

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**Screening de bactérias produtoras de celulase isoladas de solo rizosférico do mini
campus da UFAM, Manaus-AM**

**MANAUS
2011**

**Screening de bactérias produtoras de celulase isoladas de solo rizosférico do mini
campus da UFAM, Manaus-AM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**Screening de bactérias produtoras de celulase isoladas de solo rizosférico do mini
campus da UFAM, Manaus-AM**

Bolsista: Rafael Menezes Valente
Orientador: Raimundo Felipe da Cruz Filho

**MANAUS
2011**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta das amostras

3.2 Coleta das amostras de solo

3.3 Diluição sucessiva e inoculação

3.4 Meio de cultura para isolamento preliminar

3.5 Seleção de bactérias produtoras de celulasas

3.6 Identificação bacteriana

3.7 Seleção das bactérias via análise qualitativa da produção de celulase

3.8 Seleção das bactérias por análise quantitativa da produção de celulase via açúcares redutores

3.9 Análise estatística

4. Resultados e Discussão

5. Conclusão

6. REFERÊNCIAS

7. CRONOGRAMA

1. Introdução

As enzimas são proteínas formadas por cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Elas são divididas em dois grupos: endógenas, encontradas no próprio organismo e as exógenas, que são adquiridas pela ingestão dos alimentos. Depois dos antibióticos, as enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana (OLIVEIRA et al., 2006) e o desenvolvimento de tecnologias que permitam sua produção a um custo competitivo é de grande importância para diversas aplicações biotecnológicas (SOUZA et al., 2008). As celulasas são enzimas que hidrolisam substratos celulósicos e são formadas por um complexo de enzimas compostas por endoglucanase ou endo-1,4- β -glucanase, exoglucanase ou exo-1,4- β -glucanase, celobiase ou β -glucosidase e exoglucosidase ou exo-1,4- β -glucosidase (SOUZA et al., 2008). A celulase é utilizada na indústria de alimentos, como na preparação do malte da cerveja, em processo de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. No setor de alimentação animal, é utilizada em ração para aves e suínos. Na área energética, empregada visando à fabricação de produtos como o etanol (RODRIGUES, 2008). Na natureza, existem muitos microrganismos que produzem celulasas, como as bactérias, que produzem essa enzima para a degradação da biomassa celulósica, já que a maioria destes compostos são difíceis de decompor rapidamente no ambiente natural (CHANG et al., 2009). Algodão e papel de filtro são usados como substratos indutores para a produção e para medir a atividade do complexo celulolítico total (RUEGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

A celulose é um dos compostos orgânicos mais importantes da natureza, representando aproximadamente de 15 a 60% da matéria seca dos vegetais (OSAKI, 2008) sendo encontrada em suas paredes celulares. A Amazônia é formada por uma das maiores reservas de biomassa celulósica do mundo e seus solos são muito ricos em

matéria orgânica constituindo um excelente “habitat” microbiano, principalmente para bactérias.

A celulose é o recurso natural renovável mais abundante do planeta, por isso, torna-se interessante a realização de uma busca, no solo amazônico, por bactérias potencialmente produtoras de celulasas para fins industriais a um baixo custo, e que possam ser cultivadas em grandes quantidades e tempo curto.

O objetivo deste trabalho é selecionar uma bactéria potencialmente produtora de celulasas no solo amazônico.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Enzimas e aplicação biotecnológica

A aplicação de enzimas na indústria vem crescendo a cada ano. Enzimas importantes na indústria de alimentos são utilizadas com o intuito de influenciar a composição final do produto. A utilização das enzimas nas indústrias é indispensável por melhorar a qualidade de um produto e tornar fácil sua obtenção (LIMA et al, 2001).

A perspectiva de desenvolvimento da biotecnologia no século XXI, em diferentes setores industriais, é muito promissora, visto que diversas indústrias têm demonstrado um forte potencial de desenvolvimento, tendo se destacado a indústria farmacêutica, seguida da indústria de produção de enzimas microbianas (ALBUQUERQUE, 2009). Atualmente, quase todas as enzimas preparadas em escala industrial são extracelulares porque seu isolamento dos meios de cultivo é geralmente mais simples, embora elas se encontrem sob forma muito diluída nestes meios (KIELING, 2002).

Segundo Politzer e Bon (2006), a Tecnologia Enzimática está ultrapassada no Brasil, embora se possua uma enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis que podem ser transformadas em produtos úteis e de maior valor agregado.

