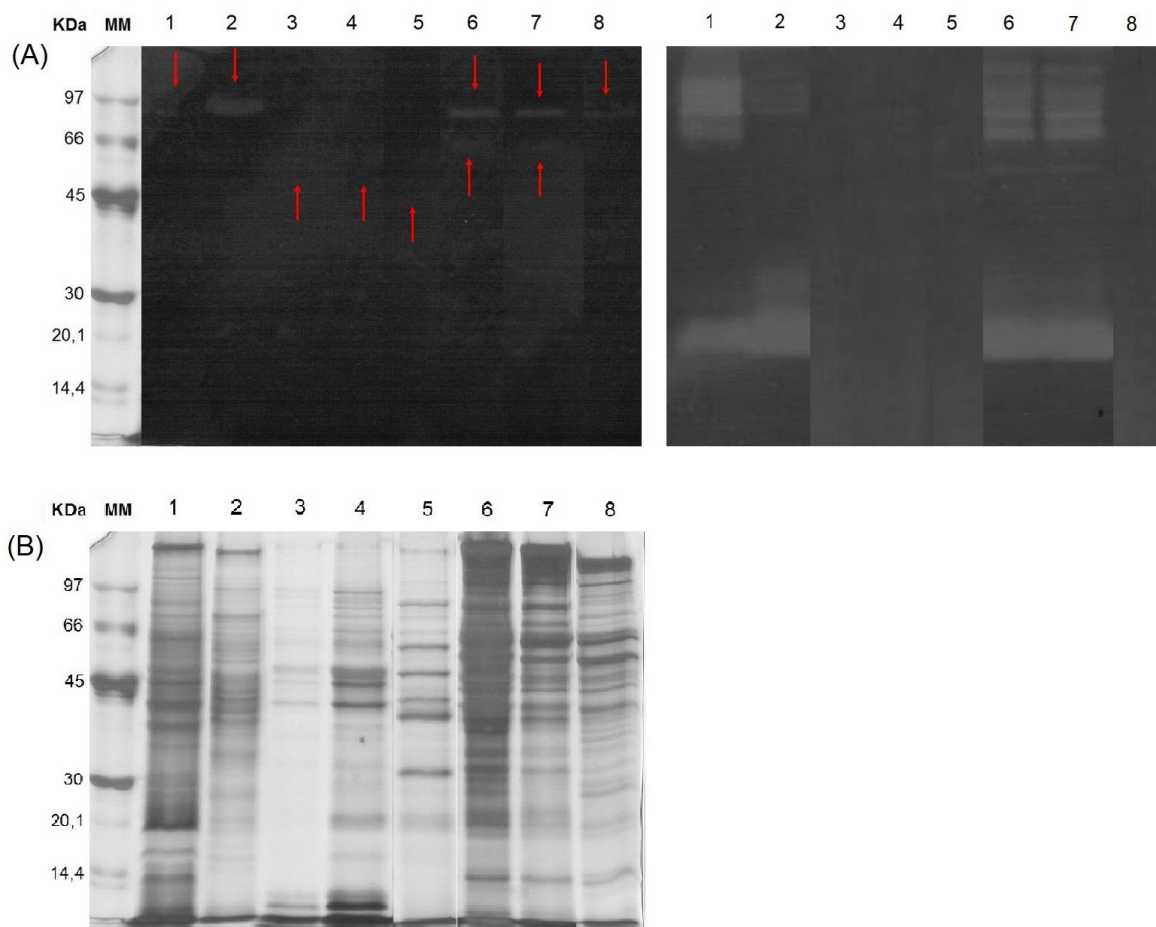
Nos sobrenadantes das culturas dos isolados incluindo C1\_37L, C1\_37S, A1\_37L1, A1\_37S5, A1\_60L4, A1\_50L2, A1\_50L3 e A1\_50S2 cultivados em meio contendo celulose como fonte de carbono foram detectadas atividades de endo-1,4- $\beta$ -glucanase. E ainda, nos sobrenadantes dos isolados C1\_37L e C1\_37S foram detectadas uma banda com massa molecular estimada de 90 kDa, e nos sobrenadantes dos isolados A1\_37L1 e A1\_37S5 foram detectadas uma banda protéica com massa molecular estimada de 50 kDa. Já nos sobrenadantes dos isolados A1\_50L2 e A1\_50L3, foram detectadas 2 bandas com massas moleculares estimadas de 60 kDa e 85 kDa, e no sobrenadante do isolado A1\_50S2 foi detectada uma banda com massa molecular estimada de 85 kDa (Figura 5A).

Nos sobrenadantes das culturas dos isolados C1\_37L, C1\_37S, A1\_50L2 e A1\_50L3 cultivados em meio líquido contendo celulose como fonte de carbono, foram detectadas atividades de endo-1,4- $\beta$ -xilanase (Figura 5B).

Enquanto que no sobrenadante do isolado C1\_37L foram detectadas bandas com massas moleculares estimadas entre 50 kDa e 100 kDa e entre 20 kDa e 30 kDa, respectivamente, no sobrenadante do isolado C1\_37S, foram detectadas bandas com massas moleculares estimadas entre 70 kDa e 100 kDa e entre 20 kDa e 30 kDa. Além disso, nos sobrenadantes dos

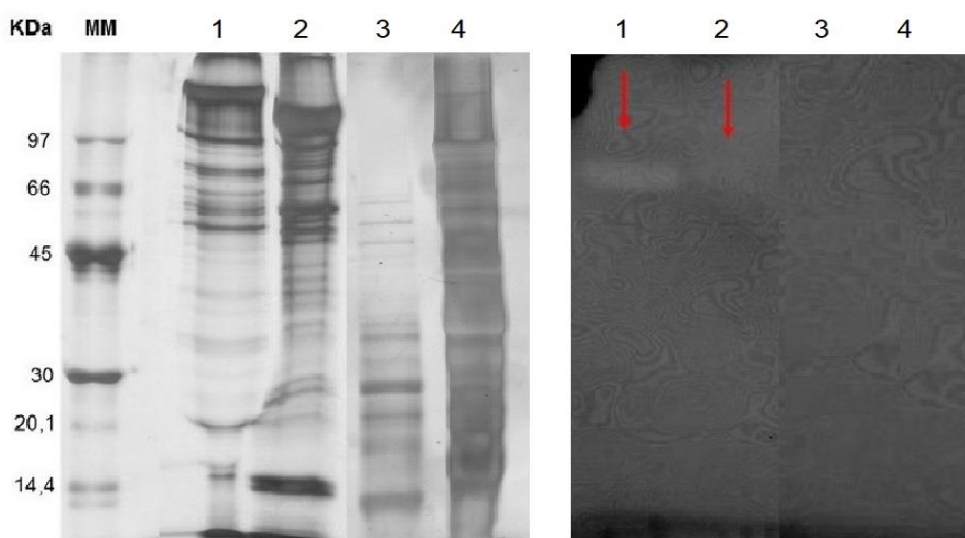
isolados A1\_50L2 e A1\_50L3 foram detectadas bandas com massas moleculares estimadas entre 50 kDa e 120 kDa e entre 20 kDa e 30 kDa, respectivamente (Figura 5B).

Nos sobrenadantes das culturas dos isolados incluindo A1\_50L2 e A1\_50S2 cultivados em meio líquido contendo amido como fonte de carbono foi detectada apenas uma banda com atividade  $\alpha$ -amilase com massa molecular estimada de 66 kDa (Figura 6).



**Figura 5.** SDS-PAGE 12% e zimograma em SDS-PAGE 12% dos isolados selecionados com maior atividade enzimática. (1): C1\_37L; (2): C1\_37S; (3): A1\_37L1; (4): A1\_37S5; (5): A1\_60L4; (6): A1\_50L2; (7): A1\_50L3; (8): A1\_50S2; (MM): marcadores de massa molecular. Na figura (A), o gel da esquerda representa o zimograma com atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, e o gel da direita representa o zimograma com atividade de endo-1,4- $\beta$ -xilanase. A figura (B), representa o gel de SDS-PAGE 12%. As setas vermelhas apontam bandas de hidrólise com atividade de endoglucanase. Foram utilizados 1 mL de amostra para cada atividade.





**Figura 6.** SDS-PAGE 12% e zimograma em SDS-PAGE 12% dos isolados selecionados com maior atividade enzimática  $\alpha$ -amilase. (1): A1\_50L2; (2): A1\_50S2; (3): A1\_60L2; (4): C2\_60L1; (MM): marcadores de massa molecular. À esquerda, o gel de SDS-PAGE 12%, à direita, o zimograma em SDS-PAGE 12%. As setas vermelhas apontam bandas de hidrólise com atividade de  $\alpha$ -amilase. Foram utilizados 1 mL de amostra para cada atividade.

Em relação as análises de SDS-PAGE e zimograma, mesmo os sobrenadantes dos isolados C1\_37L e C1\_37S apresentaram atividade endo-1,4- $\beta$ -glucanase e características morfológicas de colônias bastante próximas foram observadas diferenças quanto à perfil protéico entre ambas as amostras. Além disso, também foram detectadas diferenças quanto às bandas com atividade endo-1,4- $\beta$ -xilase, confirmando mais uma vez a diferenciação entre C1\_37L e C1\_37S. Por outro lado, sobrenadantes das amostras A1\_37L1 e A1\_37S5 apresentaram semelhanças no perfil protéico e bandas similares com atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, assim como atividades endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xilase e  $\alpha$ -amilase, indicando que ambas as amostras guardam semelhanças entre si (Figura 5).

O perfil protéico do sobrenadante do isolado A1\_60L4, não apresentou semelhanças com nenhum outro isolado e mostrou apenas uma banda com atividade endo-1,4- $\beta$ -glucanase.

Dentre os sobrenadantes dos isolados A1\_50L2, A1\_50L3 e A1\_50S2, as amostras A1\_50L2 e A1\_50L3 apresentaram semelhanças no perfil protéico, assim como bandas similares com atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xilanase e, adicionalmente, as mesmas características morfológicas de colônia e temperatura; contudo, A1\_50L3 não apresentou nenhuma banda com atividade de  $\alpha$ -amilase. Em contrapartida, o sobrenadante do isolado A1\_50S2 mostrou uma banda com atividade de  $\alpha$ -amilase com massa molecular similar à A1\_50L2. No entanto, o sobrenadante do isolado A1\_50S2 apresentou diferenças no perfil protéico entre ambas as amostras (Figura 5; Figura 6).

#### **2.4 Análise dos isolados bacterianos por espectrometria de massa**

O dendrograma gerado com os espectros adquiridos para os 37 isolados bacterianos agrupou-os em 10 grupos.

O grupo 1 foi composto por A1\_50L1 e por isolados de *P. barengoltzii* incluindo A1\_50L2, A1\_50S2 e A1\_50L4, enquanto que o grupo 2 foi composto por isolados classificados como *Lactobacillus paracasei* incluindo A2\_37L4, A2\_37L5 e A2\_37L6, o grupo 3 foi composto por A1\_60L4, A1\_60L5 e por isolados do gênero *Bacillus* incluindo A1\_50S5 e A1\_50S6. Já o isolado A1\_37L1 agrupou-se com A1\_37S5 (*Bifidobacterium thermocidophilum*) formando o grupo 4 (Figura 7).

O grupo 5 foi composto por isolados identificados como *E. coli* incluindo C1\_37L, C2\_37L1, C2\_37L2, C2\_37S, C1\_37S. O grupo 6 foi composto apenas por A1\_50S3 e não agrupou com as demais. Com relação ao grupo 7, este foi composto pelos isolados C2\_60L2, C2\_60L1 e por A1\_60L2 (*Bacillus thermoamylovorans*). Adicionalmente, o grupo 8 foi composto por C1\_60L3, C1\_60L4, C1\_60L5, C1\_60L6, C1\_60L7, C1\_60L8 e o grupo 9 composto pelos isolados Cel1\_50S3 e Cel1\_50S4. Além disso, o grupo 10

foi composto pelos isolados Cel1\_37S1, Cel1\_37S4 e Cel1\_37S2 (Figura 7).

Os resultados obtidos pelo dendrograma permitiram mostrar as relações proteômicas entre os 37 isolados bacterianos com base na tipagem MALDI-TOF. Sendo assim, a comparação dos espectros de massas dentre os isolados do grupo 1, indicaram uma estreita proximidade entre os isolados A1\_50L1, A1\_50L3 e os 3 isolados classificados como *P. barengoltzii*, (A1\_50S2, A1\_50L2 e A1\_50L4), sugerindo que são a mesma espécie. Além disso, os espectros do grupo 1, foram diferentes aos do grupo 2,3 e 4, ficando em um ramo separado dos outros. Os espectros dos isolados do grupo 2 apresentaram alta similaridade e foram classificados como *Lactobacillus paracasei*. No grupo 3, a comparação de espectros mostrou semelhanças entre A1\_60L4, A1\_60L5 e A1\_50S5 e A1\_50S6 (classificado como *Bacillus*), sugerindo que são o mesmo gênero. Além disso, foi evidenciado que os grupos 1, 2 e 3 ficaram em ramos próximos. Esse resultado condiz com trabalhos baseados em filogenia de Ash et al. (1993), que conclui que os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Lactobacillus* apresentam relações filogenéticas próximas.

Os espectros de isolados do grupo 4 foram semelhantes sendo classificados como *Bifidobacterium thermoacidophilum*. Com relação ao grupo 5, as comparações de espectros foram semelhantes entre os isolados e estes foram classificados como *E. coli*. O grupo 6 não foi identificado e ficou em um ramo separado dos outros grupos (7, 8 e 9).

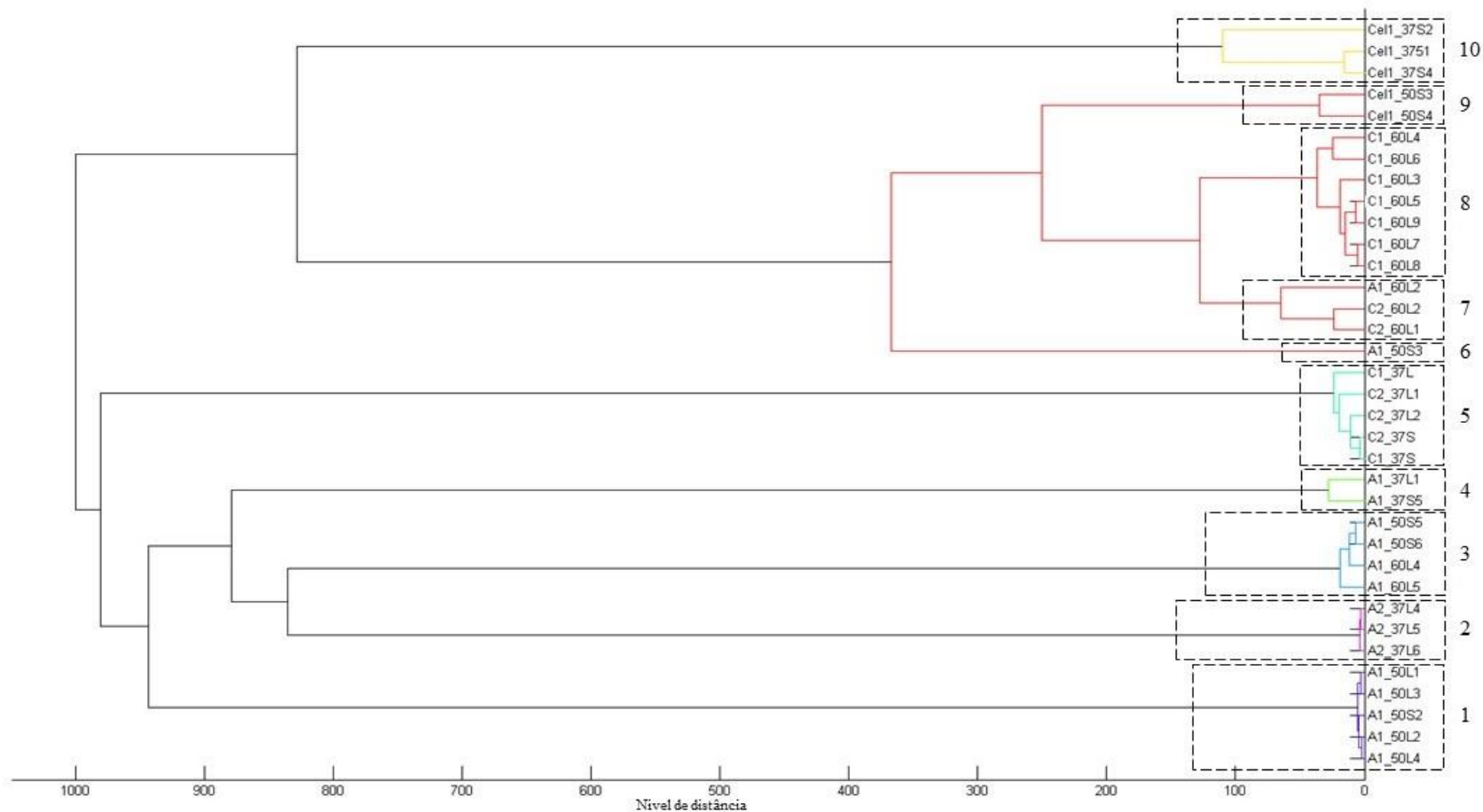
Apesar do agrupamento em clados distintos, a matriz de similaridade mostrou que entre os espectros dos grupos 7,8 e 9 há uma similaridade considerável, levando à hipótese que são do mesmo gênero (Figura 7).

Dentro do grupo 7, o isolado A1\_60L2 (*Bacillus thermoamylovoras*) ficou em um ramo separado dos isolados C2\_60L1 e C2\_60L2. Essa separação pode ser explicada por uma diferença nos espectros, uma vez que o isolado mais distante mostrou maior número de espectros de alta intensidade.

Além disso, a comparação dos espectros dentro do grupo 8 levou à formação de dois ramos, sendo que os isolados A1\_60L4 e C1\_60L6 ficaram em um ramo separado dos outros, sugerindo que este grupo estaria formado por duas espécies diferentes. Com relação ao grupo 9, as comparações de espectros resultaram próximas entre os isolados, indicando que são a mesma espécie. A comparação dos espectros do grupo 10 resultaram na formação de dois ramos, sendo que o isolado Cel1\_37S2 formou um ramo separado dos isolados Cel1\_37S1 e Cel1\_37S4, que por sua vez apresentaram estreita proximidade; isto sugere a presença de espécies diferentes dentro do grupo.

Os espectros obtidos dos 37 isolados possibilitaram, através das análises do algoritmo Matlab7, a distinção de todos os isolados bacterianos e subsequentemente o seu agrupamento. O agrupamento de tais espectros junto com as identificações, revelaram a afiliação dos isolados aos filos bacterianos *Firmicutes* (68%), *Proteobacteria* (14%) e *Actinobacteria* (6%). Dentre o filo *Firmicutes*, o gênero *Bacillus* foi mais abundante (56%), seguido de *Paenibacillus barengoltzii* (20%), *Lactobacillus paracasei* (12%) e *Bacillus thermoamylovorans* (12%). Enquanto, o filo *Proteobacteria* foi composto por isolados de *E. coli*, o filo *Actinobacteria* foi composto *B. thermoacidophilum*. Esse resultado condiz com trabalhos de Pavani (2017) baseados em metagenômica de rúmen bovino que conclui que depois do filo *Bacteroidetes*, o filo *Firmicutes* é o mais abundante, seguido de *Proteobacteria* e *Actinobacteria*.

Ao contrário da identificação por meio de métodos convencionais tais como testes bioquímicos que são metodologias demoradas e requerem mais de 24 horas após o crescimento da cultura, a identificação usando MALDI-TOF é realizado em minutos, após a extração de proteínas, sendo uma metodologia de triagem rápida de bactérias. De acordo com Jang e Kim (2018), a tipagem por meio do perfil proteômico de microrganismos, ao invés de diferenciações morfológicas, metabólicas ou bioquímicas é uma das principais vantagens da espectrometria de massas.



**Figura 7.** Dendrograma mostrando as relações proteômicas entre os isolados bacterianos ruminais com base na tipagem MALDI-TOF. O dendrograma foi construído com conjunto de espectros de proteínas ribossomais obtidas após análise MALDI-TOF de cada amostra utilizando o programa estatístico Matlab 7 integrado ao programa Biotyper 3, com os parâmetros de distância por correlação, sendo esta normalizada entre distancia 0 (concordância total) e 1000 (sem concordância).

Os espectros gerados na análise por espectrometria de massa possibilitaram a identificação de quatorze isolados bacterianos a nível de espécie, classificados como *Escherichia coli* (C1\_37L, C1\_37L1, C1\_37S, C2\_37L2, C2\_37S), *Bifidobacterium thermoacidophilum* (A1\_37L1, A1\_37L3), *Lactobacillus paracasei* (A2\_37L4, A2\_37L5, A2\_37L6), *Paenibacillus barengoltzii* (A1\_50L2, A1\_50L4, A1\_50S2) e *Bacillus thermoamylovorans* (A1\_60L2), uma vez que apresentaram valores de escore maior que 2. Além disso, cinco isolados bacterianos foram identificados a nível de gênero, classificados como *Bacillus* (C1\_60L8, A1\_50S5, A1\_50S6, A1\_50S7) e *Paenibacillus* (A1\_50L1) uma vez que apresentaram valores de escore entre 1,9 e 2,0. No entanto, os escores dos dezoito isolados restantes foram menores que 1,9, o que não permitiu identificar a nível de espécie ou gênero (Tabela 2).

Em relação às identificações, 38% dos isolados foram identificados a nível de espécie e 13% a nível de gênero. Diversas pesquisas têm relatado a identificação de vários microrganismos em diferentes níveis taxonômicos, como o trabalho de Barba et al. (2014). Esses autores, utilizando MALDI-TOF avaliaram a capacidade de identificação de 135 isolados bacterianos, incluindo 31 espécies e 11 gêneros, reportando a identificação correta de 99,8% para gênero e 99,1% para espécie. Além desse relato, também Hsu e Burnham. (2014) utilizaram MALDI-TOF para analisar 101 bactérias anaeróbicas, conseguindo demonstrar a identificação correta de 84 bactérias a nível de espécie e 17 bactérias a nível de gênero.

Por outro lado, 49% dos isolados bacterianos não foram identificados, possivelmente pelas características das células destes cultivos ou erros metodológicos, como problemas na homogeneização da mistura ou cristalização inadequada, podem ter provocado baixas intensidades dos picos dos espectros.

A identificação negativa também é atribuída pela ausência na biblioteca das cepas de referência correspondentes a esses isolados. Van Belkum et

al. (2017) relataram que quando os espectros obtidos, não são identificados na biblioteca disponível (Biotyper), é possível gerar os próprios e incluí-los na biblioteca de referência. De acordo com Veloo et al. (2016) a identificação de bactérias também está relacionada à qualidade dos espectros. Esses autores relataram que tanto as matrizes quanto os métodos de amostragem poderiam influenciar na aquisição da relação massa/carga dos espectros.

**Tabela 2.** Identificação de isolados bacterianos após análise por MALDI-TOF MS

Isolado	Identificação	Escore
C1_37L	<i>E. coli</i> DSM 1103	2,352
C2_37L1	<i>E. coli</i> DSM 682	2,397
C1_37S	<i>E. coli</i> DSM 1103	2,352
C2_37L2	<i>E. coli</i>	2,352
C2_37S	<i>E. coli</i>	2,413
C1_60L3	-	1,604
C1_60L4	-	1,520
C1_60L5	-	1,635
C1_60L6	-	1,472
C1_60L7	-	1,691
C1_60L8	<i>Bacillus</i>	1,942
C1_60L9	-	1,695
C2_60L1	-	1,685
C2_60L2	-	1,771
Cel1_37S1	-	1,748
Cel1_37S2	-	1,401
Cel1_37S4	-	1,841
Cel1_50S3	-	1,575
Cel1_50S4	-	1,608
A1_37L1	<i>Bifidobacterium thermoacidophilum</i>	2,206
A1_37L3	<i>Bifidobacterium thermoacidophilum</i>	2,263
A1_37S5	-	1,757
A2_37L4	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,293
A2_37L5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,384
A2_37L6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,321
A1_50S3	-	1,805
A1_50S5	<i>Bacillus</i>	1,933
A1_50S6	<i>Bacillus</i>	1,955
A1_50S7	<i>Bacillus</i>	1,913
A1_50L1	<i>Paenibacillus</i>	1,902
A1_50L2	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	2,232
A1_50L3	-	1,828
A1_50L4	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	2,11
A1_60L2	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	2,022
A1_60L4	-	1,830
A1_60L5	-	1,879
A1_50S2	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	2,082



## 2.5 Identificação dos isolados bacterianos de interesse por 16S rDNA

O gene 16S rDNA dos isolados C1\_37L, C1\_37S, A1\_60L2, C2\_60L2 e A1\_50L2 foi sequenciado e comparado com às sequências de nucleotídeos existentes no Genbank (NCBI) (Tabela 3). Com base nos dados do sequenciamento, foi determinado que os isolados C1\_37L e C1\_37S apresentaram identidade de 95,7% e 96,7% respectivamente, com *Escherichia fergusonii* ATCC 35469. Os isolados A1\_60L2 e C2\_60L2 apresentaram identidade de 98,7% e 99%, respectivamente, com *Bacillus thermoamylovorans*. O isolado A1\_50L2 apresentou identidade de 99,8% com *Paenibacillus barengoltzii*.

**Tabela 3.** Comparação das sequências parciais 16S rDNA dos isolados com sequências depositadas no GenBank (NCBI).

Isolado	Identificação	Cobertura	Identidade (%)	Nº de acesso
C1_37L	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	99	95,73	NR_027549
C1_37S	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	99	96,7	NR_027549
A1_60L2	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> LMG 18084	99	98,71	NR_117028
C2_60L2	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> LMG 18084	100	99,04	NR_117028
A1_50L2	<i>Paenibacillus barengoltzii</i> SAFN-016	100	99,8	NR_042756

Os dados de identificação bacteriana por sequência 16S rDNA (Tabela 3) confirmaram as identificações obtidas por MALDI-TOF para os isolados incluindo A1\_50L2, C2\_60L2 e A1\_60L2. Por outro lado, as identidades de C1\_37L e C1\_37S por 16S rDNA não corresponderam às identificações por MALDI-TOF. Cabe ressaltar que, os isolados C1\_37L e C1\_37S após análise 16S rDNA, apresentaram identidades de 95,7% e 96, 4%, respectivamente, sugerindo que a identificação a nível de espécie não foi totalmente satisfatória e subsequentemente confirmando apenas como gênero *Escherichia*. Contudo, os resultados de MALDI-TOF mostraram que C1\_37L e C1\_37S apresentam relações proteômicas similares, indicando que pertencem ao mesmo gênero. Por tanto, esses resultados estão em concordância com os resultados da análise 16S rDNA.

Os resultados obtidos de identificação entre as duas técnicas abrem a possibilidade da utilização da espectrometria de massas como ferramenta para triagem rápida de microrganismos de um ambiente, tais como o rúmen bovino.

Com relação à bactéria *P. barengoltzii* A1\_50L2, é o primeiro reporte desta espécie para rúmen bovino. No entanto, pesquisas em metagenômica do rúmen, já tem reportado o gênero *Paenibacillus* participando na produção de GHs e CBM associadas a degradação de hemicelulose e amido (Jose et al. 2017). De fato, *P. barengoltzii* A1\_50L2 se destacou quanto à produção de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xilanase e  $\alpha$ -amilase, reafirmando as características enzimáticas descritas para espécies deste gênero. Além disso, *P. barengoltzii* A1\_50L2 foi caracterizado como moderadamente termófilo (50°C), tornando-se um candidato para pesquisa, já que enzimas secretadas por bactérias termófilas vêm sendo procuradas para aplicações de base tecnológica incluindo biorefinarias e indústrias de processamento de amido (R Sindhu et al. 2016; Singhania et al. 2015).

Os isolados C1\_37L e C1\_37S identificados por ambas as técnicas como *Escherichia*, já têm sido relatados para microbioma ruminal, como visto no trabalho de Pang et al. (2017). Esses autores, isolaram e identificaram cepas de *E. coli* e *Shigella* capazes de produzir metano e hidrogênio, após fermentação de celulose microcristalina. Cabe ressaltar que C1\_37L e C1\_37S apresentaram atividade endo-1,4- $\beta$ -glucanase e em menor proporção atividade endo-1,4- $\beta$ -xilanase.

*Bacillus thermoamylovorans* têm sido caracterizada como bactéria termófila e atua principalmente sobre carboidratos não estruturais, como amido, mas também pode hidrolisar a xilana e manana (BLanc et al. 1995). O gênero *Bifidobacterium* foi relatado no rúmen como produtor de GHs das famílias GH13, GH39, atuando sobre componentes de amido e em celobiose (Wang et al. 2013).

