



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

RAQUEL NUNES FERNANDES

**UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, ÁGUA DE MACERAÇÃO
DE MILHO E FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ PARA A PRODUÇÃO DE
CELULASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2**

ALEGRE – ES

2016

RAQUEL NUNES FERNANDES

**UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, ÁGUA DE MACERAÇÃO
DE MILHO E FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ PARA A PRODUÇÃO DE
CELULASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho

Coorientadores: Prof^a. PhD. Meire Lelis Leal Martins e Prof. DSc. Joel Camilo de Souza Carneiro

ALEGRE – ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F363u Fernandes, Raquel Nunes, 1991-
Utilização do bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá para a produção de celulasas pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 / Raquel Nunes Fernandes. – 2016.
65 f. : il.

Orientadora: Raquel Vieira de Carvalho.

Coorientadoras: Meire Lellis Leal Martins ; Joel Camilo de Souza Carneiro.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Avicelase. 2. CMcase. 3. FPase. 4. Resíduos agroindustriais. 5. *Bacillus* sp. 6. Enzimas. I. Carvalho, Raquel Vieira de. II. Martins, Meire Lellis Leal. III. Carneiro, Joel Camilo de Souza. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 664

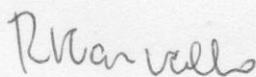
RAQUEL NUNES FERNANDES

**" UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, ÁGUA DE
MACERAÇÃO DE MILHO E FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ
PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus*
sp. SMIA-2 "**

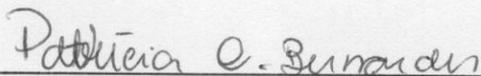
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Raquel Vieira de Carvalho
Universidade Federal do Espírito Santo- UFES
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Patrícia Campos Bernardes
Universidade Federal do Espírito Santo- UFES
Examinadora Interna



Prof^a. Dr^a. Jussara Moreira Coelho
Universidade Federal do Espírito Santo- UFES
Examinadora Externa

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e acima de tudo a Deus, que guiou e abençoou minha trajetória.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) por ter cedido o laboratório para realização dos experimentos.

À prof^a. Dr^a. Raquel Vieira de Carvalho por ter aceitado ser minha orientadora, pelos ensinamentos, paciência e principalmente confiança.

À prof^a. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins pela coorientação, incentivo e fundamental apoio para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Joel Camilo de Souza Carneiro pela coorientação, amizade e incentivo.

Aos professores integrantes da banca examinadora, por terem aceitado contribuir com este trabalho.

À prof^a. Dr^a. Luana Pereira de Moraes e às colegas, Érica e Edite, pela contribuição e apoio.

À técnica, Ana Lúcia, pela imensa colaboração e amizade.

Ao secretário do PCTA, Toninho, pela presteza e amizade.

À minha mãe, Elizabeth, pela motivação, amor, amizade e dedicação. Por compreender minha ausência e não medir esforços pelo meu sucesso. As palavras são poucas para expressar minha gratidão.

Ao meu irmão, Neto, e toda minha família pelo amor, carinho e apoio.

Ao meu pai, Anibal, (*in memoriam*) que, infelizmente apesar de não ter vivenciado essa conquista, tenho certeza que se orgulharia de mim.

Ao meu namorado, Saulo, pelo amor, amizade, companheirismo e apoio.

Aos meus amigos, em especial Milton, Luiza, Mila, Lucas e Maraysa, por participarem de ocasiões especiais como esta, pelo carinho e incentivo.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação do planejamento experimental com os níveis das variáveis independentes: bagaço, água de maceração de milho (AMM) e tempo 32	
Tabela 2 - Atividades das celulases produzidas por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 cultivado em meios que continham como substratos: bagaço “ <i>in natura</i> ” (1), bagaço tratado com álcali (2), bagaço tratado com álcali e ácido (3) e papel de filtro Whatman nº 1 (4).....	38
Tabela 3 - Matriz do DCC 2 ³ para a atividade específica das celulases com os valores reais e codificados das variáveis independentes.....	41
Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta atividade específica da avicelase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	42
Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta atividade específica da CMCase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase. Fonte: Kumar et al. (2008).....20
- Figura 2 - Representação do complexo lignocelulósico da parede celular vegetal. Fonte: Murphy; McCarthy (2005).24
- Figura 3 - Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas. Fonte: Sun; Cheng (2002).....25
- Figura 4 - Teste qualitativo de produção de celulases por *Bacillus* sp. SMIA-2, após revelação com lugol. Substratos: avicel (A); carboximetilcelulose (B).....36
- Figura 5 - Crescimento celular de *Bacillus* sp. SMIA-2 e pH dos meios de cultura contendo o bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento (1), tratado com álcali (2), tratado com álcali e depois com ácido (3) e papel de filtro Whatman n° 1 (4), após 168 horas de incubação a 50 °C.37
- Figura 6 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de bagaço de cana-de-açúcar na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de água de maceração de milho constante.43
- Figura 7 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de água de maceração de milho (AMM) na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de bagaço de cana-de-açúcar constante.43
- Figura 8 - Superfície de resposta: Efeitos das concentrações de água de maceração de milho (AMM) e bagaço de cana-de-açúcar na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a um tempo de incubação constante.44
- Figura 9 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de bagaço de cana-de-açúcar na secreção de CMCase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de água de maceração de milho constante.46
- Figura 10 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de água de maceração de milho (AMM) na secreção de CMCase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de bagaço de cana-de-açúcar constante.46
- Figura 11 - Superfície de resposta: Efeitos das concentrações de água de maceração de milho (AMM) e bagaço de cana-de-açúcar na secreção de CMCase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a um tempo de incubação constante.47
- Figura 12 - Valores preditos e observados para a variável dependente atividade específica da FPase.....48
- Figura 13 - Crescimento celular de *Bacillus* sp. SMIA-2 e pH dos meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono: Controle (1), Glicose (2), Frutose (3), Xilose (4), Lactose (5), Celbiose (6), FCM (7) e Pectina (8), após 168 horas de incubação a 50 °C.49

Figura 14 - Atividades específicas da avicelase (a), CMCase (b) e FPase (c) em função de diferentes fontes de carbono: Controle (1), Glicose (2), Frutose (3), Xilose (4), Lactose (5), Celobiose (6), FCM (7) e Pectina (8).....50

Figura 15 - Densidade ótica (\circ), pH (*) e atividades específicas da avicelase (\blacktriangleright), CMCase (\bullet) e FPase(\blacksquare) secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2, em cultivo submerso contendo bagaço de cana ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$), farinha da casca de maracujá ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e água de maceração de milho ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) após 180 horas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$52

Figura 16 - Crescimento celular de *Bacillus* sp. SMIA-2 e pH dos meios de cultivo em função das concentrações da farinha da casca de maracujá, após 168 horas de incubação a $50 \text{ }^\circ\text{C}$54

Figura 17 - Atividades da avicelase (a), CMCase (b) e FPase (c) para diferentes concentrações de farinha da casca de maracujá.55

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Enzimas: conceito, classificação e obtenção	18
2.2. Celulases	20
2.3. Microrganismo: <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	22
2.4. Aplicação industrial das celulases.....	23
2.5. Materiais lignocelulósicos.....	24
2.6. Bagaço de cana-de-açúcar	26
2.7. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de enzimas	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Microrganismo e meio de manutenção	29
3.2. Avaliação qualitativa da atividade enzimática	29
3.3. Meio de cultivo	30
3.4. Preparo do inóculo	30
3.5. Crescimento do microrganismo.....	30
3.6. Influência do bagaço de cana-de-açúcar no crescimento e secreção das celulases de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	31
3.7. Otimização das condições do meio de cultivo utilizando planejamento experimental.....	31
3.8. Influência da fonte de carbono sobre o crescimento celular e a atividade das celulases	33
3.9. Variações de pH.....	33
3.10. Obtenção das enzimas.....	33
3.11. Ensaio enzimáticos	34
3.11.1. Atividade enzimática da avicelase (EC 3.2.1.91)	34
3.11.2. Atividade enzimática da carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4).....	34
3.11.3. Atividade enzimática da celulase total (FPase).....	35
3.12. Determinação da proteína.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

4.1. Avaliação qualitativa da atividade celulolítica de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	36
4.2. Efeito do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes tratamentos e do papel de filtro sobre o crescimento celular e atividade das celulasas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	37
4.3. Otimização da produção de celulasas usando o termofílico <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 utilizando planejamento experimental	40
4.4. Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 e a atividade das celulasas	48
4.5. Perfil do crescimento celular e atividade das celulasas	52
4.6. Efeito das concentrações da farinha da casca de maracujá sobre o crescimento celular e atividade das celulasas	53
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS.....	57

RESUMO

FERNANDES, Raquel Nunes. **Utilização do bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá para a produção de celulasas pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho. Coorientadores: Prof^a. PhD. Meire Lelis Leal Martins, Prof. DSc. Joel Camilo de Souza Carneiro.