Os autores enfatizam a importância da tecnologia enzimática para a indústria de alimentos, já que o Brasil é um grande produtor dos mesmos.

As enzimas hidrolíticas são aplicadas na degradação de várias substâncias naturais (OLIVEIRA et al., 2006) e a maior dificuldade ao uso das enzimas nesses processos está relacionado ao alto custo desse catalisador, que chega a movimentar um mercado de aproximadamente US\$ 1,5 bilhões. A preferência pelo uso industrial de enzimas decorre de sua natureza protéica, seu uso em baixas concentrações e sua inocuidade, já que estas enzimas são inativadas durante o processamento (SALAMONI, 2005).

Os microrganismos são fontes de enzimas utilizadas na indústria. Entretanto, mesmo com o surgimento de novas tecnologias moleculares, menos de 1% dos microrganismos foram cultivados em laboratório e o potencial de 99% permanece inexplorado (MOLINARI, 2008).

As enzimas produzidas por bactérias apresentam um grande potencial de aplicação biotecnológica, dentre elas estão: pectinases, celulasas, amilases, xilanases e proteases, utilizadas principalmente na indústria de alimentos (GHORAI et al. 2009).

2.2. Celulose

Segundo Ruegger e Tauk-Tornisielo (2003), a celulose é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada a glicose. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem. Na natureza, esses processos representam a maior fonte de carbono para o solo.

Em sua forma natural, a celulose não ocorre com 100% de pureza. Este polímero encontra-se associado com outros polissacarídeos como amido, pectina, lignina e hemicelulose (BISARIA; GHOSE, 1981). É o principal material estrutural das plantas e

o componente principal do algodão, madeira, linho, palha e folhas de milho. Possui um alto peso molecular, sendo constituída por mais de 10.000 moléculas de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (GABRIEL, 2009).

Durante a síntese de celulose as moléculas de glicose são unidas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals, o que resulta em uma forma rígida, insolúvel e resistente à hidrólise enzimática. Estas cadeias são orientadas em paralelo com uma extremidade redutora e outra não redutora com regiões altamente ordenadas e cristalinas intercaladas por regiões paracristalinas ou amorfas (SALAMONI, 2005).

O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua procedência e processamento. A celulose de algodão possui cadeias mais ordenadas, apresentando cristalinidade de aproximadamente 70%, enquanto a celulose de árvores apresenta índice de cristalinidade de 40% (SILVA et al., 2009).

A celulose pode ser convertida em seus monômeros constituintes de cinco e seis carbonos através da hidrólise (adição de água à molécula) com o auxílio de um catalisador. Quando a hidrólise é realizada com ácidos concentrados a conversão atinge resultados satisfatórios, porém, o custo de recuperação dos ácidos é muito alto e todos estes processos operam em batelada (SOARES; ROSSELL, 2007).

2.3. Celulases

Celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão divididas em três classes: endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose; exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- β -D-glucosidases que hidrolisam a celobiose. As endo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucano-4-glucano-hidrolases atuam nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4). As celobio-hidrolases (exo-1,4- β -D-

glucanases) atuam nos terminais redutores das cadeias de celulose, liberando D-celobiose. As " β -D-glucosidases" ou β -D-glucoside gluco-hidrolases catalisam a liberação de unidades monoméricas de D-glicose a partir da celobiose e celodextrinas solúveis (OGEDA; PETRI, 2010).

As celulases compreendem 15 famílias das 99 famílias de glicosil hidrolases. Esta nomenclatura é aplicada para uma variedade de domínios catalíticos da enzima. Dentro de uma mesma família, as enzimas relacionadas não necessariamente refletem uma relação filogenética ente os organismos que as produzem (SALAMONI, 2005).

Estudos têm sido realizados na busca das celulases capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulásicos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies produtoras dessas enzimas mediante aplicação de métodos de engenharia genética (BUSSAMRA, 2010).