**CAPÍTULO 2 – Este capítulo foi submetido para publicação na revista  
Waste and Biomass Valorization**

***Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 as a source of plant cell wall  
degrading enzymes and its use on lignocellulosic biomass hydrolysis**

***Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 as a source of plant cell wall degrading enzymes and its use on lignocellulosic biomass hydrolysis**

Alonso R. P. Ticona<sup>1,3</sup>, Sadia F. Ullah<sup>1</sup>, Pedro R. V. Hamann<sup>1</sup>, Fabyano A. C. Lopes<sup>2</sup>, Eliane F. Noronha<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Enzymology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional -TO, Brazil

<sup>3</sup>Microbial Biology Graduate Program, University of Brasilia, Brasilia -DF, Brazil

\* Corresponding author: Eliane F. Noronha

Laboratory of Enzymology, University of Brasilia (UnB), 70910-900, Brazil.

Telephone: 0055 061 31072952

E-mail address: [enoronha@unb.br](mailto:enoronha@unb.br)

## Abstract

Lignocellulosic residues daily generated as a by-product of economic activities worldwide, stand out as potential feedstock to biorefineries. However, industrial processes based on their use still face a challenge in the development of low-cost enzymatic mixtures resistant to inhibitors produced during pre-treatment step and efficient to complete deconstruct different lignocellulosic wastes. In the present work, *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 isolated from bovine rumen was studied as a source of plant cell wall degrading enzymes. In addition, the natural produced enzymatic cocktail was characterized and applied to hydrolysis of lignocellulosic substrates. *P. barengoltzii* grown in liquid media containing cellulose, sugarcane bagasse and wheat bran, as carbon source producing endo-1,4- $\beta$ -xylanases, pectinases, mannanases, endo-1,4- $\beta$ -glucanases, exo-1,4- $\beta$ -glucanases and  $\beta$ -glucosidases, with highest values of Endo-1,4- $\beta$ -xylanase activity. Six isoforms of endo-1,4- $\beta$ -xylanase (45 to 116 kDa), three of endo-1,4- $\beta$ -glucanase (40 to 66 kDa) and a single band of mannanase (62 kDa) were secreted by the bacterium during growth on wheat bran, all activities presented maximal activity in pH ranging from 4 up to 8 and temperature from 45 up to 60 °C. Endo-1,4- $\beta$ -glucosidases and endo-1,4- $\beta$ -xylanases activities were enhanced in the presence of ferulic acid, however, the presence of syringaldehyde and vanillin caused activity loss to every tested activity. *P. barengoltzii* enzymatic cocktail (PbEC) hydrolyze sugarcane bagasse, banana stem and corncob with hydrolysis values comparable to those obtained for the commercial blend Viscozyme®. Addition of PbEC to Viscozyme® increase hydrolysis rate of sugarcane bagasse, banana stem and corncob in 3-4 times.

Keywords: Rumen, *Paenibacillus*, enzymes, agro-industrial residues, hydrolysis.

## Introduction

Billion tons of lignocellulosic biomass daily produced as by-products in result of agro-industrial activities represent one of the largest sources of renewable carbon in the world (Bhowmick et al., 2018). This type of biomass, which includes sugarcane bagasse, wheat bran, corn stover, corncob, soybean hulls, and banana stem, can potentially be used as a green platform to produce industrial enzymes, biofuels and other value-added products (Anwar, Gulfranz, and Irshad 2014a; Obeng et al. 2017). However, their production with a competitive price in the market is still technically challenging due to the operational cost (Isikgor and Becer 2015). Low-cost enzymatic mixtures resistant to inhibitors produced during pre-treatment step, as lignin derivatives, and efficient to completely deconstruct different lignocellulosic wastes is one of the challenges to be overcome.

Lignocellulosic materials are mainly constituted by cellulose (40-50%), hemicellulose (20-30%), pectin (5-10%) and lignin (20-25%) (Anwar et al. 2014a). Cellulose is a linear homopolymer, composed of D-glucose monomers, joined by  $\beta$ -1,4 glycoside linkages. Long cellulose chains strongly interact by hydrogen bonds forming cellulose microfibrils, which in turn associate between them to form macrofibrils that interact forming a cellulose fiber, making this polysaccharide crystalline and recalcitrant. Among hemicelluloses, xylan is the most abundant, composed of xylose units joined by  $\beta$ -1,4 glycosidic linkage. In contrast to cellulose, xylan could present a diversity of substituted groups such as acetyl, arabinose, glucuronic acid and ferulic acid in its side chain (Yang et al. 2014). Lignin is a complex aromatic structure composed of phenylpropan monomers such as *p*-coumaryl, guaiacyl, synapyl, coniferyl alcohols, giving the plant greater strength and impermeability (Abraham et al. 2016). Complete hydrolysis of plant cell wall requires a set of enzymes active on each of the above described polymers as cellulases, hemicellulases, lignin-active enzymes, pectinases, mannanases and lytic polysaccharide mono-oxygenases (LPMOs) (Vaaje-Kolstad et al. 2017).

Ruminants stomach chamber rumen is a biome natural specialized in

plant cell wall solubilization, being its microbiome represented by *Paenibacillus*, *Clostridium* and *Fibrobacter* taxonomic units the main responsible to actively degrades plant fibers (Grady et al. 2016; Ishaq et al. 2015; Di Marco et al. 2017).

In the present work, we explore *P. barengoltzii*, isolated from bovine rumen as a producer of holocellulases aiming to obtain enzymatic mixtures presenting kinetic parameters suitable to industrial processes based on the use of lignocellulosic biomass as feedstock. *Paenibacillus thailandensis* and *Paenibacillus nanensis* isolated from soil were previously studied regarding production of glycosyl hydrolases (Di Marco et al. 2017). However, *Paenibacillus barengoltzii* remains unknown for its potential to produce plant cell wall degrading enzymes.

## **Material and Methods**

### **Bacteria isolation and characterization**

Sampled animals of Veterinary and Zoo-technical School-Federal University of Goiás, Brazil, Holstein dairy cows, were fed with a mixture of grass silage (50% dry matter) and concentrate (50% dry matter of soybean, corn and urea). Liquid ruminal samples collected were immediately filtered through a sterile gauze and then inoculated into four sealed serum bottles containing 100 mL of reducing liquid medium, under anaerobic atmosphere, and 1% (w/v) of microcrystalline cellulose, as carbon source (Sigma Aldrich, USA). Reducing liquid media was prepared as previously described in Osiro et al. (2017). Two inoculated bottles were incubated at 37°C and the other two at 50°C.

After three days of growth, an aliquot of 100 µL of each culture was spread in serum bottles containing solid reducing media supplemented with 1% (w/v) of microcrystalline cellulose or carboxymethylcellulose, as a carbon source under anaerobic atmosphere and incubated at 37 and 50°C. After two days, bacterial colonies were individually collected and re-inoculated on solid media. Passages on solid media were repeated three times. A total of 46 bacteria were isolated and the bacterium isolate A1\_50L2 which

presented the highest values of endo-1,4- $\beta$ -glucanase and endo-1,4- $\beta$ -xylanase activities was chosen for further steps of characterization.

Isolate A1\_50L2 morphology was evaluated according to colony shape and color during growth on solid media. Scanning electronic microscopy using the apparatus JSM-7000F (Jeol, Japan) was also applied to analyze shape and spore formation as previously described by Ko et al. (2007). The effect of temperature on isolate A1\_50L2 growth was evaluated by its grown in liquid reducing media buffered at pH 7 under anaerobic atmosphere, as above described, at 37, 45, 50, 55 or 60°C for three days. The effect of pH was evaluated growing A1\_50L2 in reducing liquid media buffered in pH values from 5 up to 8 (100 mM sodium citrate pH 5, 100 mM sodium phosphate pH 6 and 7 and 100 mM Tris-HCl pH 8), in a fixed temperature of 55°C for three days. Carbon utilization was evaluated by growing A1\_50L2 in reducing liquid media buffered at pH 7 containing maltose, sucrose, cellobiose, D-glucose, D-xylose, starch, chitin, casein, pectin, sugarcane bagasse, wheat bran, cellulose, xylan and carboxymethylcellulose at 1% (w/v) as carbon source at 55°C for three days. Bacterial growth was determined by measuring the turbidity at 600 nm. The experiments were conducted in three biological replicates.

### **Molecular identification of isolate A1\_50L2**

A1\_50L2 was identified using 16S rDNA sequence. At first, the bacterium was grown in 100 mL of reducing liquid media under anaerobic atmosphere supplemented with microcrystalline cellulose 1% (w/v), for 3 days at 55°C. Cultures were vacuum filtered and then centrifuged at 12,000 x *g* for 20 minutes at 4°C. Supernatant was discarded and harvested cells suspended with 50 mL of TE buffer (Tris 10 mM pH 8 containing 0.1 mM of EDTA), genomic DNA extraction was carried using Wizard® genomic DNA purification kit A1120 (Promega, USA) following manufacturer's instructions.

Amplification of 16S rDNA sequence was performed using the universal primers 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') and 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'). PCR reactions contained: 20 ng of



genomic DNA, 2.5  $\mu$ L of 10X buffer (Phoneutria, Brazil), 2.0 mM of  $MgCl_2$ , 1U of Taq DNA polymerase (Phoneutria, Brazil), 10  $\mu$ M of reverse and forward primers in a final volume of 25  $\mu$ L. PCR cycling was carried as follow: initial denaturation at 95 °C for 3 minutes, 39 cycles of denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing at 51 °C for 1 minute and 30 seconds, extension at 72 °C for 2 minutes, and final extension at 72 °C for 10 minutes. Amplified DNA was analyzed by electrophoresis on agarose gel 1 % (w/v). PCR product presenting 1200 bp was purified from agarose gel using GeneJET PCR purification kit (Thermo fisher, USA) and then sequenced by Sanger procedure (Macrogen Inc. Korea).

Sequence data analysis was made using Geneious software v.5.11.1.2 (<http://www.geneious.com> Biomatters, New Zealand). Sequence was trimmed using Phred quality score and compared against the collection of 16S ribosomal rRNA sequences from Genbank database (Benson et al. 2012) by BLASTn algorithm (Madden, 2013). The best-hit sequences with the lower e-value that maximized the coverage of query sequences was chosen and used to classify the sequence at species level. Multiple alignments of *Paenibacillus* sequences (similarities above 95%) were performed in MUSCLE v. 3.8.31 (Edgar 2004), using 16S rDNA sequences of isolates from different environmental such as, soil, industrial effluent, ocean sediment and rumen, retrieved from Genbank (Supplementary file 1). The phylogenetic tree was constructed in FastTree v.2.1 with default parameters and 1,000 bootstrap test (Price, Dehal, and Arkin 2010). *P. barengoltzii* A1\_50L2 sequenced 16S rDNA region was deposited in the Genbank database under the accession number MK243683.

### **Production of plant cell degrading enzymes by *P. barengoltzii* A1\_50L2**

At first, we carried a time course experiment to evaluate enzyme production. Briefly, *P. barengoltzii* A1\_50L2 was inoculated into serum bottles containing 100 mL of reducing liquid media under anaerobic atmosphere, supplemented with 1% (w/v) of sugarcane bagasse, wheat bran or microcrystalline cellulose. Inoculated bottles were incubated at 55°C

and samples of 5 mL removed after each 24 hours until seven days of growth. These samples were centrifuged at 10000 g at 4°C for 10 minutes, and the supernatant used as source of enzyme for detection of endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xylanase, pectinase, mannanase, and  $\beta$ -glucosidase activities.

Highest activity values were detected for growth for six days using wheat bran as carbon source, thus this growth condition was chosen to grow *P. barengoltzii* A1\_50L2 and obtain the enzymatic sample used in enzymatic characterization experiments and hydrolysis assays. The bacterium was inoculated into serum bottles containing 100 mL of reducing liquid media under anaerobic atmosphere supplemented with 1% (w/v) wheat bran and incubated at 55°C. After 6 days of growth, cultures were vacuum filtered and centrifuged at 12000 g at 4°C for 10 minutes. Supernatant was collected, concentrated using ultrafiltration (cutoff of 10 kDa) (PM10 Millipore Co., USA) in an Amicon® stirred cell at 2.5 kgf.cm<sup>-2</sup> at room temperature, dialyzed against distilled water (12 kDa cutoff) at 4°C overnight and kept at 4°C until further use. Concentrated supernatant was named Pb enzyme cocktail (PbEC) and used in enzyme characterization (effect of temperature, pH, phenolic compounds and thermal stability on enzymatic activities) and hydrolysis experiments.

### **Enzymatic assays and protein quantification**

Activity of endo-1,4- $\beta$ -xylanase, mannanase, pectinase and endo-1,4- $\beta$ -glucanase, were measured using oat spelt xylan 1% (w/v), locus bean mannan 1% (w/v), citrus pectin 1% (w/v), carboxymethylcellulose (CMC) 2% (w/v), respectively, buffered with 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0. Exo-1,4- $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -glucosidase activities were determined using 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside at 4 mM, and 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-cellobioside at 4 mM as substrates, respectively. Enzymatic assays were carried out at 50°C as described in Hamann et al. (2015). One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu$ mol of reducing sugar or 1  $\mu$ mol of *p*-Nitrophenol per minute of reaction.

D-xylose, D-glucose, galacturonic acid, D-mannose, and *p*-Nitrophenol were used as standard. Protein quantification was carried out according to Bradford method (Bradford 1976) using bovine serum albumin as standard. All assays were performed in triplicate.

## **Enzymatic characterization**

### **Zymogram analysis**

Zymogram analysis were carried using denaturing SDS-PAGE (12%) with minor modifications (Laemmli 1970). The substrates, oat spelt xylan, locust bean mannan, and carboxymethylcellulose at final concentration of 0.1% (w/v) were added to the gel mixture. A total of thirty micrograms of proteins were applied onto SDS-PAGE gel. Electrophoresis run condition, enzyme re-naturation and revelation of enzymatic bands were carried out as performed in Hamann et al. (2015), using the incubation temperature of 50°C.

### **Effect of pH and temperature on enzymatic activities**

Effect of pH on endo-1,4- $\beta$ -xylanase, mannanase, pectinase, endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase, and  $\beta$ -glucosidase activities was evaluated using the procedure above described varying pH values from 3 up to 10. Buffer systems used were: 100 mM sodium citrate pH 3, 4 and 5, 100 mM sodium phosphate pH 6 and 7, 100 mM tris-HCl pH 8 and 9, and 100 mM sodium bicarbonate pH 10. Temperature effect was evaluated varying temperature values from 30 up to 70°C in enzymatic assays buffered with 50 mM sodium citrate pH 5.0.

### **Thermal stability**

PbEC was pre-incubated at 50 and 60 °C, aliquots of 500  $\mu$ L were withdrawn after every six hours until eight days of incubation and the residual enzymatic activity detected as above described. Values of enzymatic activity from PbEC without pre-incubation were defined as the maximal activity, 100% of activity.

### **Effect of lignin-derived phenolic on PbEC activities**

Effect of lignin-derived phenolic compounds on endo-1,4- $\beta$ -xylanase, mannanase, pectinase, endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase, and  $\beta$ -glucosidase activities was carried out using: trans-cinnamic acid, syringaldehyde, trans-ferulic acid, *p*-coumaric acid, tannic acid, 4-hydroxybenzoic acid, vanillin and gallic acid. Briefly, an aliquot of 50  $\mu$ L of PbEC was incubated with each compound at a final concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> for 12 hours at 25°C. Activities were measured using the standard enzymatic assay, above described. Concentration of phenolic compounds was the same assayed by De Souza Moreira et al. (2013).

### **Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass**

#### **Substrates preparation**

Sugarcane bagasse, banana stem, soya husk, corncob and corn stover, were obtained from local farms (Brasília – DF, Brazil). Wheat bran was purchased from a local market. Lignocellulose biomasses were autoclaved for 1 hour, rinsed with distilled water until no soluble sugars were present and dried at 60°C until reaching constant weight. Dried biomasses was further milled and sieved to obtain a powder, which were used as substrate.

#### **Hydrolysis assays**

At first hydrolysis assay was carried out using only wheat bran as substrate to determine enzyme load. PbEC and the commercial enzymatic cocktail Viscozyme® from *Aspergillus aculeatus* (Novozymes Corp, Denmark) were used as source of enzymes. Hydrolysis assays were carried using 2% (w/v) of substrate and enzymatic cocktails in five assay condition, those containing only PbEC (2 up to 10mg), only Viscozyme® (2 up to 10mg) and those mixing Viscozyme® (V) and PbEC, varying their quantity as follow: V-2mg:PbEC-8mg (V2:PbEC8); V-4mg:PbEC-6mg (V4:PbEC6); V-5mg:PbEC-5mg (V5:PbEC5); V-6mg:PbEC-4mg (V6:PbEC4) and V-8mg:PbEC-2mg (V8:PbEC2). Assays were buffered using sodium citrate 50mM pH 5 and incubated at 50°C under rotation of 180 rpm. After 120 hours, assays were centrifuged at 12,000 x *g* for 10 minutes, supernatants

were collected, boiled for 15 minutes and used to quantify released sugars. Total reducing sugars were quantified as described by Miller (1959).

In the second round of hydrolysis assay in addition to wheat bran, sugarcane bagasse, banana stem, soya husk, corncob and corn stover were also used as substrate (2% w/v). Enzymatic loads used were: Viscozyme®-4 mg (V4), PbEC-6mg (PbEC6) and the cocktail mixture (V4:PbEC6). Hydrolysis Assays were incubated under the condition above described, after each 24 h an aliquot was removed centrifuged at 12,000 x g for 10 minutes at 4 °C, boiled for 15 minutes and used to quantify released sugars. Degree of synergism (DS) was calculated as previously described (Yang et al. 2018), using the formula:

$$DS = \frac{S_{V+PbEC}}{(S_V + S_{PbEC})}$$

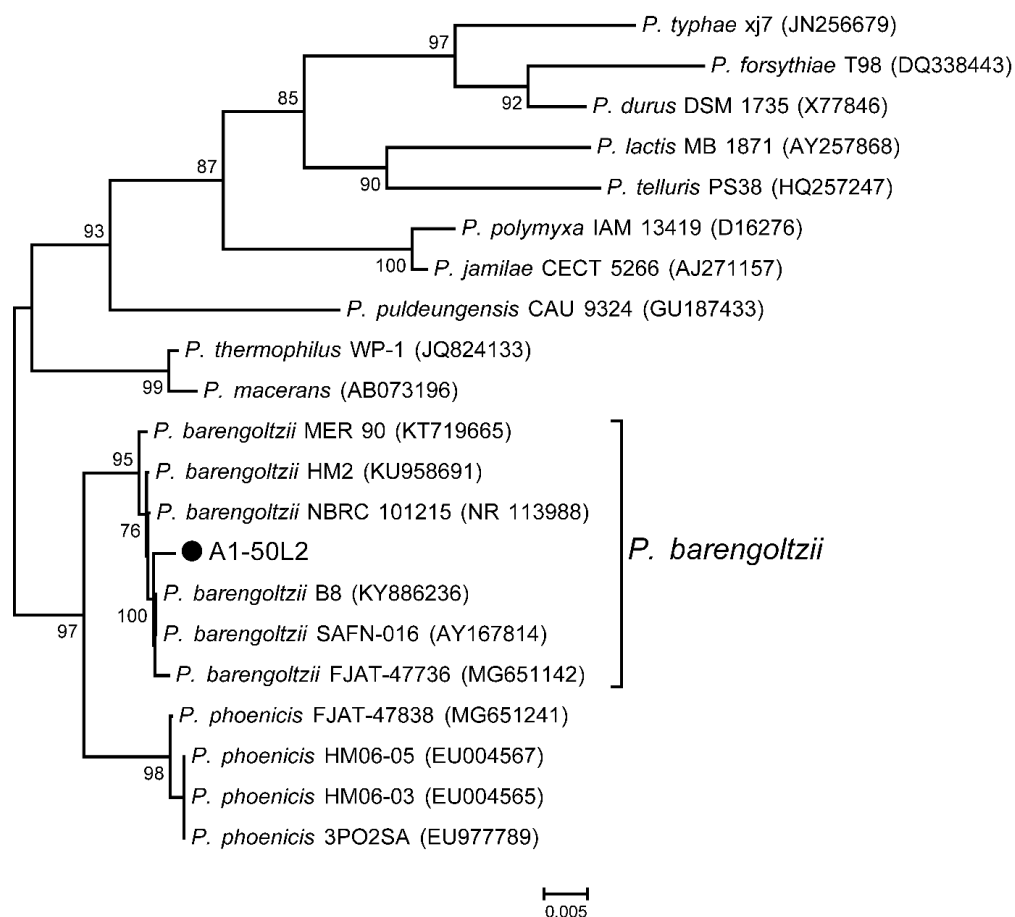
$S_V$ : reducing sugar released by Viscozyme®,  $S_{PbEC}$ : reducing sugar released by PbEC.  $S_{V+PbEC}$ : reducing sugar released by the mixtures.

### **Statistical analysis**

Production and enzyme characterization experiments were carried out in triplicate, and data are presented as mean values ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using SigmaPlot v.12.0 (Systat Software Inc, USA), and statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . Lignocellulose hydrolyses treatments using Viscozyme®, PbEC and mixture Viscozyme:PbEC were compared by Tukey's test and ANOVA, with a  $p < 0.05$  deemed significant.

## Results and discussion

Isolate A1\_50L2 identified by 16S rDNA as *P. barengoltzii* presented the highest activity values for endo- $\beta$ 1,4-glucanases and endo- $\beta$ -1,4-xylanases in comparison to the other bacterial isolates evaluated (Supplementary Table 1). This isolate 16S rDNA sequence shares 99.8% of sequence similarity with 16S rDNA sequence of *P. barengoltzii* SAFN-016, isolated from spacecraft assembly facility (Osman et al. 2006) and 98% with 16S rDNA sequence of *Paenibacillus phoenicis* isolated from a subsurface molybdenum mine. Phylogenetic tree analysis arranged *P. barengoltzii* A1\_50L2 together with *P. barengoltzii* isolates in a group distinct from other *Paenibacillus* species (Fig. 1).

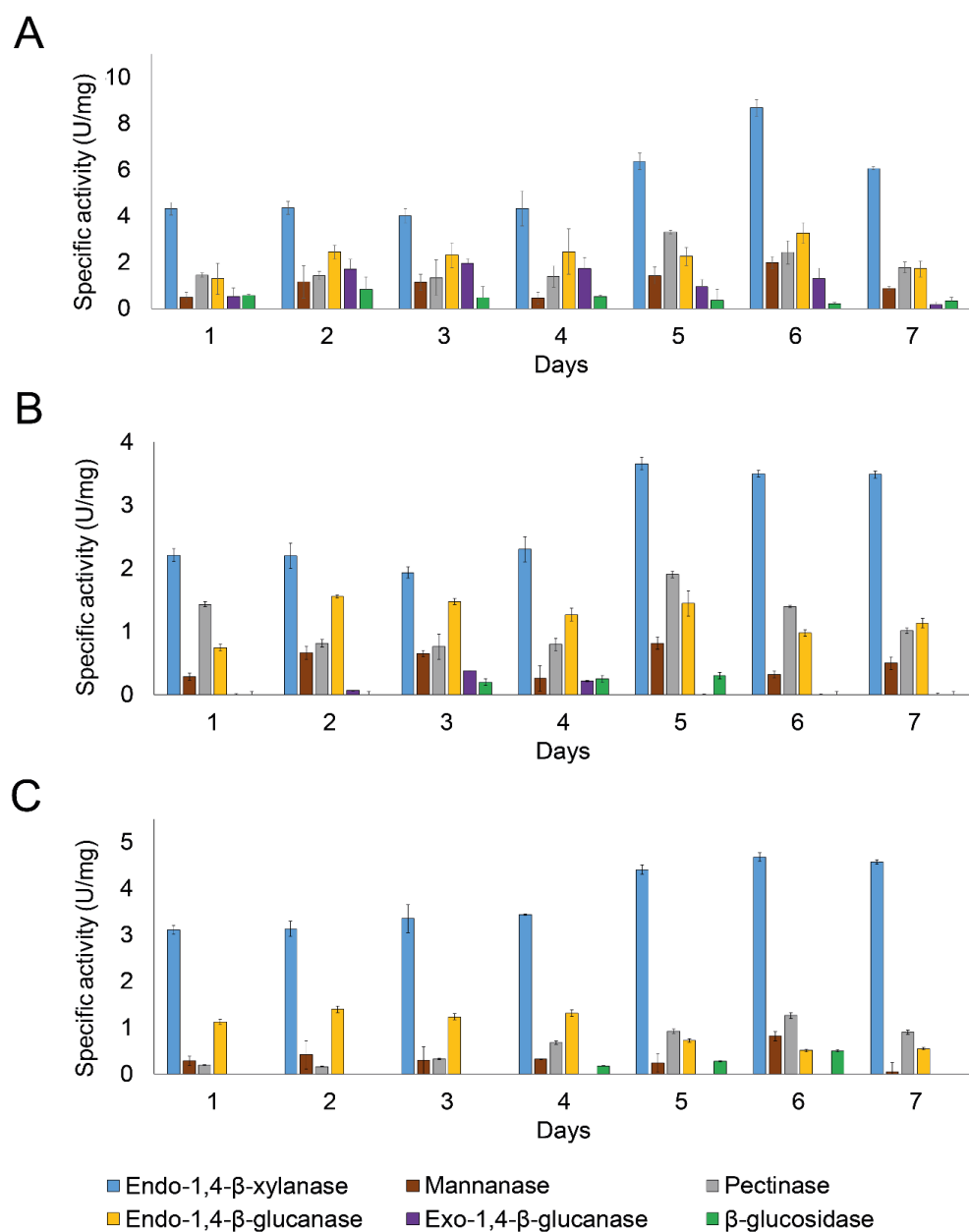


**Fig.1** Phylogenetic tree of 16S rRNA gene from *Paenibacillus*. The sequence *P. barengoltzii* A1\_50L2 is highlighted with circle symbol. The tree was constructed using Fast Tree v.2.1 with 1,000 bootstraps. Values below than 70% were not shown.

*P. barengoltzii* A1\_50L2 presents average cell size of 2.1 – 4.0  $\mu\text{m}$  in length  $\times$  0.3 – 0.5  $\mu\text{m}$  in width (Supplementary figure 1) and smooth form, circular/yellowish-white colony, as previously described for *P. barengoltzii* SAFN-016 (Osman et al. 2006). However, we characterized *P. barengoltzii* A1\_50L2 as a facultative anaerobe. Optimum growth rate was achieved in temperature ranges from 50 °C to 55 °C and pH ranges from 6 to 8 in liquid media containing xylan, CMC, starch, pectin, cellulose, sugarcane bagasse and wheat bran, xylose, sucrose, maltose, as a carbon source, and was unable to grow in the presence of casein (Supplementary table 2).

*P. barengoltzii* A1\_50L2 produced endo-1,4- $\beta$ -xylanase, endo- and exo- $\beta$ -1,4-glucanase, mannanase,  $\beta$ -glucosidase, and pectinase in liquid media containing, crystalline cellulose, sugarcane bagasse and wheat bran as carbon sources. However, highest activity values were detected when the bacteria was grown in the presence of wheat bran (Fig. 2). Maximal production of  $\beta$ -glucosidases (0.80 U/mg) and exo-1,4- $\beta$ -glucanases (1.90 U/mg) were detected on the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> day of growth. Production of pectinases was maximum (3.3 U/mg) after 5 days. Maximal production values of mannanase (2.0 U/mg), endo- $\beta$ -1,4-glucanases (3.2 U/mg) and endo- $\beta$ -1,4-xylanases (8.6 U/mg) were obtained after 6 days in presence of wheat bran. Early production of  $\beta$ -glucosidase is significant for the consuming of cellobiose, which can inhibit exo- and endo-1,4- $\beta$ -glucanases and the hydrolysis of cellulose (Silva et al. 2019).

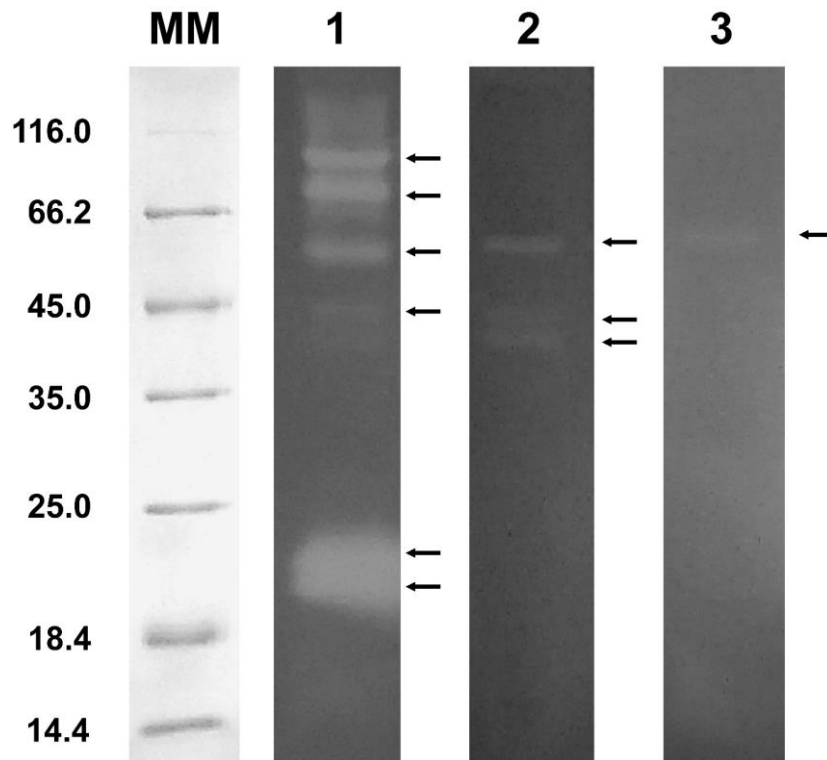
*Paenibacillus* species have been reported as a strong producers of cellulases, hemicellulases and pectinases mainly during growth on crystalline cellulose, sugarcane bagasse and wheat straw (Di Marco et al. 2017; Mondéjar et al. 2016). However, so far there has been no report of production of these activities by *Paenibacillus barengoltzii* using agro-industrial residues as carbon source. Indeed, the high activity of endo-1,4- $\beta$ -xylanase obtained in presence of wheat bran by *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 can be an important key to the development of new saccharification processes.