A utilização de resíduos agroindustriais, como fontes de carbono para a obtenção de enzimas, tem garantido boa produção enzimática e redução dos custos do processo. Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o crescimento do termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 e melhorar a secreção de celulasas, em cultivos submersos contendo substratos alternativos e baratos como o bagaço de cana-de-açúcar, a água de maceração de milho e a farinha da casca de maracujá. Ao estudar os diferentes tipos de bagaço de cana foi observado que os melhores níveis de atividade específica de avicelase e FPase foram obtidos quando se utilizou o bagaço tratado com hidróxido de potássio. A condição ótima de cultivo, determinada usando a técnica do planejamento composto central (2^3), foi 0,625% (m/V) de bagaço, 0,625% (m/V) de água de maceração de milho e os tempos de incubação de 120 horas para CMCase e de 168 horas para avicelase. A adição de novas fontes de carbono ao meio demonstrou que o microrganismo foi capaz de utilizar satisfatoriamente cada uma delas, porém as atividades das enzimas celulolíticas variaram em função das fontes testadas. Foi observada uma inibição da síntese enzimática no meio contendo celobiose. No entanto, um grande aumento da secreção das celulasas ocorreu quando se utilizou a farinha da casca de maracujá, bagaço e água de maceração de milho, obtendo-se valores de atividades específicas de 3,931 U.mg ptn⁻¹ para a avicelase, 1,032 U.mg ptn⁻¹ para a CMCase e 4,084 U.mg ptn⁻¹ para a FPase. Níveis semelhantes foram obtidos nos meios que continham a pectina de maçã. A máxima produção das enzimas foi observada no intervalo de 168 horas, quando a cultura se encontrava na fase estacionária. O estudo do efeito das concentrações de farinha da casca de maracujá indicou que a adição de 0,5%

(m/V) e 0,75% (m/V) deste substrato ao meio proporcionou igualmente uma melhor produção das celulases. Como uma visão geral deste estudo, foi possível aumentar a produção das celulases pela otimização do meio de cultivo.

Palavras-chave: avicelase; CMCase; FPase; resíduos agroindustriais, *Bacillus* sp.

ABSTRACT

FERNANDES, RAQUEL NUNES. **Utilization of sugarcane bagasse, corn steep liquor and passion fruit peel flour for producing cellulases by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2.** 2016. Dissertation (Master's degree in Food Science and Technology) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Adviser: Prof. DSc. Raquel Vieira de Carvalho. Co-adviser: Prof. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins, Prof. DSc. Joel Camilo de Souza Carneiro

The use of agroindustrial residues as carbon sources for obtaining enzymes, has ensured good enzyme production and reduction of process costs. In this context, this study has as goal evaluated the growth of the thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and enhance the secretion of cellulase in submerged crops containing alternative and cheap substrates such as sugarcane bagasse, corn steep liquor and passion fruit peel flour. By studying the different types of bagasse it was observed that the best specific activity levels of avicelase and FPase were obtained when using the residue that treated with potassium hydroxide. The optimal cultivation condition, determined using the technique of the central composite design (2^3), was 0.625% (w/V) sugarcane bagasse, 0.625% (w/V) of corn steep liquor and 120 hours incubation time for CMCase and 168 hours for avicelase. The addition of new carbon sources of the medium showed that the microorganism was able to satisfactorily use each one of them, but the activities of cellulolytic enzymes has varied depending on the sources tested. An inhibition of enzymatic synthesis in medium containing cellobiose was observed. However, a large increase in the secretion of the cellulase was obtained with the flour of passion fruit peel, sugarcane bagasse and corn steep liquor, showed specific activity values of 3.931 U.mg protein⁻¹ for avicelase, 1.032 U.mg protein⁻¹ for CMCase and 4.084 U.mg protein⁻¹ for FPase. Similar levels were measured in media containing apple pectin. The maximum production of the enzymes was observed in the range 168 hours, when the culture was in stationary phase. The study of the effect of flour concentrations of passion fruit peel indicated that addition of 0.5 % (w/V) and 0.75 % (w/V) of this substrate in the middle equally provided better production of

cellulases. As an overview of this study, it was possible to increase the production of cellulases by optimizing the culture medium.

Keywords: avicelase; CMCase; FPase; agroindustrial waste; *Bacillus* sp.

1. INTRODUÇÃO

As celulasas compõem um complexo multienzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Tais enzimas são biocatalisadores altamente específicos que agem em sinergia para a liberação de açúcares (CASTRO; PEREIRA JR., 2010; BINOD et al., 2012). De acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as celulasas se dividem em três grandes grupos: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e as β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis à glicose (LYND et al., 2002).

No que diz respeito à biomassa vegetal, a celulose é o biopolímero mais abundante e devido a sua composição estrutural, a bioconversão exige condições específicas para a hidrólise completa deste composto. Muitos microrganismos estão envolvidos neste processo e, para isso, necessitam produzir uma diversidade de enzimas com diferentes especialidades (MARCO, 2012).

A capacidade de converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis é amplamente distribuída entre muitos grupos de fungos dentro do domínio *Eukarya* e em gêneros do domínio *Bacteria* (LYND et al., 2002). Dentre as bactérias, o gênero *Bacillus* tem sido muito bem caracterizado quanto à produção de celulasas, como observaram Singh et al. (2009), Kim et al. (2005), Delatorre (2010), Marco (2012) e Ladeira et al. (2015), entre outros.

As características do gênero *Bacillus*, como sua atividade metabólica em condições ácidas, neutras e alcalinas, combinadas com a presença de termófilos fazem com que espécies deste gênero tenham alcançado espaço no mercado. Entre algumas espécies com potencial celulolítico estão *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus licheniformis* (SINGH; KUMAR, 1998; SINGH et al., 2004; SHABEB et al., 2010; AYGAN et al., 2011).

A importância das celulasas deve-se a sua ampla utilização em diversos ramos da indústria, como por exemplo: na indústria têxtil e de detergentes, na indústria de polpa de celulose e de papel, na indústria de alimentação animal, na fabricação de etanol de segunda geração, na preparação do malte da cerveja, em processos de extração de sucos, pigmentos, óleos vegetais, amido e alcalóides (BHAT, 2000).

Contudo, o elevado custo de produção das celulasas e demais enzimas é o principal obstáculo para sua aplicação industrial. Dentre os fatores que influenciam na produção econômica das celulasas estão: o meio ou substrato utilizado, a complexidade da estrutura da celulose, as baixas quantidades de celulasas produzidas por microrganismos celulolíticos devido à repressão catabólica, a etapa de purificação, entre outros (SRIDEVI, et al., 2009).

A necessidade de se obter enzimas industriais de maneira economicamente viável determina a busca de substratos de baixo custo. Neste sentido, considerando o elevado teor de carboidratos presente nos resíduos agroindustriais, a utilização dessas matérias-primas como fontes de carbono no processo produtivo de enzimas tem sido uma alternativa racional, pois reduz o custo de produção, além de ajudar a resolver os problemas ambientais decorrentes de sua eliminação (KUBERAN et al. 2010).

A tecnologia enzimática concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental, cenário importante para a inserção do Brasil no mercado internacional (POLITZER; BON, 2006). O mercado brasileiro de enzimas revela grande potencial devido ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos, papel, etc., e a enorme geração de resíduos agroindustriais (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Em sua maioria, os resíduos agroindustriais são materiais lignocelulósicos, ou seja, complexos orgânicos de carbono formados principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN et al., 2007). São exemplos destes materiais o farelo de trigo, o bagaço de cana, a casca de arroz, as farinhas das cascas de frutas, o sabugo de milho, resíduos florestais e madeiras. Porém, no Brasil o resíduo agroindustrial que mais se destaca pela abundância em determinadas regiões e pelo baixo custo, é o bagaço de cana-de-açúcar oriundo do processamento da cana-de-açúcar para a produção de etanol e açúcar (PANDEY et al., 2000; CUNHA et al., 2005).

A escolha dos componentes do meio de cultivo, assim como do microrganismo, é essencial para o sucesso do processo fermentativo e de sua viabilidade econômica. No entanto, nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento da cultura favorece a formação das enzimas. A produção ótima e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre,

pois as condições ótimas variam para os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (SANTOS et al., 2005).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições do meio de cultivo para aumentar a produção de celulases pela bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2 em cultivos submersos, utilizando como substratos resíduos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar, a água de maceração de milho e a farinha da casca de maracujá.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enzimas: conceito, classificação e obtenção

As enzimas são, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes que, além de formarem a base do sistema metabólico dos organismos vivos, proporcionam grandes oportunidades às indústrias por realizarem conversões biocatalíticas eficientes e mais econômicas (GODFREY et al., 1996).

Segundo a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas estão classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reação em que atuam (SHULER, 1992).

