

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIELA BARÇANTE CAMPOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA
PRODUÇÃO DE XILANASE POR ACIDOBACTÉRIAS

PATOS DE MINAS – MG
MARÇO 2026

GABRIELA BARÇANTE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA
PRODUÇÃO DE XILANASE POR ACIDOBACTÉRIAS**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

Prof. Dra. Cristine Chaves Barreto

PATOS DE MINAS – MG

MARÇO DE 2026

GABRIELA BARÇANTE CAMPOS

Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase por acidobactérias

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca examinadora:

Professora Dra. Cristine Chaves Barreto – Universidade Federal de Uberlândia
Presidente

Professor Dr. Gilvan Caetano Duarte - Universidade Federal de Uberlândia
Membro

Professor Dr. Carlos Emanuel Soares – Universidade Católica de Brasília
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, 11 de março de 2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Universidade Federal de Uberlândia, por proporcionar uma formação de excelência, pela bolsa concedida e por oferecer as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho

À Cristine, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica e pela confiança, dedicação, paciência, pelos bolos, conselhos e por me mostrar que não existe problema no laboratório que não possa ser resolvido depois de um sorvete. Sua orientação foi fundamental não apenas para minha formação acadêmica, mas também para despertar em mim a paixão pela pesquisa e confirmar que a Biotecnologia era o caminho que eu realmente queria seguir.

À minha família, por todo o amor, compreensão e incentivo. Especialmente aos meus avós Vere e Neide pelas visitas mensais e por todo o carinho e amor que sempre tiveram comigo. À minha mãe por sempre se certificar de que eu fosse incluída nos eventos familiares mesmo à distância e por sempre estar lá quando eu precisei. Ao meu pai por ter possibilitado que eu seguisse meu sonho.

Aos meus amigos Jhonatan, Nathália, Érica, Júlia, Ana Ligia e Cristal por todos os momentos, choros, alegrias e surtos. Meu eterno grupo que espero que me acompanhe em todas as conquistas. Quero agradecer especialmente a minha eterna dupla Júlia e minhas amigas Ana e Cristal por serem como minhas irmãs, presentes em todos os momentos da minha vida.

À minha amiga Lui, por aguentar todos os meus surtos e assistir minhas apresentações mesmo sem entender nada do que eu estava falando.

Aos meus eternos companheiros Tino e Sushi que me fizeram a melhor das companhias durante esses 4 anos e me fizeram me sentir em casa mesmo a quase mil quilômetros de distância de casa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

As Acidobactérias, pertencentes ao filo Acidobacteriota, são encontradas em todos os ambientes, especialmente em solos. Porém, são consideradas bactérias de difícil cultivo *in vitro*. Considerando o vasto repertório de genes de enzimas encontrados em seus genomas, acredita-se que estejam envolvidas na ciclagem de matéria orgânica no solo. A degradação de material lignocelulósico possui grande importância ambiental na ciclagem de nutrientes e importância biotecnológica na indústria de biocombustíveis e na conversão de biomassa. Em projetos anteriores, nosso grupo de pesquisa construiu uma coleção de bactérias de solos do Cerrado pertencentes ao filo Acidobacteriota e tem trabalhado em demonstrar atividades de enzimas do tipo glicosil-hidrolases envolvidas na degradação de material vegetal. O presente trabalho teve como objetivo principal estudar as condições de cultura que promovem a degradação de material lignocelulósico *in vitro*. O efeito das fontes de carbono glicose, xilose e xilana nos meios de cultura foi avaliado de forma sistemática para a bactéria AB23 no crescimento e na produção de xilanase, enzima já bem estudada nessas Acidobactérias do Cerrado. A quantificação de proteínas foi avaliada por Bradford e a atividade enzimática foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para a liberação de proteínas associadas ao *pellet* da cultura, foi realizado lise celular utilizando a associação das técnicas *freeze-thaw* e ultrassom de mesa. As amostras foram fracionadas em *pellet* e sobrenadante, sendo observado maior concentração de proteínas e maior atividade enzimática no *pellet*. A quantificação de proteínas em glicose foi de 2,14 mg/mL, 8,03 mg/mL em xilana e 25,97 mg/mL em xilose. A atividade enzimática em glicose foi de 78 mU/mL, 60 mU/mL em xilana e 143 mU/mL em xilose. A menor atividade em glicose pode estar associada à repressão catabólica, enquanto o maior valor em xilose sugere indução catabólica devido ao seu baixo peso molecular que permite uma maior facilidade de ser associado pela membrana da célula bacteriana. Neste trabalho, foi possível demonstrar que há uma relação direta entre o crescimento celular, a atividade enzimática e a produção de proteínas, sendo essas três variáveis diretamente proporcionais.

Palavras-chave: Bactérias do solo; Cerrado; Biomassa lignocelulósica; Glicosil-hidrolases

ABSTRACT

Acidobacteria, belonging to the phylum *Acidobacteriota*, are found in all environments, especially in soils. However, they are considered difficult-to-culture bacteria in vitro. Considering the vast repertoire of enzyme-encoding genes found in their genomes, they are believed to be involved in the cycling of organic matter in soil. The degradation of lignocellulosic material is of great environmental importance in nutrient cycling and of biotechnological relevance in the biofuel industry and biomass conversion. In previous projects, our research group built a collection of bacteria from Cerrado soils belonging to the phylum *Acidobacteriota* and has been working to demonstrate the activity of glycosyl hydrolase-type enzymes involved in plant material degradation. The main objective of this study was to investigate culture conditions that promote the degradation of lignocellulosic material in vitro. The effect of the carbon sources glucose, xylose, and xylan in the culture media was systematically evaluated for the bacterium AB23 in terms of growth and xylanase production, an enzyme already well studied in these Cerrado Acidobacteria. Protein quantification was performed using the Bradford assay, and enzymatic activity was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. To release proteins associated with the culture *pellet*, cell lysis was carried out using a combination of freeze–thaw cycles and bench-top ultrasonication. The samples were fractionated into *pellet* and supernatant, with higher protein concentration and higher enzymatic activity observed in the *pellet*. Protein quantification in glucose was 2.14 mg/mL, 8.03 mg/mL in xylan, and 25.97 mg/mL in xylose. Enzymatic activity in glucose was 78 mU/mL, 60 mU/mL in xylan, and 143 mU/mL in xylose. The lower activity in glucose may be associated with catabolite repression, while the higher value in xylose suggests catabolite induction due to its low molecular weight, which allows easier uptake by the bacterial cell membrane. In this study, it was possible to demonstrate a direct relationship between cell growth, enzymatic activity, and protein production, with these three variables being directly proportional.

Keywords: Soil bacteria; Cerrado; Lignocellulosic biomass; Glycosyl hydrolases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da xilana e da ação das principais enzimas envolvidas em sua degradação.....	13
Figura 2 – Amostras de AB23 durante a lise celular em A) Nitrogênio Líquido; B) Sonicador de mesa; C) Amostras de AB23 após lise celular.....	19
Figura 3 – Curva padrão de xilose em ácido 3,5-dinitrosalicílico.....	21
Figura 4 – Atividade enzimática com xilana dos ensaios 1 e 2 com tempo de incubação com o substrato de 30 minutos e 60 minutos.....	22
Figura 5 – Atividade enzimática do <i>pellet</i> e sobrenadante da amostra crescida em xilana e lisada por sonicador de ponta	25
Figura 6 – Curva padrão protocolo Micro 2 mL Assay Protocol da Sigma-Aldrich.....	26
Figura 7 – Curva padrão protocolo de dosagem de proteínas Bio-Rad.....	26
Figura 8 - Curva padrão protocolo Standard 3,1 mL Assay.....	27
Figura 9 – Dosagem de proteínas em amostra lisada com sonicador de ponta contendo AB23 cultivada em xilana como fonte única de carbono.....	28
Figura 10 - Crescimento bacteriano em VI-55 líquido: (1) Glicose, (2) Xilana e (3) Xilose. A) Células em meio de cultura, B) Células precipitadas, com meio de cultura aspirado.....	29
Figura 11 – Atividade enzimática do <i>pellet</i> da amostra contendo glicose, xilana e xilose e do sobrenadante da glicose como fontes de carbono únicas	30
Figura 12 - Observação dos diferentes tipos de xilana: à esquerda encontra-se a xilana de faia (<i>beechwood</i>) e, à direita, a xilana de aveia (<i>oat spelts</i>).....	31
Figura 13 – Curva padrão ácido 3,5-dinitrosalicílico com xilose como substrato	32
Figura 14 – Atividade enzimática do <i>pellet</i> da amostra contendo glicose, xilana e xilose e do sobrenadante da glicose como fontes de carbono únicas.....	33
Figura 15 – Dosagem de proteínas em amostra lisada contendo AB23 cultivada em glicose, xilana e xilose como fonte única de carbono.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1.1.1 Características gerais das Acidobactérias.....	10
1.1.2 Distribuição geográfica de Acidobactérias.....	11
1.1.3 Acidobactérias na biotecnologia.....	11
1.1.4 Atividade enzimática microbiana e biotecnologia.....	13
1.2 HIPÓTESE.....	14
1.3 OBJETIVOS.....	15
1.3.1 Objetivo geral	15
1.3.2 Objetivos específicos.....	15
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 CEPA DE ACIDOBACTÉRIA E MANUTENÇÃO	15
2.2 MEIO DE CULTURA.....	16
2.3 INOCULAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	16
2.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XILANASE	16
2.4.1 Ensaio enzimático.....	17
2.4.2 Avaliação da atividade enzimática	18
2.5 LISE CELULAR.....	18
2.5.1 Método de lise celular	19
2.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS POR MÉTODO COLORIMÉTRICO.....	20
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1 ESTABELECIMENTO DOS PROTOCOLOS DE ENSAIO ENZIMÁTICO EM CONTROLES: CULTURAS CRESCIDAS EM XILANA	20
3.1.1 Análise de concentração de açúcares redutores e atividade enzimática: sobrenadante.....	20
3.1.2 Comparação de métodos de lise celular	23
3.1.3 Análise da atividade de xilanase: sobrenadante e <i>pellet</i>	24
3.1.4 Dosagem de proteínas por método colorimétrico.....	25
3.2 CRESCIMENTO DE AB23 EM MEIO CONTENDO XILANA, XILOSE OU GLICOSE.....	28
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE XILANASE NAS TRÊS FONTES DE CARBONO ESTUDADAS.	29
3.3.1 Análise de concentração de açúcares redutores e atividade enzimática.....	29
3.3.2 Dosagem de proteínas por método colorimétrico.....	34
4. CONCLUSÃO.....	35

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos de solo, como bactérias e fungos, têm sido amplamente estudados devido a sua importância nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento dos ecossistemas a partir da ciclagem e decomposição da matéria orgânica. Eles apresentam grande potencial biotecnológico em diferentes áreas, como em processos de biorremediação, produção de biocombustíveis e conversão de biomassa (Goi; Souza, 2006). Na medicina, os microrganismos são usados na produção de vacinas, de biomoléculas como antibióticos e biofármacos, além da produção em grande escala de insulina. Microrganismos são fontes de enzimas para a indústria, essas enzimas são aplicadas na indústria de alimentos para a remoção de açúcares como a lactose de laticínios (Costa *et al.*, 2024), na panificação (Bhardwaj; Kumar; Verma, 2019) e pela indústria de papel e celulose no processo de branqueamento (Yang *et al.*, 2023).