**Fig.2** Production of lignocellulose-degrading enzymes by *P. barengoltzii* A1\_50L2 when grown on 1% (w/v) as carbon source (A) wheat bran (B) sugarcane bagasse (C) cellulose.

*P. barengoltzii* A1\_50L2 secreted three endo-β-1,4-glucanase with molecular masses of 42, 45 and 63 kDa, six forms of endo-β-1,4-xylanase with molecular masses of 21, 23, 43, 60, 85 and 105 kDa and a single band with 62 kDa molecular mass of mannanase (Fig. 3).





**Fig. 3** Zymogram analysis of *Paenibacillus barengoltzii* enzyme cocktail. Lanes: MM Molecular marker, (1) xylanase activity (2) endoglucanase activity (3) mannanase activity.

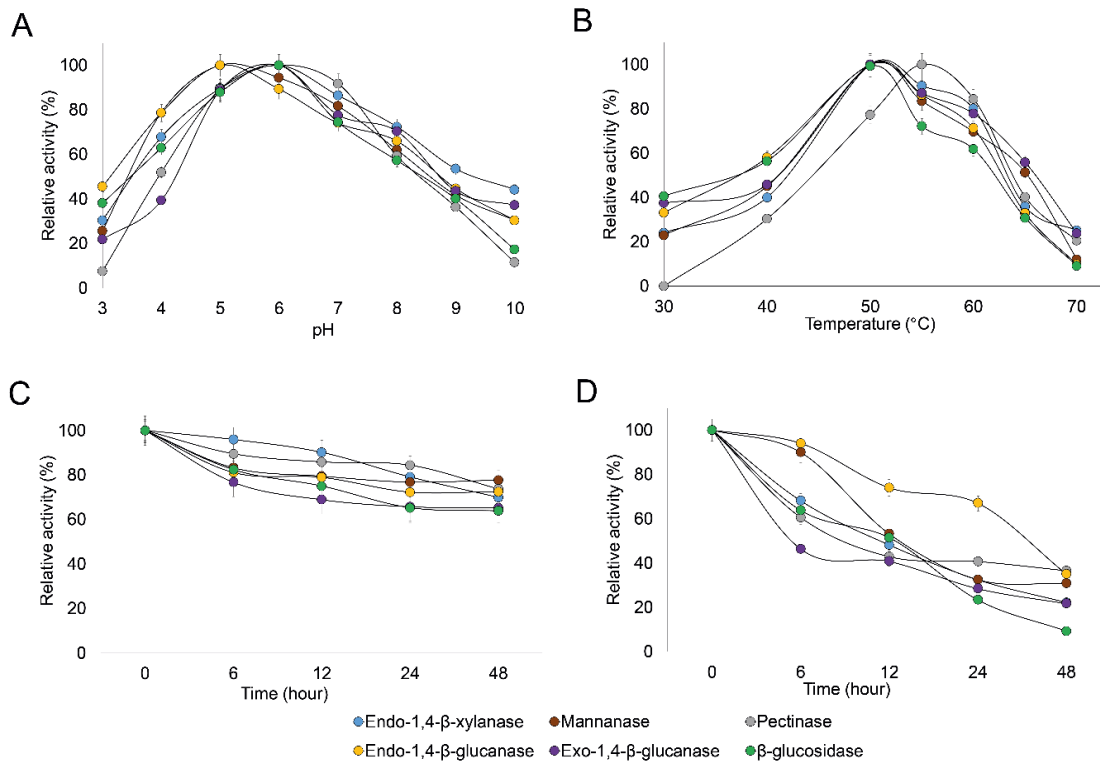
Production of  $\beta$ -1,4-glucanases (*Egl*) and (*CelP*) with molecular mass 58 kDa and 60 kDa were reported from the *Paenibacillus* sp. KSM-N546 and M33, respectively (Ogawa et al. 2007; Kanchanadumkerng et al., 2017). Both strains were isolated from soil and shares less than 70% sequence similarity. Consistently,  $\beta$ -1,3-1,4-glucanases (*PbBglu16A*) of 44 kDa was purified from *P. barengoltzii* CAU904 isolated from the marine environment. In comparison to above mentioned cellulases, a high molecular weight (145 kDa) endoglucanase with both (CMCase and avicelase) activities was purified from *Paenibacillus* sp. B39.

On the other hand, xylanases of 32 kDa (GH10 *XynA*) and 20 kDa (GH11 *XynB*) were described from *Paenibacillus* sp. A59. Similarly, 33 kDa xylanase characterized from *Paenibacillus* sp. 2S-6. To date, only one

xylanase (*PbXyn10A*) with molecular weight of 109.1 kDa was described from *P. barengoltzii* strain CAU904 (Liu et al., 2018). *PbXyn10A* is a thermophile xylanase and locate multiple structural domains. This suggests that endo-1,4- $\beta$ -xylanase with high molecular weight (105 kDa) observed in *P. barengoltzii* A1\_50L2 enzyme cocktail (PbEC) possibly shares a similar domain structure as described from *PbXyn10A*.

Production of various xylanolytic enzymes from *P. barengoltzii* A1\_50L2 with a range of low (GH11) and high molecular (GH10) weight is interesting, since both enzyme families display differences in substrate specificity (Moreira and Filho 2016). As example, GH10 xylanases usually act on substituted forms of the xylan backbone, releasing ramified oligosaccharides, while xylanases from family GH11 are strict to xylan backbone and act on unsubstituted regions of the polysaccharide (Biely, Singh, and Puchart 2016). The presence of these two GH families (10 and 11), boosts the xylan deconstruction, and thus highlighting the potential of *P. barengoltzii* enzymes to deconstruction of hemicellulose rich biomasses.

PbEC showed activity values above 55% in pH range from 4.0 to 8.0 (Fig. 4A), and temperature range from 45 to 60 °C (Fig. 4B). A broad pH range of enzymatic activities for PbEC could be attributed to the presence of multiple forms of enzymes, as shown on zymograms.



**Fig.4** Optimal pH (A), temperature (B) and thermal stability at 50°C (C) and 60°C (D) of PbEC from *P. barengoltzii* A1\_50L2.

Optimum activity of β-glucosidase, endo-1,4-β-xylanases, exo-β-1,4-glucanase and pectinase was detected at pH 6.0 and temperature of 50°C. While endo-1,4-β-glucanase and mannanase activities were maximum at pH 5.0 and temperature of 50°C. Our results are in agreement to optimum pH values detected for endo-1,4-β-glucanases produced by *P. barengoltzii* CAU904, *Paenibacillus* sp.M33, and *Paenibacillus* sp.B39 (Kanchanadumkerng et al. 2017; Na et al. 2015; Zhang et al. 2017). The optimum temperature and pH of PbEC endo-1,4-β-xylanases are in agreement to those obtained for xylanases from *Paenibacillus* sp2S-6, A59 and *P. barengoltzii* CAU904 (Ko et al., 2011; Ghio et al., 2018; Liu et al., 2018). Likewise, mannanase activity of PbEC presented the optimal pH and temperature similar to those produced by *Paenibacillus* sp.HY-8 and *P. thiaminolyticus*.

Mannanase and endo-1,4-β-xylanase with increased activity at higher temperatures (above 50°C) have potential applications in softwood paper pulp bleaching, as well as, general lignocellulose deconstruction for biofuels

production, processes that usually are carried out at elevated temperatures. This study is the primary report describing the properties of mannanase synthesized by *P. barengoltzii* in response to lignocelluloses, reinforcing the versatility of *P. barengoltzii* in deconstructing either xylan based hemicellulose, or mannan.

PbEC retained 70% of activity after 12 hours of incubation at 50°C (Fig. 4C). In contrast, enzymatic activities were less stable at 60°C and reduced to 65 to 60% after 6 hours of incubation (Fig 4D). Among the produced enzymes, endo-1,4-β-xylanase showed the longest half-life  $t_{1/2}$  187 hours at 50°C and endo-β-1,4-glucanase instead have  $t_{1/2}$  81 hours at 50°C and 28 hours at 60°C (Table.1). These values are remarkable in comparison to *P. barengoltzii* CAU904 thermophile endo-1,4-β-xylanase (*PbXyn10A*) that has half-life time of 8.4 hours at 50°C and 2.9 hour at 60°C and endo-1,4-β-glucanase (*PbBglu16A*).

**Table. 1.** Thermal deactivation and half-life ( $t_{1/2}$ ) of the enzymes (PbEC) produced by *P. barengoltzii* A1\_50L2.

Enzymatic cocktail ( <i>PbEC</i> )	Temperature 50°C		Temperature 60°C	
	$t_{1/2}$ (hour)	$K_d$ (hour <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (hour)	$K_d$ (hour <sup>-1</sup> )
Endo-1,4-β-xylanase	187	$3.7 \times 10^{-3}$	11.5	$6.0 \times 10^{-2}$
Mannanase	84	$8.3 \times 10^{-3}$	13	$5.2 \times 10^{-2}$
Pectinase	126	$5.5 \times 10^{-3}$	10	$7.0 \times 10^{-2}$
Endo-1,4-β-glucanase	81	$8.6 \times 10^{-3}$	28	$2.5 \times 10^{-2}$
Exo-1,4-β-glucanase	52	$1.3 \times 10^{-2}$	9.3	$7.4 \times 10^{-2}$
β-glucosidase	67	$1.0 \times 10^{-2}$	13	$5.5 \times 10^{-2}$
Thermal deactivation constant ( $K_d$ hour <sup>-1</sup> )				

The thermostability profile reported in the present study, in addition to the broad acting pH for endo-1,4- $\beta$ -glucanases, and endo-1,4- $\beta$ -xylanases activities produced by *P. barengoltzii* A1\_50L2 raise attention to utilization of this secretome in more diversified industrial applications. For instance, thermostable cellulases are sought after for detergent formulation (Haki and Rakshit 2003), and thermostable xylanases for paper pulp bleaching (Shukla and Kumar 2016). In order to achieve industrial application, further studies are required aiming large-scale production of *P. barengoltzii* enzymes.

Syringaldehyde inhibited the activity of exo-1,4- $\beta$ -glucanase, endo-1,4- $\beta$ -xylanase, mannanase, pectinase, and  $\beta$ -glucosidase and inhibition of endo-1,4- $\beta$ -glucanase with inhibitions values from 20% up to 40%. Phenolic compound 4-hydroxybenzoic acid inhibits 20% of endo-1,4- $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -glucosidase activities, whereas 30-35% inhibition was detected for exo- and endo-1,4- $\beta$ -glucanase. Vanillin inhibits the 30% activity of endo-1,4- $\beta$ -xylanase, pectinase, and  $\beta$ -glucosidase. Gallic acid was a strong inhibitor of pectinase, inhibiting this activity in 80% while for the other five enzymes activity no inhibition was detected. Similarly, tannic acid inhibits 20 – 30% of pectinase and endo-1,4- $\beta$ -xylanase activities and other four activities were not affected (Table 2). Ferulic, cinnamic and *p*-coumaric acid instead increased endo-1,4- $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -glucosidase activities (Table 2).

**Table.2.** Effect of lignin-derived phenolic compounds (1 mg.mL<sup>-1</sup>) on activity of enzyme cocktail from *P. barengoltzii* (PbEC).

	Relative activity (%)					
	Endo-1,4- β-xylanase	Mannanase	Pectinase	Endo-1,4- β-glucanase	Exo-1,4 β- glucanase	β- glucosidase
Control	100 ± 0.04	100 ± 0.02	100 ± 0.02	100 ± 0.03	100 ± 0.02	100 ± 0.02
Trans-cinnamic acid	81 ± 0.02	94 ± 0.01	123 ± 0.03	118 ± 0.01	106 ± 0.03	112 ± 0.04
Syringaldehyde	70 ± 0.02	79 ± 0.02	73 ± 0.02	61 ± 0.03	81 ± 0.04	72 ± 0.02
Trans-Ferulic acid	128 ± 0.03	92 ± 0.03	97 ± 0.01	143 ± 0.02	126 ± 0.02	104 ± 0.03
<i>p</i> -Coumaric acid	102 ± 0.03	100 ± 0.04	70 ± 0.03	117 ± 0.03	104 ± 0.02	99 ± 0.03
Tannic acid	70 ± 0.02	181 ± 0.03	83 ± 0.02	108 ± 0.05	101 ± 0.03	106 ± 0.05
4-Hydroxy-benzoic acid	82 ± 0.01	96 ± 0.02	93 ± 0.02	66 ± 0.03	73 ± 0.02	81 ± 0.03
Vanillin	67 ± 0.03	89 ± 0.01	70 ± 0.03	86 ± 0.02	81 ± 0.03	72 ± 0.04
Gallic acid	103 ± 0.06	215 ± 0.02	20 ± 0.02	161 ± 0.03	105 ± 0.01	118 ± 0.03

Inhibition values described in the present report are lower than those reported in previous studies, for instance, ferulic acid was described as an inhibitor of xylanases produced by *Thermobacillus xylanolicus* (Boukari et al. 2011). Aligned to our results, Osiro et al (2017) reported that ferulic and *p*-coumaric acid had a positive effect over *C. thermocellum* B8's xylanases. Indeed, the fact that *P. barengoltzii* A1\_50L2 enzymes had minor inhibition in the presence of plant-phenolics could suggest that they have naturally been selected to hydrolyse substrates that are more recalcitrant in terms of lignin content. This feature is also well desirable in the ruminal environment, on which lignin and plant-phenols are slowly degraded in anaerobic conditions.

Although the inhibitory effects of plant-phenols on fungal hemicellulases have been listed in the literature, little is known about pectinase inhibition (Infante et al. 2016; Moreira and Filho 2016). In respect to the present study, only gallic acid caused major inhibition on pectinase activity. Result described here are remarkably different from previous reports, on which gallic acid caused pectinase activity enhancement (Silva et al. 2019; Wu et al. 2009). It is worth to emphasize that these studies were carried out using

fungal enzymes, reasonably is expected that these proteins may structurally differ from pectinases produced by ruminal bacteria, and differentially interacting with lignin components.

PbEC hydrolyzes wheat bran and levels of reducing sugar released increased according to the time of incubation in a time course manner according to enzyme load (PbEC2 up to PbEC10), and enzyme hydrolysis of PbEC showed a linear increase on product release over time (Table 3). After 120 h of hydrolysis, maximum value of 3.24 mg mL<sup>-1</sup> reducing sugar was reached by PbEC10, while a maximum value of 6.47 mg mL<sup>-1</sup> reducing sugar was released by V10. Values of sugar released are significantly highest for combinations of V:PbEC, containing increased load of PbEC. An increment on releasing of reducing sugars of 28.2 to 71.9% was detected for V6:PbEC4 and V2:PbEC8 in comparison to the assay containing only Viscozyme, no further increase was detected for V8:PbEC2 (Table 3). The highest value of degree of synergism (DS 1.2) on wheat bran hydrolysis was detected for the mixture V4:PbEC6 combination.

These results demonstrate that amounts of reducing sugars released can be increased when PbEC and Viscozyme are combined at an appropriate proportion of enzyme loading.

Commercial enzymes are currently limited in composition, high in cost and generally formulated for a limited group of substrates (Banerjee et al. 2010). Commercial Viscozyme has been described previously, mainly exhibit high pectinase and cellulase activities but low activities of holocellulases (Gama, Van Dyk, and Pletschke 2015). The increase of reducing sugar released in V:PbEC combinations suggest that endo- $\beta$ -1,4-xylanase isoforms, mannanase and  $\beta$ -glucosidase from PbEC promoted hydrolysis, due to the numerous holocellulases degrading enzymes activities present, consistent with the results of the above zymogram analysis and enzyme activities assayed. The boost effect on hydrolysis could be explained by the removal of the residual xylan, and galactomannan present in wheat bran, subsequently promoting cellulose conversion by cellulases.

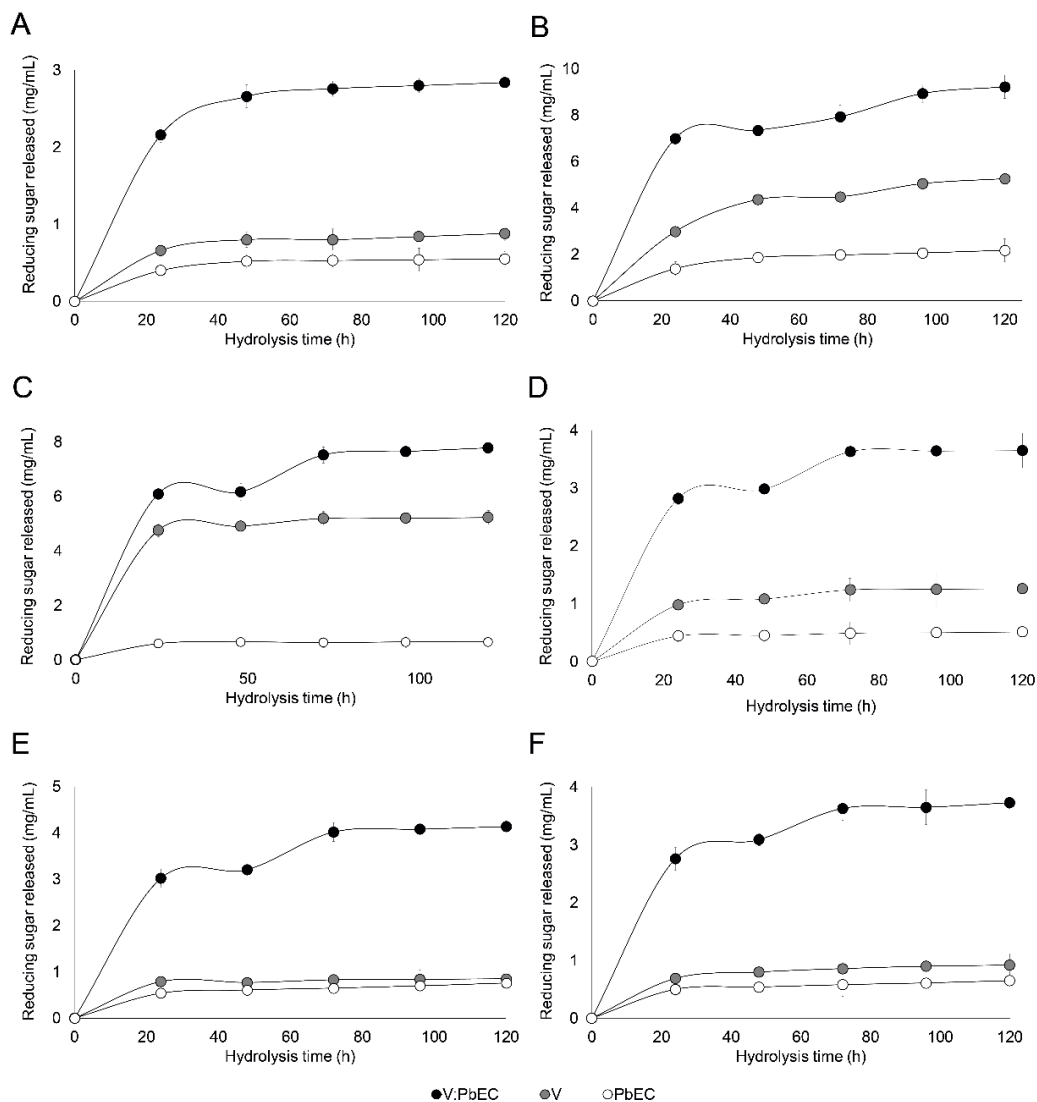
**Table.3.** Enzymatic hydrolysis of wheat bran by using enzyme cocktail from *P. barengoltzii* (PbEC), commercial Viscozyme cocktail (V) and combination of enzymatic mixtures (V:PbEC).

Hydrolysis strategy	Total protein (mg/g substrate)	Enzymatic mixture	Reducing sugars released (mg mL <sup>-1</sup> )				
			24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Pb enzyme cocktail (PbEC)	2	PbEC2	0.73 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.27 ± 0.01	1.46 ± 0.01	1.81 ± 0.03
	4	PbEC4	1.27 ± 0.007	1.57 ± 0.01	1.80 ± 0.03	2.01 ± 0.02	2.32 ± 0.01
	5	PbEC5	1.32 ± 0.02	1.74 ± 0.02	1.89 ± 0.02	2.30 ± 0.03	2.57 ± 0.03
	6	PbEC6	1.39 ± 0.01	1.77 ± 0.01	1.98 ± 0.01	2.37 ± 0.01	2.68 ± 0.01
	8	PbEC8	1.83 ± 0.01	2.01 ± 0.02	2.26 ± 0.01	2.75 ± 0.01	2.81 ± 0.03
	10	PbEC10	1.98 ± 0.01	2.25 ± 0.02	2.46 ± 0.02	2.96 ± 0.05	3.24 ± 0.04
Viscozyme® (V)	2	V2	2.07 ± 0.02	3.01 ± 0.01	4.11 ± 0.02	4.52 ± 0.01	4.56 ± 0.03
	4	V4	2.99 ± 0.01	4.30 ± 0.01	5.34 ± 0.01	5.66 ± 0.01	5.57 ± 0.04
	5	V5	4.01 ± 0.01	4.66 ± 0.02	5.46 ± 0.02	6.02 ± 0.02	6.11 ± 0.02
	6	V6	4.16 ± 0.02	4.88 ± 0.01	5.66 ± 0.03	6.27 ± 0.01	6.31 ± 0.03
	8	V8	4.68 ± 0.01	5.0 ± 0.01	6.24 ± 0.01	6.37 ± 0.02	6.42 ± 0.02
	10	V10	5.32 ± 0.02	5.54 ± 0.02	6.41 ± 0.02	6.43 ± 0.02	6.47 ± 0.01
Combination of enzymatic mixtures	10	V2:PbEC8	6.37 ± 0.04	6.76 ± 0.02	7.78 ± 0.04	8.53 ± 0.01	9.08 ± 0.04
	10	V4:PbEC6	7.32 ± 0.02	7.37 ± 0.03	7.95 ± 0.03	8.63 ± 0.04	9.52 ± 0.03
	10	V5:PbEC5	6.73 ± 0.01	6.84 ± 0.02	7.47 ± 0.03	8.23 ± 0.02	8.68 ± 0.01
	10	V6:PbEC4	6.64 ± 0.01	6.77 ± 0.01	7.15 ± 0.02	8.18 ± 0.03	8.46 ± 0.01
	10	V8:PbEC2	6.33 ± 0.02	6.44 ± 0.02	6.90 ± 0.04	7.88 ± 0.03	8.21 ± 0.03



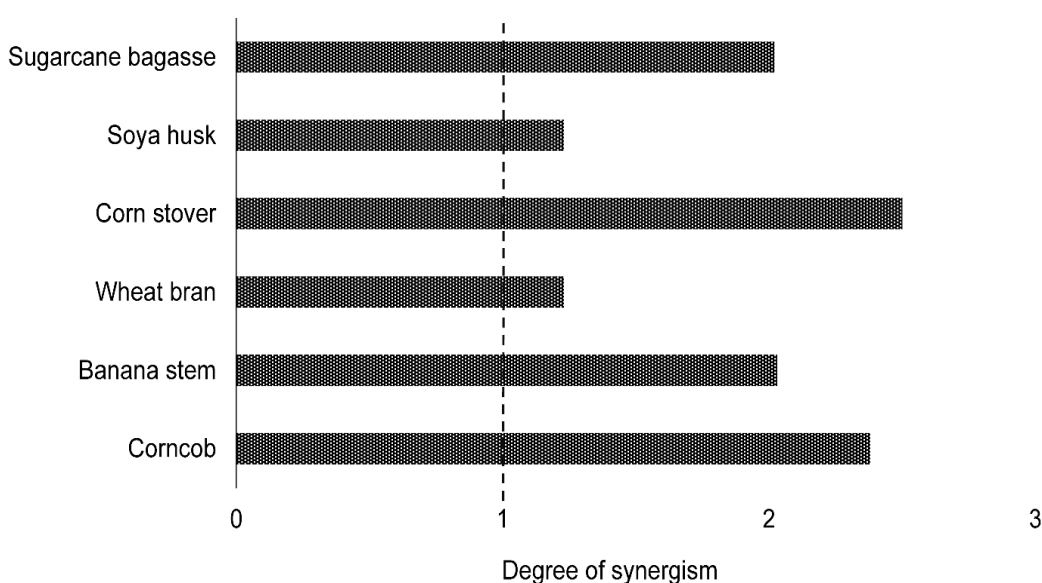
Hydrolysis of agro-industrial residues by Viscozyme and PbEC and their mixtures were also analyzed. Using the conditions in which the greatest synergistic effect was determined, we employed V4:PbEC6 combination to hydrolysis test.

After 120 h of hydrolysis, the reducing sugar released from sugarcane bagasse, banana stem, corn stover, soya husk and wheat bran were 2.84, 3.65, 3.73, 4.14, 7.78 and 9.22 mg mL<sup>-1</sup> higher than with V4 and PbEC6 alone, respectively (Fig 5).



**Fig.5** Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues by *P. barengoltzii* enzymatic cocktail-6 mg (PbEC), commercial Viscozyme cocktail-4 mg (V) and mixture formulation of V4:PbEC6. (A) Sugarcane bagasse, (B) wheat bran, (C) Soya husk, (D) banana steam, (E) corn stover, (F) corncob.

The degree of synergism values (above 1) of V4:PbEC6 on enzymatic hydrolysis of complexes biomass suggest that the enzyme mixtures worked in cooperation to hydrolyze the substrate, as described by Gonçalves et al. (2015). Highest values of DS (above 2) were obtained from sugarcane bagasse, banana stem, corncob and corn stover by the action of V4:PbEC6, in comparison to DS (below 2) observed in soya husk and wheat bran. Although sugarcane bagasse, banana stem, corncob and corn stover, have observed the highest DS during hydrolysis, these biomasses have also generated lower values of reducing sugar released (Fig 6).



**Fig.6** Degree of synergism (DS) from different lignocellulosic biomasses by mixture formulation of V4:PbEC6.

The observed differences in the synergistic effects with different agro-industrial residues might be related to the different structures, properties and lignin content of substrates. Indeed, soya husk and wheat bran have been reported as low lignin residues (Brijwani, Oberoi, and Vadlani 2010), in comparison to corn stover (22%) and sugarcane bagasse (19%), therefore, our results are in agreement with a previous report published by Andersen et al. (2008), suggesting that high DS are generally reported for substrates with high crystallinity, while low DS is found on substrates with low crystallinity.

Further studies on the synergy between crude enzyme PbEC and other commercial enzymes is needed. It may be possible to optimise the enzymatic load of the PbEC's holocellulases with different commercial enzymes in view of the structure and composition of different lignocellulosic substrates in order to obtain optimal substrate-specific enzyme hydrolysis systems in vitro.

## **Conclusion**

*P. barengoltzii* A1\_50L2 isolated from cow rumen presented a potential use as a source of enzymes to amend commercial enzymatic cocktails providing additional accessory activities and  $\beta$ -glucosidase, which promote an increase of reducing sugars in biomass hydrolysis. Enzymes kinetic properties point for its promising application for biotechnological processes based on the deconstruction of lignocellulose to obtain added-value products.

## **Acknowledgement**

Alonso R.P Ticona, and Pedro R.V Hamann are recipient of CAPES doctoral scholarship, Sadia F. Ullah is recipient of CNPq doctoral scholarship, Eliane F. Noronha is recipient of CNPq research scholarship. This work was funded by FAP-DF, University of Brasília, and CNPq. Authors would like to thank Dr. Thomas C.R Williams (University of Brasília, Botany department) for his valuable assistance with HPLC analyses, and Dr. Reginaldo N. Ferreira (Federal University of Goiás, Physiology and Pharmacology department) for providing ruminal samples.