No Quadro 1, estão apresentadas as classes das enzimas e suas respectivas funções.

QUADRO 1 - Classes e funções das enzimas

Classes	Funções
Oxirredutases	Catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.
Transferases	Transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil e carboxil.
Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.
Liasas	Catalisam reações de remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.
Isomerasas	Catalisam reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos.
Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes.

Fonte: Lima et al. (2001)

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (FERNANDES et al., 2004). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos

mais explorados pela indústria biotecnológica, as quais são empregadas em larga escala, principalmente, nas indústrias têxtil, de papel, detergente, couro e de alimentos (KIRK et al., 2002; VAN BEILEN, 2002).

Assim como todo catalisador, as enzimas atuam diminuindo a energia requerida para a ativação de uma determinada reação, tornando, assim, mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para serem iniciadas e, por isso, sua velocidade é menor do que em reações catalisadas (LENINGHER, 2006).

Embora as enzimas ocorram amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam cerca de 90% do mercado, uma vez que possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como ampla diversidade bioquímica, suscetibilidade à manipulação genética, menor tempo e custo de produção (LIMA, 2001).

As enzimas podem ser secretadas por reações que ocorrem dentro (intracelulares) ou fora das células (extracelulares), sendo que as de natureza extracelular existem em maior quantidade. As enzimas intracelulares que são secretadas dentro das células e permanecem no citoplasma, são utilizadas quando não há outra forma de síntese, principalmente quando a replicação do DNA é necessária. Portanto, as mais utilizadas industrialmente são as extracelulares, que são secretadas no ribossomo próximo à membrana celular e transferidas para fora da célula (BOURGAIZE et al., 2000).

Para a produção de enzimas microbianas são utilizados basicamente, dois tipos de processos, classificados conforme a quantidade de água no meio: fermentação em estado sólido (FES) ou semi-sólido (FMSS) e fermentação submersa (FSM).

As FES ou FMSS se referem à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato), onde o conteúdo líquido está ligado a ela, com um nível de atividade de água que assegure o crescimento e o metabolismo das células e, ao mesmo tempo, não exceda à máxima capacidade de ligação de água com a matriz sólida. A umidade desses meios geralmente não ultrapassa 70%, o que limita bastante o número de microrganismos que são capazes de adaptar-se a este processo. Os fungos, em sua grande maioria, filamentosos, são bastante tolerantes a esse ambiente (PANDEY, 2003; COUTO; SANROMÁN, 2006).

As FSM são tradicionalmente utilizadas para produção de enzimas a partir de bactérias, pois há melhor controle de alguns parâmetros importantes do processo como pH e crescimento celular, além da recuperação de enzimas extracelulares ser facilitada (OLIVEIRA et al., 2011). A principal característica é a quantidade de água usada no meio de cultivo, que é superior a 95% em relação à massa presente no meio. A maioria das enzimas comerciais é obtida por FSM, uma vez que os métodos modernos de controle de fermentação são mais facilmente adaptados, os rendimentos são maiores e os custos e riscos de contaminação menores (AGUIAR e MENEZES, 2000).

2.2. Celulases

As celulases formam um conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose. Estas enzimas, que coletivamente apresentam especificidade para as ligações glicosídicas β -1,4, são necessárias para a solubilização completa da celulose, mesmo das regiões cristalinas, existindo sinergismo na sua forma de atuar (BON, GÍRIO; PEREIRA Jr., 2008).

O complexo enzimático celulolítico, oriundo de microrganismos, animais e plantas, é dividido em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: β -1,4- endoglucanases (EC 3.2.1.4), β -1,4-exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (WYMAN et al., 2005; JUNG et al., 2015).

Na Figura 1 está esquematizado a estrutura da celulose e o modo de ação de cada celulase.

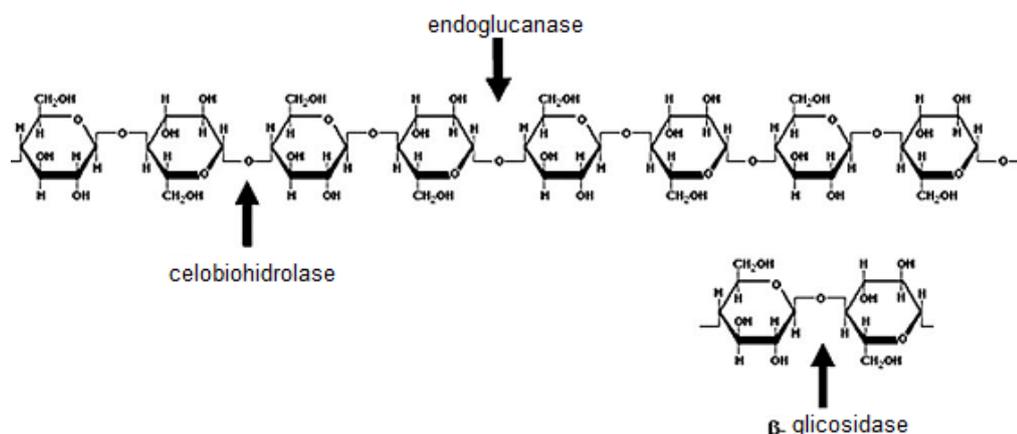


Figura 1 - Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase. Fonte: Kumar et al. (2008).

As endoglucanases ou carboximetilcelulases são enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em moléculas menores. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (LYND; ZHANG, 2002; CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

As exoglucanases ou celobiohidrolases são responsáveis pela liberação de glicose e celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da molécula de celulose (LYND; ZHANG, 2002; CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

As β -glicosidases são enzimas que têm a propriedade de hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose (OGEDA e PETRI, 2010).

As celulases podem ser produzidas em meios quimicamente definidos, utilizando como fonte de carbono celulose cristalina, carboximetilcelulose ou celobiose (CASTRO, 2006; CARVALHO, 2007), ou em meios complexos, utilizando resíduos agrícolas e agroindustriais os quais podem servir como suporte, e, ou fonte de carbono (LIMING; XUELIANG, 2004; ADSUL et al. 2004; MARTINS et al. 2008). Além da fonte de carbono, faz-se necessária a suplementação do meio com fontes de nitrogênio, e, ou nutrientes minerais, que irão atuar, respectivamente, no desenvolvimento do microrganismo e como cofatores enzimáticos.

Na natureza, existe um grande espectro de microrganismos que degradam a biomassa lignocelulósica (LYND et al., 2002). Na produção de enzimas, como as celulases, os microrganismos termofílicos são de particular interesse, pois as enzimas secretadas apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos significativamente reduzidos (HAKI; RAKSHIT, 2003).

Dentre os microrganismos envolvidos na degradação de materiais celulósicos, as bactérias do gênero *Bacillus* têm merecido destaque em muitos estudos. Suas características como tolerância a altas temperaturas, crescimento rápido e ótima atividade enzimática fazem com que espécies deste gênero tenham alcançado espaço no mercado, principalmente nos processos de biorremediação e uso em detergentes. Entre algumas das espécies com potencial

celulolítico estão *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus licheniformis* (SINGH; KUMAR, 1998; SINGH et al., 2004; SHABEB et al., 2010; AYGAN et al., 2011).

2.3. Microrganismo: *Bacillus* sp. SMIA-2

O microrganismo *Bacillus* sp. SMIA-2 é uma bactéria formadora de esporos, gram-positiva, termofílica e aeróbica estrita, que foi isolada por Souza e Martins (2001) de amostras de solo coletadas na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

Em Ágar nutriente, as colônias de *Bacillus* sp. SMIA-2 formadas apresentam formato circular, tamanho de até 4 mm de diâmetro, brilhosas, borda lisa, cor amarelada e elevação convexa. Esta bactéria é capaz de crescer em diversas fontes de carbono, como: glicose, frutose, celobiose, amido, glicogênio, sacarose, glicerol, entre outras. O crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 ocorre a valores de pH variando de 6,5 a 9,0 e o crescimento ótimo ocorre em torno de pH 7,0. Sua temperatura ótima de multiplicação é em torno de 55 °C e a máxima de 70 °C (SOUZA; MARTINS, 2001).

Os resultados de comparação das sequências de 16S rRNA indicaram que *Bacillus* sp. SMIA-2 possui 94% de similaridade com *Bacillus caldoolyolyticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1, e 90% a 91% de semelhança com *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus denitrificans*, *Bacillus flavothermus* e *Bacillus thermoglucosidasius* (SOUZA; MARTINS, 2001).

Estudos demonstraram que o termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 possui boa capacidade de produzir enzimas de grande uso industrial. De acordo com Andrade et al. (2011), *Bacillus* sp. SMIA-2 produziu poligalacturonase em culturas submersas usando pectina e água de maceração de milho. Quando cultivado em culturas líquidas contendo amido solúvel como fonte de carbono e proteína de soro de leite esta bactéria foi capaz de secretar a enzima α -amilase (CARVALHO et al. 2008).