2.4. Microrganismos do solo

O solo não é simplesmente uma massa de detritos inertes, mas sim, um ambiente cheio de vida, heterogêneo, descontínuo e estruturado, dominado pela fase sólida (argila, húmus e complexos organo-minerais) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A grande diversidade dos microrganismos do solo produz enzimas extracelulares, e assim eles conseguem degradar os complexos formados por compostos orgânicos em moléculas menores que podem ser assimiladas (RODRIGUES, 2008). Esses microrganismos do solo desempenham um papel fundamental como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem de elementos (ALBUQUERQUE, 2009). O processo de mineralização da matéria orgânica é catalisado por diferentes enzimas, produzidas na sua maioria pelos microrganismos do

solo. Na degradação de celulose, as reações envolvidas tornam o carbono disponível para o crescimento dos mesmos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As principais vantagens de se utilizar células microbianas como fontes de enzimas são: obtenção de elevadas concentrações de enzimas através de manipulação genética e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de microrganismos superprodutores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso (CANILHA et al, 2005).

2.5. Bactérias celulolíticas do solo

As bactérias estão em maior quantidade no solo, sendo a maioria heterotrófica e sob a forma de bacilos esporulados. É estimada uma população de aproximadamente 10^8 a 10^9 unidades g^{-1} de solo e acredita-se que existam mais de 800 espécies de bactérias, sendo que a maior parte pertence à ordem Eubacteriales, que habitam as camadas superficiais, principalmente em partículas orgânicas por ocasião da degradação da serrapilheira e na rizosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As bactérias de maior ocorrência no solo pertencem aos gêneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas* e *Micrococcus* (OSAKI, 2008).

Os microrganismos são estimulados por exsudatos de tecidos radiculares, podendo a população bacteriana na zona rizosférica atingir valores superiores a cem vezes ao encontrado em zonas de solo livre. O efeito rizosférico varia com a espécie vegetal, sendo o das leguminosas, geralmente, mais pronunciado por unidade de superfície de raiz (COELHO et al., 2008).

O mecanismo de hidrólise das celulasas produzidas por bactérias pouco estudado. Toda bactéria celulolítica secreta endoglucanase com propriedades diferentes,

a maioria mostra uma pequena atividade na estrutura cristalina da celulose. Algumas exoglucanases de origem bacteriana já foram caracterizadas, mas apenas duas foram identificadas como exoglucanases e apenas uma atuou sinergicamente com a endoglucanase na hidrólise da estrutura cristalina da celulose (RODRIGUES, 2008).

2.6. Fermentação submersa

Desde a época do pós-guerra, a indústria de fermentação passou por um período de grande expansão, devido ao rápido desenvolvimento de métodos para a produção de antibióticos em cultivo submerso. As enzimas de interesse industrial têm sido produzidas por culturas líquidas submersas. As fermentações submersas apresentam grande homogeneidade e eficiente transferência de nutrientes, já que consistem de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis (ALONSO, 2001).

A técnica de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros físico-químicos do processo (pH, temperatura e agitação), além da facilidade de recuperação das enzimas. (PINHEIRO, 2006).

2.7. Método do Ácido Dinitrossalicílico

Um dos métodos de determinação de glicose em amostras líquidas mais utilizado no é o do ácido Dinitrossalicílico (DNS), do final da década de 1950 (MILLER, 1959). Baseia-se numa leitura em espectrofotômetro a 540 nm de um complexo formado pela glicose com o DNS (BIAZZUS et al, 2007). Este complexo torna a solução mais escura quanto maior a quantidade de glicose (REGULY, 1996).

O método fundamenta-se na reação dos açúcares redutores com o ácido 3,5-Dinitrossalicílico, que é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que, no caso mais simples, o grupamento aldeído parece ser oxidado a grupamento carboxila (ODELIS; TAVARES, 1994).

3. Material e métodos

3.1. Local de coleta das amostras

As amostras de solo foram obtidas de uma área de mata do setor sul do campus universitário da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, e conduzida até o laboratório de microbiologia no bloco D, sala 10 do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFAM.

3.2. Coleta das amostras de solo

A região escolhida foi a rizosfera das árvores, a partir da superfície até uma profundidade de 20 cm, utilizando uma espátula e um recipiente de vidro, ambos esterilizados, para coleta e armazenamento das amostras respectivamente. As amostras foram agitadas de forma manual durante 5 minutos para homogeneização. Posteriormente, das mesmas serão pesados 10g e misturados a 90 ml de solução salina esterilizada. A mistura foi agitada durante 10 minutos para homogeneização e denominada solução estoque (LIMA et al.,2009)

3.3. Diluição sucessiva e inoculação

A diluição sucessiva foi feita até 10^{-5} da solução estoque. Foram preparados cinco tubos contendo 9 ml de solução salina esterilizada e numerados como: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , respectivamente. Posteriormente foi retirado 1 mL da solução estoque para o tubo 10^{-1} e agitado para homogeneização, repetindo esse procedimento até o tubo 10^{-5} . Dos tubos 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram retiradas alíquotas de 100 μ L despejadas em placas de Petri contendo o meio de cultura para isolamento preliminar. As placas foram inoculadas em triplicata utilizando a alça de Drigalski, incubadas à de 37°C e observado o crescimento a cada 24 horas por sete dias (LIMA et al., 2009).