## References

- Abraham, A., Mathew, A.K., Sindhu, R., Pandey, A., Binod, P., 2016. Potential of rice straw for bio-refining: An overview. *Bioresour. Technol.* 215, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.011>
- Andersen, N., Johansen, K.S., Michelsen, M., Stenby, E.H., Krogh, K.B.R.M., Olsson, L., 2008. Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.018>
- Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M., 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy : A brief review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7, 163–173.
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J.S., Borrusch, M.S., Bongers, M., Walton, J.D., 2010. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 9097–9105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.028>
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., Sayers, E.W., 2012. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D41–D47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1094>
- Bhowmick, G. De, Sarmah, A.K., Sen, R., 2018. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresour. Technol.* 247, 1144–1154.
- Biely, P., Singh, S., Puchart, V., 2016. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnol. Adv.* 34, 1260–1274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001>
- Boukari, I., O'Donohue, M., Rémond, C., Chabbert, B., 2011. Probing a family GH11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 72, 130–138.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.010>

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)

Brijwani, K., Oberoi, H.S., Vadlani, P. V, 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochem.* 45, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.015>

De Souza Moreira, L.R., De Carvalho Campos, M., De Siqueira, P.H.V.M., Silva, L.P., Ricart, C.A.O., Martins, P.A., Queiroz, R.M.L., Filho, E.X.F., 2013. Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genet. Biol.* 60, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.006>

Di Marco, E., Soraire, P.M., Romero, C.M., Villegas, L.B., Martínez, M.A., 2017. Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 19057–19067. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9494-3>

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Gama, R., Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2015. Optimisation of enzymatic hydrolysis of apple pomace for production of biofuel and biorefinery chemicals using commercial enzymes. *3 Biotech* 5, 1075–1087. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0312-7>

Ghio, S., Ontañón, O., Piccinni, F.E., Marrero Díaz de Villegas, R., Talia, P., Grasso, D.H., Campos, E., 2018. *Paenibacillus* sp. A59 GH10 and GH11

- Extracellular Endoxylanases: Application in Biomass Bioconversion. *Bioenergy Res.* 11, 174–190. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9887-7>
- Gonçalves, G.A.L., Takasugi, Y., Jia, L., Mori, Y., Noda, S., Tanaka, T., Ichinose, H., Kamiya, N., 2015. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* 72, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.01.007>
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microb. Cell Fact.* 15, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresour. Technol.* 89, 17–34. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6)
- Hamann, P.R. V., Serpa, D.L., Barreto da Cunha, A.S., de Camargo, B.R., Osiro, K.O., Valle de Sousa, M., Felix, C.R., Miller, R.N.G., Noronha, E.F., 2015. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 105, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.013>
- Infante, C., Pereira, G., Neto, D.S., Frederico, C., Castro, D.S., Michelin, M., Polizeli, M.D.L.T.M., Ximenes, E., Filho, F., 2016. Partial Purification and Characterization of a Thermostable  $\beta$ -Mannanase from *Aspergillus foetidus*. *Appl. Sci.* <https://doi.org/10.3390/app5040881>
- Ishaq, S.L., Kim, C.J., Reis, D., Wright, A.D.G., 2015. Fibrolytic bacteria isolated from the rumen of North American moose (*Alces alces*) and their use as a probiotic in neonatal lambs. *PLoS One* 10, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144804>
- Isikgor, F.H., Becer, C.R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform

- for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* 6, 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>
- Kanchanadumkerng, P., Sakka, M., Sakka, K., Wiwat, C., 2017. Characterization of endoglucanase from *Paenibacillus* sp. M33, a novel isolate from a freshwater swamp forest. *J. Basic Microbiol.* 57, 121–131. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600225>
- Ko, C.H., Chen, W.L., Tsai, C.H., Jane, W.N., Liu, C.C., Tu, J., 2007. *Paenibacillus campinasensis* BL11: A wood material-utilizing bacterial strain isolated from black liquor. *Bioresour. Technol.* 98, 2727–2733. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.034>
- Ko, C.H., Tsai, C.H., Tu, J., Yang, B.Y., Hsieh, D.L., Jane, W.N., Shih, T.L., 2011. Identification of *Paenibacillus* sp. 2S-6 and application of its xylanase on biobleaching. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.12.006>
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Madden, T., 2013. The BLAST Sequence Analysis Tool. *NCBI Handbook*[internet] 1–15. <https://doi.org/10.1086/597785>
- 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>
- Mondéjar, L.R., Zühlke, D., Větrovský, T., Becher, D., Riedel, K., Baldrian, P., 2016. Decoding the complete arsenal for cellulose and hemicellulose deconstruction in the highly efficient cellulose decomposer *Paenibacillus* O199. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0518-x>
- Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F., 2016. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5205–5214.

<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7555-z>

- Na, H.B., Jung, W.K., Jeong, Y.S., Kim, H.J., Kim, S.K., Kim, J., Yun, H.D., Lee, J.K., Kim, H., 2015. Characterization of a GH family 8  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase with distinctive broad substrate specificity from *Paenibacillus* sp. X4. *Biotechnol. Lett.* 37, 643–655. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1724-x>
- Obeng, E.M., Nurul, S., Adam, N., Budiman, C., Ongkudon, C.M., Maas, R., Jose, J., 2017. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. *Bioresour. Bioprocess.* 16, 1–22. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0146-8>
- Osiro, K.O., de Camargo, B.R., Satomi, R., Hamann, P.R. V., Silva, J.P., de Sousa, M.V., Quirino, B.F., Aquino, E.N., Felix, C.R., Murad, A.M., Noronha, E.F., 2017. Characterization of *Clostridium thermocellum* (B8) secretome and purified cellulosomes for lignocellulosic biomass degradation. *Enzyme Microb. Technol.* 97, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.002>
- Osman, S., Satomi, M., Venkateswaran, K., 2006. *Paenibacillus pasadenensis* sp. nov. and *Paenibacillus barengoltzii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly facility. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1509–1514. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64085-0>
- Price, M., Dehal, P., Arkin, A., 2010. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS One* 5, 170–176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Shukla, P., Kumar, V., 2016. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-2005-0>
- Silva, L.D.M.B., Gomes, T.C., Ullah, S.F., Ticona, A.R.P., Hamann, P.R. V., Noronha, E.F., 2019. Biochemical Properties of Carbohydrate-Active Enzymes Synthesized by *Penicillium chrysogenum* Using Corn Straw as



Carbon Source. Waste and Biomass Valorization.

- Ullah, S.F., Souza, A.A., Hamann, P.R. V., Ticona, A.R.P., Oliveira, G.M., Freitas, S.M., Barbosa, J.A.R.G., Noronha, E.F., 2019. Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. *Int. J. Biol. Macromol.* 127, 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.057>
- Vaaje-Kolstad, G., Forsberg, Z., Loose, J.S., Bissaro, B., Eijsink, V.G., 2017. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 44, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.012>
- Wu, H.S., Wang, Y., Zhang, C.Y., Bao, W., Ling, N., Liu, D.Y., Shen, Q.R., 2009. Growth of in vitro *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in chemically defined media amended with gallic acid. *Biol. Res.* 42, 297–304. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602009000300004>
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S.-Y., Wyman, C.E., 2014. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* 2, 421–449. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.116>
- Yang, Y., Yang, J., Liu, J., Wang, R., Liu, L., Wang, F., Yuan, H., 2018. The composition of accessory enzymes of *Penicillium chrysogenum* P33 revealed by secretome and synergistic effects with commercial cellulase on lignocellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 257, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.028>
- Zhang, B., Liu, Y., Yang, H., Yan, Q., Yang, S., Jiang, Z., Li, S., 2017. Biochemical properties and application of a novel b-1,3-1,4-glucanase from *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chem.* 234, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.162>

## **Supplementary Files**

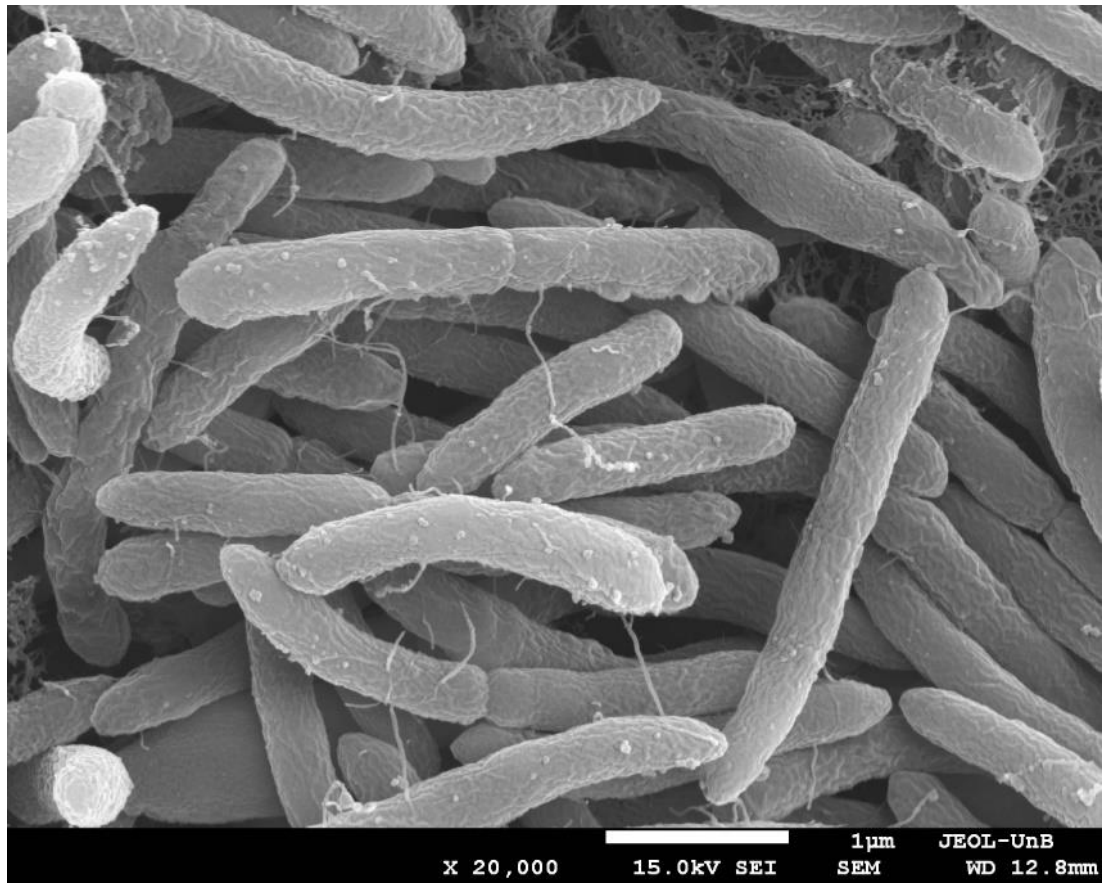
Table S1. Endo-1,4- $\beta$ -xylanase and endo-1,4- $\beta$ -glucanase activities by ruminal isolates.

Ruminal isolates	Endo-1,4- $\beta$ -xylanase (UI/mL)	Endo-1,4- $\beta$ -glucanase (UI/mL)	Protein ( $\mu$ g/mL)
C1_37L	0.10 $\pm$ 0.0031	0.14 $\pm$ 0.0034	38.0 $\pm$ 0.0013
C2_37L1	0.05 $\pm$ 0.0045	0.04 $\pm$ 0.0029	20.5 $\pm$ 0.0045
C1_37S	0.08 $\pm$ 0.0023	0.11 $\pm$ 0.0033	32.2 $\pm$ 0.0031
C2_37L2	0.06 $\pm$ 0.0037	0.05 $\pm$ 0.0026	26.9 $\pm$ 0.0025
C2_37S	0.08 $\pm$ 0.0011	0.06 $\pm$ 0.0034	33.7 $\pm$ 0.0038
C1_60L3	0.06 $\pm$ 0.0045	0.03 $\pm$ 0.0021	19.3 $\pm$ 0.0014
C1_60L4	0.05 $\pm$ 0.0017	0.04 $\pm$ 0.0035	18.3 $\pm$ 0.0020
C1_60L5	0.07 $\pm$ 0.0044	0.04 $\pm$ 0.0027	28.1 $\pm$ 0.0014
C1_60L6	0.04 $\pm$ 0.0012	0.06 $\pm$ 0.0033	27.3 $\pm$ 0.0023
C1_60L7	0.05 $\pm$ 0.0034	0.05 $\pm$ 0.0017	24.9 $\pm$ 0.0024
C1_60L8	0.02 $\pm$ 0.0029	0.04 $\pm$ 0.0034	17.6 $\pm$ 0.0035
C1_60L9	0.06 $\pm$ 0.0028	0.05 $\pm$ 0.0019	28.4 $\pm$ 0.0022
C2_60L1	0.05 $\pm$ 0.0035	0.05 $\pm$ 0.0024	27.9 $\pm$ 0.0036
C2_60L2	0.06 $\pm$ 0.0022	0.05 $\pm$ 0.0032	27.1 $\pm$ 0.0014
Cel1_37S1	0.06 $\pm$ 0.0014	0.03 $\pm$ 0.0034	26.7 $\pm$ 0.0029
Cel1_37S2	0.07 $\pm$ 0.0037	0.06 $\pm$ 0.0019	33.6 $\pm$ 0.0012
Cel1_37S4	0.05 $\pm$ 0.0016	0.02 $\pm$ 0.0015	28.7 $\pm$ 0.0028
Cel1_50S3	0.05 $\pm$ 0.0022	0.03 $\pm$ 0.0012	34.7 $\pm$ 0.0014
Cel1_50S4	0.04 $\pm$ 0.0014	0.05 $\pm$ 0.0034	32.1 $\pm$ 0.0027
A1_37L1	0.10 $\pm$ 0.0024	0.12 $\pm$ 0.0013	44.7 $\pm$ 0.0012
A1_37L2	0.05 $\pm$ 0.0025	0.05 $\pm$ 0.0018	34.0 $\pm$ 0.0016
A1_37L3	0.06 $\pm$ 0.0018	-	23.3 $\pm$ 0.0023
A1_37L4	0.02 $\pm$ 0.0068	0.06 $\pm$ 0.0024	31.1 $\pm$ 0.0022
A1_37S1	0.02 $\pm$ 0.0032	-	24.7 $\pm$ 0.0026
A1_37S2	0.07 $\pm$ 0.0084	0.06 $\pm$ 0.0013	45.3 $\pm$ 00.029
A1_37S3	0.01 $\pm$ 0.0027	0.06 $\pm$ 0.0031	34.0 $\pm$ 0.0013
A1_37S4	0.08 $\pm$ 0.0034	0.07 $\pm$ 0.0026	31.3 $\pm$ 0.0047
A1_37S5	0.10 $\pm$ 0.0025	0.15 $\pm$ 0.0036	34.8 $\pm$ 0.0033
A2_37L4	0.05 $\pm$ 0.0067	0.08 $\pm$ 0.0035	43.3 $\pm$ 0.0014
A2_37L5	0.06 $\pm$ 0.0023	0.06 $\pm$ 0.0028	40.0 $\pm$ 0.0038
A2_37L6	0.06 $\pm$ 0.0031	0.07 $\pm$ 0.0011	38.7 $\pm$ 0.0023
A1_50S3	0.07 $\pm$ 0.0013	0.01 $\pm$ 0.0034	48.7 $\pm$ 0.0014
A1_50S4	-	-	-
A1_50S5	0.06 $\pm$ 0.0021	0.04 $\pm$ 0.0015	30.7 $\pm$ 0.0027
A1_50S6	0.06 $\pm$ 0.0073	0.04 $\pm$ 0.0037	34.0 $\pm$ 0.0032
A1_50S7	0.07 $\pm$ 0.0011	0.01 $\pm$ 0.0021	49.3 $\pm$ 0.0031
A1_50L1	0.24 $\pm$ 0.0029	0.16 $\pm$ 0.0028	42.0 $\pm$ 0.0013
<b>A1_50L2</b>	0.23 $\pm$ 0.0083	0.13 $\pm$ 0.0035	30.3 $\pm$ 0.0036
A1_50L3	0.22 $\pm$ 0.0016	0.14 $\pm$ 0.0046	39.3 $\pm$ 0.0023
A1_50L4	0.06 $\pm$ 0.0051	0.07 $\pm$ 0.0034	29.0 $\pm$ 0.0015
A1_60L2	0.09 $\pm$ 0.0026	0.06 $\pm$ 0.0032	30.3 $\pm$ 0.0024
A2_50L1	0.04 $\pm$ 0.0022	0.09 $\pm$ 0.0013	47.3 $\pm$ 0.0037
A2_50L2	-	-	-
A1_60L4	0.07 $\pm$ 0.0026	0.14 $\pm$ 0.0026	34.7 $\pm$ 0.0012
A1_60L5	0.07 $\pm$ 0.0013	0.07 $\pm$ 0.0041	42.0 $\pm$ 0.0016
A1_50S2	0.15 $\pm$ 0.0032	0.10 $\pm$ 0.0025	26.3 $\pm$ 0.0015

Table S2. Phenotypic characteristics of *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50 L2. All phenotypic data were determined in this study.

Physiological and biochemical characterization of <i>P. barengoltzii</i> A1_50L2		
Colonies		Smooth, circular and yellowish-white
Morphology		Rods
Gram staining		Positive
Average cell size		2.1-4.0 $\mu\text{m}$ length x 0.3-0.5 $\mu\text{m}$ width
Endospore formation		+
Motility		+
Oxygen requirement		Facultative anaerobe
Growth	Temperature (°C)	40-60
	pH	6 - 8
	NaCl (%)	1 - 3
Hydrolysis of	CMC	+
	Starch	+
	Xylan	+
	Cellulose	+
	Wheat bran	+
	Sugarcane bagasse	+
	Pectin	+
	Casein	-
	Chitin	+
	Xylose	+
	Glucose	+
	Cellobiose	+
Sucrose	+	
Maltose	+	

Figure S1. Scanning electron micrographs of *Paenibacillus barengoltzii* A1\_50L2 grown on CMC medium, incubated at 50°C for 48 h.



**Capítulo 3. Produção e caracterização parcial da atividade de  $\alpha$ -amilase do sobrenadante de *P. barengoltzii* A1\_50L2**

## **1. Metodologia**

### **1.1. Manutenção e cultivo do microrganismo**

Foi utilizado, neste capítulo, o isolado A1\_50L2 identificado como *P. barengoltzii* por análise da sequência 16S rDNA e caracterizado por sua capacidade para produzir  $\alpha$ -amilase conforme descrito no capítulo 1 deste trabalho. O isolado foi mantido a 50°C em meio líquido redutor sob atmosfera anaeróbica conforme anteriormente descrito em Hamann et al. (2015) e suplementado com 1% (m/v) de amido como fonte de carbono.

### **1.2. Efeito do pH e temperatura no crescimento de *P. barengoltzii* A1\_50L2**

Para determinação do efeito do pH no crescimento bacteriano, foram preparados frascos de soro contendo 100 mL de meio líquido sob atmosfera anaeróbica suplementado com 1% (m/v) de amido e tamponados nos pHs de 6, 6,5, 7,5 e 8,5 em dois diferentes tipos de tampão: fosfato de sódio pH 6 e 6,5 100 mM e Tris-HCl pH 7,5 e 8,5 100 mM e em seguida, alíquotas do isolado A1\_50L2 (3mL OD<sub>600nm</sub>=0,1) foram inoculados e incubados a 50°C por 2 dias. Após incubação, a taxa de crescimento foi avaliada medindo-se a absorbância a 600 nm.

O efeito da temperatura no crescimento bacteriano foi realizado em temperaturas de 30, 40, 50, 55, 60 e 65°C em pH 7,5 por 48 horas. Após incubação, a taxa de crescimento foi avaliada medindo-se a absorbância a 600 nm.

### **1.3. Curva de crescimento de *P. barengoltzii* A1\_50L2**

O isolado A1\_50L2 (3mL OD<sub>600nm</sub>=0,1) foi inoculado em 3 frascos de soro contendo 100 mL de meio líquido conforme descrito acima e incubados a 55°C por 48 horas. Para obtenção da curva de crescimento, foram retiradas alíquotas de 3 mL a cada 12 horas e realizadas leituras de densidade ótica dos sobrenadantes das culturas a 600 nm.

#### **1.4. Avaliação do consumo do amido e liberação de açúcar redutor**

A detecção do consumo do amido foi realizado seguindo o método descrito por Fuwa (1954) com pequenas modificações, 200 µL do sobrenadante da cultura foram adicionados a 9,4 mL de água destilada e 200 µL de reagente Fuwa. A leitura de absorvância foi realizada a 620 nm. Os resultados foram mostrados em 1 mg mL<sup>-1</sup> de amido consumido. A quantificação de açúcares redutores produzidos a partir do amido solúvel foi realizado de acordo com o método descrito por Miller (1959).

#### **1.5. Cinética da produção de α-amilase**

##### **1.5.1. Preparo da amostra**

*P. barengoltzii* A1\_50L2 foi cultivado em 3 frascos de soro contendo 100 mL de meio líquido sob atmosfera anaeróbica suplementado com 1% (m/v) de amido, e em seguida, foram incubados a 55°C por 2 dias. Foram retiradas alíquotas de 3 mL a cada 12 horas, e os cultivos retirados, foram centrifugados a 10000 x *g* a 4 °C por 10 minutos, e em seguida, os sobrenadantes obtidos foram usados como fonte de enzima para avaliação da atividade α-amilase.

##### **1.5.2. Determinação da atividade de α-amilase**

A atividade α-amilase foi quantificada seguindo o método descrito por Fuwa (1954), 60 µL da amostra enzimática foi adicionado a 100 µL de 1% de amido preparado em tampão citrato de sódio pH 5.0 100mM, o ensaio foi incubado a 50°C por 30 minutos, a reação interrompida com 200 µL de ácido acético 1M, e ao ensaio adicionado 9,4 mL de água destilada e 200 µL de reagente Fuwa (Sindhu et al., 2016). A leitura de absorvância foi realizada a 620 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 1 mg de amido por minuto de reação.



### **1.6. Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE e Zimograma**

O total de 30 µg de proteínas do sobrenadante foram aplicados no gel de poliacrilamida, a sua preparação, da amostra e corrida eletroforética foram realizados conforme descrito por Laemmli (1970). O kit, Unstained Protein MW Marker foi utilizado como marcador de massa molecular (Thermo Scientific, USA).

Para a determinação da atividade em gel, amido na concentração final de 0,1% (m/v) foram adicionados à matriz do gel, preparado como acima descrito. Um total de 30 µg de proteínas do sobrenadante foram aplicados no gel SDS-PAGE. A corrida eletroforética, renaturação enzimática e revelação das bandas com atividade foram realizadas conforme descrito em Osiro et al. (2017).

### **1.7. Efeito do pH e temperatura na atividade de α-amilase**

O efeito do pH na atividade de α-amilase foi realizado utilizando o procedimento descrito no item 1.4.2 variando apenas os valores de pH de 3 a 10. Foram utilizados os seguintes tampões: citrato de sódio 100 mM pH 3, 4 e 5, fosfato de sódio 100 mM pH 6 e 7, tris-HCl 100 mM pH 8 e 9 e bicarbonato de sódio 100 mM pH 10. O efeito da temperatura foi realizado variando os valores de temperatura de 30 a 75°C em ensaios enzimáticos tamponados com fosfato de sódio 100 mM pH 6,0.

### **1.8. Estabilidade térmica na atividade de α-amilase**

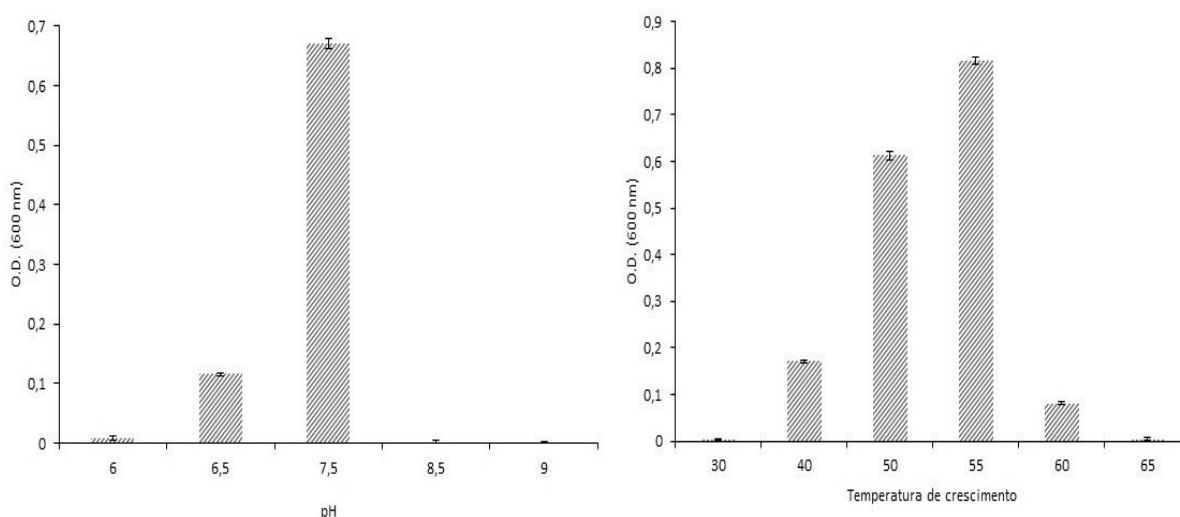
Para determinar os efeitos da estabilidade térmica da α-amilase, duas amostras (sobrenadante) foram pre-incubadas a 50 e 60 °C, respectivamente. A cada 24 horas, foram retiradas alíquotas de 500 µL e testadas as atividades seguindo o procedimento descrito no item 1.4.2. Ensaios enzimáticos da amostra fresca (não-incubada), foram avaliadas e consideradas como 100% da atividade.

## 2. Resultados e Discussão

### 2.1 Determinação dos parâmetros de crescimento e avaliação da produção de $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2

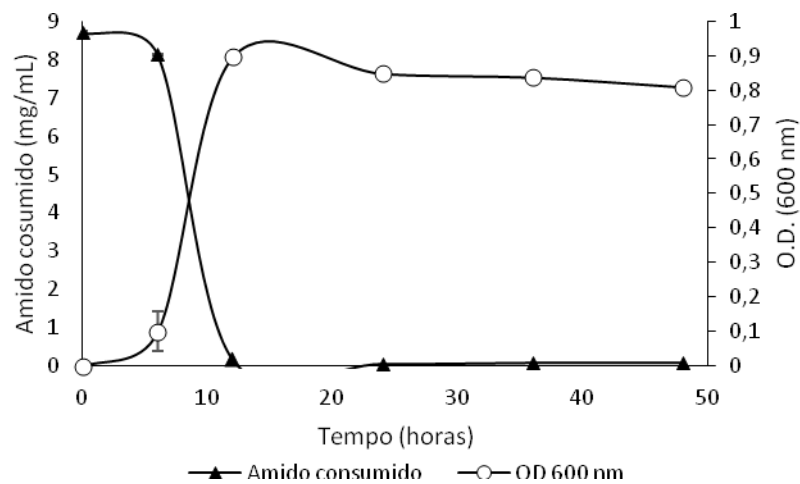
*P. barengoltzii* A1\_50L2 alcançou crescimentos de  $OD_{600nm}=0,13$  a pH 6,5 e  $OD_{600nm}=0,68$  a pH 7,5, porém, acima deste o crescimento foi inibido.

Além disso, A1\_50L2, registrou crescimentos de  $OD_{600nm}=0,18$  a 40°C,  $OD_{600nm}=0,61$  a 50°C,  $OD_{600nm}=0,83$  a 55°C e  $OD_{600nm}=0,08$  a 60°C. Não houve crescimento a 30°C e 65°C (Figura 1).



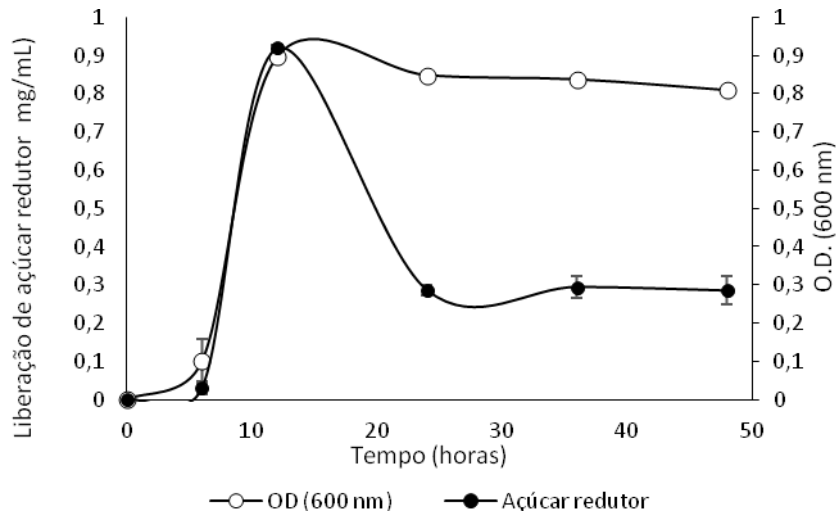
**Figura 1.** Efeito do pH e temperatura no crescimento microbiano de *P. barengoltzii* A1\_50L2 quando crescido em 1% (p/v) de amido como fonte de carbono. A barra de erro representa o desvio padrão de replicatas biológicas.