As Acidobactérias estão entre os filos bacterianos mais comumente encontrados nas comunidades microbianas no solo, representando, em média, 20% de todos os filos presentes, com variação entre 5% e 46% (Janssen, 2006), sendo especialmente abundantes em solo ácido do Cerrado. Embora a função ecológica das Acidobactérias ainda não seja bem compreendida, foi detectada a presença de genes codificadores de enzimas hidrolíticas em vários genomas (Coluccia; Besaury, 2023), o que sugere uma capacidade de degradação de material lignocelulósico. Esses genes são muito utilizados na conversão de biomassa em bioenergia.

Dentre essas enzimas, destacam-se as xilanases, que podem ser classificadas em endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) e exo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.156), que atuam na degradação da xilana, um dos principais componentes da hemicelulose, pois já foi demonstrada que as Acidobactérias crescem nesse substrato (De Castro *et al.*, 2013). Em bactérias, a glicose apresenta o efeito de repressão catabólica impedindo a produção de enzimas degradadoras de outros dissacarídeos ou polissacarídeos (Bruckner; Titgemeyer, 2002). No caso da expressão de xilanases em Acidobactérias, essa regulação ainda não é conhecida. Nesse contexto, é importante avaliar a influência das condições de cultivo que induzem a produção das xilanases, como por exemplo a concentração e o tipo de fonte de carbono utilizados.

1.1 Referencial teórico

1.1.1 Características gerais das Acidobactérias

As acidobactérias pertencem ao filo *Acidobacteriota*, formalmente estabelecido em 2024 e nomeado em 2021 pelo *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP) (Oren; Garrity *et al.*, 2021). Esse filo inclui membros como *Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida* e *Geothrix fermentans* (Kielak *et al.*, 2016). Análises filogenéticas usando o gene do 16S RNAr como marcador molecular indicam que a diversidade filogenética das Acidobactérias é comparável a das Proteobactérias, um dos grupos bacterianos mais diversos e amplamente estudados (Janssen, 2006). Em 2007, havia na literatura cerca de 26 subdivisões dentro do filo (Barns *et al.*, 2007).

Nas últimas duas décadas, o filo passou de praticamente desconhecido a ser reconhecido como um dos mais abundantes e diversos do planeta (Kielak *et al.*, 2016). No entanto, as Acidobactérias possuem poucas espécies descritas formalmente tanto pela dificuldade de seu cultivo *in vitro* (Janssen, 2006) quanto pela sua baixa representatividade nas coleções de cultura bacteriana, dado que apenas 8 das 26 subdivisões do filo são encontradas em cultura (Kielak *et al.*, 2016).

As análises do gene 16S RNAr, embora extremamente úteis na caracterização do filo e de suas linhagens, são limitadas à apenas demonstrar sua diversidade filogenética não permitindo investigações sobre as características fenotípicas ou fisiológicas de bactérias não cultivadas (Quaiser *et al.*, 2003). Por outro lado, alguns genomas já sequenciados não apenas corroboram a diversidade filogenética encontrada anteriormente, e revelam alguns aspectos do seu metabolismo, que será discutido a seguir.

As Acidobactérias são bactérias gram-negativas (Hiraishi *et al.*, 1995) que apresentam grande diversidade metabólica, podendo ser heterotróficas aeróbicas, em alguns casos anaeróbicas e há pelo menos uma espécie fototrófica (Kielak *et al.*, 2016). Possuem afinidade por ambientes levemente ácidos, mas não extremos, sendo consideradas moderadamente acidófilas (Hugenholtz; Goebel; Pace, 1998).

Estudos demonstram que sua abundância e distribuição está fortemente relacionada ao pH do solo, sendo observado que a formação de colônias é maior na presença de pH 5,5 do que em pH 7,0 (Sait; Davis; Janssen, 2006). Em isolados de turfeiras russas, foram identificadas linhagens com crescimento ótimo entre pH 3,5 e 4,5, enquanto outras prosperam melhor entre

pH 5,5 e 6,5, reforçando sua classificação como moderadamente acidófilas (Pankratov *et al.*, 2008).

1.1.2 Distribuição geográfica de Acidobactérias

As Acidobactérias são membros ecologicamente significativos de diversos ecossistemas e são cosmopolitas; podem ser encontradas principalmente em solos, mas também já foram reportadas em pântanos, drenagem ácida de minas, aquíferos contaminados e lagos (Hugenholtz; Goebel; Pace, 1998). Sua predominância no solo destaca seu papel ecológico nos ciclos biogeoquímicos.

No Brasil, foram descritas cepas isoladas de Acidobactérias em solos da Amazônia Oriental (Navarrete *et al.*, 2013), Amazônia Ocidental (Kim *et al.*, 2007; Jesus *et al.*, 2009), Amazônia Central (Navarrete *et al.*, 2010) e do Cerrado (Araujo *et al.*, 2012). O Cerrado ocupa cerca de 24% do total da área territorial do Brasil sendo considerado o segundo maior bioma do país e é considerado um *hotspot* de biodiversidade (Araujo *et al.*, 2012). Seu solo é ácido, distrófico (baixa fertilidade) e apresenta baixa disponibilidade de nutrientes. Possui alta disponibilidade de ferro e de alumínio, minerais comuns em solos de baixo pH (entre 4 e 5,5) e que apresenta alta toxicidade para a maioria das espécies não nativas dessa região (Haridasan, 2008).

Uma investigação do microbioma do solo do cerrado revelou a presença de Acidobactérias com uma alta incidência de 47% das sequências do gene de RNAr 16S analisadas (Araujo *et al.*, 2012). Esses organismos apresentam preferência por ambientes oligotróficos (Kielak *et al.*, 2009), o que justifica sua abundância nesse ecossistema. Sua predominância sugere um papel essencial na dinâmica microbiana e nos ciclos biogeoquímicos do Cerrado. Com base nesses estudos, em 2012 foram coletadas e isoladas em Cristalina – Goiás, cinco espécies de Acidobactérias (De Castro *et al.*, 2013), incluindo a AB23 descrita neste trabalho.

1.1.3 Acidobactérias na biotecnologia

As Acidobactérias apresentam grande potencial biotecnológico sendo estudados como possíveis conversoras de biomassa e produção de biocombustíveis. Em 2009, os primeiros genomas sequenciados de cepas de Acidobactérias foram publicados e permitiram a avaliação

preliminar de possíveis funções ambientais e potenciais fisiológicos, incluindo o uso de carbono, a assimilação de nitrogênio, o metabolismo de ferro e a abundância de transportadores. Entre todos os aspectos fisiológicos revelados pela genômica, o metabolismo de carboidratos foi o mais amplamente investigado por ser um requisito fisiológico essencial para a descrição de novas espécies (Kielak *et al.*, 2016). Essa análise revelou também uma alta presença de genes codificadores de glicosídeo hidrolases, sugerindo a capacidade de degradação da celulose (Ward *et al.*, 2009).

A habilidade de utilizar diferentes fontes de carbono por uma espécie sugere a existência de atividades no solo (Ward *et al.*, 2009). As Acidobactérias isoladas do Cerrado demonstraram capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono como a arabinose, dextrose e xilose, com destaque para a xilana. Esse crescimento sugere que essas bactérias são essenciais na decomposição da biomassa vegetal e na ciclagem do carbono no ambiente (De Castro *et al.*, 2013) podendo esse ser seu papel nos ecossistemas.

Também foram identificadas enzimas capazes de degradar outros polissacarídeos encontrados na parede celular vegetal como as pectinas e xilanas, componentes da hemicelulose vegetal (Ward *et al.*, 2009). Estudos posteriores sugeriram a presença de xilanases, enzimas responsáveis pela degradação da xilana, com base no cultivo *in vitro* de Acidobactérias em meios contendo xilana como única fonte de carbono (Eichorst; Kuske; Schmidt, 2011).

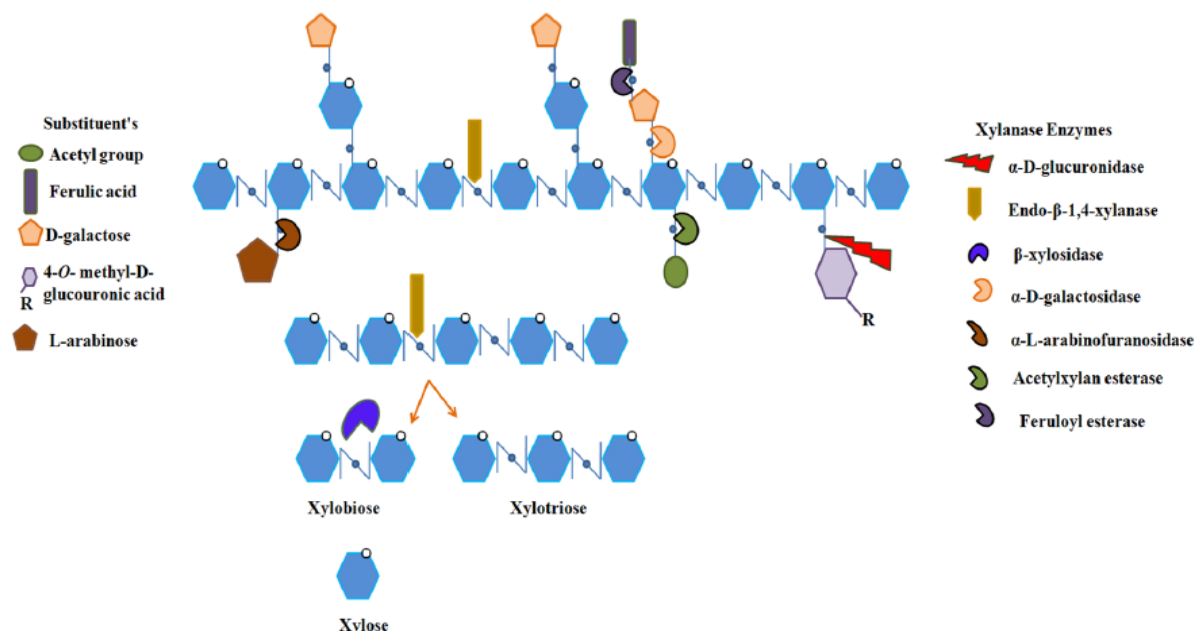
A capacidade de degradação de polímeros demonstra que as Acidobactérias atuam como decompositoras no solo, provavelmente participando do ciclo de degradação da matéria orgânica derivada de plantas, fungos e insetos, pois muitos genomas possuem também genes de quitinases. Sua alta incidência sugere que sua contribuição nesse processo é significativa para o ambiente (Ward *et al.*, 2009).

A disponibilidade de substratos orgânicos desempenha um papel fundamental no crescimento e distribuição das Acidobactérias em ambientes naturais. Estudos em turfeiras demonstraram que essas bactérias respondem positivamente à adição de açúcares como glicose, xilana, pectina e amido, indicando uma preferência por mono e polissacarídeos em seu metabolismo (Pankratov *et al.*, 2008). Foi demonstrado que representantes de diferentes subdivisões apresentam a capacidade de degradar distintos polissacarídeos, incluindo celulose cristalina (Pankratov *et al.*, 2012), quitina (Foesel *et al.*, 2013) e celulose microcristalina (Huber *et al.*, 2014). Entretanto, a degradação de xilana é a mais amplamente relatada, indicando um possível papel das Acidobactérias na degradação da parede celular de plantas (Kielak *et al.*, 2016).