No estudo de Corrêa (2011), *Bacillus* sp. SMIA-2 produziu simultaneamente as enzimas protease e α -amilase em culturas submersas

usando um concentrado de proteína de soro de leite e água de maceração de milho. Em meios líquidos, que continham soro de queijo e farinha da casca de maracujá como substratos, *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de secretar proteases (BARBOSA et al., 2014). Este termofílico também teve boa produção de celulases quando crescido em meio contendo bagaço de cana de açúcar e água de maceração de milho (LADEIRA et al., 2015).

2.4. Aplicação industrial das celulases

Dentre as enzimas utilizadas em biotecnologia, as celulases têm atraído muito interesse devido a suas diversas aplicações. Tais enzimas têm mostrado um enorme potencial biotecnológico, pois podem ser usadas com diversas finalidades, como degradação de materiais lignocelulósicos e na desintoxicação de resíduos agroindustriais (EI-SERSY et al., 2010; NARAIAN et al., 2010). Entre as principais aplicações industriais das celulases estão: fabricação de rações animal, indústria têxtil, indústria de bebidas (cerveja, vinhos e sucos), na indústria de papel e na produção de biocombustíveis.

Na indústria de sucos, as celulases auxiliam no processo de extração do suco da fruta e na sua clarificação, alterando sua viscosidade e aumentando a taxa de filtração e estabilidade do produto final. Na produção da cerveja a ativação das hidrolases ocorre durante a maltagem e a fermentação. Na indústria de vinhos, os principais benefícios dessas enzimas ocorrem em três etapas da produção: na maceração da pele da uva, na filtração e na clarificação da bebida (BATH, 2000).

Na indústria de biocombustíveis, as celulases estão presentes durante a hidrólise da celulose, liberando os açúcares e facilitando assim o processo de fermentação e posterior formação do bioetanol (LIMAYEN; RICK, 2012).

Na indústria de polpa e papel, as celulases são usadas misturadas com hemicelulases para melhorar a drenagem e execução de máquinas de papel, e também o destino de fibras recicladas (CAO; TAN, 2002). As celulases são também muito empregadas na indústria têxtil, devido a sua capacidade de modificar a fibra de celulose de forma controlada, melhorando a qualidade dos tecidos, sendo empregadas também no momento da fiação, tingimento e

acabamento. Quando utilizadas em detergentes, melhoram o desempenho deste, pois permitem a remoção de pequenas fibrilas difusas do tecido, conferindo assim brilho e maciez ao mesmo (BATH, 2000).

No entanto, a aplicação industrial de enzimas, como as celulases, pode ser dificultada devido à quantidade limitada produzida por alguns microrganismos, além dos custos dos substratos utilizados para o seu cultivo. Estima-se que cerca de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultivo utilizado para o crescimento do microrganismo. Contudo, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultivo específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático e reduzir os custos de produção (KUMAR; TAKAGI, 1999; JOO; CHANG, 2005).

2.5. Materiais lignocelulósicos

A Figura 2 apresenta uma representação dos três principais componentes dos materiais lignocelulósicos, lignina, hemicelulose e celulose. Estes três componentes formam uma estrutura rígida e resistente, que só é possível devido às interações, e, ou, ligações covalentes existentes entre estes (BARTON II, 1988; VASSILEV et al., 2012).

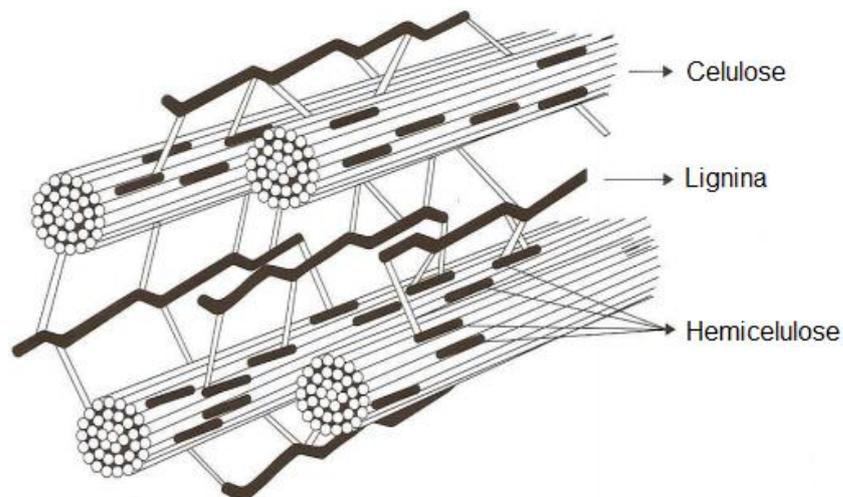


Figura 2 - Representação do complexo lignocelulósico da parede celular vegetal. Fonte: Murphy; McCarthy (2005).

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por celulose (32-

50%), hemiceluloses (19-25%) e lignina (23-32%) (TAMANINI, 2004; RABELO, 2007; SÁNCHEZ, 2009). Como componentes minoritários, também podem ocorrer a presença de compostos orgânicos chamados de extrativos (ésteres, álcoois, esteroides e outros) e inorgânicos (principalmente sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio) (JENKINS et al., 1998; PANDEY et al., 2000). As proporções destes componentes químicos podem variar de espécie para espécie, e também podem sofrer alterações significativas durante o ciclo de vida da planta (VASSILEV et al., 2012; VASSILEV et al., 2013).

A celulose é o principal componente das biomassas e caracteriza-se por ser um polímero linear, composto de unidades de D-glicose. Essas unidades são ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), que se formam pela condensação de duas unidades de glicose, com eliminação de uma molécula de água entre as hidroxilas dos carbonos 1 e 4 (DKESHWANI, 2010). As cadeias de celulose possuem organização fibrilar, com ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares, exibindo regiões cristalinas e amorfas que ocorrem em intervalos irregulares. Nas regiões amorfas, ao contrário das regiões cristalinas, as ligações de hidrogênio ocorrem em menor grau e estas regiões estão relacionadas à hidrólise da celulose por rota enzimática ou ácida (LEHNINGER, 2006).

Na Figura 3 está representada a estrutura molecular da celulose.

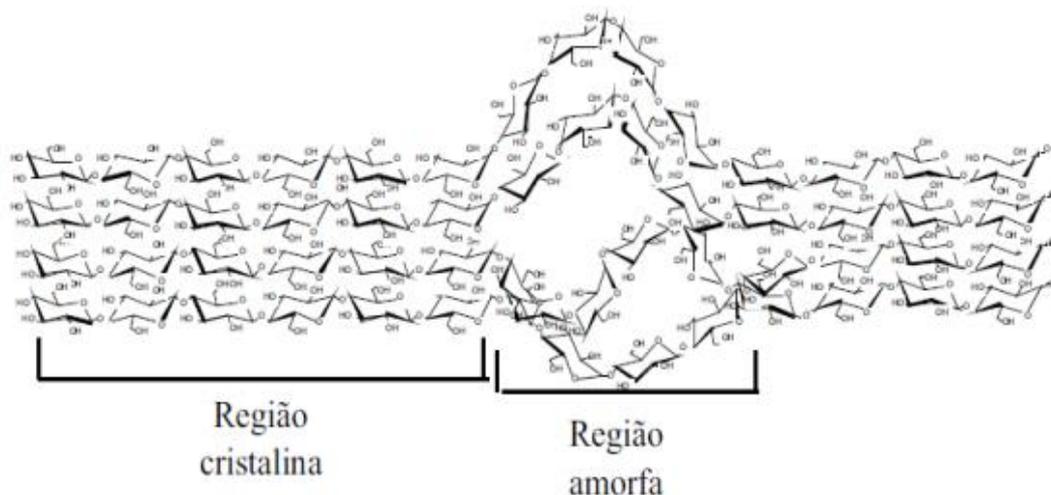


Figura 3 - Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas
Fonte: Sun; Cheng (2002).

As hemiceluloses correspondem a uma cadeia linear constituída por unidades de diversos açúcares, não cristalina e com massa molar média

relativamente baixa (JIANG et al., 2014). São compostas de pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose) e hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose). A cadeia principal da hemicelulose, em muitos vegetais, é constituída principalmente por unidades de xilose, ligadas por ligações β -1-4-glicosídicas em que os grupos hidroxila dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por arabinose e ácidos urônicos (ácidos β -D-glicurônico, α -D-4-O-metilglicurônico e α -D-galacturônico) (EGÜÉS et al., 2013). Na biomassa lignocelulósica, as hemiceluloses se encontram nos contornos das microfibrilas da celulose, conferindo um isolamento das microfibrilas aos ataques biológicos (enzimas e, ou, microrganismos) e de alguns agentes químicos (PENG; SHE, 2014).