3.4. Meio de cultura para isolamento preliminar

Para verificar a atividade enzimática dos microrganismos, foram preparados 500 ml de ágar da solução de Manachini {[KH_2PO_4 , 2 g.L⁻¹; (NH_4) $_2\text{SO}_4$, 1 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g.L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 g.L⁻¹; extrato de levedura, 1 g/L]; substrato indutor (carboximetilcelulose, 0,5%) como única fonte de carbono, 2% de Agar bacteriológico e água destilada 1000 mL, pH ajustado para 7,0} (SOUZA et al., 2008).

3.5. Seleção de bactérias produtoras de celulase

As colônias que apresentaram crescimento foram repicadas para placas de Petri com Ágar Nutriente (peptona, 5 g; extrato de carne, 3 g; cloreto de sódio, 1 g; ágar, 20 g; água destilada; 1000 mL) para isolamento e posterior identificação (LIMA et al., 2009).

3.6. Identificação bacteriana

A identificação foi feita a nível de gênero seguindo as provas bioquímicas da metodologia de Barrow e Feltham (1999).

3.7. Seleção das bactérias via análise qualitativa da produção de celulase

Os isolados foram inoculados em frascos erlenmeyer contendo 50 mL de Solução Manachini contendo o substrato indutor e mantidos sob agitação 150 rpm durante 24h para estimular a secreção enzimática. Posteriormente, o fermentado foi centrifugado a 15000 rpm e filtrado para obtenção do extrato enzimático bruto (SENA, 2006).

Para o teste da atividade enzimática do extrato bruto, foram preparados meios com Agar bacteriológico (1,8%), carboximetilcelulose (1%) e água destilada (100 mL). Após esterilização, foram distribuídos em placas de Petri 120x20 mm onde foram feitas perfurações circulares de 5 mm de diâmetro (técnica de “cup plate”) no meio das placas onde foram adicionados 100µL do extrato bruto. As placas foram incubadas a 37°C por

24h. Posteriormente adicionadas de revelador Vermelho Congo (0,1%) seguido de uma lavagem com solução de NaCl 1 M para visualização e determinação do diâmetro dos halos de degradação do substrato (SENA, 2006).

3.8. Seleção das bactérias por análise quantitativa da produção de celulase via açúcares redutores

A seleção das bactérias produtoras de celulase via açúcares redutores foi realizada utilizando o método de Miller (1959) que consiste na utilização de uma solução de DNS (10g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300g de tartarato duplo de sódio e potássio. O Tartarato Duplo de Sódio e Potássio foi dissolvido em Béquer, com aproximadamente 125 mL de água deionizada, o ácido 3,5-dinitrosalicílico foi dissolvido, a quente, em 50 mL de solução 2M de NaOH. Posteriormente, foram misturadas as duas soluções em um balão, com agitação constante, completando-se o volume com água deionizada para 250 mL) (BIAZUS et al, 2007)].

Para quantificação da produção de açúcares redutores foi utilizada uma curva de calibração tendo como base a solução-estoque de 2,5g/dL de glicose segundo Biazus (2007).

Foram preparados em tubos contendo 0,5 mL do extrato bruto, 1,5 mL de água deionizada e 3 mL de DNS. A mistura foi aquecida até a água ficar em ebulição por cinco minutos e/ou o tempo necessário para o desenvolvimento da cor. Depois de resfriadas, as amostras foram analisadas a 540 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220). O tubo branco para calibração do equipamento foi constituído dos reagentes supracitados sem o extrato bruto. Posteriormente foi montado um gráfico da concentração *versus* absorbância para quantificar a melhor produção de açúcares redutores (BIAZUS et al, 2007).