1.1.4 Atividade enzimática microbiana e biotecnologia

A parede celular vegetal é constituída em sua grande maioria por celulose (40-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-20%). A hemicelulose é formada principalmente por xilana, um heteropolissacarídeo composto por vários monossacarídeos e ácidos orgânicos unidos por ligações glicosídicas e ligações éster (Gray; Zhao; Emptage, 2006). As xilanases são um grupo de enzimas que incluem principalmente as endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), as β -D-xylosidases (E.C. 3.2.1.37) e as α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) que estão envolvidas na despolimerização da xilana em xilo-oligossacarídeos (XOS) e xilose. São divididas em endo-xilanases e exo-xilanases (Figura 1), onde as primeiras clivam aleatoriamente a região interna da cadeia principal da xilana, produzindo xilo-oligômeros de cadeia longa, enquanto as segundas atuam na clivagem a partir das extremidades redutoras, gerando oligômeros de cadeia curta (Juturu; Wu, 2014).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da xilana e da ação das principais enzimas envolvidas em sua degradação.



Fonte: Bhardwaj *et al.*, 2019.

Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos, protozoários e moluscos (Beg *et al.*, 2001) mas sua produção em escala industrial ocorre majoritariamente por bactérias e

fungos, sendo as bactérias as produtoras de xilanases extracelulares mais eficientes (Motta *et al.*, 2013). A xilanase é necessária em grandes quantidades para aplicações em indústrias, exigindo propriedades capazes de resistir às condições rigorosas dos processos produtivos (Qiu *et al.*, 2010). Assim, há a necessidade de selecionar microrganismos eficientes para sua produção e otimizar os componentes do meio para maximizar o seu rendimento (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Os microrganismos são amplamente utilizados pela indústria para a produção em larga escala de enzimas de interesse. Enzimas são biocatalisadores essenciais em vários processos químicos e principalmente biológicos (Madhavan *et al.*, 2017). Na indústria, as xilanases são utilizadas principalmente no processo de branqueamento de papel (Walia *et al.*, 2017) devido a sua capacidade de degradar a hemicelulose e por ser uma alternativa ecológica a compostos químicos tóxicos. Também são utilizadas pela indústria de alimentos na área de panificação (Bhardwaj; Kumar; Verma, 2019) e clarificação de sucos (Danalache *et al.*, 2018).

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o crescimento e a produção de xilanase por Acidobactérias em diferentes fontes de carbono, investigando quais substratos favorecem a expressão dessa enzima. Os resultados obtidos poderão contribuir para o entendimento do papel dessas bactérias na decomposição da biomassa vegetal e na ciclagem do carbono, além de possibilitar o uso de aplicações biotecnológicas voltadas para a conversão de biomassa e a produção de biocombustíveis. Dessa forma, este trabalho está alinhado com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 7 e 15 da ONU (United Nations, 2015).

“ODS 7. Energia limpa e acessível - Garantir o acesso a fontes de energia fiáveis, sustentáveis e modernas para todos.”

“ODS 15. Vida terrestre - Proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da Terra e deter a perda da biodiversidade.”

1.2 Hipótese

A concentração e o tipo de fonte de carbono influenciam na produção de xilanase em Acidobactérias.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Analisar o crescimento e produção de xilanase por acidobactérias cepa AB23 em diferentes fontes de carbono

1.3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer protocolos de ensaio enzimático em controles: culturas crescidas em xilana;
2. Observar o crescimento de AB23 em meio contendo xilana, xilose e glicose;
3. Avaliar atividade de xilanase das culturas cultivadas nas três fontes de carbono estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepa de acidobactéria e manutenção

A cepa utilizada nesse estudo foi a acidobacteria AB23, obtida a partir de uma amostra de solo do Cerrado coletada em uma fazenda próxima à cidade de Cristalina – Goiás (De Castro *et al.*, 2013), pelo grupo de pesquisa liderado pela professora Dra. Cristine Barreto. Essa bactéria já possui genoma sequenciado apresentando genes de xilanases e a atividade xilanolítica já foi demonstrada em meio de cultura sólido. As culturas são mantidas em meio VL-55 sólido (Sait; Hugenholtz; Janssen, 2002), contendo xilana como única fonte de carbono, a 25 °C, sob fonte luminosa para formação de carotenoides facilitando a visualização de contaminações com outras bactérias.

2.2 Meio de cultura

A viabilidade do crescimento dos microrganismos foi avaliada utilizando o meio VL-55 (Sait; Hugenholtz; Janssen, 2002), amplamente empregado para o cultivo *in vitro* de Acidobactérias. O meio VL-55 líquido é constituído de uma solução de sais contendo 0,4 mM de MgSO_4 , 0,4 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 0,6 mM de CaCl_2 e 3,9g/L de tampão MES. São adicionados os seguintes fatores de crescimento por litro de meio VL-55: 2 mL de solução de tungstato/selenito (NaOH , 0,5 g; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3 mg; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg /L); 2 mL de solução de elemento-traço SL10 (ácido nitriloacético 1,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,556; MgSO_4 , 0,5mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5mg; Na_2MoO_4 , 0,24 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mg; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, 0,01 mg; H_3BO_3 mg) e 2 mL de solução de vitaminas de Wolfe (Biotina, 2 mg/L; Ácido fólico 2 mg/L; Piridoxina-HCl 10 mg/L; Tiamina - HCl 5mg/L; Riboflavina 5 mg/L; Ácido nicotínico 5 mg/L; Ácido pantotênico 5mg/L; Cianocobalamina 0,1 mg/L e Ácido lipóico 5 mg/L).

Por fim, são adicionadas as fontes de carbono: xilana (0,05%), xilose (0,05%) ou glicose (0,05%). O meio sólido, quando utilizado, foi solidificado com 1,5 % de ágar nobre.

2.3 Inoculação em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono

A partir de placas contendo as colônias de AB23 crescidas em VL-55 sólido contendo xilana como fonte de carbono, foi adicionado 1 mL de solução de sais (MgSO_4 , CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) e as placas foram raspadas com o auxílio de uma ponteira e a mistura contendo a AB23 e a solução salina foi pipetada em tubos falcons de 15 mL que continham cerca de 7,5 mL de VL-55 líquido com cada uma das três fontes de carbono analisadas nas mesmas concentrações utilizadas para o meio sólido. As amostras foram incubadas sob luz constante por 3 semanas sem agitação e sob temperatura ambiente, o crescimento visível foi verificado pela coloração rosa, dada pela presença de carotenoides. O cultivo em meio líquido foi realizado para analisar o crescimento bacteriano em três diferentes fontes de carbono: xilana, xilose e glicose.

2.4 Análise da atividade enzimática de xilanase

O método escolhido para determinar a atividade enzimática da xilanase foi o método espectrofotométrico com DNS, descrito por Miller (1959). O ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS) é um método indireto para a determinação da atividade enzimática, pois não quantifica diretamente a enzima, mas sim o produto liberado durante a reação. Nesse método, a atividade enzimática é determinada pela absorbância a 540 nm do produto formado na reação entre o DNS e a amostra enzimática bacteriana. Foi construída uma curva padrão a partir de diferentes concentrações de solução estoque de xilose (2 mg/mL), a fim de determinar a concentração de açúcares redutores produzidos pelo consumo de cada fonte de carbono. As concentrações de xilose usadas na curva padrão foram: 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1 mg/mL e 1,2 mg/mL.

O reagente DNS foi cedido pelo Professor Dr. Gilvan Caetano Duarte e apresenta a seguinte composição para 1L de solução: 300 g de tartarato de sódio e potássio, 10 g de DNS e 200 mL de hidróxido de sódio 2 M.

As leituras da absorbância foram plotadas em um gráfico de Absorbância x Massa da xilose para obter uma curva padrão e a equação da reta obtida foi utilizada para o cálculo das atividades enzimáticas das amostras.

2.4.1 Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi realizado em triplicata, utilizando microtubos de 2 mL. As amostras foram divididas em 3 composições diferentes. A primeira, denominada Enzima (E), é composta por 50 µL da amostra enzimática e 100 µL do substrato xilana 1% (m/v) (0,1g em 10 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5). A segunda, denominada Branco do Substrato (BS), composta por 50 µL de tampão acetato 0,1 M, pH 5 (preparado com 14,8 mL de ácido acético 0,2 M, 35,2 mL de acetato de sódio e 50 mL de água destilada) e 100 µL do substrato xilana 1% (m/v). A terceira foi o Branco da Enzima (BE), composto por 50 µL de amostra enzimática e 100 µL de tampão acetato 0,1 M, pH 5. Além delas, teve o Branco (B) composto apenas por 150 µL de água destilada e o reagente DNS, que serviu como um parâmetro para o espectrofotômetro.

A incubação das amostras foi de 60 minutos a 50°C no banho-maria. Após a incubação foram adicionados 300 µL de DNS em todas as amostras. Em seguida, o ensaio foi fervido por 10 minutos. Após 10 minutos, foi adicionado 1,5 mL de água destilada e possibilitar a leitura da absorbância a 540 nm.

2.4.2 Avaliação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada conforme a equação definida por Ghose (1987), onde a unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de xilose por minuto ($\mu\text{moles/min}$), nas condições de ensaio.

$$\text{Xilanase (mU/mL)} = \frac{(A-B)*f*0,15}{x*t*0,05} \times 1000$$

Onde:

A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do branco da amostra (branco do substrato);

f = Fator de conversão da curva padrão para enzimas (mg/mL); *

0,15 = Volume total do meio de reação (mL);

x = Fator de conversão de mg para μmol de xilose (0,15);

t = Tempo de reação (min);

0,05 = Volume da enzima no meio de reação (mL);

* Calculado com base na equação da reta da curva padrão:

$$f = \frac{1}{ax}$$

2.5 Lise celular

Por se tratar de uma bactéria Gram-negativa, foram avaliadas duas técnicas de lise celular: banho ultrassônico e nitrogênio líquido, com o objetivo de romper a membrana celular e permitir o acesso às enzimas presentes no espaço periplasmático das bactérias. Nos dois métodos a amostra, após a lise, foi separada em *pellet* e sobrenadante e tiveram sua atividade avaliada no ensaio enzimático

2.5.1 Método de lise celular

O protocolo estabelecido para a lise celular consistiu na transferência das células cultivadas em meio VL-55 líquido para microtubos de 2 mL, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 90 segundos para obtenção do *pellet* celular. O sobrenadante foi descartado, e o procedimento foi repetido até a completa remoção do meio, permanecendo apenas o *pellet*. Em seguida, o material foi ressuspensão em 1 mL de solução de lise composta por NaCl 0,6 M e HCl 0,1%, sendo as amostras homogeneizadas em vórtex.

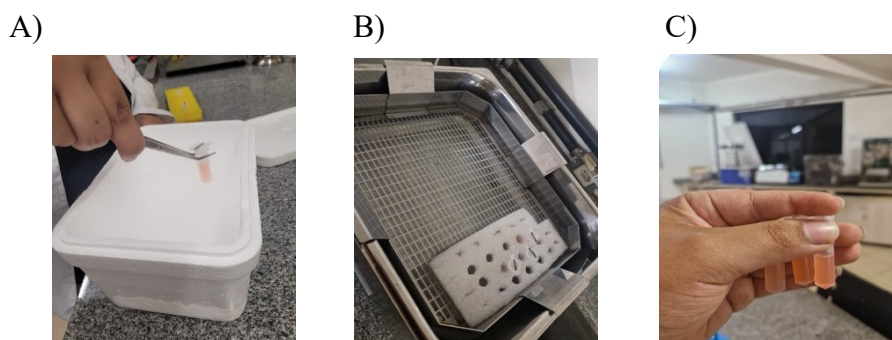
Posteriormente, as amostras foram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, consistindo na imersão em nitrogênio líquido por 30 segundos (Figura 2A) e incubação em banho-maria a 37 °C por 40 segundos. Esse procedimento foi repetido oito vezes consecutivas, com o objetivo de enfraquecer a membrana externa bacteriana e favorecer a penetração do ultrassom.