A lignina é uma macromolécula tridimensional, amorfa e altamente ramificada. Apresenta inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, com diversos anéis fenilpropânicos substituídos, ligados por meio de diferentes tipos de ligações, como do tipo éter ou carbono-carbono (FENGEL; WEGENER, 1989; RAMIRES, 2010). É o último componente na estrutura da célula vegetal, envolvendo as microfibrilas celulósicas, fortalecendo e enrijecendo a parede celular, conferindo às plantas resistência mecânica. Ela também auxilia no transporte de água e nutrientes das plantas, além de proteger os tecidos vegetais da degradação química e, ou, biológica (FENGEL; WEGENER, 1989; CANILHA et al., 2010). Por esse motivo, a lignina é um dos interferentes na obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa vegetal.

2.6. Bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção estimada de 658,7 milhões de toneladas, na safra de 2015/2016 (CONAB, 2015). Esta produção considerável leva ao acúmulo de subprodutos, principalmente de palha de cana, de folhas frescas e de bagaço.

O bagaço de cana-de-açúcar é o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil, aproximadamente 30% de bagaço é produzido a cada tonelada de cana colhida (SILVA et al., 2007). Este resíduo é o material lignocelulósico obtido após a moagem da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) nas usinas de açúcar e álcool. É formado por um conjunto de

fragmentos bastante heterogêneo, com dimensões que oscilam de 1 a 25 mm. A moagem e a variedade da cana determinam a granulometria do bagaço. Do ponto de vista físico, o bagaço industrial é constituído por cerca de 50% de umidade, 45% de estruturas fibrilares e 5% de extrativos e componentes inorgânicos (MARTIN et al., 2002).

A composição química do bagaço varia de acordo com vários fatores, dentre eles, a variedade da cana, o tipo de solo de plantio, as técnicas de colheita e de manuseio (AGUIAR FILHO, 2008). O bagaço de cana pode conter de 32 a 44% de celulose, 27 a 32% de hemicelulose, 20 a 24% de lignina e 4,5 a 9,0% de cinzas (SOCCOL et al., 2010). Devido ao elevado teor de carboidratos, teor de lignina relativamente baixo e sua disponibilidade como um resíduo agroindustrial, o bagaço é particularmente adequado como fonte de carbono em processos biotecnológicos. Algumas alternativas para sua utilização como matéria-prima são a produção de etanol, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, forragem para agricultura, álcool, alcaloides e enzimas (CARVALHO, 2005).

2.7. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de enzimas

O estudo de meios de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem recebido bastante atenção nos últimos anos. Uma diversidade de subprodutos agrícolas ou resíduos agroindustriais têm sido estudados com o objetivo de estabelecer substratos para bioprocessos, devido à alta disponibilidade e por representarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial (SILVA et al., 2009; ERNANDES et al., 2010). Estes materiais orgânicos têm estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Em sua maioria, são fontes de carbono e nitrogênio, insolúveis em água, atuando como suporte para o crescimento de microrganismos (CORREIA, 2004).

Além de fornecerem substratos alternativos, a utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos, também ajuda a solucionar os problemas de poluição que sua disposição no meio ambiente poderia causar (PANDEY et al., 2000).

Muitos esforços concentram-se no emprego de subprodutos agroindustriais

como substratos, buscando obter produtos de alto valor comercial e baixo custo de produção. Os grupos de pesquisa existente ao redor do mundo tiram proveito de substratos naturalmente abundantes em sua região (CORREIA, 2004). O Brasil, pelas características climáticas e territoriais, possui biodiversidade sem igual no mundo e grande abundância de biomassa e resíduos agroindustriais. Esses fatores têm contribuído para o aumento do interesse na produção de enzimas e outros bioprodutos no país, uma vez que os processos biotecnológicos são frequentemente limitados pelos custos dos substratos empregados (SOCCOL et al., 2010).

Assim, a utilização de meios econômicos, com o aproveitamento de resíduos, e técnicas para otimizar a produção de enzimas têm sido propostos em muitos trabalhos científicos. Já foram relatadas diversas fontes alternativas, como por exemplo, o farelo de soja (JOO et al., 2002; JOO; CHANG, 2005), a palha de trigo (SINGH, 2009), o melaço (LADEIRA et al., 2010), o farelo de trigo (WEI et al., 2011), o bagaço de cana-de-açúcar (SRIDEVI et al. 2009; MAKKY, 2009; LADEIRA et al., 2010; LADEIRA et al., 2015), o soro de queijo e a água de maceração de milho (SILVA et al.,2007; NASCIMENTO et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; LADEIRA et al., 2010; LADEIRA et al., 2015), entre outros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e meio de manutenção

Para realização deste estudo, foi utilizada uma cultura bacteriana termofílica, *Bacillus* sp. SMIA-2, isolada por Souza e Martins (2001) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a partir de amostras do solo da região de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

O microrganismo foi mantido em placas de Petri contendo meio TSY (triptona 20 g.L⁻¹; cloreto de sódio (NaCl) 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 10 g.L⁻¹; ágar 20 g.L⁻¹ e água destilada, 1 L), sob temperatura de refrigeração (7 °C).

3.2. Avaliação qualitativa da atividade enzimática

A análise qualitativa da atividade celulolítica do microrganismo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi realizada em placas de Petri. O meio de cultura continha os seguintes nutrientes (g.L⁻¹ de água destilada): água de maceração de milho (Sigma), 1,0; peptona, 1,0; KCl, 0,3; K₂HPO₄, 0,87; MgSO₄, 0,5; NaCl, 10,0; ágar, 20; e traços de metais (CaCl₂, 2,2x10⁻³; ZnO, 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O, 2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O, 1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O, 8,5x10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O, 2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O, 2,5x10⁻⁴; H₃BO₃, 3,0x10⁻⁴; Na₂MoO₄, 1,0x10⁻³). Este meio foi suplementado, separadamente, com avicel e carboximetilcelulose a 0,5% (m/V).

Com o auxílio de uma agulha estéril, o microrganismo foi inoculado nas placas e incubado a 50 °C por 24 horas. Após o crescimento, as placas foram coradas com 10 mL de lugol 1% (V/V) por 15 minutos. Em seguida, a solução foi descartada e adicionou-se 10 mL de solução de NaCl 1 M por 30 minutos. Transcorrido esse tempo, o excesso de solução salina foi removido e foi feita a observação das zonas de hidrólise em torno das colônias. A presença do halo foi considerada como teste positivo.

3.3. Meio de cultivo

O meio de cultivo para a produção do complexo enzimático (avicelase, carboximetilcelulase e FPase) continha os seguintes nutrientes (g.L⁻¹ de água destilada): peptona, 1,0; KCl, 0,3; K₂HPO₄, 0,87; MgSO₄, 0,5; NaCl, 10,0; e traços de metais (CaCl₂, 2,2x10⁻³; ZnO, 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O, 2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O, 1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O, 8,5x10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O, 2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O, 2,5x10⁻⁴; H₃BO₃, 3,0x10⁻⁴; Na₂MoO₄, 1,0x10⁻³). A este meio basal foi adicionado 0,5% (m/V) de água de maceração de milho (Sigma Aldrich) e 0,5% (m/V) de bagaço de cana-de-açúcar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,5 com NaOH 1,0 M e esterilizado por autoclavagem a 121 °C, 1 atm durante 15 minutos.

3.4. Preparo do inóculo

As placas de Petri contendo o microrganismo em meio TSY foram incubadas em estufa da marca QUIMIS (modelo Q 315 D26) a 50 °C durante 18 horas. Após este período, 5 mL do meio de cultivo foram transferidos para as placas para ressuspensão das células que, com o auxílio de uma pipeta estéril, foram posteriormente sugadas, inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo e incubadas por mais 18 horas em agitador orbital (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) a 50 °C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, este inóculo foi utilizado para inocular o meio de cultivo.

3.5. Crescimento do microrganismo

O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo. Os frascos foram inoculados com 2 mL do inóculo e posteriormente incubados a 50 °C em um agitador orbital (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Nos intervalos de tempo definidos, o crescimento do microrganismo foi determinado medindo-se a densidade ótica do meio a 600 nm com a utilização de um espectrofotômetro (UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japão).

3.6. Influência do bagaço de cana-de-açúcar no crescimento e secreção das celulasas de *Bacillus* sp. SMIA-2

Diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar foram empregados separadamente para avaliar a secreção das enzimas, sendo eles:

- Bagaço “*in natura*”;
- Bagaço tratado com solução de hidróxido de potássio (KOH 10%, m/V);
- Bagaço tratado com solução de hidróxido de hidróxido de potássio (KOH 10%, m/V) e posteriormente tratado com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1,2%, m/V).

Os bagaços de cana-de-açúcar empregados foram obtidos da Usina sucroalcooleira Paraíso (Campos dos Goytacazes - RJ), tratados no Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) em Lisboa - Portugal e foram armazenados sob temperatura de refrigeração (7 °C) até sua utilização neste trabalho (LADEIRA, 2013).