Com relação à avaliação da curva de crescimento, foi observado que *P. barengoltzii* A1\_50L2 alcança a fase Log após 6 horas de incubação e atinge o crescimento máximo (fase estacionária) a partir de 12 horas. No mesmo experimento, foi observado que a degradação total do amido ocorre em 12 horas de incubação, em concordância com o tempo em que a bactéria alcança a fase estacionária (Figura 2).



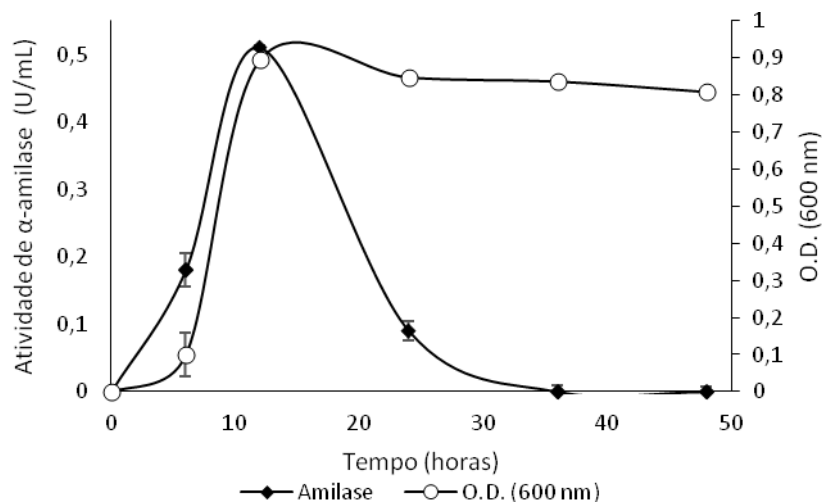
**Figura 2.** Curva de crescimento e consumo de amido de *P. barengoltzii* A1\_50L2 cultivado em meio líquido contendo 1% (p/v) de amido como fonte de carbono. A barra de erro representa o desvio padrão de replicatas técnicas.

Foi observado que a liberação de açúcares redutores alcançou o valor máximo de  $0,91 \text{ mg.mL}^{-1}$  após 12 horas de incubação e após esse tempo houve a diminuição da concentração de açúcares redutores. Após 24 horas de crescimento (fase estacionária) a concentração foi constante em valores de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 3).



**Figura 3.** Curva de crescimento e açúcares redutores liberados por *P. barengoltzii* A1\_50L2 quando cultivado em meio líquido contendo 1% (p/v) de amido como fonte de carbono. A barra de erro representa o desvio padrão de replicatas técnicas.

Com relação à análise de cinética enzimática, *P. barengoltzii* A1\_50L2 alcançou valores de  $0,18 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,51 \text{ U.mL}^{-1}$  após 6 e 12 horas de incubação, respectivamente, e após este período, a atividade de  $\alpha$ -amilase diminuiu consideravelmente (Figura 4).



**Figura 4.** Cinética da produção de  $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2 quando cultivado em meio líquido contendo 1% (p/v) de amido como fonte de carbono. A barra de erro representa o desvio padrão de replicatas técnicas.

Os resultados do pH mostraram que *P. barengoltzii* A1\_50L2 cresceu a condição ótima em pH 7,5, sendo o crescimento inibido em pHs mais alcalinos e ácidos demonstrando que o pH do meio influenciou no crescimento microbiano. Estudos indicaram que mudanças significativas do pH no meio afetam fortemente o transporte de compostos químicos e enzimas que atravessam a membrana celular durante o metabolismo microbiano, resultando na inibição do crescimento microbiano (Tse e Ma, 2016).

Além disso, o pH ótimo de crescimento de *P. barengoltzii* A1\_50L2 está de acordo com o pH do ecossistema ruminal, que pode variar em torno de 5,7 a 7,5 (Weimer, Russell, and Muck 2009). Saleem et al. (2013) relataram que dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentescíveis favorecem o pH ácido, devido à elevada concentração de ácidos graxos e ácido láctico produzidos, no entanto, dietas mais fibrosa em material vegetal incrementa o pH ruminal acima de 6,5 favorecendo o crescimento de bactérias hemicelulolíticas.

Em relação à influência da temperatura sobre o crescimento, *P. barengoltzii* A1\_50L2 mostrou ser um microrganismo moderadamente termófilo, alcançando crescimento máximo a 55°C, no entanto, Weimer et al. (2009) relataram a temperatura ruminal entorno de 39 °C. Ao todo, a presença de *P. barengoltzii* A1\_50L2 é possível, devido à ampla diversidade da microbiota ruminal. De fato, os *Firmicutes* um dos filos mais importantes no rúmen, compreende uma ampla diversidade de bactérias, dentre estes os gêneros *Clostridium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, sendo que muitos dos seus integrantes são termófilos tais como *Clostridium thermocellum* (60 °C), *Clostridium stercocarium* (60°C), *Bacillus thermozeamaize* (55 °C) e *Bacillus thermoamylovoras* (50°C) (BLanc et al. 1995; Blume et al. 2013; Nissilä et al. 2011).

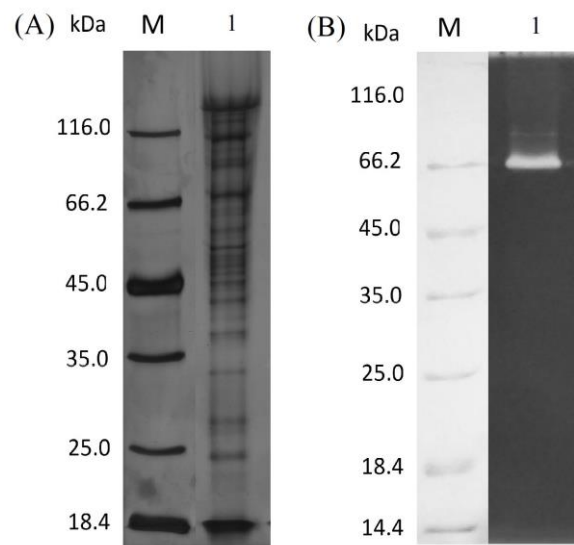
A curva de crescimento da bactéria atingiu a fase estacionária após 12 horas de incubação, e o amido é solubilizado no mesmo período de tempo, demonstrando o papel importante de *P. barengoltzii* A1\_50L2 na metabolização de alimentos amiláceos no rúmen. Além disso, os açúcares liberados pela bactéria A1\_50L2, pode sugerir o efeito sinérgico com outros microrganismos, como exemplo microrganismos tais como *Lactobacillus* sp, *Streptococcus* sp e *Enterobacter* sp utilizam açúcares diversos como substrato, transformando-os em ácidos graxos voláteis, lactato, acetato e butirato, as quais o animal consegue absorver e assimilar (Nagaraja 2016).

Em relação à cinética enzimática, a maior atividade amilolítica (0,51 U.mL<sup>-1</sup>) apresentada por *P. barengoltzii* A1\_50L2 após 12 horas, está de acordo com o padrão de atividades enzimáticas já descritas para outras bactérias ruminais, tais como *Prevotella ruminicola* 23 (0,37 U.mL<sup>-1</sup>), *Prevotella ruminicola* B4 (0,47 U.mL<sup>-1</sup>), *Butirivibrio fibrosolvens* (0,86 U.mL<sup>-1</sup>), que alcançaram atividade máxima o tempo de 15 horas de incubação com subsequente liberação de glucose e maltose como produtos do metabolismo (Puniya et al. 2013).

## **2.2. Caracterização enzimática da atividade $\alpha$ -amilase do sobrenadante de *P. barengoltzii* A1\_50L2**

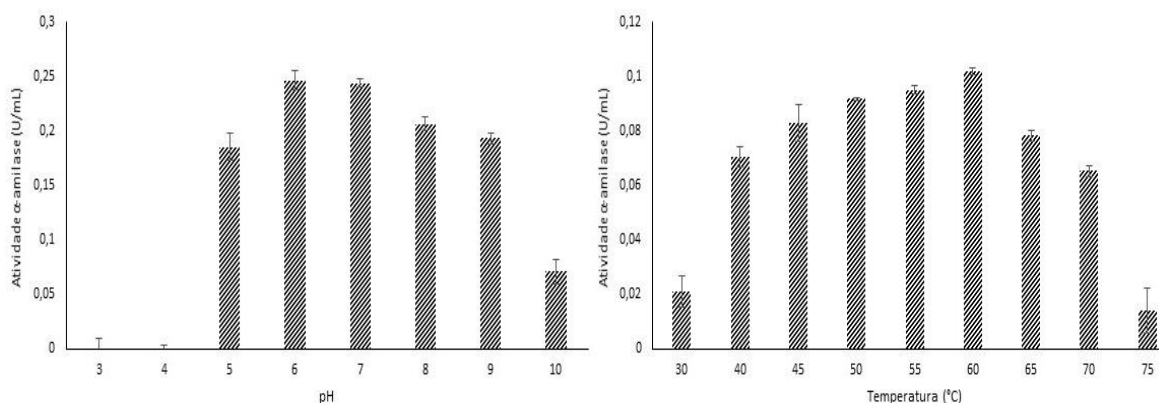
Após análise em gel SDS-PAGE, o perfil protéico de *P. barengoltzii* A1\_50L2 cultivado em meio líquido contendo amido como fonte de carbono apresentou bandas protéicas em torno de 25 kDa a 120kDa, e acentuado número de bandas acima de 45 kDa. Além disso, o sobrenadante do isolado A1\_50L2 apresentou apenas uma banda de atividade  $\alpha$ -amilase com massa molecular estimada de 66 kDa (Figura 5).

Amilases são produzidas por uma ampla variedade de gêneros como *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Streptomyces sp.*, *Clostridium* (R Sindhu et al. 2016). Dheeran et al. (2010) reportaram uma amilase com massa molecular de 97 kDa de *Geobacillus sp.* IIPN. Além disso, uma amilase parcialmente purificada de *Streptomyces erumpens* mostrou uma massa molecular estimada de 54 kDa (Kar et al., 2008). Também foram reportadas amilases com massas moleculares estimadas de 50 kDa e 70 kDa a partir de *Aspergillus niger* e *Paenibacillus sp.*, respectivamente (Rajesh et al. 2013; Wang et al. 2016).



**Figura 5.** Análise da atividade de  $\alpha$ -amilase em gel SDS-PAGE (A) e Zimograma 12% (B). MM: marcador de massa molecular; 1: sobrenadante de *P. barengoltzii* A1\_50L2 cultivado em 1% (m/v) de amido como fonte de carbono.

O efeito do pH na atividade  $\alpha$ -amilase, apresentou valores significativos nos pHs 5, 6, 7, 8, 9 e 10. A atividade é evidentemente mais baixa em pH 10, sendo detectada atividade apenas de 30%, enquanto que em pHs 3 e 4, não foram detectadas atividades. Além disso, a  $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2 apresentou atividade nas temperaturas entre 30°C e 75°C, com atividade máxima a 60°C (Figura 6).



**Figura 6.** Efeito do pH e temperatura na atividade de  $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2. A barra de erro representa o desvio padrão de replicatas técnicas.

As amilases constituem uma classe de enzimas industriais que ocupam cerca de 25% do mercado de enzimas. Ogbonnaya e Odiase (2015) destacam a importância de enzimas tolerantes a pH alcalino, particularmente na indústria de detergentes, assim como enzimas termotolerantes.

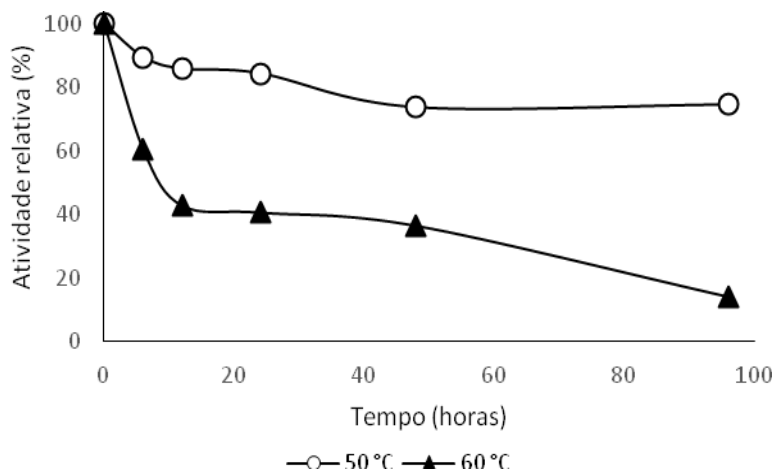
Com relação à atividade em pHs mais alcalinos, ao contrário do já descrito para amilases de outros isolados de *Paenibacillus*, à atividade  $\alpha$ -amilase do sobrenadante de *P. barengoltzii* A1\_50L2 mantiveram esta atividade tanto em pH ácidos, quanto alcalinos (Figura 6). Já foi relatado a perda total de atividade entre os pHs 8, 9, 10 em estudos de amilases de *Paenibacillus amylolyticus* (Haq et al., 2012). Assim como a perda total da atividade em pHs 5 e 6, da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* CB-18 (Ogbonnaya and Odiase, 2015). Essa diferença de atividade ao pH entre  $\alpha$ -amilases está



relacionada com a estrutura e composição de cada enzima. Sindhu et al. (2016) relataram que a adaptação de  $\alpha$ -amilases poderia ser influenciada pela diminuição de aminoácidos carregados negativamente e aumento de resíduos hidrofílicos incluindo histidina, asparagina, e glutamina, tornando as interações eletrostáticas entre resíduos, fatores essenciais para tolerar ambientes com pH extremos.

Quanto a temperatura, a atividade de  $\alpha$ -amilase foi maior nas temperatura de 55°C e 60°C, respectivamente, como já descrito para atividade de pululanase tipo 1 de *Paenibacillus barengoltzii* CAU904 (Liu et al. 2016). Um dos principais fatores descritos para que estas enzimas mantenham suas atividades em altas temperaturas é a interação de proteínas, pois foi relatado uma forte correlação quanto às ligações dissulfeto entre as proteínas e a manutenção da estabilidade térmica (Rigoldi et al. 2018).

Com relação à estabilidade térmica, o sobrenadante com atividade  $\alpha$ -amilase apresentou 90% de atividade relativa após 6 horas de incubação a 50 °C, em contrapartida, quando incubada a 60°C a atividade relativa foi de 60%. Após 24 horas de incubação, o sobrenadante apresentou 83% da atividade relativa a 50°C e 40% da atividade relativa quando incubada a 60°C. A atividade relativa de  $\alpha$ -amilase foi de 80% a 50°C e 20% a 60°C, respectivamente, após 4 dias de incubação (Figura 7).



**Figura 7.** Análise de estabilidade térmica a 50 °C e 60 °C da  $\alpha$ -amilase do sobrenadante de *P. barengoltzii* A1\_50L2.

A  $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2 apresentou maior estabilidade térmica, em comparação com os resultados da atividade  $\alpha$ -amilase de *P. amylolyticus* e até mesmo de  $\alpha$ -amilases comerciais de *Bacillus licheiformis* (Haq et al., 2012). Para a  $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2, após 6 horas de incubação a 60°C, foi registrada a perda 40% de atividade. Já para a  $\alpha$ -amilase comercial de *Bacillus licheniformis* foi descrita a perda de 50% da atividade a 60°C, no mesmo período de incubação (Declerck et al. 2003).

A  $\alpha$ -amilase de *P. barengoltzii* A1\_50L2 apresentou parâmetros cinéticos que as habilitam a aplicação em processos industriais, pois por ser termoestável, podem ser armazenados em temperatura ambiente sem perder atividade. Além disso, possui resistência a temperatura de 60°C, e em caso de pre-tratamentos que geram alta temperatura, não se faz necessário o resfriamento total do processo, evitado maiores gastos na obtenção de de bioprodutos como etanol (R Sindhu et al., 2016).

## **Conclusões e perspectivas**

## CONCLUSÕES

- A estratégia de Espectrometria de Massa MALDI-TOF pode ser utilizada para a triagem de isolados bacterianos anaeróbicos a partir de amostras de rúmen bovino.
- As atividades enzimáticas da mistura PbEC de *P. barengoltzii* A1\_50L2 apresentaram parâmetros cinéticos como pH ótimo (4-8), temperatura ótima (40-60) e estabilidade térmica (50°C), que apontam sua aplicação em processos industriais baseados na hidrólise de biomassa lignocelulósica.
- A mistura enzimática de *P. barengoltzii* A1\_50L2 apresentou taxa de hidrólise semelhante à mistura comercial Viscozyme.
- A mistura enzimática PbEC produzida por *P. barengoltzii* A1\_50L2 apresentou potencial para ser utilizada como aditivo em misturas comerciais.

## PERSPECTIVAS

- Análise por HPLC dos produtos de hidrólise do farelo de trigo produzidos pela ação da mistura enzimática PbEC de *P. barengoltzii* A1\_50L2.
- Realizar mais experimentos de hidrólise utilizando PbEC e outras misturas comerciais para determinar se realmente a mistura PbEC pode ser utilizada industrialmente como aditivo em misturas comerciais.
- Análise do secretoma da mistura PbEC de *P. barengoltzii* A1\_50L2 por espectrometria de massa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, Amith, Anil Kuruvilla Mathew, Raveendran Sindhu, Ashok Pandey, and Parameswaran Binod. 2016. "Potential of Rice Straw for Bio-Refining: An Overview." *Bioresource Technology* 215:29–36.
- Administration, U. S. Energy Information. 2017. *International Energy Outlook 2017 Overview*.
- Andersen, Natalija, Katja S. Johansen, Michael Michelsen, Erling H. Stenby, Kristian B. R. M. Krogh, and Lisbeth Olsson. 2008. "Hydrolysis of Cellulose Using Mono-Component Enzymes Shows Synergy during Hydrolysis of Phosphoric Acid Swollen Cellulose (PASC), but Competition on Avicel." *Enzyme and Microbial Technology* 42(4):362–70.
- Anderson, Kevin L. 2002. "Purification and Analysis of a Membrane-Associated Starch-Degrading Enzyme from *Ruminobacter Amylophilus*." *Anaerobe* 8(5):269–76.
- Anwar, Zahid, Muhammad Gulfraz, and Muhammad Irshad. 2014a. "Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review." *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7:163–73.
- Anwar, Zahid, Muhammad Gulfraz, and Muhammad Irshad. 2014b. "Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review." *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2):163–73.
- Ash, Carol, Fergus G. Priest, and M. David Collins. 1993. "Molecular Identification of RRNA Group 3 Bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) Using a PCR Probe Test." *Antonie van Leeuwenhoek* 64(3–4):253–60.
- Bajpai P. 2016. "Structure of Lignocellulosic Biomass." Pp. 5–12 in *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*.
- Banerjee, Goutami, Suzana Car, John S. Scott-Craig, Melissa S. Borrusch,

- Mareike Bongers, and Jonathan D. Walton. 2010. "Synthetic Multi-Component Enzyme Mixtures for Deconstruction of Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 101(23):9097–9105.
- Barba, M. J., A. Fernández, M. Oviano, B. Fernández, D. Velasco, and G. Bou. 2014. "Evaluation of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Identification of Anaerobic Bacteria." *Anaerobe* 30:126–28.
- BBC Research. 2017. *Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*.
- Van Belkum, Alex, Martin Welker, David Pincus, Jean Philippe Charrier, and Victoria Girard. 2017. "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues?" *Annals of Laboratory Medicine* 37(6):475–83.
- Benson, Dennis A., Mark Cavanaugh, Karen Clark, Ilene Karsch-Mizrachi, James Ostell, Kim D. Pruitt, and Eric W. Sayers. 2012. "GenBank." *Nucleic Acids Research* 41(D1):D41–47.
- Bentsen, Niclas Scott., Claus. Felby, and Bo Jellesmark. Thorsen. 2014. "Agricultural Residue Production and Potentials for Energy and Materials Services." *Progress in Energy and Combustion Science* 40(1):59–73.
- Bertoft, Eric. 2017. "Understanding Starch Structure: Recent Progress." *Agronomy* 1:7–59.
- Bhattacharya, Ankita Shrivastava, Abhishek Bhattacharya, and Brett I. Pletschke. 2015. "Synergism of Fungal and Bacterial Cellulases and Hemicellulases: A Novel Perspective for Enhanced Bio-Ethanol Production." *Biotechnology Letters* 37(6):1117–29.
- Bhowmick, Goldy De, Ajit K. Sarmah, and Ramkrishna Sen. 2018. "Lignocellulosic Biorefinery as a Model for Sustainable Development of Biofuels and Value Added Products." *Bioresource Technology* 247:1144–54.

- Biely, Peter, Suren Singh, and Vladimír Puchart. 2016. "Towards Enzymatic Breakdown of Complex Plant Xylan Structures: State of the Art." *Biotechnology Advances* 34(7):1260–74.
- Blácido, Delia R. Tapia, Bianca C. Maniglia, and Milena Martelli Tosi. 2017. "Biopolymers from Sugarcane and Soybean Lignocellulosic Biomass." Pp. 227–53 in *Sustainable Polymers from Biomass*.
- BLanc, Combet Y., B. Olliver, C. Streicher, B. K. C. Patel, P. Dwivedi, B. Pot, G. Prensier, and J. L. Garcia. 1995. "Bacillus Thermoamylovorans Sp. Nov., a Moderately Thermophilic and Amyolytic Bacterium." *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(1):9–16.
- Blume, Liana R., Eliane F. Noronha, Jackeline Leite, Marcelo Valle De Sousa, and Carlos R. Felix. 2013. "Characterization of Clostridium Thermocellum Isolates Grown on Cellulose and Sugarcane Bagasse." *Bioenergy Research* 6:763–75.
- Bordonal, Ricardo De Oliveira, João Luis N. Carvalho, Rattan Lal, Eduardo Barretto De Figueiredo, Bruna Gonçalves De Oliveira, and Newton La Scala Jr. 2018. "Sustainability of Sugarcane Production in Brazil . A Review." *Agronomy for Sustainable Development* 38(13):3–22.
- Boukari, Imen, Michael O'Donohue, Caroline Rémond, and Brigitte Chabbert. 2011. "Probing a Family GH11 Endo- $\beta$ -1,4-Xylanase Inhibition Mechanism by Phenolic Compounds: Role of Functional Phenolic Groups." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72(3–4):130–38.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1–2):248–54.
- Brijwani, Khushal, Harinder Singh Oberoi, and Praveen V Vadlani. 2010. "Production of a Cellulolytic Enzyme System in Mixed-Culture Solid-State Fermentation of Soybean Hulls Supplemented with Wheat Bran." *Process*



*Biochemistry* 45:120–28.

Chakdar, Hillol, Murugan Kumar, Kuppusamy Pandiyan, Arjun Singh, Karthikeyan Nanjappan, Prem Lal Kashyap, and Alok Kumar Srivastava. 2016. “Bacterial Xylanases: Biology to Biotechnology.” *3 Biotech* 6(2):1–15.

Chen, Bo Yuan and Han Tsung Wang. 2008. “Utility of Enzymes from *Fibrobacter Succinogenes* and *Prevotella Ruminicola* as Detergent Additives.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(8):923–30.

Conab. 2018a. *Análise Mensal, Madioca*.

Conab. 2018b. *Projeções Do Agroegócio*.

Cunha, Isabel S., Cristine C. Barreto, Ohana Y. A. Costa, Marco A. Bomfim, Alinne P. Castro, Ricardo H. Kruger, and Betania F. Quirino. 2011. “Bacteria and Archaea Community Structure in the Rumen Microbiome of Goats (*Capra Hircus*) from the Semiarid Region of Brazil.” *Anaerobe* 17(3):118–24.

Das, Krushna Chandra and Wensheng Qin. 2012. “Isolation and Characterization of Superior Rumen Bacteria of Cattle (*Bos Taurus*) and Potential Application in Animal Feedstuff.” *Open Journal of Animal Sciences* 02(04):224–28.

Declerck, Nathalie, Mischa Machius, Philippe Joyet, Georg Wiegand, Robert Huber, and Claude Gaillardin. 2003. “Hyperthermostabilization of *Bacillus Licheniformis*  $\alpha$ -Amylase and Modulation of Its Stability over a 50°C Temperature Range.” *Protein Engineering, Design and Selection* 16(4):287–93.

Denardin, Cristiane Casagrande and Leila Picolli Silva. 2008. “Estrutura Dos Grânulos de Amido e Sua Relação Com Propriedades Físico-Químicas.” *Ciência Rural* 2:1–10.

- Dhawan, Samriti, Rajvinder Singh, Ramandeep Kaur, and Jagdeep Kaur. 2016. "A  $\beta$ -Mannanase from *Paenibacillus* Sp.: Optimization of Production and Its Possible Prebiotic Potential." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 63(5):669–78.
- Dheeran, Pratibha, Sachin Kumar, Yogesh K. Jaiswal, and Dilip K. Adhikari. 2010. "Characterization of Hyperthermostable  $\alpha$ -Amylase DHEERAN2010.Pdf." *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:1857–66.
- Edgar, Robert C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput." *Nucleic Acids Research* 32(5):1792–97.
- Ezeilo, Uchenna Regina, Iffah Izzati Zakaria, Fahrul Huyop, and Roswanira Abdul Wahab. 2017. "Enzymatic Breakdown of Lignocellulosic Biomass: The Role of Glycosyl Hydrolases and Lytic Polysaccharide Monooxygenases." *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 31(4):647–62.
- Fu, Xing, Qiaojuan Yan, Shaoqing Yang, Xinbin Yang, Yu Guo, and Zhengqiang Jiang. 2014. "An Acidic, Thermostable Exochitinase with  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase Activity from *Paenibacillus* Barengoltzii Converting Chitin to N-Acetyl Glucosamine.Pdf." *Biotechnology for Biofuels* 174(7):1–11.
- Fuwa, Hidetsugu. 1954. "A New Method for Microdetermination of Amylase Activity by the Use of Amylose as the Substrate." *Journal of Biochemistry Biochemistry* 41(5):583–603.
- Gama, Repson, J. Susan Van Dyk, and Brett I. Pletschke. 2015. "Optimisation of Enzymatic Hydrolysis of Apple Pomace for Production of Biofuel and Biorefinery Chemicals Using Commercial Enzymes." *3 Biotech* 5(6):1075–87.
- Ghio, Silvina, Ester M. Insani, Florencia E. Piccinni, Paola M. Talia, Daniel H. Grasso, and Eleonora Campos. 2016. "GH10 XynA Is the Main Xylanase

Identified in the Crude Enzymatic Extract of *Paenibacillus* Sp. A59 When Grown on Xylan or Lignocellulosic Biomass.” *Microbiological Research* 186–187:16–26.

Ghio, Silvina, Ornella Ontañon, Florencia E. Piccinni, Rubén Marrero Díaz de Villegas, Paola Talia, Daniel H. Grasso, and Eleonora Campos. 2018. “*Paenibacillus* Sp. A59 GH10 and GH11 Extracellular Endoxylanases: Application in Biomass Bioconversion.” *Bioenergy Research* 11(1):174–90.

Gonçalves, Geisa A. L., Yusaku Takasugi, Lili Jia, Yutaro Mori, Shuhei Noda, Tsutomu Tanaka, Hirofumi Ichinose, and Noriho Kamiya. 2015. “Synergistic Effect and Application of Xylanases as Accessory Enzymes to Enhance the Hydrolysis of Pretreated Bagasse.” *Enzyme and Microbial Technology* 72:16–24.

de Gonzalo, Gonzalo, Dana I. Colpa, Mohamed H. M. Habib, and Marco W. Fraaije. 2016. “Bacterial Enzymes Involved in Lignin Degradation.” *Journal of Biotechnology* 236:110–19.

Grady, Elliot Nicholas, Jacqueline MacDonald, Linda Liu, Alex Richman, and Ze Chun Yuan. 2016. “Current Knowledge and Perspectives of *Paenibacillus*: A Review.” *Microbial Cell Factories* 15(1):1–18.

Habu, J., I. Ndams, P. Wuyep, B. Ibeh, and J. Ameh. 2017. “Isolation and Biochemical Characterization of Anaerobic Bacteria Strains from Discarded Ruminant Contents of Nigerian Breed Cattle and Preliminary Evaluation of Its Suitability for Animal Feedstuff.” *Biotechnology Journal International* 17(2):1–13.

Haki, G. D. and S. K. Rakshit. 2003. “Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review.” *Bioresource Technology* 89(1):17–34.

Hamann, Pedro Ricardo V., Dayane L. Serpa, Amanda Souza Barreto da Cunha, Brenda R. de Camargo, Karen Ofuji Osiro, Marcelo Valle de Sousa, Carlos R. Felix, Robert N. G. Miller, and Eliane F. Noronha. 2015.

“Evaluation of Plant Cell Wall Degrading Enzyme Production by *Clostridium Thermocellum* B8 in the Presence of Raw Agricultural Wastes.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 105:97–105.

Haq, Ikram, Uzma Hameed, Zeeshan Mahmood, and Muhammad Mohsin Javed. 2012. “Solid State Fermentation for the Production of  $\alpha$ -Amylase by *Paenibacillus Amylolyticus*.” *Pakistan Journal of Botany* 44(SPL.ISS.1):341–46.