Após o último ciclo, as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex e submetidas a dois ciclos de sonicação em banho ultrassônico, com duração de 15 minutos cada, intercalados por agitação em vórtex (Figura 2B). Em seguida, realizou-se centrifugação a 5.500 g por 10 minutos para separação do extrato enzimático do material particulado. Após a lise, as amostras líquidas apresentaram coloração rosada compatível com a cepa AB23, indicando a eficácia do rompimento da membrana celular (Figura 2C).

Por fim, as amostras foram separadas em *pellet* e sobrenadante e submetidas às análises subsequentes. O *pellet* da amostra sonicada na Universidade Católica de Brasília (UCB) foi diluído duas vezes para obtenção do volume final de 300 µL necessários ao ensaio, sendo estabelecido, a partir desse experimento, um tempo de incubação de 2 horas.

Figura 2 – Amostras de AB23 durante a lise celular em A) Nitrogênio Líquido; B) Sonicador de mesa; C)

Amostras de AB23 após lise celular.



Fonte: Elaborado pelo autor

2.6 Dosagem de proteínas por método colorimétrico

Foi utilizado o reagente de Bradford, da marca Sigma-Aldrich, para a visualização e quantificação da concentração total de proteínas presentes nas amostras a partir da coloração azul formada através da interação do corante Coomassie brilhante G-250 com a solução proteica (Sigma-Aldrich Co.). Foram testados três protocolos diferentes para verificar qual o melhor para o seguinte trabalho. Foi utilizado em todos os testes uma solução estoque de albumina bovina (BSA) com concentração de 10 mg/mL como referência para a determinação quantitativa nas amostras analisadas.

Em todos os protocolos foi-se adicionado a quantidade correspondente de BSA + reagente de Bradford em tubos de ensaio tendo o tempo de reação de 15 minutos. As amostras foram analisadas no espectrofotômetro a 595 nm.

Os dois primeiros protocolos testados foram da Sigma-Aldrich sendo o primeiro para 2 mL de solução e o segundo para 3,1 mL, em ambos utilizou concentrações que variaram de 0,1 a 1,4 mg/mL de BSA. O terceiro protocolo foi o Quick Start™ Bradford protein assay (BIORAD), que utilizou 7 concentrações diferentes da solução estoque de BSA que variou de 0,125 mg/mL a 2 mg/mL. O teste foi feito na proporção de 20 µL de BSA e 1 mL de Bradford.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

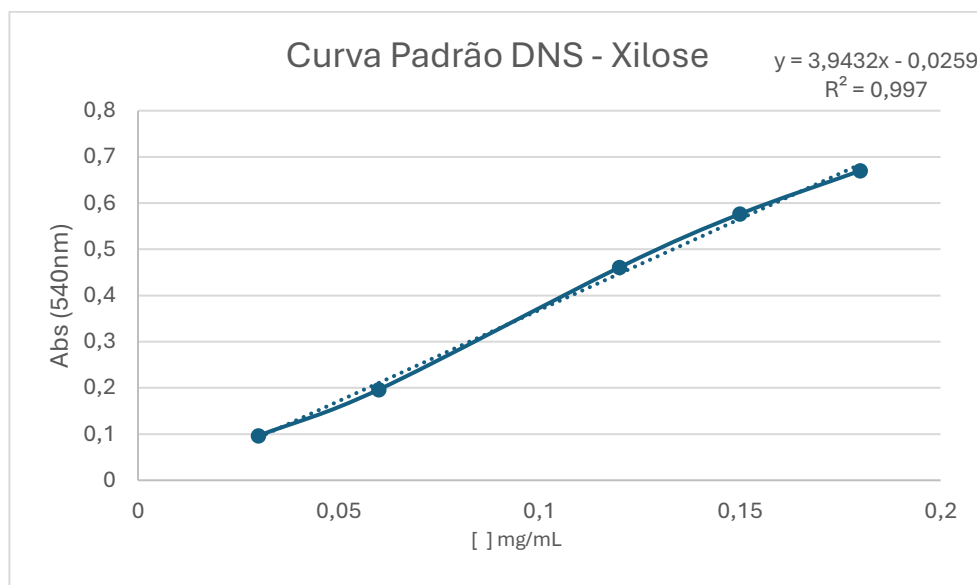
3.1 Estabelecimento dos protocolos de ensaio enzimático em controles: culturas crescidas em xilana

3.1.1 Análise de concentração de açúcares redutores e atividade enzimática: sobrenadante

Inicialmente, foram utilizadas culturas de bactérias em meio líquido contendo xilana como fonte de carbono a fim de verificar a confiabilidade dos resultados obtidos pelo método do DNS, pois é esperado que essas culturas apresentem atividade quitinolítica em seu sobrenadante como descrito por Pinto (2017).

A curva padrão contendo concentrações crescentes de xilose 0,2 a 1,2 mg/mL apresentou um $r = 0,997$ (Figura 3), dessa forma pode ser utilizada para os experimentos seguintes.

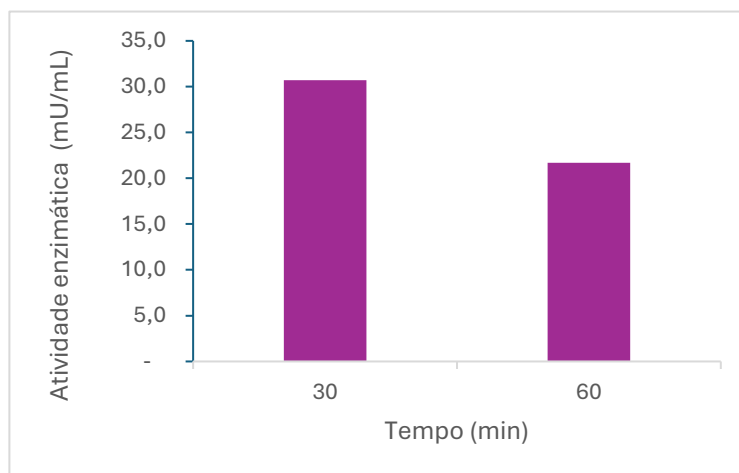
Figura 3 – Curva padrão de xilose em ácido 3,5-dinitrosalicílico



Fonte: Elaborado pelo autor

A seguir, foram realizados dois ensaios enzimáticos em dias consecutivos (Figura 4). O ensaio 1 seguiu um tempo de incubação de 30 minutos e apresentou uma atividade enzimática de 30,7 mU/mL. Devido à baixa atividade enzimática, foi-se realizado o ensaio 2 com um tempo de incubação de 1 hora. O segundo ensaio também apresentou uma baixa atividade enzimática de 21,7 mU/mL, entretanto apresentou valor menor do que a do primeiro ensaio, indicando que o tempo de incubação é um fator importante na expressão da atividade enzimática.

Figura 4 - Atividade enzimática com xilana dos ensaios 1 e 2 com tempo de incubação com o substrato de 30 minutos e 60 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor

A atividade enzimática obtida em ambos os ensaios apresentou valores muito baixos, independente do tempo de incubação. Foi demonstrado por Bocchini *et al.* (2005) que *Bacillus circulans* D1 apresenta atividade xilanolítica de 8,4 U/mL e, por Knob (2008), que *Penicillium sclerotiorum* apresenta atividade enzimática de 7,5 U/mL, evidenciando que o resultado obtido neste estudo é significativamente inferior aos valores descritos na literatura para espécies reconhecidas por sua atividade xilanolítica.

O uso do DNS constitui um dos métodos mais utilizados para a determinação de açúcares redutores em amostras devido a sua simplicidade, baixo custo e fácil acessibilidade. Devido a essas características é uma alternativa viável a métodos como o *Nelson-Somogyi* (Nelson, 1944), que apesar de também ser um método colorimétrico, envolve etapas mais complexas e maior manipulação experimental, limitando sua aplicação em análises rotineiras. Além disso, o DNS é utilizado em substituição a técnicas mais robustas como o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) que necessita de um equipamento mais específico, menos acessível e que geralmente é utilizado para análises que requerem maior precisão e especificidade.

Entretanto, o método do DNS apresenta limitações importantes. Moretti e Thorson (2008) demonstraram que, quando comparado com outros métodos indicadores de açúcar redutor, como o azul de tetrazólio, azul da Prússia e Honda MBTH, o DNS é o que apresenta a menor sensibilidade sendo necessário mais açúcar para gerar o sinal detectável quando comparado aos indicadores testados. Isso demonstra que, apesar de o DNS ser um método muito utilizado em laboratórios, sua menor sensibilidade analítica pode ter limitado a detecção de

pequenas variações na liberação de açúcares redutores, principalmente nas amostras com baixa atividade enzimática. Dessa forma, é possível que a atividade de xilanase encontrada tenha sido subestimada em condições próximas ao limite de detecção do método.

A baixa atividade enzimática observada nas amostras com enzima sugere, também, que as proteínas não estavam sendo liberadas pela bactéria no ambiente extracelular, e indica que, por se tratar de uma Gram-negativa, é provável que as enzimas estejam localizadas no espaço periplasmático da bactéria como demonstrado por Rodrigues *et al* (2020). Por conta disso, seria necessário realizar uma lise celular para romper a membrana externa e ter acesso a essas enzimas.

3.1.2 Comparação de métodos de lise celular

Como demonstrado por Rodrigues *et al.* (2020), a forma mais eficiente de realizar a lise celular em Acidobactérias é através de um sonicador de ponta, equipamento que promove a ruptura da membrana celular através de pulsos direcionados de ondas ultrassônicas. Entretanto, como esse equipamento não está disponível em nosso laboratório, buscou-se na literatura alternativas de métodos de lise celular que fossem eficazes, mas que não envolvessem o uso de detergentes ou procedimentos excessivamente agressivos, a fim de evitar a degradação parcial ou integral das enzimas. Através dessa busca foram testadas duas formas de lise celular: o ultrassom de mesa e *freeze-thaw*.

A técnica de *freeze-thaw* consiste na realização de ciclos sucessivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria. A variação brusca de temperatura promove o rompimento da membrana celular e a liberação das proteínas citoplasmáticas sem causar sua degradação completa (Johnson; Hecht, 1994). Trata-se de um método bem estabelecido e amplamente empregado na literatura (Wanarska; Hilderandt; Kur, 2007; Geada *et al.*, 2019).

O rompimento celular por ondas ultrassônicas também é amplamente difundido, especialmente por meio do sonicador de ponta, considerado método padrão para lise celular (Song *et al.*, 2007). Simon (1974) descreveu o uso do banho ultrassônico para ruptura de células em pequenos volumes, evidenciando seu potencial como alternativa indireta de lise. Embora o ultrassom de mesa emita pulsos menos intensos e menos direcionados que o sonicador de ponta, ele foi testado neste trabalho como fonte alternativa de ondas ultrassônicas. Dessa forma, a

proposta deste estudo consistiu em avaliar métodos de lise mais simples e acessíveis, visando ampliar a viabilidade experimental em laboratórios com infraestrutura limitada.

Os resultados demonstraram que a lise celular promoveu aumento expressivo na atividade enzimática detectada, evidenciando que parcela significativa da atividade de xilanase estava associada à fração celular. O *pellet* apresentou médias de 67 mU/mL para xilana, 49,5 mU/mL para glicose e 113,5 mU/mL para xilose, valores substancialmente superiores aos observados nas amostras sem lise (30,7 mU/mL e 21,7 mU/mL). Esses dados indicam que a ruptura celular foi determinante para a liberação da enzima em sua forma ativa.