3.9. Análise estatística

Os dados referentes a produção da celulase foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) para verificar a variação inter e intravariáveis, utilizando-se os programas MINITAB 16.0 e Microsoft Office Excel, 2010.

4. Resultados e discussão

Foram isoladas dez colônias que apresentaram crescimento nas placas de Agar celulose e identificadas S1 a S10. Os isolados S1, S3 e S8 apresentaram os maiores halos de degradação e foram identificadas (Tabela 1).

Isolado	Halo			Identificação
	24h	48h	72h	
S1	2,0	2,5	2,5	<i>Moraxella</i> sp.
S3	2,3	2,7	2,7	<i>Arcobacter</i> sp.
S8	2,5	3,0	2,9	<i>Bacillus</i> sp.

Tabela 1: Isolados produtores de celulase e seus respectivos halos (cm) de degradação.

A revelação com Solução 0,1% de Vermelho Congo, muito utilizada na literatura, mostrou-se adequada para a visualização dos halos de degradação como observado na Figura 1. Observou-se que é necessário um tempo de repouso das placas de Petri (15 a 30 minutos) em superfície plana com essa solução antes de proceder à lavagem com NaCl 1M por (15 a 20 minutos). A área amarelada em forma de halo representa a degradação enzimática da celulose, enquanto que a área não afetada cora-se de vermelho.

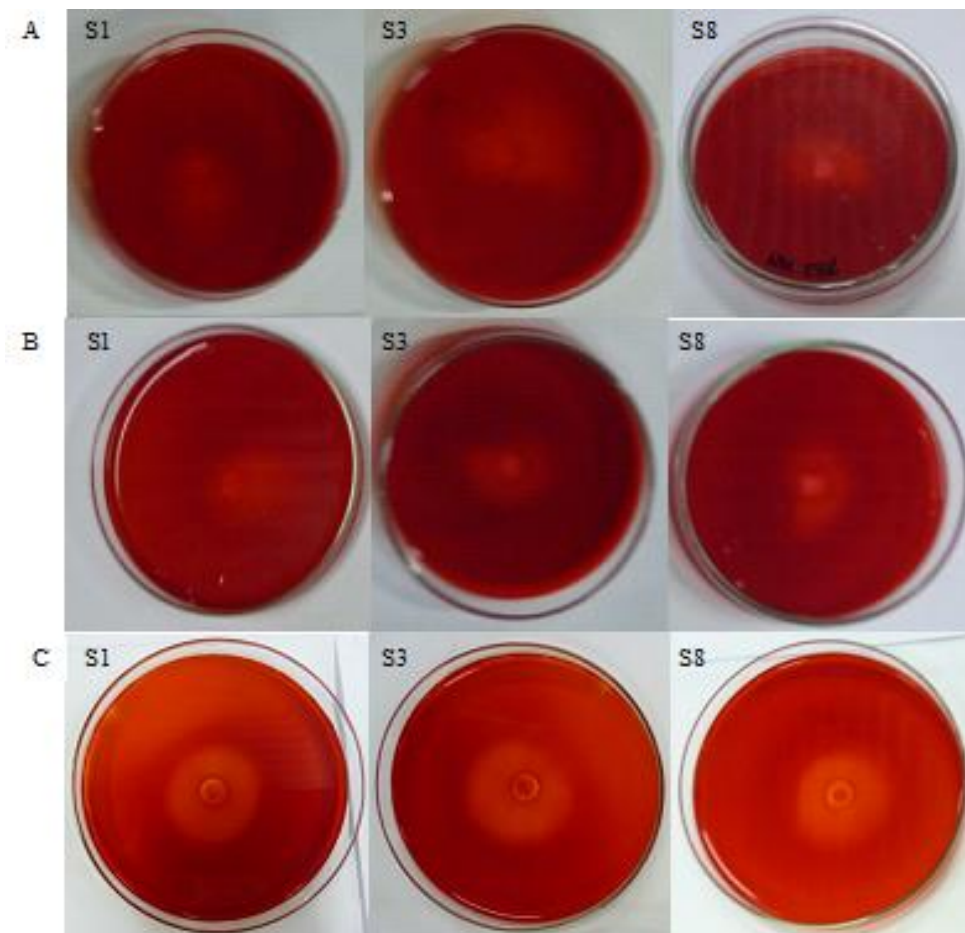


Figura 1: Teste qualitativo de produção de celulase com Solução 0,1% de Vermelho Congo. A) 24h, B) 48h e C) 72h.