He, Zengguo, Duygu Kislal, Liwen Zhang, Chunhua Yuan, Kari B. Green-Church, and Ahmed E. Yousef. 2007. “Isolation and Identification of a *Paenibacillus Polymyxa* Strain That Coproduces a Novel Lantibiotic and Polymyxin.” *Applied and Environmental Microbiology* 73(1):168–78.

Hsu, Yen-michael S. and Carey-ann D. Burnham. 2014. “MALDI-TOF MS Identification of Anaerobic Bacteria: Assessment of Pre-Analytical Variables and Specimen Preparation Techniques.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 79(2):144–48.

Hu, Jinguang, Valdeir Arantes, Amadeus Pribowo, and Jack N. Saddler. 2013. “The Synergistic Action of Accessory Enzymes Enhances the Hydrolytic Potential of a ‘Cellulase Mixture’ but Is Highly Substrate Specific.” *Biotechnology for Biofuels* 6(1):1–12.

Huws, Sharon A., Christopher J. Creevey, Linda B. Oyama, and Itzhak Mizrahi. 2018. “Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future.” *Frontiers in Microbiology* 9(9):1–33.

Infante, Conceição, Geraldo Pereira, De Souza Neto, Carlos Frederico, De Souza Castro, Michele Michelin, Maria De Lourdes T. M. Polizeli, Edivaldo Ximenes, and Ferreira Filho. 2016. “Partial Purification and Characterization of a Thermostable  $\beta$ -Mannanase from *Aspergillus Foetidus*.” *Applied Sciences* (February).

- Ishaq, Suzanne L., Christina J. Kim, Doug Reis, and André Denis G. Wright. 2015. "Fibrolitic Bacteria Isolated from the Rumen of North American Moose (*Alces Alces*) and Their Use as a Probiotic in Neonatal Lambs." *PLoS ONE* 10(12):1–25.
- Isikgor, Furkan H. and C. Remzi Becer. 2015. "Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for the Production of Bio-Based Chemicals and Polymers." *Polymer Chemistry* 6(25):4497–4559.
- Jang, Kyoung Soon and Young Hwan Kim. 2018. "Rapid and Robust MALDI-TOF MS Techniques for Microbial Identification: A Brief Overview of Their Diverse Applications." *Journal of Microbiology* 56(4):209–16.
- Janusz, Grzegorz, Anna Pawlik, Justyna Sulej, Urszula Świdarska-Burek, Anna Jarosz-Wilkolazka, and Andrzej Paszczyński. 2017. "Lignin Degradation: Microorganisms, Enzymes Involved, Genomes Analysis and Evolution." *FEMS Microbiology Reviews* 41(6):941–62.
- Jiménez, Diego Javier, Maryam Chaib De Mares, and Joana Falcão Salles. 2018. "Temporal Expression Dynamics of Plant Biomass-Degrading Enzymes by a Synthetic Bacterial Consortium Growing on Sugarcane Bagasse." *Frontiers in Microbiology* 9(FEB):1–13.
- Johansen, Katja Salomon. 2016. "Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation." *Trends in Plant Science* 21(11):926–36.
- Jose, V. L., T. Appoorthy, R. P. More, and A. S. Arun. 2017. "Metagenomic Insights into the Rumen Microbial Fibrolitic Enzymes in Indian Crossbred Cattle Fed Finger Millet Straw." *AMB Express* 7(1):1–11.
- Kanchanadumkerng, Pimpikar, Makiko Sakka, Kazuo Sakka, and Chanpen Wiwat. 2017. "Characterization of Endoglucanase from *Paenibacillus* Sp. M33, a Novel Isolate from a Freshwater Swamp Forest." *Journal of Basic Microbiology* 57(2):121–31.

- Karimi, Keikhosro and Mohammad J. Taherzadeh. 2016. "A Critical Review of Analytical Methods in Pretreatment of Lignocelluloses : Composition , Imaging , and Crystallinity." *Bioresource Technology* 200:1008–18.
- Klein-Marcuschamer, Daniel, Piotr Oleskowicz-Popiel, Blake A. Simmons, and Harvey W. Blanch. 2012. "The Challenge of Enzyme Cost in the Production of Lignocellulosic Biofuels." *Biotechnology and Bioengineering* 109(4):1083–87.
- Ko, Chun Han, Wen Luen Chen, Chung Hong Tsai, Wann Neng Jane, Chia Chen Liu, and Jenn Tu. 2007. "Paenibacillus Campinasensis BL11: A Wood Material-Utilizing Bacterial Strain Isolated from Black Liquor." *Bioresource Technology* 98(14):2727–33.
- Ko, Chun Han, Chung Hung Tsai, Jenn Tu, Bing Yuan Yang, Dong Lin Hsieh, Wann Neng Jane, and Tzenge Lien Shih. 2011. "Identification of Paenibacillus Sp. 2S-6 and Application of Its Xylanase on Biobleaching." *International Biodeterioration and Biodegradation* 65(2):334–39.
- Krause, Denis O., Stuart E. Denman, Roderick I. Mackie, Mark Morrison, Ann L. Rae, Graeme T. Attwood, and Christopher S. McSweeney. 2003. "Opportunities to Improve Fiber Degradation in the Rumen: Microbiology, Ecology, and Genomics." *FEMS Microbiology Reviews* 27(5):663–93.
- Laemmli. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 225:846-847.
- LAEMMLI, U. K. 1970. "Laemmy." *Nature* 227(5259):680–85.
- Li, Ou, Cui Lu, Ao Liu, Liang Zhu, Pin Mei Wang, Chao Dong Qian, Xin Hang Jiang, and Xue Chang Wu. 2013. "Optimization and Characterization of Polysaccharide-Based Bioflocculant Produced by Paenibacillus Elgii B69 and Its Application in Wastewater Treatment." *Bioresource Technology* 134:87–93.
- Liu, Jingjing, Yu Liu, Feng Yan, Zhengqiang Jiang, Shaoqing Yang, and

- Qiaojuan Yan. 2016. "Gene Cloning , Functional Expression and Characterisation of a Novel Type I Pullulanase from *Paenibacillus Barendoltzii* and Its Application in Resistant Starch Production." *Protein Expression and Purification* 121:22–30.
- Liu, Xiangyang and Chandrakant Kokare. 2017. "Microbial Enzymes of Use in Industry." Pp. 267–98 in *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc.
- Liu, Xueqiang, Yu Liu, Zhengqiang Jiang, Haijie Liu, Shaoqing Yang, and Qiaojuan Yan. 2018. "Biochemical Characterization of a Novel Xylanase from *Paenibacillus Barendoltzii* and Its Application in Xylooligosaccharides Production from Corncobs." *Food Chemistry* 264(November 2017):310–18.
- Liu, Yu, Zhou Chen, Zhengqiang Jiang, Qiaojuan Yan, and Shaoqing Yang. 2017. "Biochemical Characterization of a Novel B-Galactosidase from *Paenibacillus Barendoltzii* Suitable for Lactose Hydrolysis and Galactooligosaccharides Synthesis." *International Journal of Biological Macromolecules* 104:1055–63.
- Lopes, A. M., E. X. Ferreira Filho, and L. R. S. Moreira. 2018. "An Update on Enzymatic Cocktails for Lignocellulose Breakdown." *Journal of Applied Microbiology* 125(3):632–45.
- Lopes Silva, Diogo Aparecido, Ivete Delai, Mary Laura Delgado Montes, and Aldo Roberto Ometto. 2014. "Life Cycle Assessment of the Sugarcane Bagasse Electricity Generation in Brazil." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32:532–47.
- Luft, Luciana, Juliana R. F. da Silva, Raquel C. Kuhn, and Marcio A. Mazutti. 2017. "Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass of the Rice Processing Industry." Pp. 111–33 in *Lignocellulosic Production and Industrial Applications*.
- Madden, Tom. 2013. "The BLAST Sequence Analysis Tool." *The NCBI*

*Handbook[Internet]* (Md):1–15.

- Malgas, Samkelo, Mariska Thoresen, J. Susan van Dyk, and Brett I. Pletschke. 2017. "Time Dependence of Enzyme Synergism during the Degradation of Model and Natural Lignocellulosic Substrates." *Enzyme and Microbial Technology* 103:1–11.
- Di Marco, Enzo, Pablo M. Soraire, Cintia M. Romero, Liliana B. Villegas, and María Alejandra Martínez. 2017. "Raw Sugarcane Bagasse as Carbon Source for Xylanase Production by *Paenibacillus* Species: A Potential Degradation of Agricultural Wastes." *Environmental Science and Pollution Research* 24(23):19057–67.
- Martinez, Daiana Gotardo. 2016. "Produção de Etanol de Segunda Geração a Partir de Resíduos Do Processamento Da Mandioca."
- Martinez, Daiana Gotardo and Armin Feiden. 2017. "Potencial Do Resíduo Do Processamento Da Mandioca Para Produção de Etanol de Segunda Geração." *Revista Brasileira de Energias Renováveis* 1:1–14.
- Miller, Gail Lorenz. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31(3):426–28.
- Min, H. K., Choi Y.J., J. K. Ha, K. K. Cho, Y. M. Kwon, Y. H. Chang, and S. S. Lee. 1994. "Isolation and Identification of Anaerobic Rumen Bacterium, *Actinomyces* Sp. 40 and Enzymatic Properties of  $\beta$ -1,4-Endoglucanase." *AJAS* 7(3):373–82.
- Mohanram, Saritha, Dolamani Amat, Jairam Choudhary, Anju Arora, and Lata Nain. 2013. "Novel Perspectives for Evolving Enzyme Cocktails for Lignocellulose Hydrolysis in Biorefineries." *Sustainable Chemical Processes* 1(1):15.
- Mondéjar, López Rubén, Daniela Zühlke, Tomáš Větrovský, Dörte Becher, Katharina Riedel, and Petr Baldrian. 2016. "Decoding the Complete Arsenal for Cellulose and Hemicellulose Deconstruction in the Highly



- Efficient Cellulose Decomposer *Paenibacillus* O199.” *Biotechnology for Biofuels* 9(1):1–12.
- Moreira, L. R. S. and E. X. F. Filho. 2016. “Insights into the Mechanism of Enzymatic Hydrolysis of Xylan.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(12):5205–14.
- Na, Han Beur, Won Kyeong Jung, Yu Seok Jeong, Hee Jung Kim, Sung Kyum Kim, Jungho Kim, Han Dae Yun, Jung Kul Lee, and Hoon Kim. 2015. “Characterization of a GH Family 8  $\beta$ -1,3-1,4-Glucanase with Distinctive Broad Substrate Specificity from *Paenibacillus* Sp. X4.” *Biotechnology Letters* 37(3):643–55.
- Nagaraja, T. G. 2016. “Microbiology of the Rumen.” Pp. 39–61 in *Rumenology*.
- Nanda, Sonil, Ramin Azargohar, Ajay K. Dalai, and Janusz A. Kozinski. 2015. “An Assessment on the Sustainability of Lignocellulosic Biomass for Biorefining.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50:925–41.
- Nardi, Roberta De, Giorgio Marchesini, Shucong Li, Ehsan Khafipour, Kees J. C. Plaizier, and Matteo Gianesella. 2016. “Metagenomic Analysis of Rumen Microbial Population in Dairy Heifers Fed a High Grain Diet Supplemented with Dicarboxylic Acids or Polyphenols.” *BMC Veterinary Research* 12(3):1–9.
- Negi, S. and K. Vibha. 2016. *Amylolytic Enzymes: Glucoamylases*. Elsevier B.V.
- Neumann, Anthony P., Paul J. Weimer, and Garret Suen. 2018. “A Global Analysis of Gene Expression in *Fibrobacter Succinogenes* S85 Grown on Cellulose and Soluble Sugars at Different Growth Rates.” *Biotechnology for Biofuels* 1–17.
- Nissilä, Marika E., Hanne P. Tähti, Jukka A. Rintala, and Jaakko A. Puhakka. 2011. “Thermophilic Hydrogen Production from Cellulose with Rumen Fluid Enrichment Cultures: Effects of Different Heat Treatments.” *International*

*Journal of Hydrogen Energy* 36(2):1482–90.

Obeng, Eugene M., Siti Nurul, Nadzirah Adam, Cahyo Budiman, Clarence M. Ongkudon, Ruth Maas, and Joachim Jose. 2017. “Lignocellulases : A Review of Emerging and Developing Enzymes , Systems , and Practices.” *Bioresources and Bioprocessing* 16(4):1–22.

Ogbonnaya, Nwokoro and Anthonia Odiase. 2015. “Studies on the Production of Alkaline Alpha-Amylase from *Bacillus Subtilis* CB-18.” *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 14(1):71–75.

Osiro, Karen O., Brenda R. de Camargo, Rachel Satomi, Pedro Ricardo V. Hamann, Jéssica Pinheiro Silva, Marcelo Valle de Sousa, Betania F. Quirino, Elaine N. Aquino, Carlos R. Felix, André Melro Murad, and Eliane F. Noronha. 2017. “Characterization of *Clostridium Thermocellum* (B8) Secretome and Purified Cellulosomes for Lignocellulosic Biomass Degradation.” *Enzyme and Microbial Technology* 97(November 2016):43–54.

Osman, Shariff, Masataka Satomi, and Kasthuri Venkateswaran. 2006. “*Paenibacillus Pasadenensis* Sp. Nov. and *Paenibacillus Barengoltzii* Sp. Nov., Isolated from a Spacecraft Assembly Facility.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(7):1509–14.

Pang, Jian, Zhan Ying Liu, Min Hao, Yong Feng Zhang, and Qing Sheng Qi. 2017. “An Isolated Cellulolytic *Escherichia Coli* from Bovine Rumen Produces Ethanol and Hydrogen from Corn Straw.” *Biotechnology for Biofuels* 10(1):1–10.

Pason, Patthra, Khin Lay Kyu, and Khanok Ratanakhanokchai. 2006. “*Paenibacillus Curdlanolyticus* Strain B-6 Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme System That Degrades Insoluble Polysaccharides.” *Applied and Environmental Microbiology* 72(4):2483–90.

Patel, Anil Kumar, Reeta Rani Singhania, and Ashok Pandey. 2017.

“Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes.” Pp. 13–41 in *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc.

Patel, Dishita D., Amrutlal K. Patel, Nidhi R. Parmar, Tejas M. Shah, Jethabhai B. Patel, Paresh R. Pandya, and Chaitanya G. Joshi. 2014. “Microbial and Carbohydrate Active Enzyme Profile of Buffalo Rumen Metagenome and Their Alteration in Response to Variation in the Diet.” *Gene* 545(1):88–94.

Pavani, Claudio Damasceno. 2017. “Potencial Biotecnológico Do Metageoma de Rúmen Bovino Da Raça Nelore (Bos Tauros Indicus), Visando à Desconstrução Da Biomassa Vegetal.”

Peixoto, Thamires da Silva and Sibelly Resch. 2018. “Resíduos de Mandioca: Um Estudo Sobre a Destinação Da Massa de Mandioca Pelas Fecularias Brasileiras.” Pp. 1–18 in *II encontro Iternacional de Gestão, desenvolvimento e inovação*.

Price, MN., PS. Dehal, and AP. Arkin. 2010. “FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments.” *PLoS ONE* 5(3):170–76.

Puniya, Anil Kumar, Rameshwar Singh, and Devki Nandan Kamra. 2013. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*.

Puniya, Anil Kumar, Rameshwar Singh, and Devki Nandan Kamra. 2015. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*.

Rajesh, Thangamani, Yong Hyun Kim, Yong Keun Choi, Jong Min Jeon, Hyun Joong Kim, Sung Hee Park, Hyung Yeon Park, Kwon Young Choi, Hyungsup Kim, Hyung Joo Kim, Sang Hyun Lee, and Yung Hun Yang. 2013. “Identification and Functional Characterization of an  $\alpha$ -Amylase with Broad Temperature and PH Stability from *Paenibacillus* Sp.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170(2):359–69.

Ramya, Mohandass, Bhaskar Anusha, and S. Kalavathy. 2008. “Decolorization and Biodegradation of Indigo Carmine by a Textile Soil Isolate

Paenibacillus Larvae.” *Biodegradation* 19(2):283–91.

Ratanakhanokchai, Khanok, Rattiya Waeonukul, Patthra Pason, Chakrit Tachaapaikoon, Khin Lay, Kazuo Sakka, Akihiko Kosugi, and Yutaka Mori. 2013. “Paenibacillus Curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization.” *Biomass Now - Cultivation and Utilization* 394:369–94.

Rigoldi, Federica, Stefano Donini, Alberto Redaelli, Emilio Parisini, and Alfonso Gautieri. 2018. “Review: Engineering of Thermostable Enzymes for Industrial Applications.” *APL Bioengineering* 2(1):011501.

Ruiz, Héctor A., Rosa M. Rodríguez-Jasso, Ayerim Hernandez-Almanza, Juan C. Contreras-Esquivel, and Cristóbal N. Aguilar. 2016. *Pectinolytic Enzymes*. Elsevier B.V.

Saleem, Fozia, Souhaila Bouatra, An Chi Guo, Nikolaos Psychogios, Rupasri Mandal, Suzanna M. Dunn, Burim N. Ametaj, and David S. Wishart. 2013. “The Bovine Ruminant Fluid Metabolome.” *Metabolomics* 9(2):360–78.

Sari, Wenny Novita, Safika, Darmawi, and Yudha Fahrimal. 2017. “Isolation and Identification of a Cellulolytic Enterobacter from Rumen of Aceh Cattle.” *Veterinary World* 10(12):1515–20.

Sarian, Fean D., Rachel M. Van Der Kaaij, Slavko Kralj, Dirk Jan Wijbenga, Doede J. Binnema, Marc J. E. C. Van Der Maarel, and Lubbert Dijkhuizen. 2012. “Enzymatic Degradation of Granular Potato Starch by Microbacterium Aurum Strain B8.A.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(2):645–54.

Satoh, E., Y. Niimura, T. Uchimura, M. Kozaki, and K. Komagata. 1993. “Molecular Cloning and Expression of Two  $\alpha$ -Amylase Genes from Streptococcus Bovis 148 in Escherichia Coli.” *Applied and Environmental Microbiology* 59(11):3669–73.

Seo, Dong Jun, Yong Sung Lee, Kil Yong Kim, and Woo Jin Jung. 2016.

“Antifungal Activity of Chitinase Obtained from *Paenibacillus Ehimensis* MA2012 against Conidial of *Collectotrichum Gloeosporioides* in Vitro.” *Microbial Pathogenesis* 96:10–14.

Shahid, Faiza, Shah Ali Ul Qader, Talat Yasmeen Mujahid, Afsheen Aman, and Nayyar Jahan. 2017. “Utilization of Agro Waste Pectin for the Production of Industrially Important Polygalacturonase.” *Heliyon* 3(6):1–13.

Shi, Ran, Yu Liu, Qing Mu, Zhengqiang Jiang, and Shaoqing Yang. 2016. “Biochemical Characterization of a Novel L-Asparaginase from *Paenibacillus Barengoltzii* Being Suitable for Acrylamide Reduction in Potato Chips and Mooncakes.” *International Journal of Biological Macromolecules*.

Shrotri, Abhijit, Hirokazu Kobayashi, and Atsushi Fukuoka. 2017. *Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals*. 1st ed. Elsevier Inc.

Shuddhodana, S., Munishwar N. Gupta, and Virendra S. Bisaria. 2018. “Stable Cellulolytic Enzymes and Their Application in Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass.” *Biotechnology Journal* 13(6):1–10.

Shukla, Pratyosh and Vishal Kumar. 2016. “Thermostable Microbial Xylanases for Pulp and Paper Industries: Trends , Applications and Further Perspectives.” *World Journal Microbiology and Biotechnology* 32(34):1–10.

Silva, Luísa De M. B., Tainah C. Gomes, Sadia F. Ullah, Alonso R. P. Ticona, Pedro R. V Hamann, and Eliane F. Noronha. 2019. “Biochemical Properties of Carbohydrate-Active Enzymes Synthesized by *Penicillium Chrysogenum* Using Corn Straw as Carbon Source.” *Waste and Biomass Valorization* (6):1–12.

Sindhu, R, P. Binod, and A. Pandey. 2016. “ $\alpha$ -Amylases.” Pp. 3–24 in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*.

- Sindhu, Raveendran, Parameswaran Binod, and Ashok Pandey. 2016. "Bioresource Technology Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass – An Overview." *Bioresource Technology* 199:76–82.
- Singhania, Reeta Rani, Anil Kumar Patel, Leya Thomas, Mandavi Goswami, Balendu Giri, and Ashok Pandey. 2015. "Industrial Enzymes." Pp. 473–96 in *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Vol. 1. Elsevier B.V.
- Sitdhipol, Jaruwat, Jayoung Paek, Yeseul Sin, In Soon Park, Tanatip Thamacharoensuk, Bhusita Wannissorn, Somboon Tanasupawat, and Young Hyo Chang. 2016. "Paenibacillus Cathormii Sp. Nov., Isolated from Tree Bark." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(3):1187–92.
- Snelling, Timothy J. and R. John Wallace. 2017. "The Rumen Microbial Metaproteome as Revealed by SDS-PAGE." *BMC Microbiology* 17(1):9.
- De Souza Moreira, Leonora Rios, Marcela De Carvalho Campos, Pedro Henrique Vieira Martins De Siqueira, Luciano Paulino Silva, Carlos André Ornelas Ricart, Pedro Alves Martins, Rayner Myr Lautherjung Queiroz, and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho. 2013. "Two  $\beta$ -Xylanases from *Aspergillus Terreus*: Characterization and Influence of Phenolic Compounds on Xylanase Activity." *Fungal Genetics and Biology* 60:46–52.
- Vaaje-Kolstad, Gustav, Zarah Forsberg, Jennifer SM Loose, Bastien Bissaro, and Vincent GH Eijsink. 2017. "Structural Diversity of Lytic Polysaccharide Monooxygenases." *Current Opinion in Structural Biology* 44:67–76.
- Vaz, S. 2017. "Rumo a Uma Química Renovável Brasileira a Partir Da Biomassa Vegetal." *Revista Virtual de Química* 9(1):238–47.
- Veloo, A. C. M., E. D. de Vries, H. Jean-Pierre, U. S. Justesen, T. Morris, E. Urban, I. Wybo, A. J. van Winkelhoff, T. Morris, H. Shah, H. Jean-Pierre, U. S. Justesen, E. Nagy, E. Urban, M. Kostrzewa, A. Veloo, A. J. van Winkelhoff, and A. W. Friedrich. 2016. "The Optimization and Validation of

- the Biotyper MALDI-TOF MS Database for the Identification of Gram-Positive Anaerobic Cocci.” *Clinical Microbiology and Infection* 22(9):793–98.
- Virmond, E., J. D. Rocha, R. F. P. M. Moreira, and H. J. Jose. 2013. “Valorization of Agroindustrial Solid Residues and Residues from Biofuel Production Chains by Thermochemical Conversion: A Review, Citing Brazil as a Case Study.” *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 30(2):197–229.
- Walsh, Paul, Cintia Palu, Brian Kelly, Brendan Lawor, Jyotsna Talreja Wassan, Huiru Zheng, and Haiying Wang. 2017a. “A Metagenomics Analysis of Rumen Microbiome.” Pp. 2077–82 in *International Conference on Bioinformatics and Biomedicine*.
- Walsh, Paul, Cintia Palu, Brian Kelly, Brendan Lawor, Jyotsna Talreja Wassan, Huiru Zheng, and Haiying Wang. 2017b. “A Metagenomics Analysis of Rumen Microbiome.” Pp. 1–6 in *International Conference on Bioinformatics and Biomedicine*.
- Wang, Lingling, Ayat Hatem, Umit V. Catalyurek, Mark Morrison, and Zhongtang Yu. 2013. “Metagenomic Insights into the Carbohydrate-Active Enzymes Carried by the Microorganisms Adhering to Solid Digesta in the Rumen of Cows.” *PLoS ONE* 8(11):1–11.
- Wang, Mingyu, Zhonghai Li, Xu Fang, Lushan Wang, and Yinbo Qu. 2012. “Cellulolytic Enzyme Production and Enzymatic Hydrolysis For Second-Generation Bioethanol Production.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 128(2):1–24.
- Wang, Shihui, Chaoyang Lin, Yun Liu, Zhicheng Shen, Jenasia Jeyaseelan, and Wensheng Qin. 2016. “Characterization of a Starch-Hydrolyzing  $\alpha$ -Amylase Produced by *Aspergillus Niger* WLB42 Mutated by Ethyl Methanesulfonate Treatment.” *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 7(1):1–10.

- Weimer, Paul J., James B. Russell, and Richard E. Muck. 2009. "Lessons from the Cow: What the Ruminant Animal Can Teach Us about Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 100(21):5323–31.
- Wu, Hong Sheng, Yang Wang, Chao Yong Zhang, Wei Bao, Ning Ling, Dong Yang Liu, and Qi Rong Shen. 2009. "Growth of in Vitro *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Niveum* in Chemically Defined Media Amended with Gallic Acid." *Biological Research* 42(3):297–304.
- Yang, Bin, Ziyu Dai, Shi-You Ding, and Charles E. Wyman. 2014. "Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass." *Biofuels* 2:421–49.
- Yang, Yi, Jinshui Yang, Jiawen Liu, Ruonan Wang, Liang Liu, Fengqin Wang, and Hongli Yuan. 2018. "The Composition of Accessory Enzymes of *Penicillium Chrysogenum* P33 Revealed by Secretome and Synergistic Effects with Commercial Cellulase on Lignocellulose Hydrolysis." *Bioresource Technology* 257(February):54–61.
- Yanke, L. J. and K. J. Cheng. 1998. "A Method for the Selective Enumeration and Isolation of Ruminal *Lactobacillus* and *Streptococcus*." *Letters in Applied Microbiology* 26(4):248–52.
- Zbinden, R., G. V. Bloemberg, E. C. Bottger, M. Hombach, K. Brodner, and B. Schulthess. 2013. "Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Comparison of Different Preparation Methods and Implementation of a Practical Algorithm for Routine Diagnostics." *Journal of Clinical Microbiology* 51(6):1834–40.
- Zeng, Yining, Shuai Zhao, Shihui Yang, and Shi You Ding. 2014. "Lignin Plays a Negative Role in the Biochemical Process for Producing Lignocellulosic Biofuels." *Current Opinion in Biotechnology* 27:98–45.
- Zhang, Bin, Yu Liu, Hongye Yang, Qiaojuan Yan, Shaoqing Yang, Zheng-qiang



Jiang, and Shaozhen Li. 2017. "Biochemical Properties and Application of a Novel B-1,3-1,4-Glucanase from *Paenibacillus Barengoltzii*." *Food Chemistry* 234(4):68–75.

## ANEXO I

### Artigos Publicados

1. ULLAH, SADIA FIDA; SOUZA, AMANDA ARAÚJO; HAMANN, PEDRO RICARDO V.; TICONA, ALONSO ROBERTO P.; OLIVEIRA, GIDEANE M.; BARBOSA, JOAO ALEXANDRE R.G.; FREITAS, SONIA M.; NORONHA, ELIANE FERREIRA. Structural and functional characterization of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. International journal of biological macromolecules, v. 127, p. 385-395, 2019.
2. SILVA, LUÍSA DE M. B.; GOMES, TAINAH C.; ULLAH, SADIA F.; TICONA, ALONSO R. P.; HAMANN, PEDRO R. V.; NORONHA, ELIANE F. Biochemical Properties of Carbohydrate-Active Enzymes Synthesized by *Penicillium chrysogenum* Using Corn Straw as Carbon Source. Waste and Biomass Valorization, v. 1, p. 1, 2019.