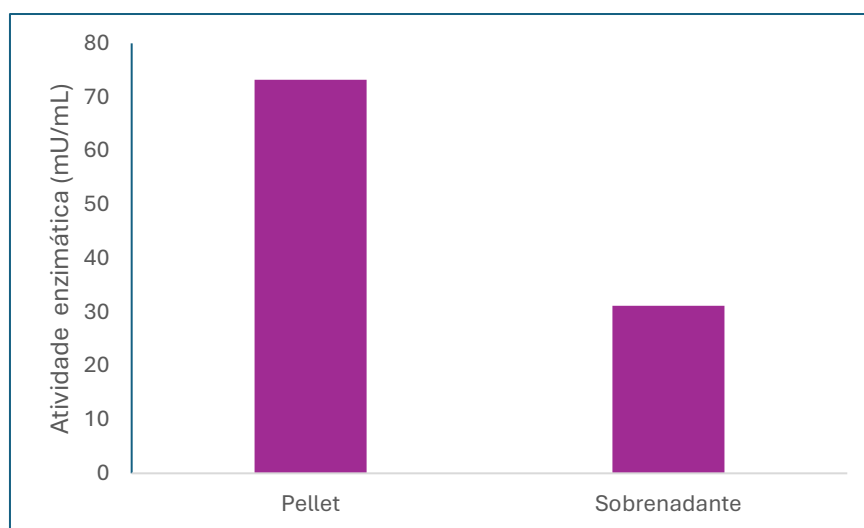
Entretanto, a atividade detectada no sobrenadante foi inferior ao limite de detecção para xilana e xilose no primeiro ensaio, reforçando a predominância da fração celular como principal reservatório da atividade enzimática e a necessidade da realização de mais testes.

3.1.3 Análise da atividade de xilanase: sobrenadante e *pellet*

Uma das amostras posteriormente foi enviada ao laboratório da Universidade Católica de Brasília (UCB) e foi lisada com o sonificador de ponta.

O sobrenadante apresentou o valor de: 31,2 mU/mL, valor esse próximo aos 30,7 mU/mL e 21,7 mU/mL encontrados nos ensaios 1 e 2 relatados na figura 3. Enquanto o *pellet* apresentou uma atividade de 73,2 mU/mL (Figura 5), valor esse aproximadamente 2x maior do que os encontrados previamente (Figura 4). Essa diferença evidencia a afirmação de que as enzimas são encontradas em maior quantidade no *pellet* bacteriano, ou seja, são associadas à fração celular. Esses dados reforçam a necessidade de lise celular para possibilitar o acesso a essas moléculas.

Figura 5 - Atividade enzimática do *pellet* e sobrenadante da amostra crescida em xilana e lisada por sonificador de ponta



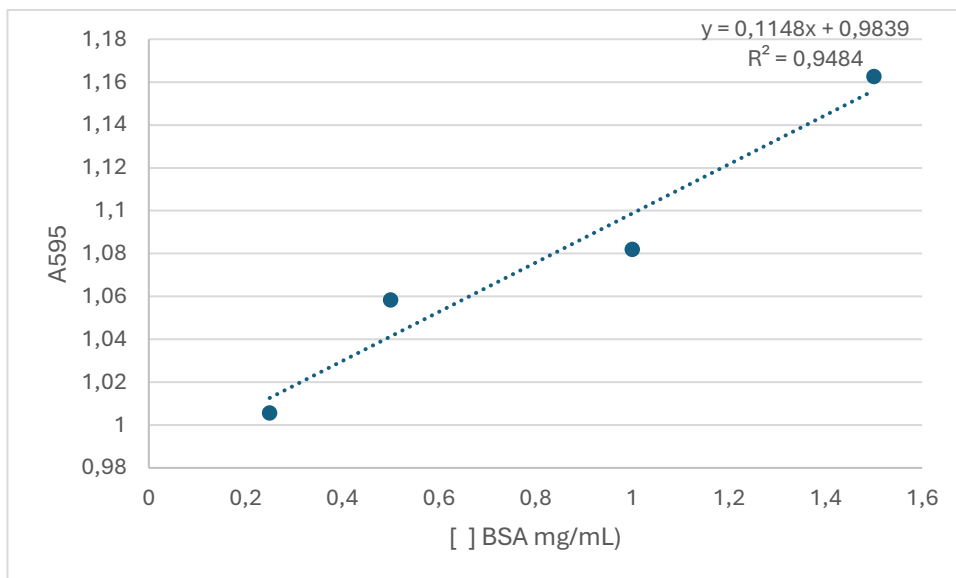
Fonte: Elaborado pelo autor

3.1.4 Dosagem de proteínas por método colorimétrico

Devido à baixa atividade enzimática detectada, a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford passou a ser utilizada para verificar a presença e dosar a quantidade de proteínas nas amostras antes de realizar o ensaio enzimático com DNS.

O primeiro protocolo testado foi o *Micro 2 mL Assay Protocol* da Sigma-Aldrich, utilizando concentrações que variavam de 0,1 a 1,4 mg/mL de BSA. A curva padrão contendo concentrações crescentes de BSA apresentou um $r = 0,9484$ (Figura 6). Como se tratava do primeiro teste com o reagente e o coeficiente de correlação (r) não apresentou um valor satisfatório, também foram testados o protocolo Quick Start™ Bradford protein assay da Biorad e o da Sigma-Aldrich *Standard 3,1 mL Assay Protocol*.

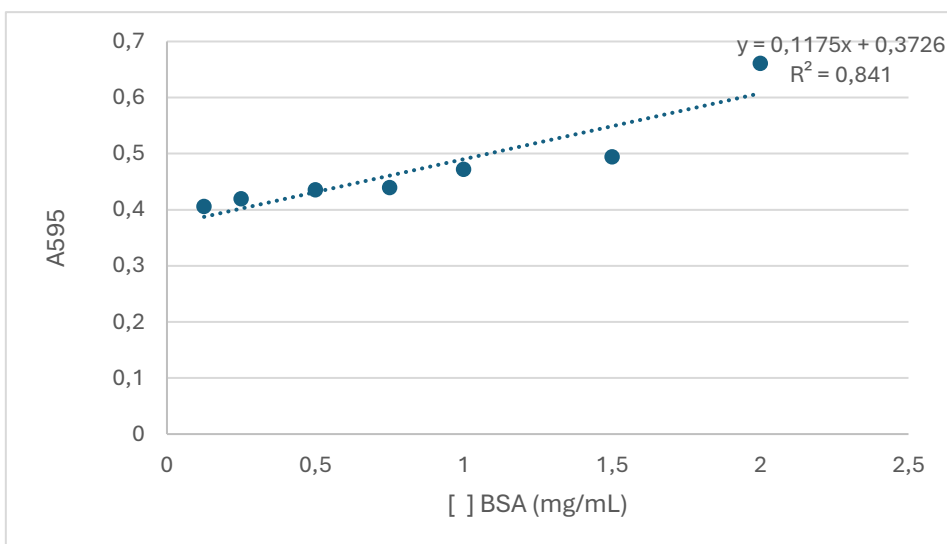
Figura 6 – Curva padrão protocolo *Micro 2 mL Assay Protocol* da Sigma-Aldrich



Fonte: Elaborado pelo autor

Utilizando-se o protocolo da Bio-Rad, cujas concentrações variavam de 0,125 a 2 mg/mL de BSA, foi encontrado um valor de r de 0,841, valor inferior ao mínimo recomendado para boa confiabilidade estatística ($r \geq 0,9$). Entretanto, observou-se que a curva apresentou uma linearidade quando as concentrações variavam de 0,5 em 0,5 mL (1;1,5 e 2,0 mL). Com base nessa observação, optou-se por aplicar essas mesmas variações no ensaio utilizando o padrão de 3,1 mL da Sigma-Aldrich, mantendo os incrementos de 0,5 em 0,5 mL (Figura 7), a fim de melhorar a linearidade e a confiabilidade dos resultados.

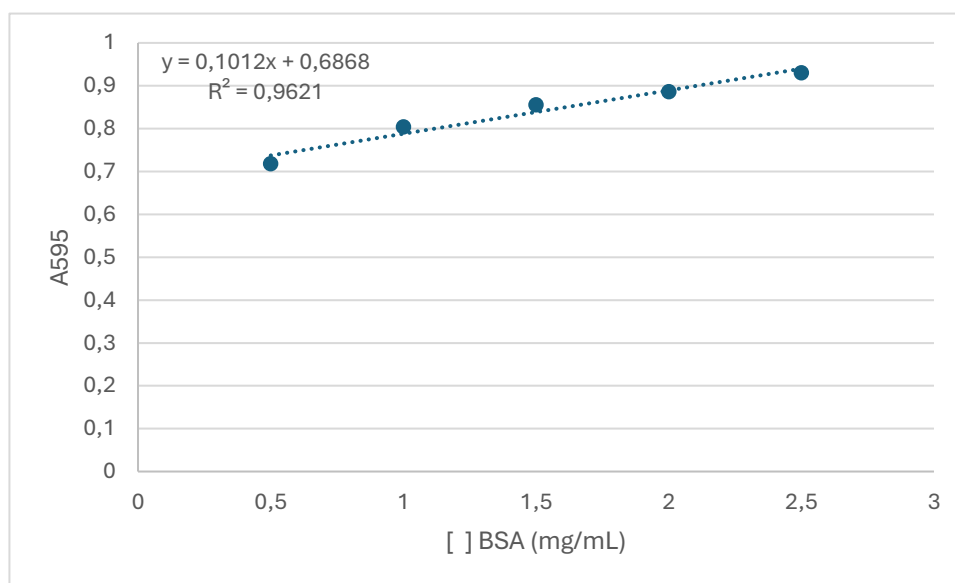
Figura 7 – Curva padrão protocolo de dosagem de proteínas Bio-Rad



Fonte: Elaborado pelo autor

A curva utilizando o protocolo *Standard 3,1 mL Assay* com concentrações que variavam de 0 a 1,4 mg/mL de BSA apresentou o maior valor de r ($r = 0,9621$) entre os testes realizados indicando maior linearidade entre a concentração de proteína e a absorbância (Figura 8). Apesar de utilizar 3 mL de reagente por amostra, decidiu-se que esse seria o protocolo adotado para as análises do ensaio de Bradford.