A curva de calibração de glicose pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) é mostrada na Figura 2. Foi observado que a adaptação dos dados a esta curva foi boa, pois o coeficiente de determinação foi $R^2 = 0,9774$, o que diminui a quantidade de erros pelo uso da curva.

Na metodologia proposta seria realizada fermentação submersa durante 24h, porém após esse período observou-se que não houve turvação dos meios líquidos. Decidiu-se então pela fermentação por 48 e 72 horas para um maior crescimento celular, aumentando, assim, a secreção enzimática pelos microrganismos.

Na Tabela 2, encontram-se os valores das análises realizadas com os extratos enzimáticos de cada isolado. Nessa tabela percebe-se que houve produção de açúcares

redutores pelas três bactérias e que a concentração desses açúcares após 48h e 72h de fermentação é a mesma, possivelmente, devido a paralização da secreção enzimática pelas bactérias.

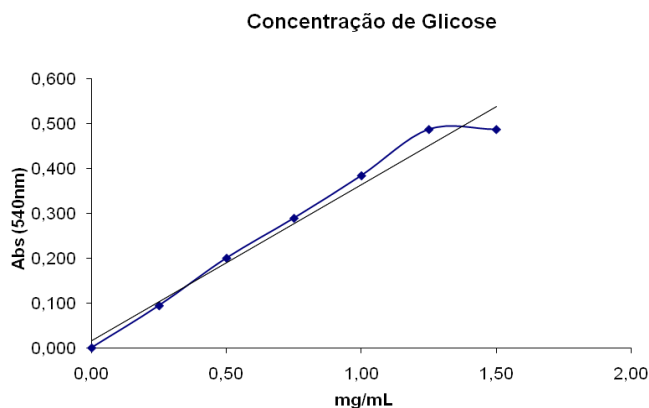


Figura 2: Curva de calibração de glicose pelo método DNS, leitura da absorbância a 540 nm

Isolado	V _{EEB} (mL)	V _{água} (mL)	V _{DNS} (mL)	Açúcares redutores (mg/mL)		
				24h	48h	72h
Branco	0,0	2,0	3,0	0	0	0
S1	0,5	1,5	3,0	0,09	0,11	0,11
S3	0,5	1,5	3,0	0,09	0,10	0,10
S8	0,5	1,5	3,0	0,05	0,08	0,08

Tabela 2: Produção de açúcares redutores de cada isolado, onde V_{EEB}, V_{água}, V_{DNS} e ABS são os volumes de Extrato Enzimático Bruto, volume de água e volume de reagente DNS, respectivamente.

5. Conclusões

A maior atividade celulolítica foi de *Moraxella* sp., porém, as quantidades de açúcares redutores produzidas pelas bactérias estudadas não apresentaram diferença significativa. Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que no solo rizosférico existe uma gama de bactérias responsáveis pela degradação da celulose com potencial a ser explorado industrialmente. Face ainda aos resultados obtidos pode-se acrescentar a

necessidade de novos estudos no que se refere a possíveis indutores para maximização da atividade enzimática, visando viabilizar a purificação para usos biotecnológicos.

6. Referências

ALBUQUERQUE, U. S. Detecção de enzimas hidrolíticas em bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto, Estação Mangueira, Recife, Pernambuco. 71 f. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ). Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio De Janeiro, 2001

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 331p., 1999.

BIAZUS, J. P. M. et al.. Desenvolvimento de *kits* para análise de níveis em pacientes com suspeita de diabetes *mellitus*. *Exacta*, São Paulo, v.5, n. 1, p 155-161, jan/jun. 2007.

BISSARIA, V. S.; GHOSE, T. K.. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 3, p. 90 – 104, 1981.

BUSSAMRA, B. C. Produção de celulase em cultivo de alta densidade celular utilizando *Escherichia coli*. 19º Programa Bolsa de Verão – 2010. São Paulo, Campinas, fev., 2010.

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos Alimentares Produzidos Por Via Fermentativa, Parte 3: Polissacarídeos e Enzimas. *Revista Analytica*, n.20, jan., 2006.

CHANG, C.; CHANG-CHAI N.G.; WANG, C.; SHYU, Y. Activity of cellulase from *Thermoactinomyces* and *Bacillus* spp. isolated from Brassica waste compost. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, Piracicaba, v. 66, n. 3, June 2009 .