## ANEXO II

### ***Paenibacillus barengoltzii* strain A1\_50L2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

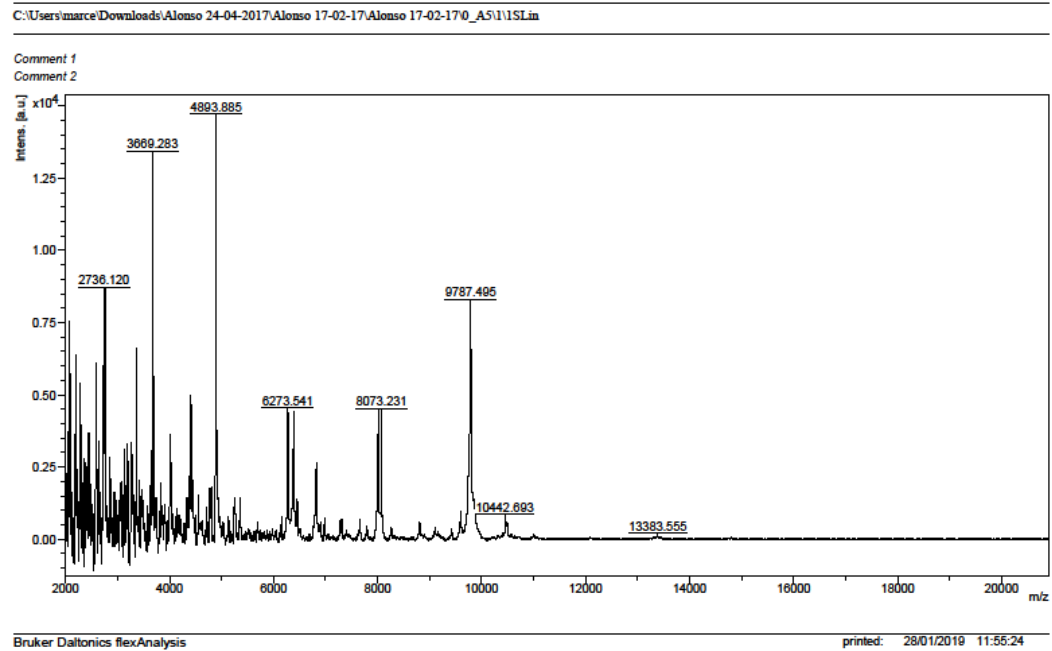
GenBank: MK243683

GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCGTAAGACTGGGAGAACTACCGGAAACGGTA  
GCTAATACCGGATACGCAAGTCTCTCGCATGAGGGGCTTGGGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTT  
ACGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGTTAGAGTAACTGCTAACGGAGT  
GACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGG  
CGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTGTTTAAGTCTGGTGTAA  
TCCTGGGGCTCAACCCGGGTCGCACTGGAACTGGGCAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG  
AATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT  
CTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA  
GTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACA  
CATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGNGGAC  
CCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGNTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  
CATCCCCCTGACCGGTGNCAGAGATGTRCCTTNTCCTTCGGGACAGGGGAGACAGGTGGTGCATG  
GTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGACTTTA  
GTTGCCAGCAAGTAAGTTGGGCACTCTAGAGTACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAACAATGGCCGGTACAAC  
GGGAAGCGAAGGAGCGATCTGGAGCGAATCCTTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGC  
AACTCGCCTGCATGAAGTCGGGAATGCTAGTAATCGCGGATCAG

# ANEXO III

## Espectros de massa gerados a partir da análise de MALDI-TOF biotyper

Amostra: A1\_37L1

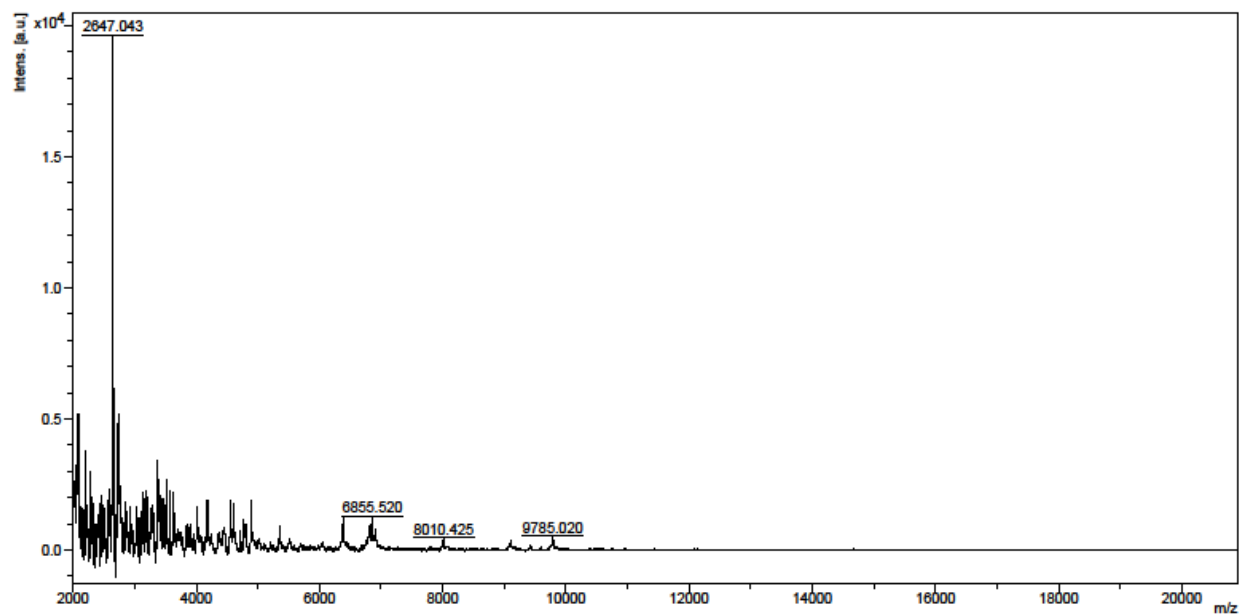


Amostra: A1\_37L2

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_A71\1SLin

Comment 1

Comment 2



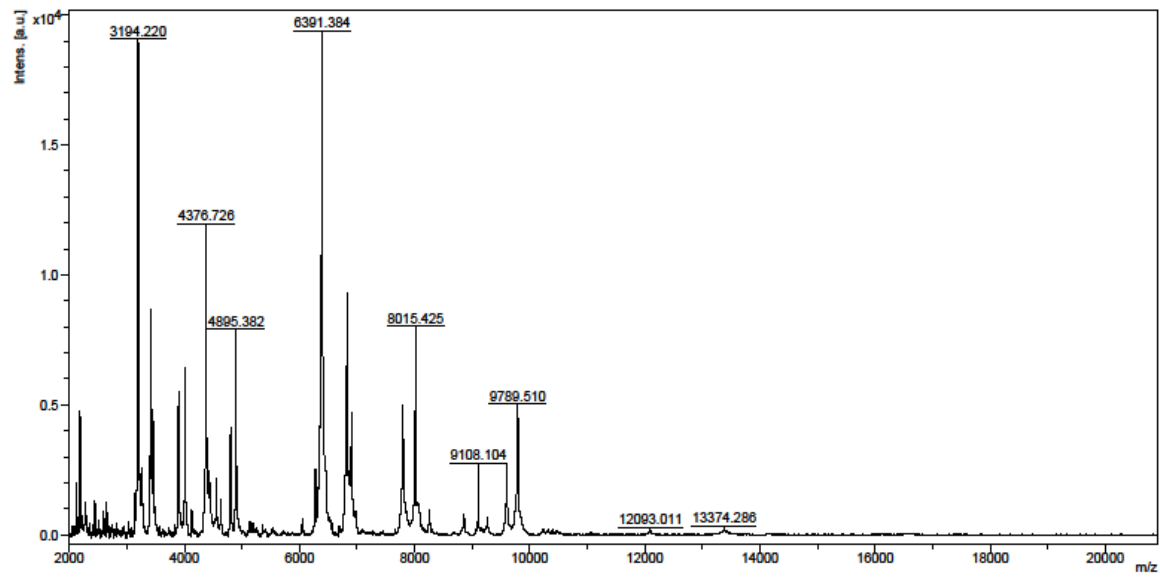
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 11:58:34

Amostra: A1\_37L3

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso Bac Extraido - 030320170\_C6\1115Lin

Comment 1  
Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

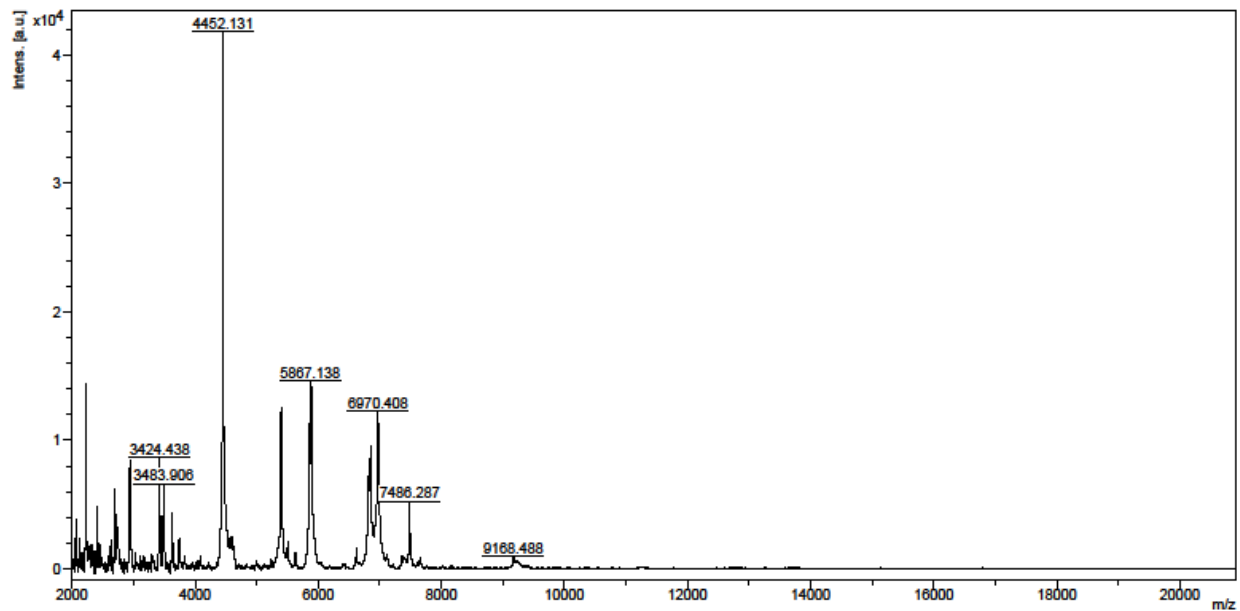
printed: 28/01/2019 12:39:16

Amostra: A1\_37L4

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_B9\1\1SLin

Comment 1

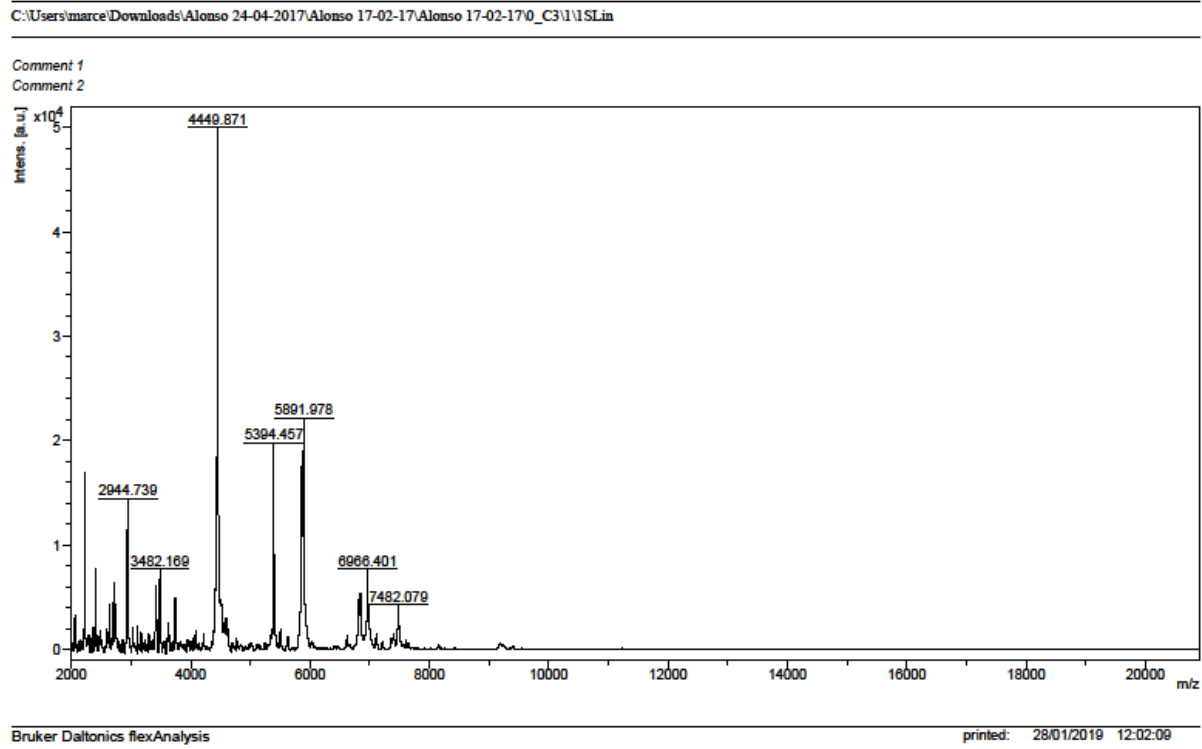
Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:00:50

Amostra: A1\_37L5



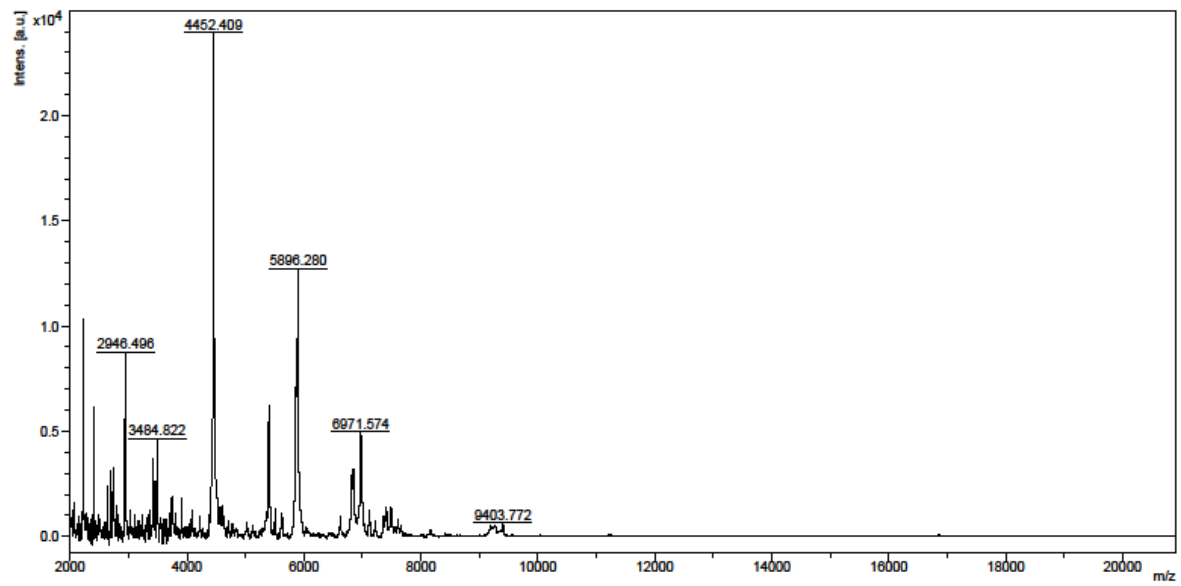


Amostra: A1\_37L6

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_C7\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



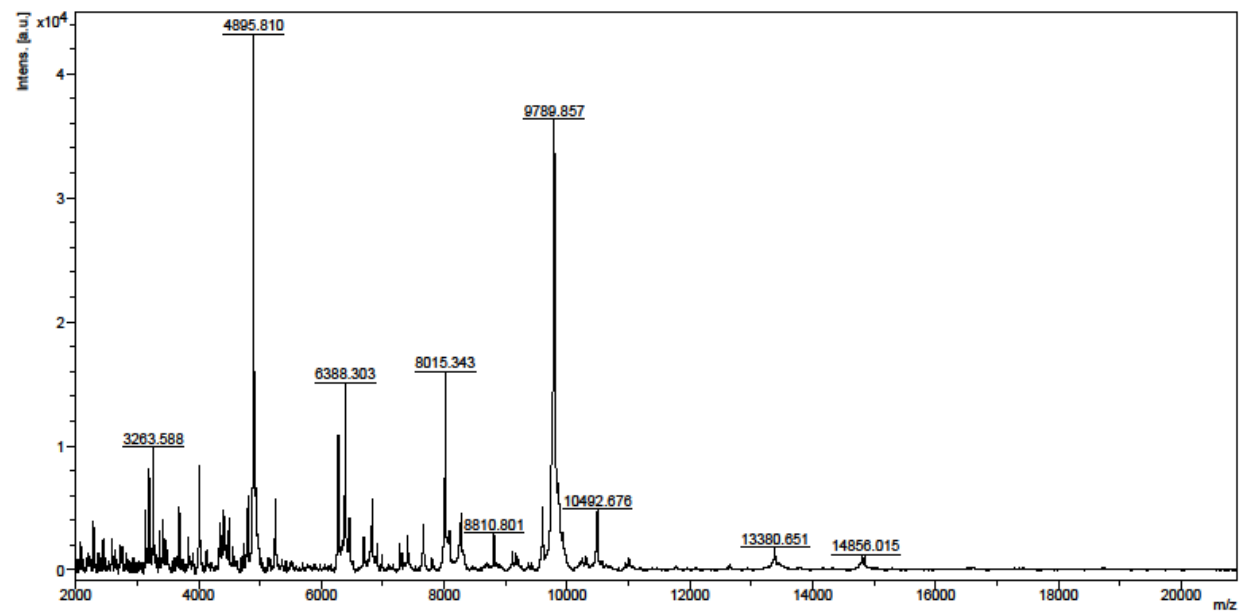
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:03:32

Amostra: A1\_37S5

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\_0\_B5\1\1SLin

Comment 1  
Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

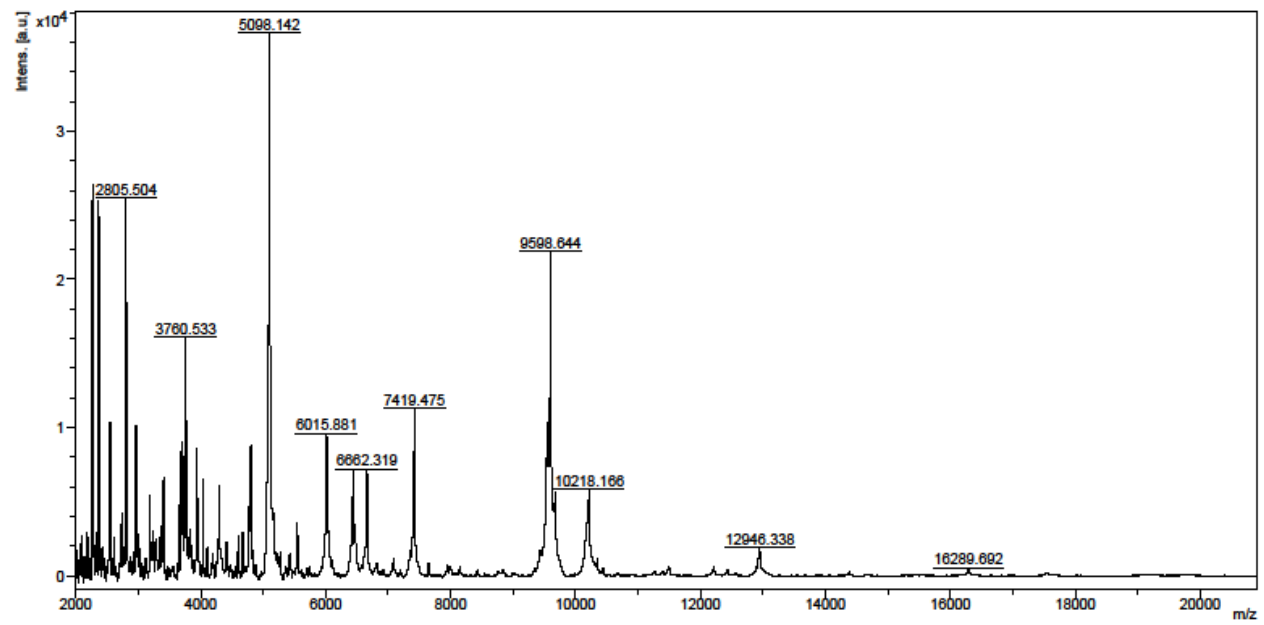
printed: 28/01/2019 11:58:43

Amostra A1\_50L1

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\_0\_F7\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



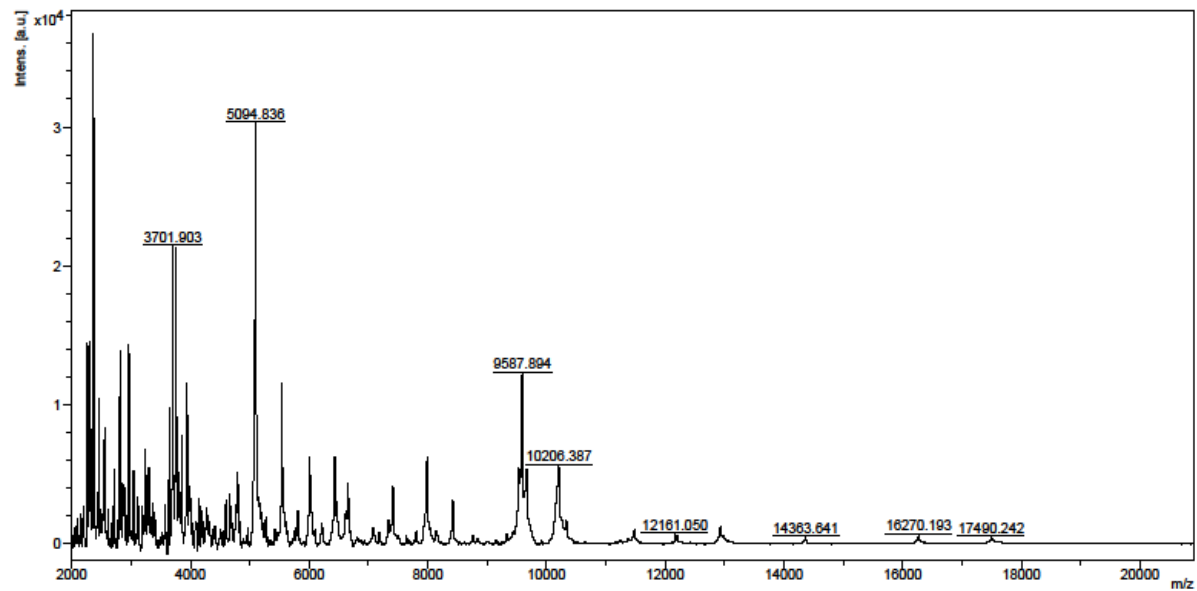
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:12:34

Amostra: A1\_50L2

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_G1\1\1SLin

Comment 1  
Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

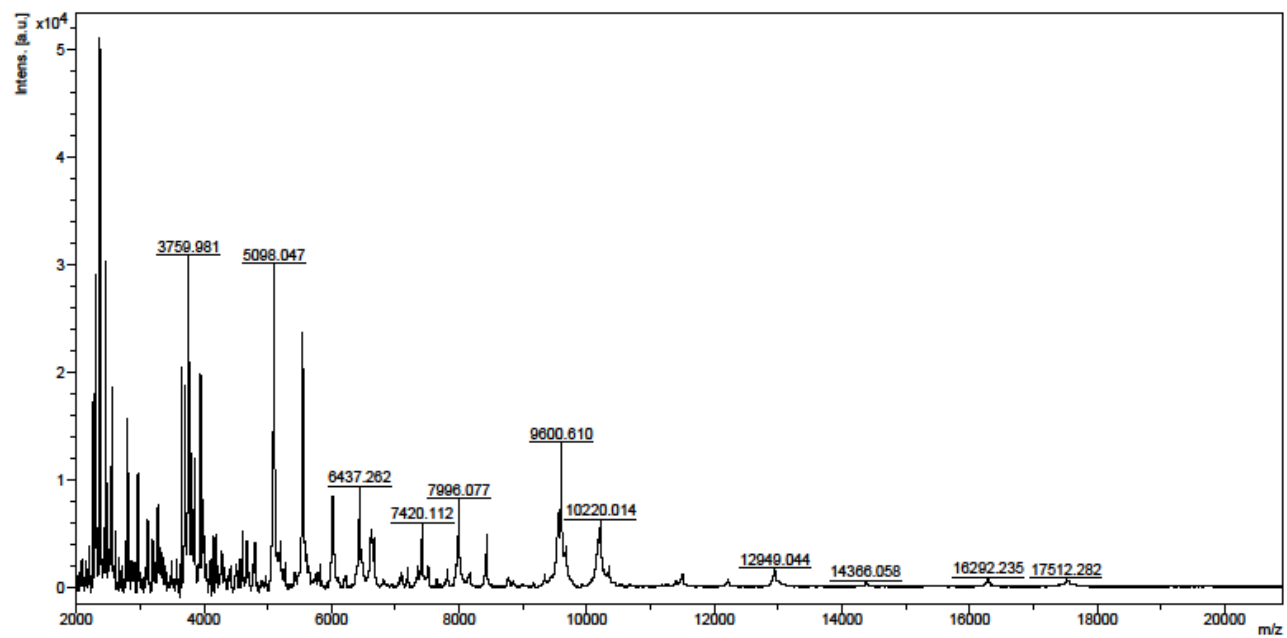
printed: 28/01/2019 12:14:14

Amostra: A1\_50L3

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_G9\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

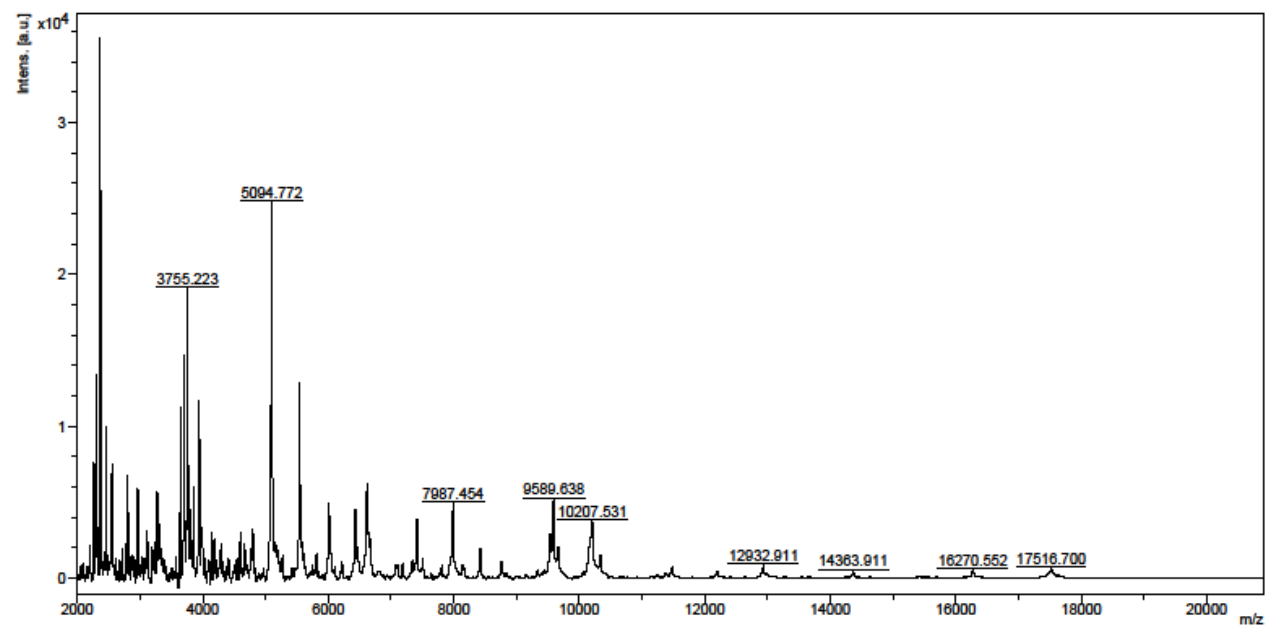
printed: 28/01/2019 12:15:09

Amostra: A1\_50L4

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_H4\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