Além disso, foi utilizado para efeito de comparação, um meio contendo 0,5% (m/V) de recortes de papel de filtro Whatman n° 1, como substrato indutor em substituição ao bagaço de cana.

3.7. Otimização das condições do meio de cultivo utilizando planejamento experimental

Após a determinação do bagaço de cana que proporcionou a maior produção enzimática, realizou-se a otimização das condições do meio de cultivo. Elaborou-se um delineamento composto central (DCC) do tipo 2³, em relação às variáveis independentes, bagaço de cana-de-açúcar (% m/V), água de maceração de milho (% m/V) e tempo de fermentação (h), com três repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 17 ensaios, à temperatura de 50 °C e agitação de 150 rpm.

Os níveis das variáveis independentes em estudo foram definidos a partir de testes preliminares e estão apresentados na Tabela 1, juntamente com as condições experimentais.

A análise estatística dos dados obtidos das condições do meio de cultivo seguiu a metodologia de superfície de resposta utilizando o programa Statistica, versão 5.0. As respostas avaliadas foram: atividades específicas da avicelase (U.mg ptn^{-1}), carboximetilcelulase (U.mg ptn^{-1}), FPase (U.mg ptn^{-1}).

Tabela 1 - Representação do planejamento experimental com os níveis das variáveis independentes: bagaço, água de maceração de milho (AMM) e tempo

Variáveis Independentes						
Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais		
	Bagaço	AMM	Tempo	Bagaço (%)	AMM (%)	Tempo (h)
1	-1	-1	-1	0,400	0,400	139
2	+1	-1	-1	0,850	0,400	139
3	-1	+1	-1	0,400	0,850	139
4	+1	+1	-1	0,850	0,850	139
5	-1	-1	+1	0,400	0,400	197
6	+1	-1	+1	0,850	0,400	197
7	-1	+1	+1	0,400	0,850	197
8	+1	+1	+1	0,850	0,850	197
9	-1,68	0	0	0,250	0,625	168
10	+1,68	0	0	1,000	0,625	168
11	0	-1,68	0	0,625	0,250	168
12	0	+1,68	0	0,625	1,000	168
13	0	0	-1,68	0,625	0,625	120
14	0	0	1,68	0,625	0,625	216
15	0	0	0	0,625	0,625	168
16	0	0	0	0,625	0,625	168
17	0	0	0	0,625	0,625	168

3.8. Influência da fonte de carbono sobre o crescimento celular e a atividade das celulasas

A influência de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento do microrganismo e sobre a atividade das celulasas foi estudada cultivando o microrganismo no meio de cultivo descrito no item 3.4, acrescido individualmente das seguintes fontes de carbono a 0,5% (m/V): glicose, frutose, xilose, lactose, celobiose, pectina de maçã e farinha da casca de maracujá. As soluções de açúcares foram esterilizadas separadamente em autoclave a 121 °C por 15 minutos e adicionadas ao meio de cultivo assepticamente em capela de fluxo laminar. Posteriormente, todos os meios, inclusive o controle (sem adição de uma nova fonte de carbono) foram incubados a 50 °C, 150 rpm durante 168 horas.

Após a definição da melhor fonte de carbono, determinou-se o tempo de fermentação em que ocorre a máxima produção das celulasas. Os tempos estudados foram: 36, 72, 108, 144, 168 e 180 horas.

Posteriormente, foi realizado um estudo para verificar a melhor concentração da fonte de carbono adicional definida. As concentrações avaliadas foram: 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,5% (m/V).

3.9. Variações de pH

As variações de pH durante o crescimento celular foram medidas pelo método potenciométrico, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

3.10. Obtenção das enzimas

As amostras contendo o meio de cultivo foram centrifugadas em uma centrífuga (HERMLEZ 382K, Wehingen, Alemanha), a 4500 rpm por 30 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células que foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

3.11. Ensaaios enzimáticos

3.11.1. Atividade enzimática da avicelase (EC 3.2.1.91)

A atividade da enzima avicelase foi determinada pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de avicel (Sigma). Uma mistura que continha 0,5 mL de solução de avicel 1% (m/V) preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi incubada a 70 °C durante 10 minutos. Transcorrido este período, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado à mistura e esta deixada em ebulição em banho-maria durante 10 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e a absorbância foi medida a 540 nm (MILLER, 1959). O mesmo procedimento foi realizado com o controle, no entanto sem o extrato livre de células. Uma unidade (U) de atividade de avicelase foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritos, usando uma curva padrão de glicose.

3.11.2. Atividade enzimática da carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4)

A atividade da enzima carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada por meio da quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de carboximetilcelulose (Sigma). Uma mistura que continha 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 1% (m/V) preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi incubada a 70 °C durante 10 minutos. Transcorrido este período, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado à mistura e esta deixada em ebulição em banho-maria durante 10 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e a absorbância foi medida a 540 nm (MILLER, 1959). O mesmo procedimento foi realizado com o controle, no entanto sem o extrato livre de células. Uma unidade (U) de atividade de CMCase foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritos, usando uma curva padrão de glicose.

3.11.3. Atividade enzimática da celulase total (FPase)

A atividade da FPase (atividade de papel de filtro) compreende um complexo de exoglucanases e endoglucanases. Esta foi determinada a partir da degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1. Uma mistura que continha uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg), 1 mL de tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi incubada a 70 °C durante 10 minutos. Transcorrido este período, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado à mistura e esta deixada em ebulição em banho-maria durante 10 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e a absorbância foi medida a 540 nm (MILLER, 1959). O mesmo procedimento foi realizado com o controle, no entanto sem o extrato livre de células. Uma unidade (U) de atividade de FPU (“Filter Paper Unity”) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritos, usando uma curva padrão de glicose.

3.12. Determinação da proteína

A dosagem de proteína nos filtrados da cultura foi determinada pelo método de Lowry modificado por Peterson (1977), utilizando-se solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação qualitativa da atividade celulolítica de *Bacillus* sp. SMIA-2

Na Figura 4, encontram-se ilustrados os resultados dos testes qualitativos para celulasas, referentes ao *Bacillus* sp. SMIA-2.

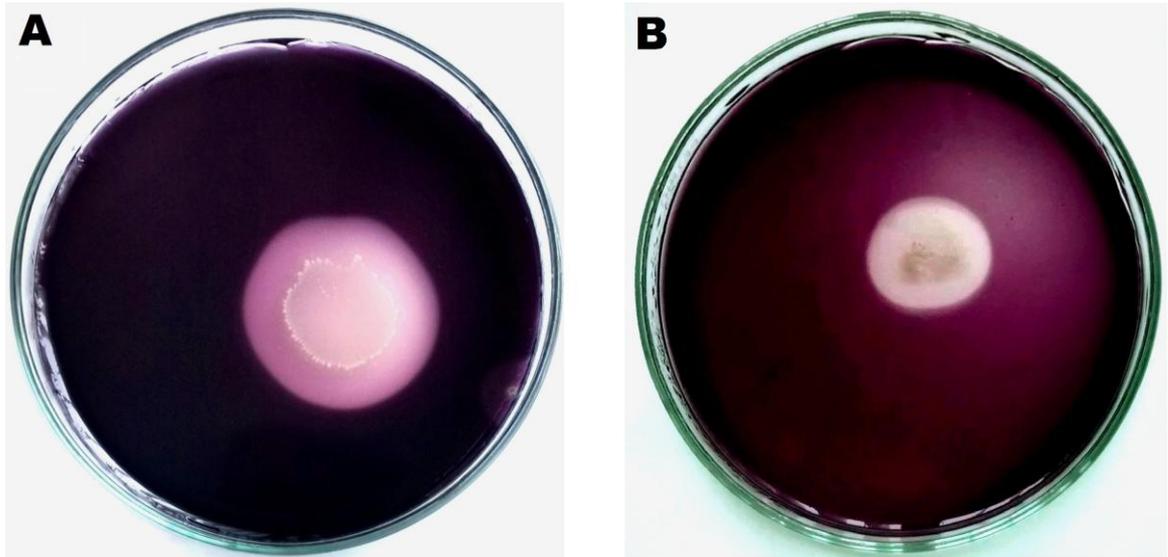


Figura 4 - Teste qualitativo de produção de celulasas por *Bacillus* sp. SMIA-2, após revelação com lugol. Substratos: avicel (A); carboximetilcelulose (B).

O lugol é capaz de permanecer ligado às regiões onde há polissacarídeos, tais como a celulose; não reagindo com dissacarídeos e monossacarídeos (JANG; CHEN, 2003). A formação de halos translúcidos ao redor da colônia corresponde à zona de hidrólise dos substratos celulósicos.