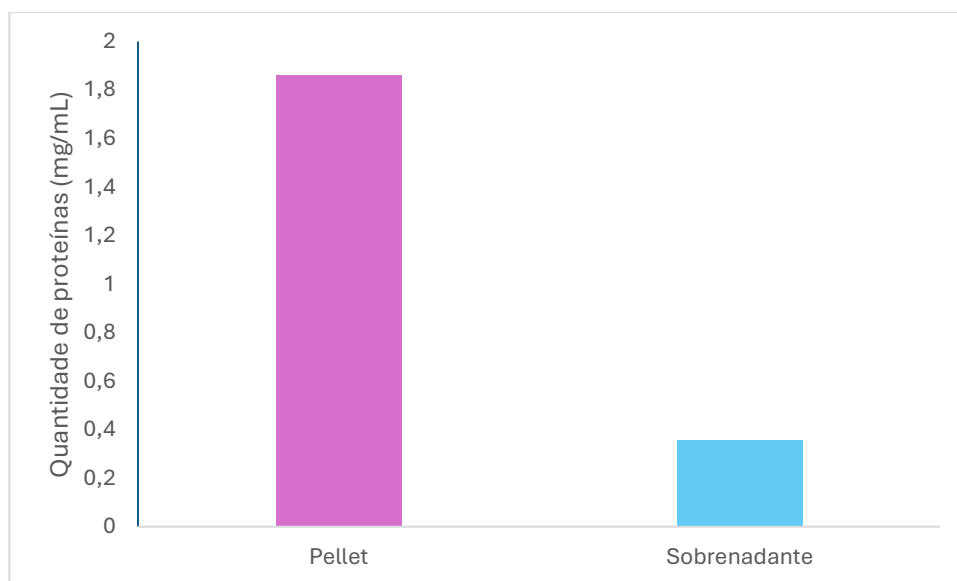
Figura 8 – Curva padrão protocolo *Standard 3,1 mL Assay*



Fonte: Elaborado pelo autor

O protocolo estabelecido para o uso do reagente de Bradford para a dosagem de proteínas ficou definido nas seguintes concentrações de 0,5 a 2,5 mg/mL utilizando 0,1 mL de solução de BSA 10 mg/mL e 3 mL de reagente do reagente de Bradford por amostra. Após o protocolo de dosagem de proteínas ter sido estabelecido foi realizado o teste com uma amostra de AB23 crescida em xilana que foi lisada com um sonicador de ponta no laboratório da UCB. A amostra foi dividida em sobrenadante e *pellet* e ambas indicaram uma alta quantidade de proteínas sendo que, como o esperado (Rodrigues *et al.*, 2020), o *pellet* apresentou maior concentração de proteínas (Figura 9).

Figura 9 – Dosagem de proteínas em amostra lisada com sonificador de ponta contendo AB23 cultivada em xilana como fonte única de carbono



Fonte: Elaborado pelo autor

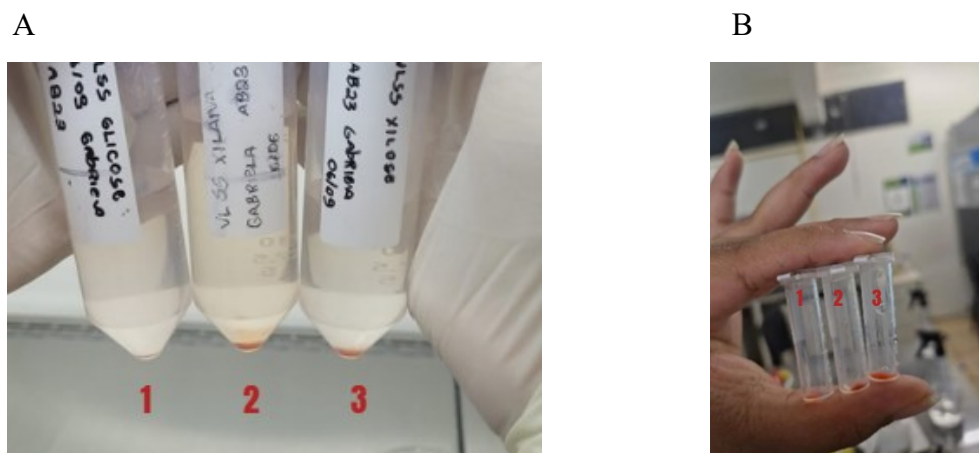
O *pellet* apresentou 1,8616 mg/mL de proteína total enquanto o sobrenadante apresentou 0,3577 mg/mL. O *pellet* apresentar 5x mais proteínas reforça a hipótese de Rodrigues *et al.* (2020) de que as enzimas das acidobactérias estão localizadas em sua grande maioria no espaço periplasmático e que se faz necessário a lise para conseguir acessá-las.

3.2 Crescimento de AB23 em meio contendo xilana, xilose ou glicose

A cepa AB23 apresentou crescimento nos três substratos de cultivo avaliados, glicose, xilana e xilose. No entanto, a análise visual do *pellet* indicou que, no meio contendo glicose, o crescimento foi inferior quando comparado aos demais substratos (Figura 10A).

Esse menor crescimento é compatível com o que foi reportado por Dedysh; Damsté (2018), uma vez que membros do filo *Acidobacteriota* são predominantemente oligotróficos e apresentam crescimento lento o que explica uma possível inibição metabólica em meios que apresentam altas concentrações de fontes de carbono facilmente oxidáveis, como a glicose (repressão catabólica). As diferenças no crescimento são observadas melhor quando o meio de cultivo é aspirado das amostras (Figura 10B).

Figura 10 - Crescimento bacteriano em VL-55 líquido: (1) Glicose, (2) Xilana e (3) Xilose. A) Células em meio de cultura, B) Células precipitadas, com meio de cultura aspirado



Fonte: Elaborado pelo autor

O crescimento observado em xilana como fonte única de carbono é compatível com o que foi descrito por Rodrigues *et al.* (2020), que demonstrou o potencial xilanolítico de bactérias do filo *Acidobacteriota* isoladas de solos do Cerrado. Nesse estudo, a cepa AB60 que foi isolada junto com a cepa AB23 por De Castro *et al.* (2013), apresentou capacidade de utilizar xilana como substrato de crescimento, associada à produção de enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos complexos, corroborando a adaptação desses microrganismos a fontes de carbono recalcitrantes presentes no solo ácido do Cerrado.

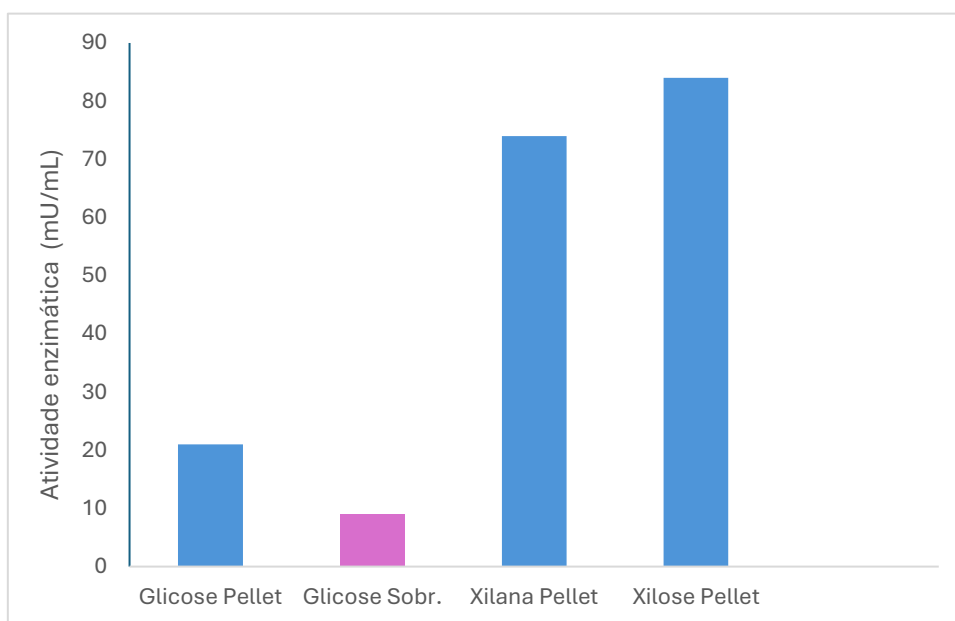
Estudos conduzidos por Sybiya *et al.* (2024) e Rodrigues (2019) demonstraram que bactérias de solo, apresentam crescimento em xilose como fonte única de carbono. Apesar da xilose ser um monossacarídeo como a glicose, sua origem como produto da degradação da hemicelulose vegetal sugere uma metabolização mais gradual e com menor efeito repressivo sobre o metabolismo bacteriano quando comparada à glicose, favorecendo o crescimento de microrganismos bactérias de solo adaptadas a ambientes oligotróficos. Logo, o resultado obtido é compatível com o encontrado na literatura.

3.3 Avaliação da atividade de xilanase nas três fontes de carbono estudadas.

3.3.1 Análise de concentração de açúcares redutores e atividade enzimática

A análise seguinte foi feita após o cultivo de AB23 nos substratos glicose, xilana e xilose como fonte de carbono única. Os três cultivos foram lisados utilizando a técnica de *freeze thaw* seguida de ultrassom de mesa citada no tópico 2.5.1. Nas três amostras o *pellet* foi diluído em 4x para alcançar o volume de 400 μ L necessários para realizar os ensaios de Bradford e DNS.

Figura 11 - Atividade enzimática do *pellet* da amostra contendo glicose, xilana e xilose e do sobrenadante da glicose como fontes de carbono únicas.



Fonte: Elaborado pelo autor

A amostra com xilose apresentou um valor de 84 mU/mL sendo o maior valor de atividade enzimática das três amostras seguida por 74 mU/mL da xilana enquanto a glicose apresentou o menor valor de 21 mU/mL no *pellet* e 9 mU/mL no sobrenadante (Figura 11). A xilana é descrita como a melhor fonte de carbono indutora da produção de xilanase (Bhardwaj *et al.*, 2019). entretanto, por se tratar de um polímero de alto peso molecular, ela não consegue entrar diretamente na célula bacteriana e induzir a produção de xilanase. Dessa forma, uma pequena quantidade de enzima constitutiva inicialmente produzida e secretada no meio promove a degradação parcial da xilana, gerando fragmentos de baixo peso molecular, como xilobiose e xilose. Esses compostos de menor peso molecular conseguem então ser assimilados pela bactéria e atuar como indutores aumentando assim a produção enzimática. (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Essa premissa justifica a atividade enzimática no meio contendo xilose ser a maior das amostras testadas devido a sua alta capacidade indutora e baixo peso molecular que permite

adentrar mais facilmente à membrana bacteriana. O valor baixo de atividade enzimática no meio contendo glicose como fonte única de carbono também está de acordo com o encontrado na literatura, uma vez que o monossacarídeo atua como um repressor na produção de xilanases, como observado em *Bacillus sp.* (Lopez *et al.* 1998) e *Trichosporon cutaneum* SL409 (Liu *et al.* 1998).

O branco do substrato apresentou valores altos, sendo que em alguns casos, foi maior do que a atividade da amostra enzimática, e ocasionou na falta de atividade enzimática nos ensaios com sobrenadantes de xilana e xilose. A xilana utilizada nos ensaios era do tipo xilana de faia (*beechwood*) que é a utilizada nos meios de cultura e apresenta uma coloração marrom. Considerando a possibilidade de que essa coloração foi responsável pelos altos valores nas amostras de branco do substrato, foram realizados novos experimentos utilizando-se xilana de aveia (*oat spelts*), que se apresenta mais clara e fina (Figura 12)

Figura 12 – Observação dos diferentes tipos de xilana: à esquerda encontra-se a xilana de faia (*beechwood*) e, à direita, a xilana de aveia (*oat spelts*).



Fonte: Elaborado pelo autor

As amostras apresentaram valores significativamente inferiores aos obtidos nas análises anteriores (Tabela 1). Entretanto, não é possível atribuir essa diferença exclusivamente à diferença entre as xilanas, uma vez que as amostras já haviam sido lisadas há alguns dias, o que pode ter levado à degradação parcial dos componentes analisados. No entanto, a absorbância do substrato apresentou o valor de 0,004 demonstrando que o substrato utilizado anteriormente (*beechwood*) estava interferindo diretamente nos resultados obtidos até então, tornando-os imprecisos.