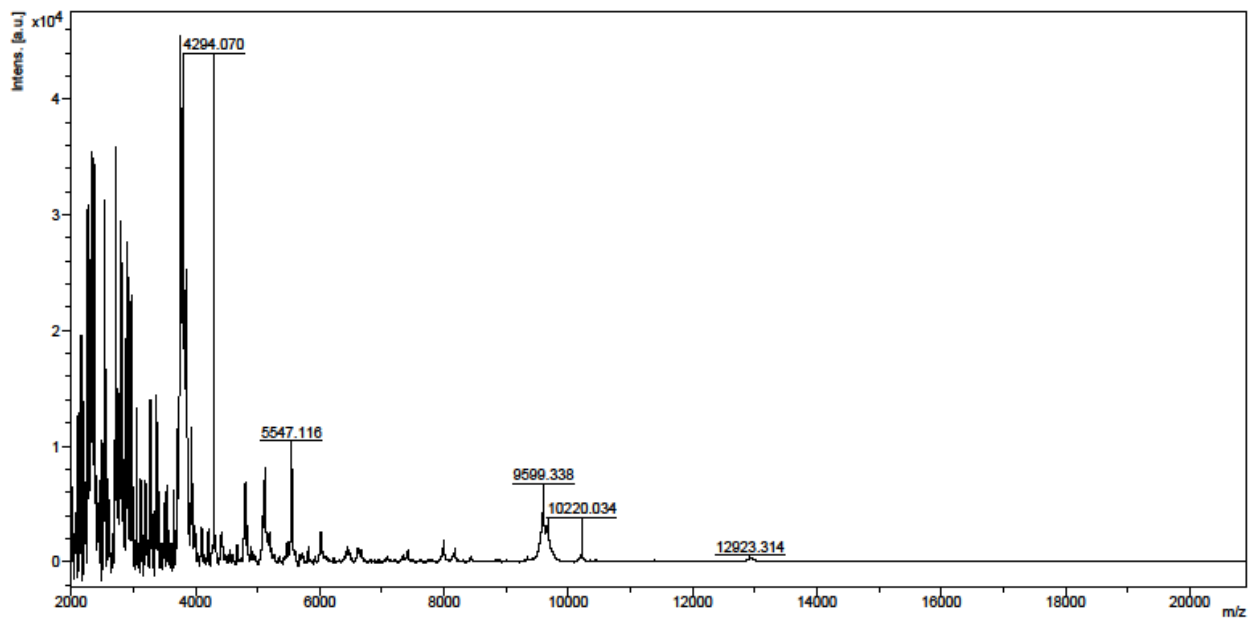
printed: 28/01/2019 12:16:14

Amostra: A1\_50S2

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-170\_D611\1SLin

Comment 1

Comment 2



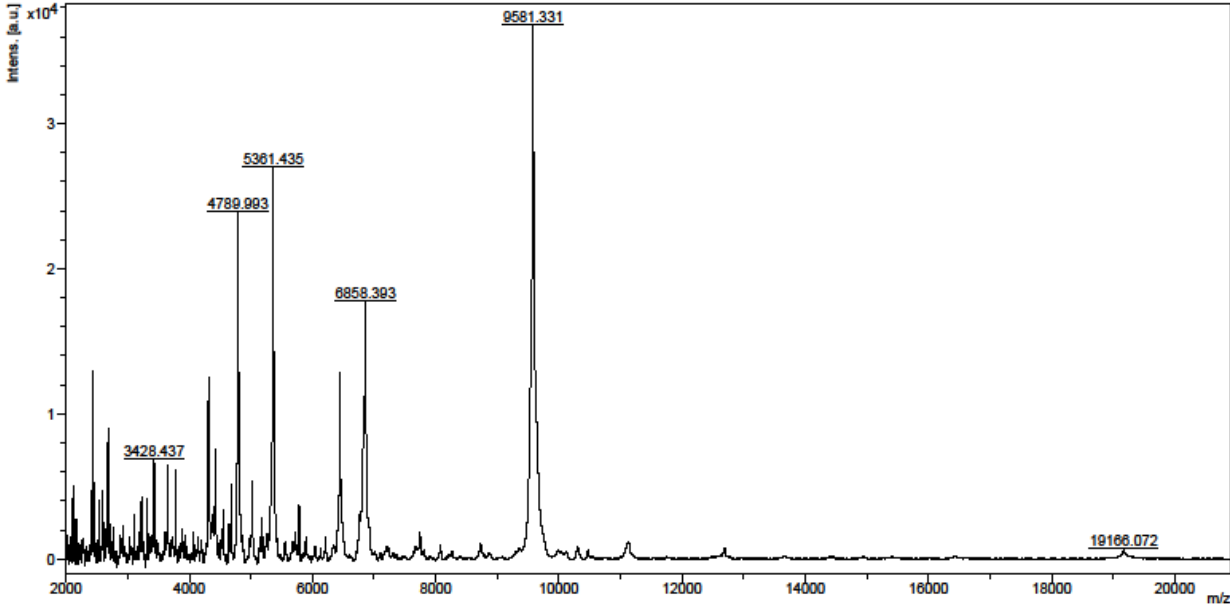
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:05:01

Amostra: A1\_50S3

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_D9\1\1SLin

Comment 1  
Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:06:35

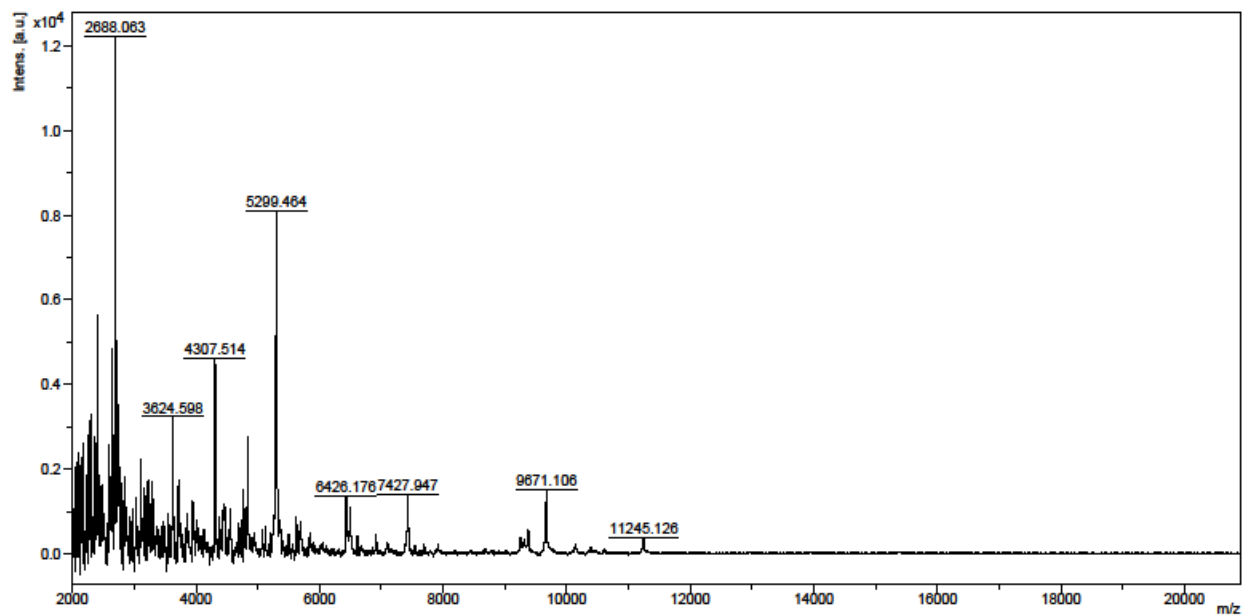


Amostra: A1\_50S4

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_E3\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

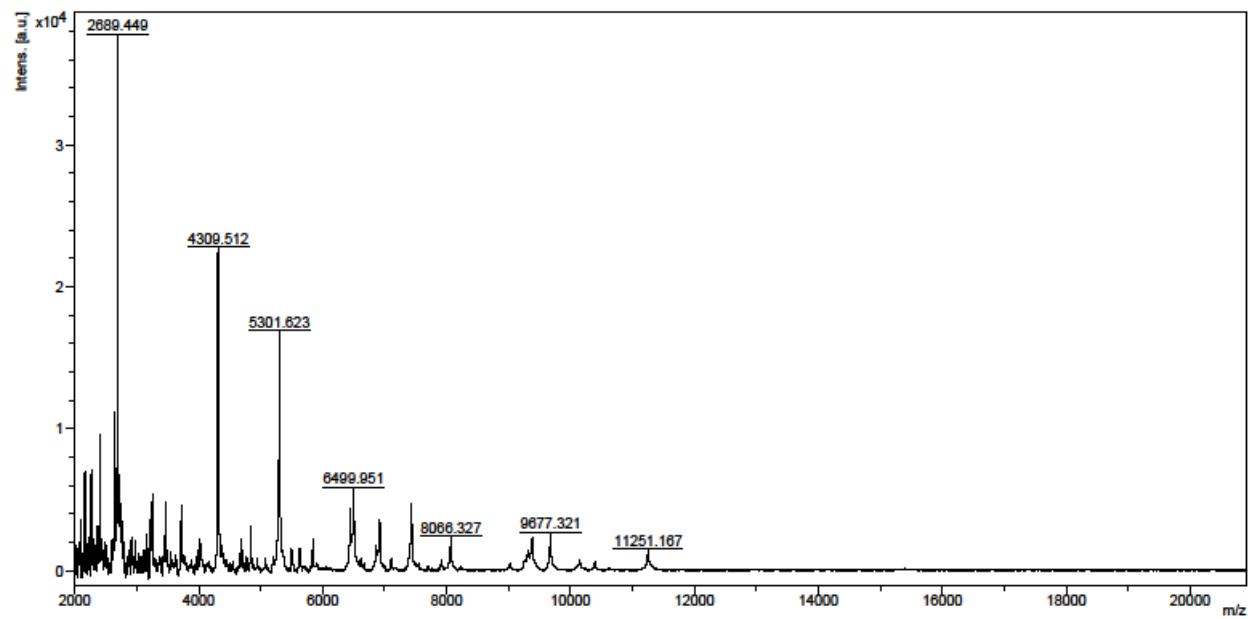
printed: 28/01/2019 12:07:56

Amostra: A1\_50S5

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_E711\1SLin

Comment 1

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

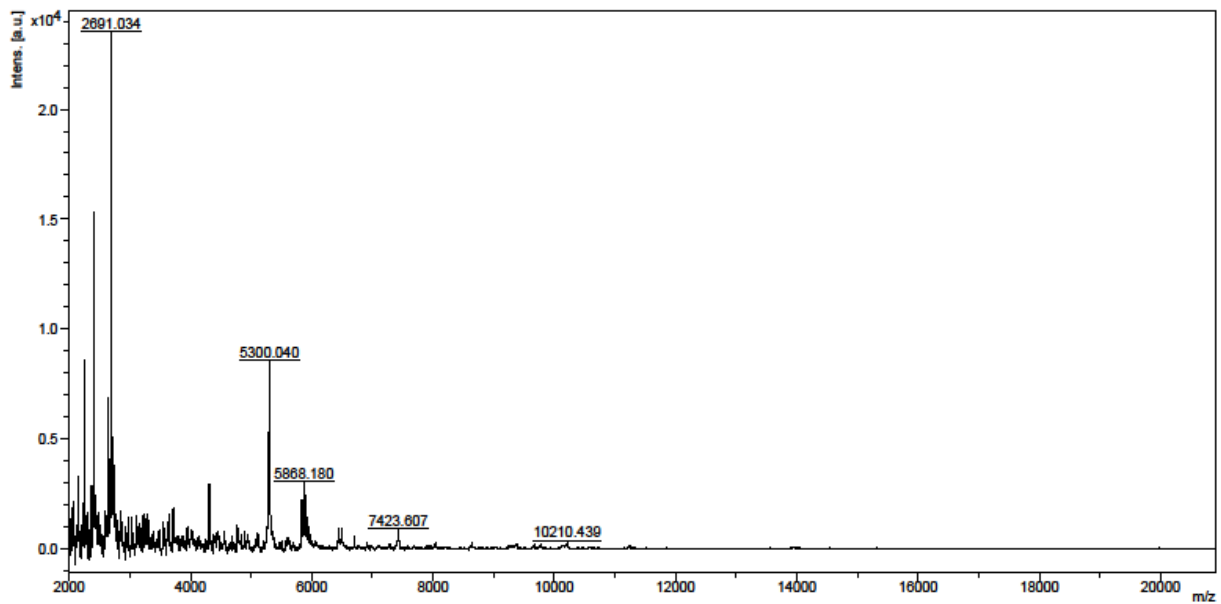
printed: 28/01/2019 12:09:00

Amostra: A1\_50S6

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso 17-02-17\Alonso 17-02-17\0\_F4\1\ISLin

Comment 1

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

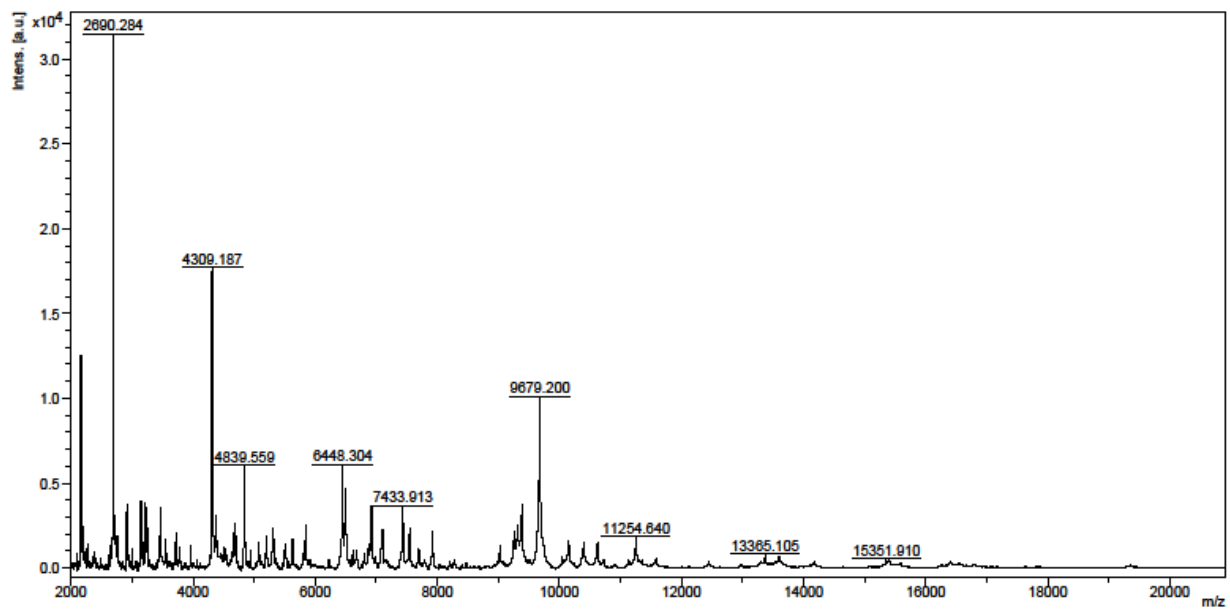
printed: 28/01/2019 12:11:32

Amostra: A1\_50S7

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso Bac Extraido - 03032017\0\_E9\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

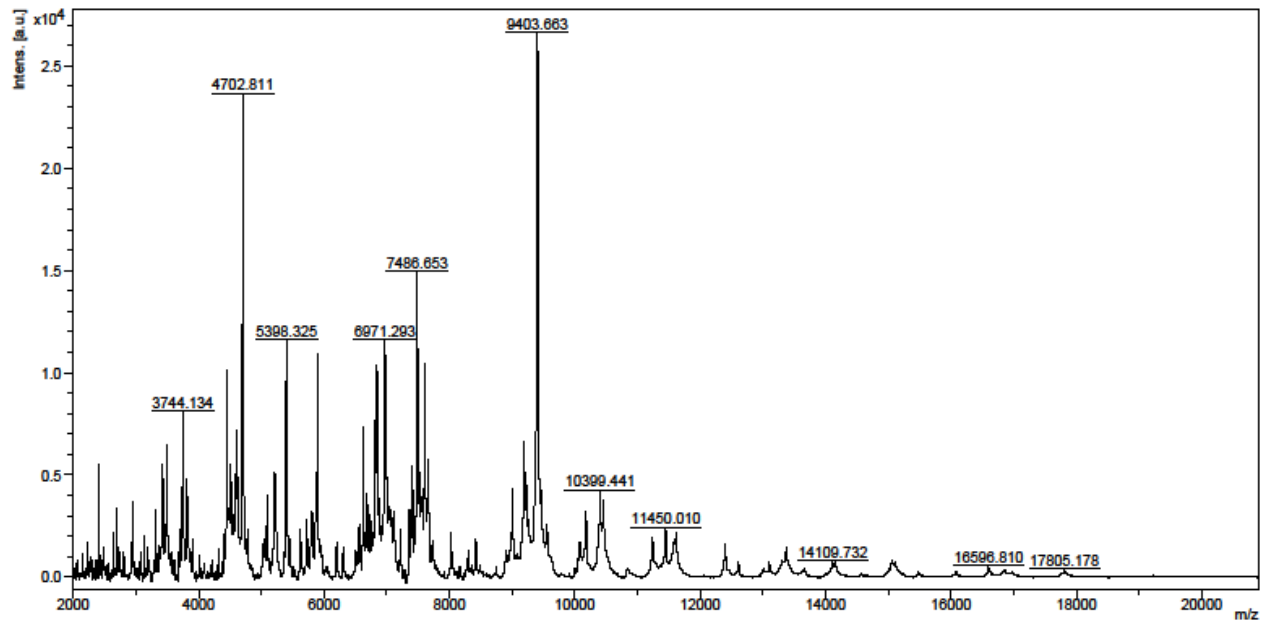
printed: 28/01/2019 12:48:15

Amostra: A2\_37L5

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso Bac Extraido - 030320170\_F71\1SLin

Comment 1

Comment 2

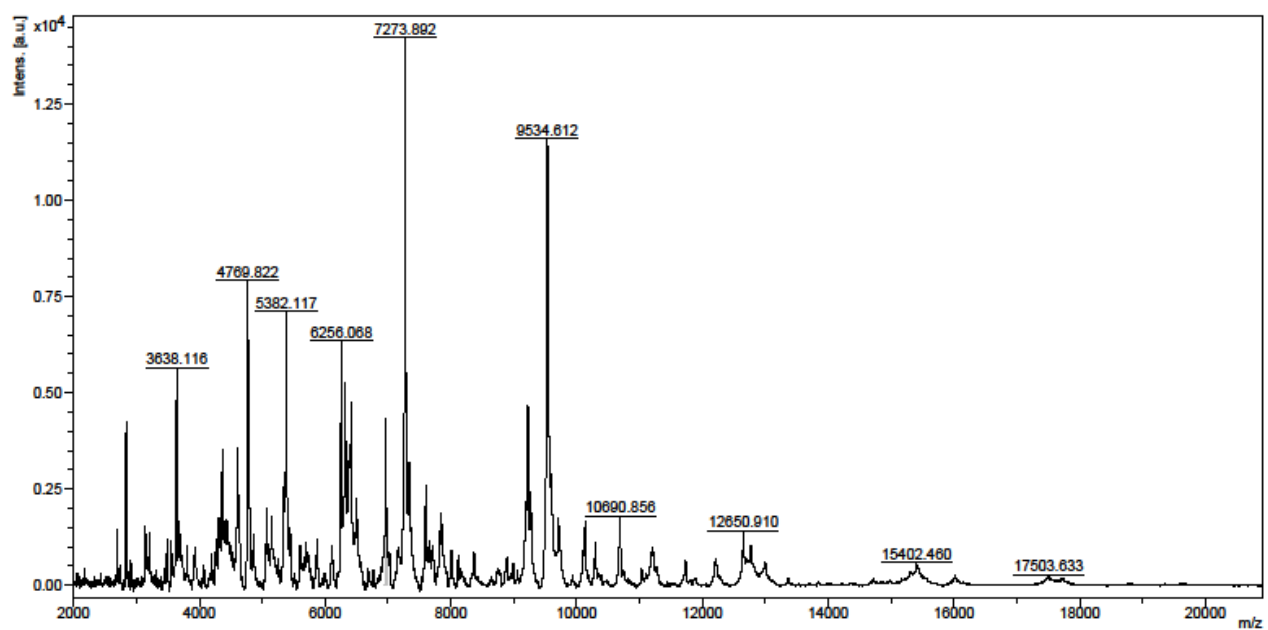


Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:41:21

Amostra: C1\_37L

Comment 1  
Comment 2



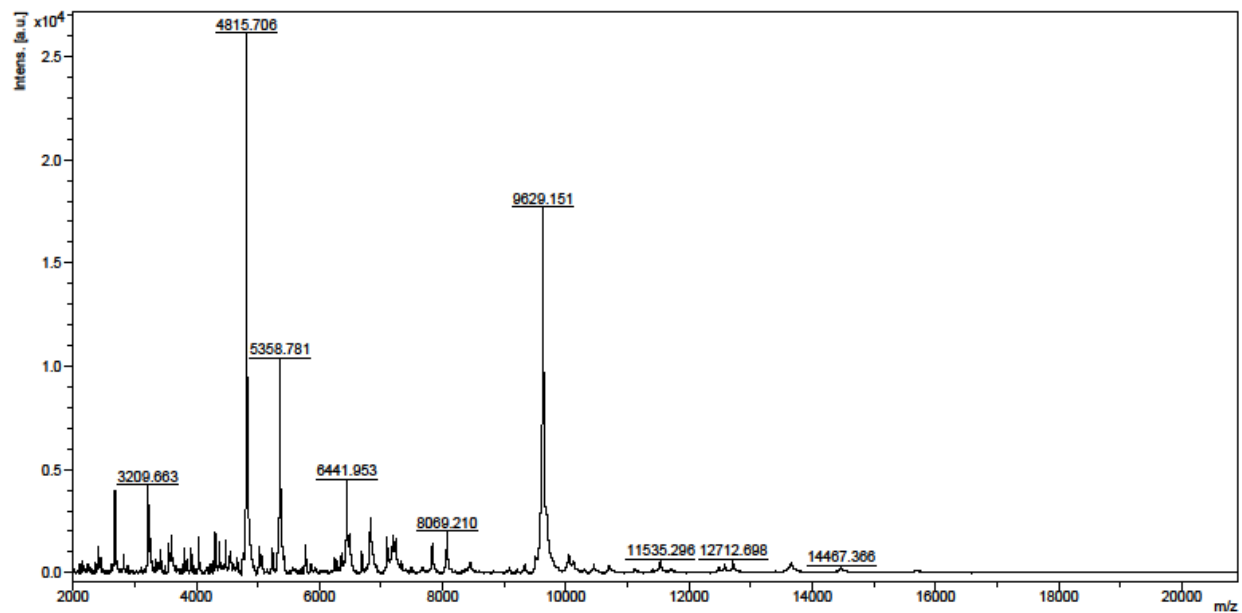
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:29:08

Amostra: C1\_60L6

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso Bac Extraido - 03032017\0\_G4\1\SLin

Comment 1  
Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

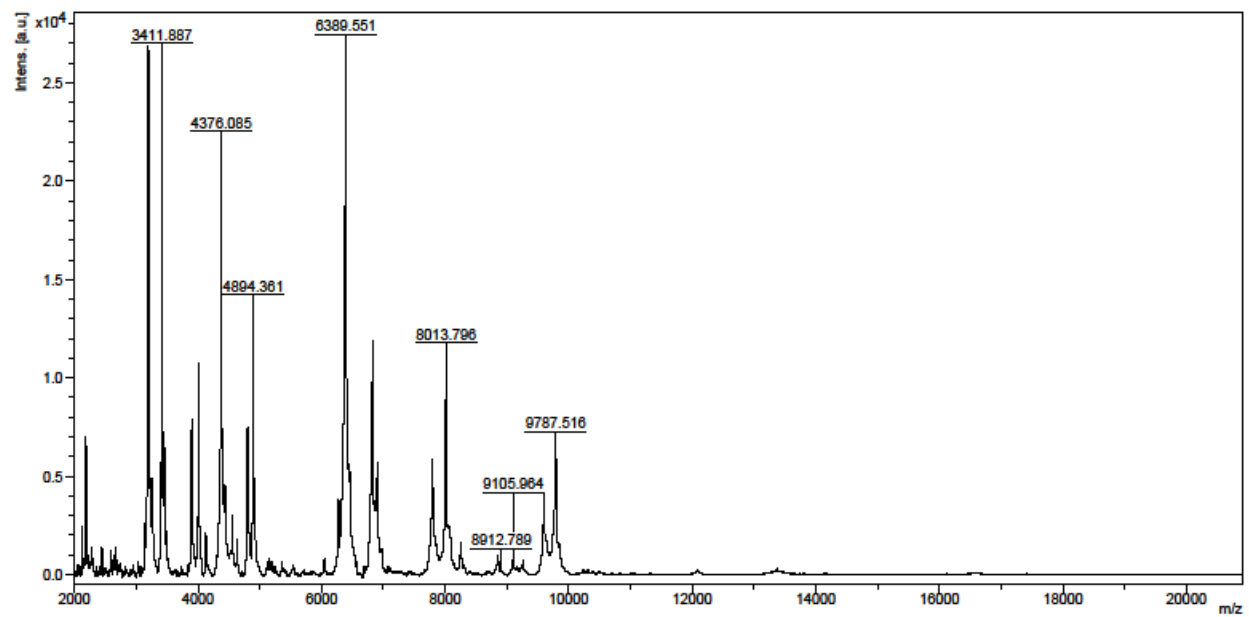
printed: 28/01/2019 12:35:19

Amostra: C1\_60L8

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso Bac Extraido - 030320170\_E5\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:37:49

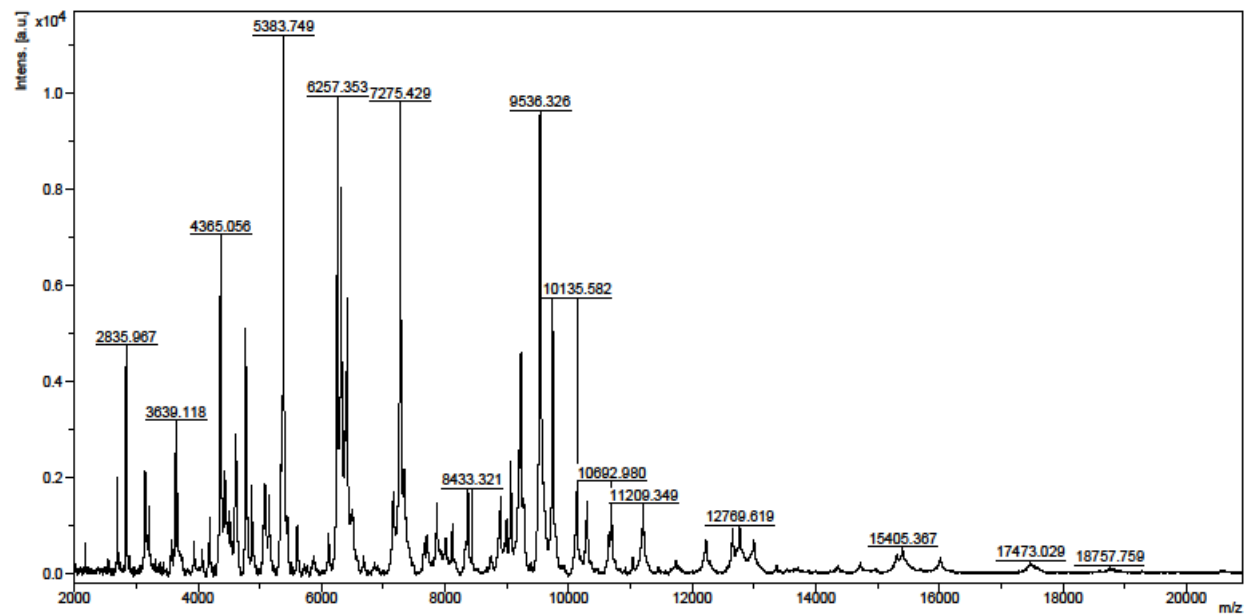


Amostra: C2\_37L2

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso Bac Extraido - 03032017\0\_E2\1\1SLin

Comment 1

Comment 2



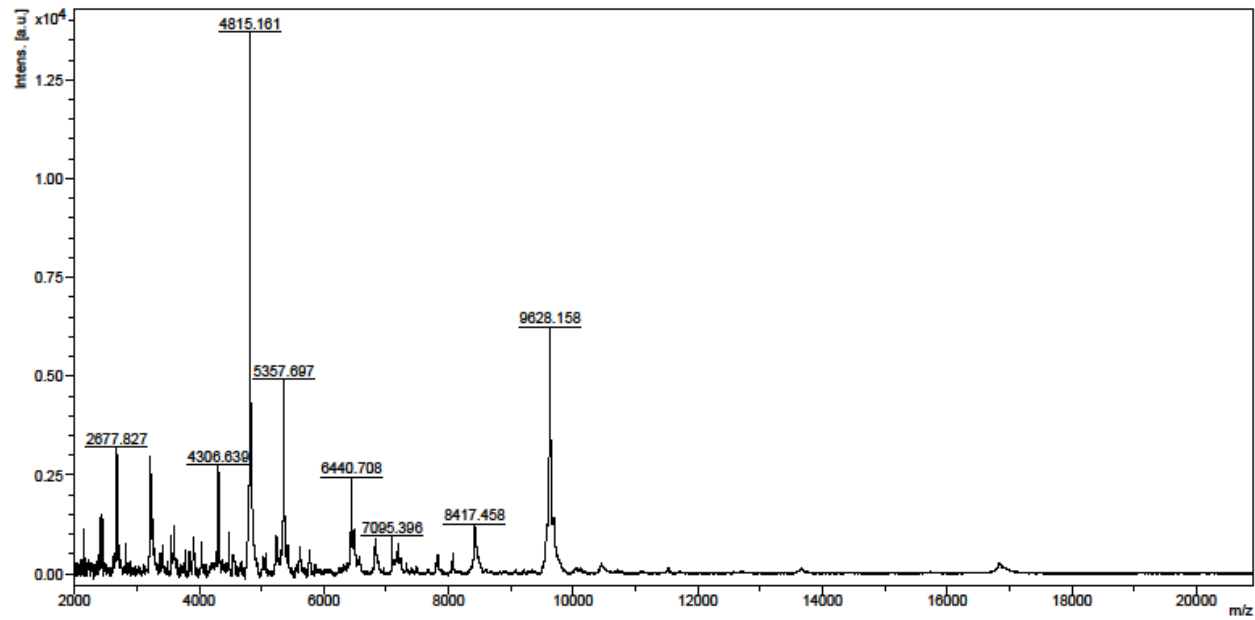
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:31:04

Amostra: C2\_60L1

C:\Users\marce\Downloads\Alonso 24-04-2017\Alonso Bac Extraido - 030320170\_E3\1\1SLin

Comment 1  
Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 28/01/2019 12:32:43