Assim, de acordo com a Figura 4, foi observado que o teste revelou-se positivo, demonstrando que o microrganismo em estudo produz celulasas que hidrolisam tanto a forma amorfa (Carboximetilcelulose) quanto cristalina (Avicel) da celulose, respectivamente as enzimas carboximetilcelulase e avicelase.

4.2. Efeito do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes tratamentos e do papel de filtro sobre o crescimento celular e atividade das celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2

Na Figura 5, estão apresentados os resultados da densidade ótica (D.O) e pH dos meios de cultivo contendo água de maceração de milho e, individualmente, os diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar e o papel de filtro Whatman n° 1.

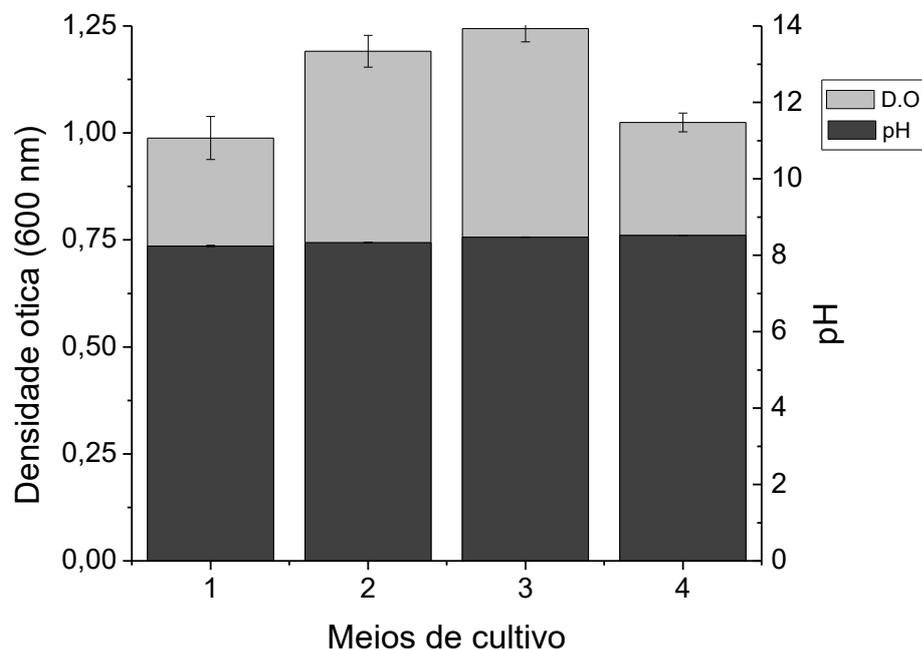


Figura 5 - Crescimento celular de *Bacillus* sp. SMIA-2 e pH dos meios de cultura contendo o bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento (1), tratado com álcali (2), tratado com álcali e depois com ácido (3) e papel de filtro Whatman n° 1 (4), após 168 horas de incubação a 50 °C.

Pela densidade ótica, foi observado que a cultura cresceu bem em todos os meios de cultivo. Contudo, os bagaços tratados promoveram um maior crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2. Os métodos de pré-tratamento aumentam a disponibilidade da celulose, em consequência disto, melhoram o crescimento celular. Estes resultados foram similares aos encontrados no estudo de Delatorre (2010) com *Bacillus* sp. SMIA-2 e no estudo de Fassanela (2008) com *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., em que o pré-tratamento químico no bagaço de cana possibilitou em ambos um maior desenvolvimento das células.

No entanto, é necessário destacar que o desenvolvimento da cultura nos

meios avaliados deve-se, principalmente, ao fornecimento de fonte de nitrogênio pela suplementação com água de maceração de milho, uma vez que o teor de nitrogênio presente no bagaço de cana é baixo para promover um bom crescimento e produção enzimática (PARK et al., 2002).

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 5, para todos os meios após 168 horas de fermentação, o pH encontrou-se acima de 8. Segundo Ming Chu (1992), a acidificação ou alcalinização do meio de cultivo reflete o consumo de substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e quando nitrogênio orgânico está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino.

Na Tabela 2, estão apresentadas as atividades das enzimas avicelase, carboximetilcelulase (CMCase) e celulase total (FPase) secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em cultivos submersos contendo água de maceração de milho e, individualmente, os diferentes tipos de bagaço de cana e o papel de filtro Whatman nº 1.

Tabela 2 - Atividades das celulases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meios que continham como substratos: bagaço “*in natura*” (1), bagaço tratado com álcali (2), bagaço tratado com álcali e ácido (3) e papel de filtro Whatman nº 1 (4)

Meios	Atividade (U.mL ⁻¹)			Proteína (mg.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ptn ⁻¹)		
	Avicelase	CMCase	FPase		Avicelase	CMCase	FPase
1	0,764	0,101	1,001	0,395	1,934	0,255	2,533
2	0,815	0,081	0,934	0,355	2,296	0,228	2,632
3	0,801	0,094	0,976	0,379	2,112	0,248	2,573
4	0,628	0,071	0,863	0,317	1,955	0,223	2,722

Os valores encontrados de atividade da avicelase foram similares para os diferentes tipos de bagaços de cana-de-açúcar. No entanto, a atividade específica desta enzima foi maior quando se utilizou como substratos indutores os bagaços tratados, principalmente com solução alcalina. Quanto à CMCase, foi observado níveis semelhantes de atividade e atividade específica para todos os meios. Já em relação à FPase, as atividades obtidas também foram similares para os diferentes meios, porém o bagaço tratado com álcali e o papel de filtro

promoveram índices maiores de atividade específica. De um modo geral, foi verificado que o emprego de um pré-tratamento químico no bagaço de cana colaborou para o aumento das atividades específicas da avicelase e FPase.

Os pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos têm os objetivos de remover a lignina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade (MCMILLAN, 1994). Os bagaços de cana-de-açúcar usados neste estudo foram, anteriormente, caracterizados por Ladeira (2013), que comprovou que os pré-tratamentos químicos empregados atenderam tais finalidades.

Deste modo, ao testar a influência dos tipos de bagaço estudados sobre a atividade enzimática, foi possível concluir que os métodos químicos de pré-tratamento empregados, especialmente com hidróxido de potássio, foram eficientes ao removerem grande parte da lignina, contribuindo para o aumento da suscetibilidade da celulose ao ataque hidrolítico das enzimas celulolíticas. Possivelmente o pré-tratamento do bagaço disponibilizou a celulose em níveis superiores ao do papel de filtro Whatman nº 1 (usado como um modelo de substrato delignificado), o que justifica os maiores índices de atividade específica para a enzima avicelase nos meios 2 e 3.

Resultado semelhante foi obtido por Sridevi et al. (2009), ao compararem o efeito do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (serragem, bagaço de cana, farelo de trigo e palha de arroz) sobre a atividade celulolítica de *Aspergillus niger*. As atividades enzimáticas foram maiores nos substratos submetidos ao pré-tratamento. No bagaço *in natura* os índices foram de 2,0 U.mL⁻¹ para FPase e 2,5 U.mL⁻¹ para CMCase, enquanto que no bagaço de cana pré-tratado foi obtido 6,6 U.mL⁻¹ para FPase e 6,0 U.mL⁻¹ para CMCase, no entanto, os valores foram superiores aos encontrados no presente trabalho.

O tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com uma solução de NaOH também proporcionou uma maior produção de avicelase pelo termofílico *Geobacillus stearothermophilus*. A atividade da enzima no bagaço de cana tratado foi de 1,99 U.mL⁻¹ e 1,06 U.mL⁻¹ no bagaço não tratado (MAKKY, 2009).

A bactéria *Bacillus* sp. SMIA-2, como observado na Tabela 2, produziu níveis maiores de atividade de exoglucanases (avicelases) do que de endoglucanases (CMCases). Provavelmente a composição do meio e as condições da cultura favoreceram a maior secreção destas enzimas. O mesmo

desempenho foi reportado por Ladeira et al. (2015) em que o microrganismo *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivado em culturas submersas contendo bagaço de cana, apresentou 0,83 U.mg ptn⁻¹ para avicelase e 0,29 U.mg ptn⁻¹ para CMCCase. Nota-se que o valor da atividade específica de avicelase encontrado por estes autores foi inferior aos valores das atividades específicas desta enzima verificados neste estudo, porém para a CMCCase foram semelhantes (Tabela 2).

Nas etapas posteriores deste trabalho foi utilizado o bagaço tratado com álcali. Tal escolha reside no fato de que o tratamento com hidróxido de potássio (KOH) foi o que melhor contribuiu para as maiores atividades específicas das enzimas avicelase e FPase.

4.3. Otimização da produção de celulases usando o termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 utilizando planejamento experimental

Um delineamento composto central (DCC) do tipo 2³ e superfícies de resposta foram utilizados para avaliar os efeitos do tempo de incubação e das concentrações de bagaço de cana e água de maceração de milho sobre as atividades específicas das celulases a fim de determinar as condições ótimas para se obter a máxima secreção dessas enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2.