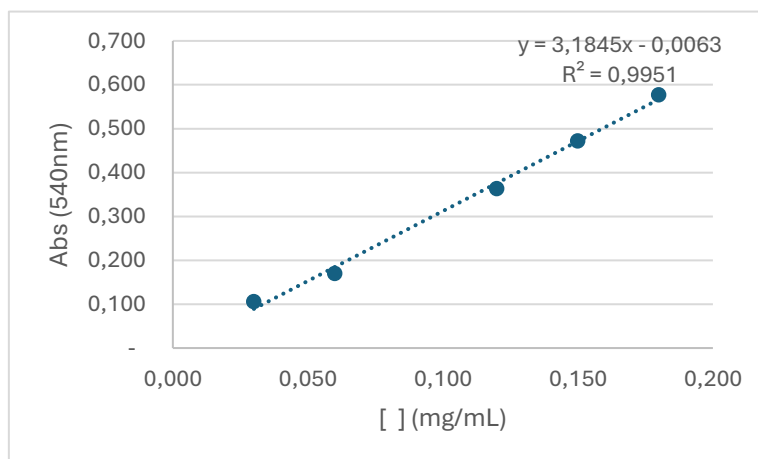
Tabela 1 - Atividade enzimática do sobrenadante da amostra contendo glicose, xilana e xilose utilizando o substrato xilana 1% de aveia (*oat spelts*).

Amostra	Atividade enzimática (mU/mL) - sobrenadante
Glicose	13,779
Xilana	21,199
Xilose	8,801

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a identificação do melhor substrato para os ensaios enzimáticos foi realizado um último ensaio com uma nova curva padrão de xilose. A nova curva padrão contendo concentrações crescentes de xilose apresentou um $r = 0,9951$ (Figura 13), dessa forma pode ser utilizada para os experimentos seguintes.

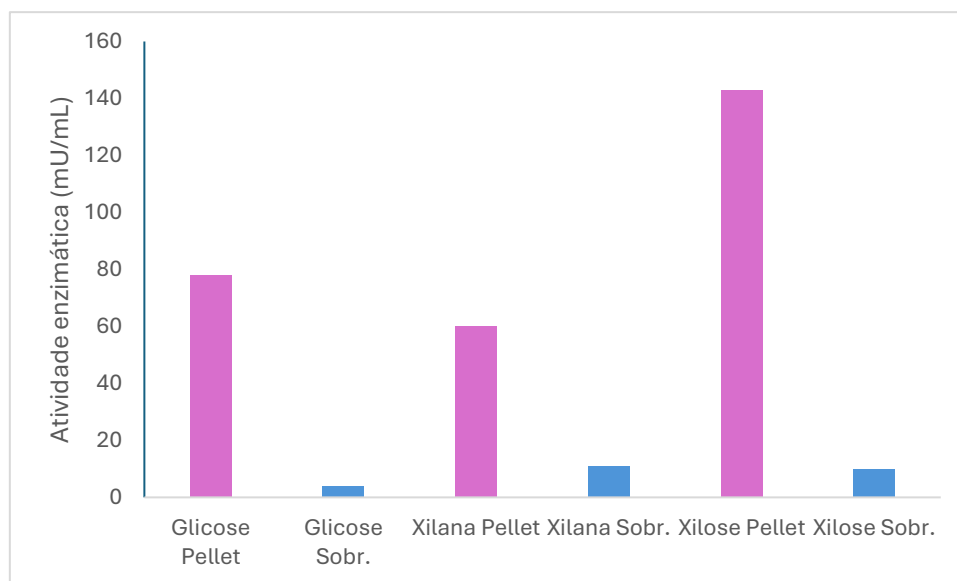
Figura 13 – Curva padrão ácido 3,5-dinitrosalicílico com xilose como substrato.



Fonte: Elaborado pelo autor

A comparação entre *pellets* e sobrenadantes obtidos a partir de culturas com xilana, xilose ou glicose (Figura 14) revelou que os *pellets* apresentaram atividade maior do que os sobrenadantes nos três substratos avaliados. No meio contendo glicose, a atividade foi de 78 mU/mL no *pellet* e 4 mU/mL no sobrenadante; na presença de xilana, foram registrados 60 mU/mL no *pellet* e 11 mU/mL no sobrenadante; e, no meio com xilose, a atividade atingiu 143 mU/mL no *pellet* e 10 mU/mL no sobrenadante.

Figura 14 – Atividade enzimática do *pellet* da amostra contendo Glicose, Xilana e Xilose e do sobrenadante da glicose como fontes de carbono únicas.



Fonte: Elaborado pelo autor

Apesar dos valores encontrados serem consideravelmente inferiores aos 8,4 U/mL de Bocchini *et al.* (2005) e aos 7,5 U/mL de Knob (2008), eles são compatíveis aos encontrados por Pinto (2017) que avaliou a atividade enzimática de enzimas como a endoglucanase em AB23. As amostras foram crescidas em três substratos diferentes e apresentaram 97,4 mU/mL, para lactose, seguido de 49,2 mU/mL em xilana e 33 mU/mL em celobiose. Também foi reportado que a porção bacteriana (*pellet*) apresentou maior atividade do que o sobrenadante. Demonstrando que os resultados encontrados nesse trabalho são compatíveis aos documentados anteriormente assegurando a sua confiabilidade.

Esses resultados também confirmam o que foi demonstrado por Rodrigues *et al* (2020), que uma parcela significativa das xilanases estão localizadas no espaço periplasmático e que o processo de lise celular se faz necessário para alcançar essas enzimas. Além disso, a maior atividade no *pellet* proveniente do meio contendo xilose como fonte única de carbono reforça que esse monossacarídeo de baixo peso molecular consegue atravessar com maior facilidade a membrana da AB23 e estimular a síntese enzimática.

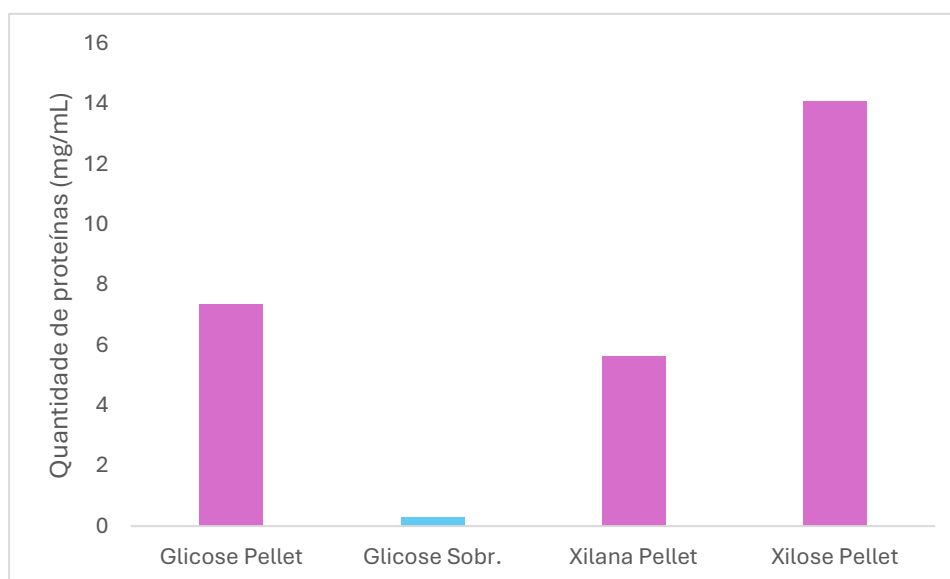
O meio contendo glicose apresentou a menor atividade o que pode estar relacionado ao efeito repressor desse açúcar sobre a produção de enzimas xilanolíticas conforme descrito por Dedysh; Damsté (2018). Já a xilana, por ser um polímero de alto peso molecular depende da geração de oligossacarídeos indutores o que pode justificar a atividade menor do que a da xilose (Rodrigues *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2019; Sybiya *et al* ,2024). Entretanto, esses resultados

não são o suficiente para estabelecer uma conclusão sobre a ação dos diferentes substratos na atividade enzimática da xilanase, uma vez que faz-se necessário realizar ensaios complementares para comparar e certificar a confiabilidade e reprodutibilidade dos valores obtidos.

3.3.2 Dosagem de proteínas por método colorimétrico

A quantificação das proteínas referentes ao ensaio da figura 13 revelou que no meio contendo glicose, a quantificação foi de 7,36 mg/mL no *pellet* e 0,28 mg/mL no sobrenadante; na presença de xilana, foram registrados 5,62 mg/mL no *pellet*; e, no meio com xilose, a quantificação foi de 14,08 mg/mL no *pellet* (Figura 15). As amostras de sobrenadante dos meios com xilana e com xilose apresentaram um valor menor do que o limite de detecção da curva padrão e por isso não foram considerados nos resultados.

Figura 15 – Dosagem de proteínas em amostra lisada contendo AB23 cultivada em glicose, xilana e xilose como fonte única de carbono.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em todas as amostras observou-se que o *pellet* apresentou uma quantidade de proteínas muito superior ao sobrenadante, conforme o esperado, uma vez que grande parte das proteínas celulares se encontram no periplasma. A xilose apresentou a maior concentração proteica e

maior atividade enzimática devido à afinidade metabólica da AB23 com esse substrato que foi discutida anteriormente.

Gong *et al.* (2018) comparou a quantificação proteica de *Aspergillus niger* em meios contendo diferentes fontes de carbono, incluindo glicose, xilana e xilose. Obteve valores aproximados de 12 mg/mL para xilose, 10 mg/mL para glicose e cerca de 5 mg/mL para xilana. Embora a análise tenha sido feita com um fungo, o padrão observado é compatível com os resultados encontrados na análise 2, onde o valor de xilana foi o menor entre os três substratos e o da xilose o maior. Esses dados sugerem que a AB23 pode possuir uma alta capacidade na produção de proteínas quando cultivada em xilose.

Gong também sugeriu que derivados da xilana, como a xilose, são capazes de induzir uma maior produção de proteínas devido a sua relação com a degradação de matéria orgânica e, também por sua maior facilidade de adentrar a membrana bacteriana. Rakotoarivonina *et al.* (2012), relata em seu trabalho que a produção de proteínas de *Thermobacillus xylanilyticus* está diretamente relacionada ao crescimento celular, indicando que maior crescimento resulta em maior produção proteica. Visualmente a AB23 apresentou maior crescimento no substrato xilose e menor crescimento na glicose, corroborando os valores de quantificação observados.

Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que há uma relação direta entre o crescimento celular e a produção de proteínas totais, evidenciada pela maior concentração de proteínas nas amostras de *pellet*, principalmente em meio contendo xilose. Isso demonstra a afinidade da AB23 por esse substrato e sugere que a xilose pode influenciar na produção metabólica de proteínas. Também reforça a capacidade que a glicose possui de repressão catabólica quando encontrada como fonte de carbono em um meio de cultura (Xing *et al.*, 2013). Contudo é necessário a realização de mais experimentos para obter resultados mais concretos sobre qual a influência dessas fontes de carbono na produção de proteínas pela AB23 e verificar a confiabilidade e reprodutibilidade dos valores obtidos.

4. CONCLUSÃO

A Acidobactéria AB23 foi exposta a diferentes fontes de carbono: glicose, xilana e xilose. Houve crescimento visual nas três fontes de carbono. O menor crescimento foi observado em glicose enquanto o maior crescimento foi em xilose. A xilana apresentou crescimento intermediário entre essas outras duas fontes de carbono evidenciando a influência da fonte de carbono sobre o crescimento da cepa.

Foi observado que os *pellets* apresentaram maior valor tanto na atividade enzimática quanto na quantificação de proteínas o que reforça a presença dessas moléculas no espaço periplasmático bacteriano e demonstra a necessidade da lise celular para acessá-las. Foi possível realizar a lise na ausência do sonificador de ponta, por meio da associação da técnica de *freeze-thaw* e ultrassom de mesa demonstrando a viabilidade metodológica da estratégia adotada.