COELHO, D. G. et al. Quantificação de fungos celulolíticos em solos de três ecossistemas. *Revista Verde*, Mossoró – RN, v.1, n.3, p.45-49. jul/set, 2008.

GABRIEL, J. R. Estudo da hidrólise de carboidratos em meio neutro, utilizando uma mistura de ésteres derivado do óleo de mamona. Dissertação (doutorado). Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos. 2009.

KIELING, D. D. Enzimas: Aspectos gerais. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Florianópolis – SC. p. 5 – 7. Jul/2002.

LIMA, U. A. et al. Biotecnologia Industrial. Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo-SP. vol. 2, p. 205-218. 2001.

LIMA, L. A.; RAMOS, L.R. ; Cruz Filho, R. F. ; SANTOS, J. G. Isolamento e identificação de bactérias tolerantes a presença de hidrocarbonetos em solo (in vitro) amazônico. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas-PE. Microbiologia Geral e Meio Ambiente, 2009.

MILLER, G. L. “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.” Analytical Chemistry, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.

MOLINARI, H. B. C. Metagenômica: uma nova ferramenta biotecnológica. Revista Opiniões, p. 54-57, jul-set/2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. p. 729, 2006.

ODELIS, D. T.; TAVARES, L. B. B. Uso do método do Ácido Dinitrossalicílico (DNS) na determinação de carboidratos nos alimentos dietéticos. B. CEPPA, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 117-126, jul/dez, 1994.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, J. F. Enzimas Hidrolíticas Extracelulares de Isolados de Rizóbia Nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Ciênc. Tecnol. Aliment, 2006.

OGEDA, Thais Lucy and PETRI, Denise F. S.. Hidrólise Enzimática de Biomassa. Quím. Nova [online]. 2010, vol.33, n.7, pp. 1549-1558. ISSN 1678-7064.

OSAKI, F. Distribuição Espacial de Microrganismos e Fertilidade em Solos de dois Ecossistemas Florestais: Floresta Ombrófila Mista e Povoamento Florestal com *Pinus Taeda* L. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, 2008.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. 2006. Dissertação (Programa de mestrado em engenharia de alimentos da URI-Campus de Erechim), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, 2006.

POLITZER K.; BON, E. P. S. Enzimas Industriais e Especiais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). Rio de Janeiro-RJ. 2006.

REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos: fermentações industriais e biomassa celular. Pelotas – RS, Editora Universitária/UFpel, p. 224, 1998.

RODRIGUES, G. R. Prospecção de Genes de Celulase Presentes dm Biblioteca Metagenômica. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. JABOTICABAL, 2008.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, v.27, n.2, p.205-211, 2004,

SALAMONI, S. P. Produção e caracterização de celulases secretadas por streptomyces sp. Isolados de processos de compostagem. Dissertação (mestrado). Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre/ RS, mai/2005.

SENA, A. R; KOBLITS, M. G. B; NETO, A. G.; UETANABARO, A. P. T.. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*, Feira de Santana, n.35, p.91-98, 2006.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas naquímica de polímeros e em compósitos. Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR, *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 661-671, 2009.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Núcleo de Análise Interdisciplinar de Políticas e Estratégias. Vol. 3, Nova Série, p. 8 - 9, 2007.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2010.

ZHANG, J.; LIU, Z.; GOODFELLOW, M. *Nocardia caishijiensis* sp. nov., a novel soil actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p.999–1004, 2003.

GHORAI S.; BANIK S. P.; VERMA D.; CHOWDHURY S.; MUKHERJEE S.; KHOWALA S. FUNGAL biotechnology in food and feed processing. *Food Research International* v. 42, p. 577–587, 2009

5. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2009	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2010	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão da Literatura	R	R	R	R	R	R	X	X	X	X	X	X
2	Coleta do material	R	R	R	R	R	R	X	X				
3	Diluição sucessiva e inoculação	R	R	R	R	R	R	X	X				
4	Seleção das bactérias produtoras de celulase					R	X	X	X				

5	Identificação bacteriana					R	R						
6	Teste qualitativo da produção de enzima					R	R	R	R				
7	Teste quantitativo da produção de enzima					R	R	R	R				
8	Preparação da apresentação parcial oral			R	R								
9	Relatório Parcial					R	R						
10	Análise estatística								R	R			
11	Elaboração do Resumo e Relatório Final										R	R	R