Na avaliação da atividade enzimática, os resultados sugerem a ocorrência de repressão catabólica na presença de glicose e a facilidade que a xilose tem de penetrar na membrana bacteriana por ser um fragmento de baixo peso molecular. A xilana é a melhor fonte de carbono indutora da produção de xilanase, entretanto, seu alto peso molecular dificulta a sua penetração e consequentemente a expressão de proteínas quando encontrada como fonte única de carbono em meio de cultura o que é demonstrado por ser valor intermediário.

A comparação entre os dados de atividade enzimática e quantificação proteica evidencia uma relação direta entre maior concentração de proteínas e maior atividade de xilanase na fração *pellet*. Essa relação direta demonstra que o aumento da atividade enzimática acompanhou o aumento da quantidade total de proteínas na fração celular. A condição com xilose apresentou aproximadamente o dobro de proteína em relação à glicose e mais que o dobro em relação à xilana, refletindo diretamente na maior atividade detectada. No sobrenadante, a concentração proteica foi muito inferior, 0,28 mg/mL para glicose e abaixo do limite de detecção para xilana e xilose, o que também se refletiu em atividades reduzidas. Esse padrão reforça que a maior quantificação proteica no *pellet* está associada à maior liberação e detecção da enzima ativa após lise celular.

Assim, os dados corroboram a hipótese de que a fonte de carbono influencia diretamente o desempenho metabólico e a produção enzimática da acidobactéria estudada, sendo a xilose a condição mais promissora dentre as avaliadas. Entretanto, é necessária a realização de novos ensaios em triplicata, a fim de assegurar maior confiabilidade e reprodutibilidade dos dados. Dessa forma, a hipótese do estudo foi parcialmente aceita. Ainda assim, foi possível verificar o crescimento da AB23 e a produção de xilanases em diferentes fontes de carbono, permitindo o alcance dos objetivos propostos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. F. *et al.* Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals *Acidobacteria* Dominance. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 3, pp.760-770. 2012.

BARNS, S. M. *et al.* *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, pp. 3113-3116. 2007.

BEG, Q. K. *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 1 ago. 2001.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. v. 6 n. 1, pp. 1-36. **Bioresources and Bioprocessing**, 2019.

BHARDWAJ, N. *et al.* Purification and characterization of a thermo-acid/alkali stable xylanases from *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in Xylo-oligosaccharides production from lignocellulosic agricultural wastes. **International journal of biological macromolecules**. v. 122, pp. 1191-1202. 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.070

BIO-RAD LABORATORIES. Quick Start™ Bradford Protein Assay: Instruction Manual. Hercules: Bio-Rad Laboratories, 20xx. Disponível em: <<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2026.

BOCCHINI, D. A.; OLIVEIRA, O. M. M.; GOMES, E.; SILVA, R. D. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, pp. 3653–3659. 2005.

BRUCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, pp. 141-148. 2002.

COLUCCIA, M.; BESAURY, L. *Acidobacteria* members harbor an abundant and diverse carbohydrate-active enzymes (CAZyme) and secreted proteasome repertoire, key factors for potential efficient biomass degradation. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 298, n. 5, pp.1135-1154. 2023.

COSTA, J. B.; NASCIMENTO, L G. L.; MARTINS, E.; *et al.* Immobilization of the β -galactosidase enzyme by encapsulation in polymeric matrices for application in the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 11, pp. 9100–9109, 2024.

DANALACHE, F.; MATA, P.; ALVES, V. D.; MOLDÃO-MARTINS, M. Enzyme-assisted extraction of fruit juices. *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*. Elsevier Inc., pp. 183–200. 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-802230-6.00010-2.

DE CASTRO, V. H. L. *et al.* *Acidobacteria* from oligotrophic soil from the Cerrado can grow in a wide range of carbon source concentrations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 11, pp. 746-53. 2013.

DEDYSH, S. N.; SINNINGHE DAMSTÉ, J. S. *Acidobacteria*. **Encyclopedia of Life Sciences (eLS)**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2018. DOI: 10.1002/9780470015902.a0027685.

EICHORST, S. A.; KUSKE, C. R.; SCHMIDT, T. M. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum *Acidobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, pp. 586–596. 2011.

FOESEL, B. U.; ROHDE, M.; OVERMANN, J. *Blastocatella fastidiosa* gen. nov., sp. nov., isolated from semiarid savanna soil – The first described species of *Acidobacteria* subdivision 4. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 82–89, mar. 2013.

GEADA, P.; LOUREIRO, L.; TEIXEIRA, J. A.; *et al.* Evaluation of disruption/permeabilization methodologies for *Microcystis aeruginosa* as alternatives to obtain high yields of microcystin release. **Algal Research**, v. 42, p. 101611, 2019.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, pp. 257–268. 1987. DOI: 10.1351/pac198759020257.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, pp. 141–146. 2006. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.035.

GOI, S. R.; SOUZA, F. A. Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 2, pp. 46–65. 2006.

GONG, W.; DAI, L.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; WANG, L. A highly efficient xylan-utilization system in *Aspergillus niger* An76: a functional-proteomics study. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 430. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00430.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20., n 3., pp. 183-185. 2008.

HIRAISHI, A. *et al.* Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo-organotroph *Acidobacterium capsulatum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, n. 1–2, pp. 91–94. 1995.

HUBER KJ. *et al.* *Aridibacter famidurans* gen. nov., sp. nov. and *Aridibacter kavangonensis* sp. nov., two novel members of subdivision 4 of the Acidobacteria isolated from semiarid savannah soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 64, pp. 1866–1875. 2014 doi: 10.1099/ijms.0.060236-0.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, v. 18, pp.4765–4774. 1998.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3. pp. 1719–28. 2006.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, p. 1004–1011, 2009.

JOHNSON, B.; HECHT, M. Recombinant proteins can be isolated from *Escherichia coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing. **Nature Biotechnology**, v. 12, n. 12, pp. 1357–1360. 1994. DOI: 10.1038/nbt1294-1357.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial exo-xylanases: a mini review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, pp. 81–92. 2014. DOI: 10.1007/s12010-014-1042-8.

KIELAK, A. *et al.* Phylogenetic diversity of *Acidobacteria* in a former agricultural soil. **ISME Journal**, v. 3, n. 3, 2009.

KIELAK, A. M. *et al.* The ecology of *Acidobacteria*: Moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7 pp. 344. 2016.

KIM, J. S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R. M.; DE MELO, W. J.; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 684–690, 2007.

KNOB A.; CARMONA E C. Xylanase Production by *Penicillium sclerotiorum* and its Characterization. **World Applied Sciences Journal**. v. 4, n.2., pp. 277–283. 2008

LIU, W.; ZHU, W.; LU, Y.; KONG, Y.; MA, G. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 3, pp. 331–336. 1998.

LOPEZ, C.; BLANCO, A.; PASTOR, F. J. Xylanase production by a new alkali-tolerant isolate of *Bacillus*. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 3, pp. 243–246. 1998.

MADHAVAN, A. *et al.* Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology** v. 245, pp.1304-1313.2017.

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

MORETTI, R; THORSON, J. S. A comparison of sugar indicators enables a universal high-throughput sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase assay. **Analytical Biochemistry**, v. 377, n. 2, p. 251–258, 2008.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass: Techniques, Applications and Commercialization. London, UK: **IntechOpen**, pp. 251–276. 2013.

NAVARRETE, A. A.; CANNAVAN, F. S.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, v. 2, p. 787–809, 2010.

NAVARRETE, A. A. *et al.* Molecular detection on culture medium of *Acidobacteria* from Amazon soils. **Microbiology Discovery**, v. 1, n. 1, pp. 787-809. 2013.

NELSON, N. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for Determination of Glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, n. 2, pp. 375-380. 1944

PANKRATOV, T. A. *et al.* Substrate-induced growth and isolation of *Acidobacteria* from acidic *Sphagnum* peat. **ISME Journal**, v. 2, n. 5, pp.5 51-560. 2008.

OREN, A.; GARRITY. G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. v.71, n. 10. 2021. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>.

PANKRATOV, T. A. *et al.* *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria, and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto *et al.* 1991. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. **62**, n. **2**, p. **430–437**, 2012.

PINTO, Otávio Henrique Bezerra. **Caracterização taxonômica de *Occallatibacter savannae* AB23 e avaliação enzimática e pigmentos de acidobacteria: um enfoque biotecnológico.** 2017. 94 f. Dissertação (Programa *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2017

QUAISER, A. *et al.* *Acidobacteria* form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: Evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**, v. **50**, n. **2**, pp.**563-575**. 2003.

QIU Z.; SHI P.; LUO H, *et al.* A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. **Enzyme and Microbial Technology**. v. **46**, n. **6**, pp.**506-512**. 2010; doi:10.1016/j.enzmictec.2010.02.003

RAKOTOARIVONINA *et al.*: The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth. **Microbial Cell Factories**. v. **11**, n. **1**, p.**159**. 2012

RODRIGUES, G. R.; PINTO, O. H. B.; SCHROEDER, L. F., *et al.* Unraveling the xylanolytic potential of *Acidobacteria* bacterium AB60 from Cerrado soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. **367**, n.**18**, p. **fnaa149**. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa149>

RODRIGUES, I. S. V. **Utilização de bactérias isoladas do solo para produção de xilanase e de bioetanol**. 2019. Tese (Doutorado em Agricultura e Biodiversidade) — Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019.

SAIT, M.; DAVIS, K. E. R.; JANSSEN, P. H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, pp. 1852-1857. 2006.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, pp. 654-666. 2002.

SIBIYA, N. G.; CHIRWA, E. M. N.; DARAMOLA, M., & BRINK, H. G. (2024). Glucose and Xylose Utilization by *Bacillus Cereus* AS1 During Anaerobic Fermentation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 110, pp.241–246. <https://doi.org/10.3303/CET24110041>

SIMON, R. D. The use of an ultrasonic bath to disrupt cells suspended in volumes of less than 100 µliters. **Analytical Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 51–58, 1974.

SINGLA, A. *et al.* Bioethanol production from xylose: Problems and possibilities. **Journal of Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 39-49, Jan. 2012. DOI: 10.5958/j.0976-3015.3.1.004.

SONG, Y.; HAHN, T.; THOMPSON, I. P.; *et al.* Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 19, p. e129–e129, 2007.

TEIXEIRA, R. S.; DA SILVA, A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; *et al.* Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydrate Research**, v. 363, p. 33–37, 2012.

UNITED NATIONS. General Assembly. Resolution 70/1, 25 September 2015. Transforming our World: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Disponível em: https://www.un.org/en/development/desa/population/migration/generalassembly/docs/globalcompact/A_RES_70_1_E.pdf. Acesso em: 8 mar. 2026

WALIA, A. *et al.* Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, pp.11-23. 2017.

WANARSKA M.;HILDEBRANDT P.;KUR J. A *freeze-thaw* method for disintegration of *Escherichia coli* cells producing T7 lysozyme used in pBAD expression systems. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 3, pp. 671-672. 2026.

WARD, N. L. *et al.* Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, pp.2046-2056. 2009.

XING S, LI G, SUN X, *et. al.* Dynamic changes in xylanases and β -1, 4-endoglucanases secreted by *Aspergillus niger* An-76 in response to hydrolysates of lignocellulose polysaccharide. **Applied biochemistry and biotechnology**. N. 171, n. 4 pp. 832-846. 2013. DOI. 10.1007/s12010-013-0402-0

YANG, Ma.; LI, J; WANG, S. *et al.* Status and trends of enzyme cocktails for efficient and ecological production in the pulp and paper industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 418, p. 138196, 2023.