Na Tabela 3 está apresentada a matriz do DCC para a atividade específica da avicelase (U.mg ptn⁻¹).

Pela Tabela 3, foi observado que a atividade específica da avicelase variou de zero (ensaios 4, 7, 8 e 12) a 2,73 U.mg ptn⁻¹ (ensaio 16). Analisando os parâmetros estudados, foi verificado que a atividade específica máxima da avicelase foi obtida quando *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado em meio líquido contendo 0,625% (m/V) de bagaço de cana e 0,625% (m/V) de água de maceração de milho durante 168 horas de fermentação, tal condição correspondia aos pontos centrais do experimento.

Ladeira et al. (2015) relataram a produção de avicelase e CMCCase por *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo 0,5% (m/V) de bagaço *in natura* e 0,5% (m/V) de água de maceração de milho. Segundo esses autores, a atividade máxima de avicelase (0,83 U.mL⁻¹) foi obtida após 120 h de incubação.

Tabela 3 - Matriz do DCC 2³ para a atividade específica das celulasas com os valores reais e codificados das variáveis independentes

Ensaio	Bagaço (% m/V)	AMM (% m/V)	Tempo (h)	Avicelase (U.mg ptn ⁻¹)	CMCase (U.mg ptn ⁻¹)	FPase (U.mg ptn ⁻¹)
1	0,400 (-1)	0,400 (-1)	139 (-1)	1,970	0,509	2,086
2	0,850 (+1)	0,400 (-1)	139 (-1)	0,440	0,570	3,499
3	0,400 (-1)	0,850 (+1)	139 (-1)	0,130	0,543	3,458
4	0,850 (+1)	0,850 (+1)	139 (-1)	0,000	0,492	2,556
5	0,400 (-1)	0,400 (-1)	197 (+1)	1,460	0,162	3,044
6	0,850 (+1)	0,400 (-1)	197 (+1)	0,700	0,392	2,704
7	0,400 (-1)	0,850 (+1)	197 (+1)	ND	0,087	1,559
8	0,850 (+1)	0,850 (+1)	197 (+1)	ND	0,105	1,703
9	0,250 (-1,68)	0,625 (0)	168 (0)	2,290	0,140	2,861
10	1,000 (+1,68)	0,625 (0)	168 (0)	0,090	0,063	2,022
11	0,625 (0)	0,250 (-1,68)	168 (0)	0,060	0,269	2,987
12	0,625 (0)	1,000 (+1,68)	168 (0)	ND	0,020	1,676
13	0,625 (0)	0,625 (0)	120 (-1,68)	2,470	0,753	1,438
14	0,625 (0)	0,625 (0)	216 (+1,68)	0,250	0,330	2,930
15	0,625 (0)	0,625 (0)	168 (0)	2,450	0,274	2,728
16	0,625 (0)	0,625 (0)	168 (0)	2,730	0,311	3,050
17	0,625 (0)	0,625 (0)	168 (0)	2,410	0,298	2,846

ND: atividade não detectada

Uma equação para a resposta atividade específica da avicelase foi desenvolvida baseada na análise dos coeficientes de regressão dos dados experimentais (Equação 1).

$$Y = 2,544 - 0,354 x_1 - 0,401 x_1^2 - 0,325 x_2 - 0,959 x_2^2 - 0,300 x_3 - 0,478 x_3^2 + 0,272 x_1x_2 + 0,113 x_1x_3 + 0,015 x_2x_3 \quad (1)$$

Onde x_1 é a concentração de bagaço de cana-de-açúcar, x_2 representa a concentração de água de maceração de milho e x_3 é o tempo de cultivo.

A significância estatística do modelo foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de variância para a produção da avicelase estão apresentados na Tabela 4. De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para a produção da enzima avicelase foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação foi de 87,99%.

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta atividade específica da avicelase de *Bacillus* sp. SMIA-2

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcal	Ftab ($p < 0,05$)
Regressão	19,83568	9	2,203964	5,696323	3,68
Resíduo	2,70837	7	0,38691		
Falta de ajuste	2,64722	5	0,529444	17,31624	19,3
Erro puro	0,06115	2	0,030575		
Total	22,54405	16			
				$R^2 =$	87,99%

Nas Figuras 6, 7 e 8 estão ilustradas as superfícies de resposta para a variável atividade específica da avicelase. As variáveis não explícitas foram fixadas no ponto central (nível 0) para a construção de uma superfície.

Pela Figura 6, foi observado um aumento no tempo de incubação com o aumento simultâneo da concentração de bagaço de cana-de-açúcar até atingir a máxima produção de avicelase. No entanto, uma concentração mais elevada do que 0,625% (m/V) de bagaço de cana diminuiu a produção da enzima.

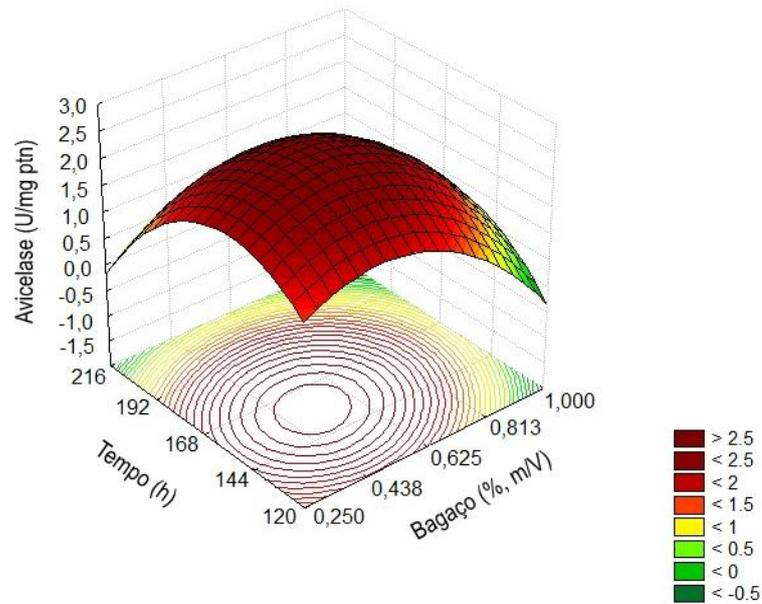


Figura 6 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de bagaço de cana-de-açúcar na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de água de maceração de milho constante.

Da mesma forma, o aumento concomitante do tempo de incubação e da concentração de água de maceração de milho resultou na máxima produção de avicelase. Porém, uma concentração mais elevada do que 0,625% (m/V) de água de maceração de milho também promoveu diminuição da secreção da enzima (Figura 7).

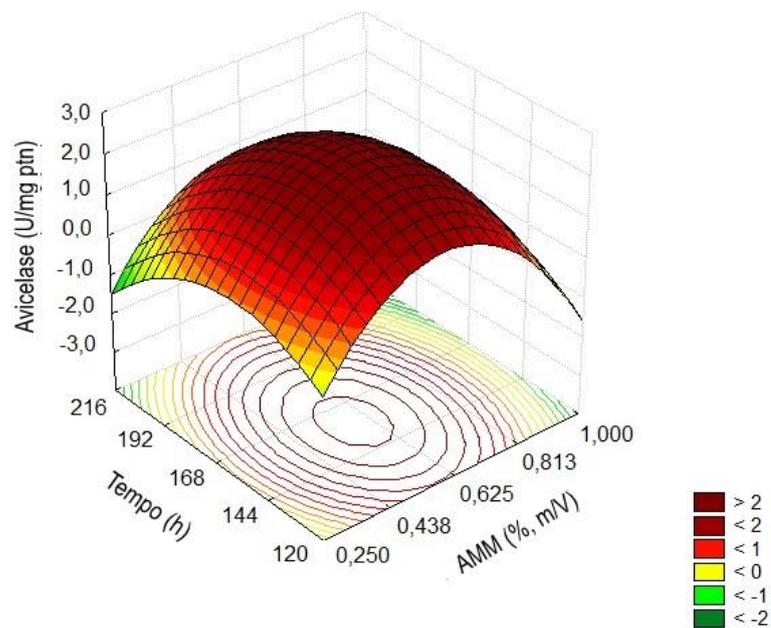


Figura 7 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de água de maceração de milho (AMM) na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de bagaço de cana-de-açúcar constante.

Finalmente, observou-se um aumento da atividade específica da enzima com o aumento simultâneo da concentração de bagaço de cana e de água de maceração de milho, até estes substratos chegarem a concentração ideal, que foi de 0,625% (m/V) para ambos (Figura 8).

A atividade enzimática pode ser regulada por seus substratos, e,ou, produtos. A inibição pelo substrato é conhecida como uma inibição por excesso de substrato (MOSIER; LADISCH, 2009). Assim, este fenômeno pode ter ocorrido nas concentrações superiores às concentrações ideais de bagaço e água de maceração de milho.

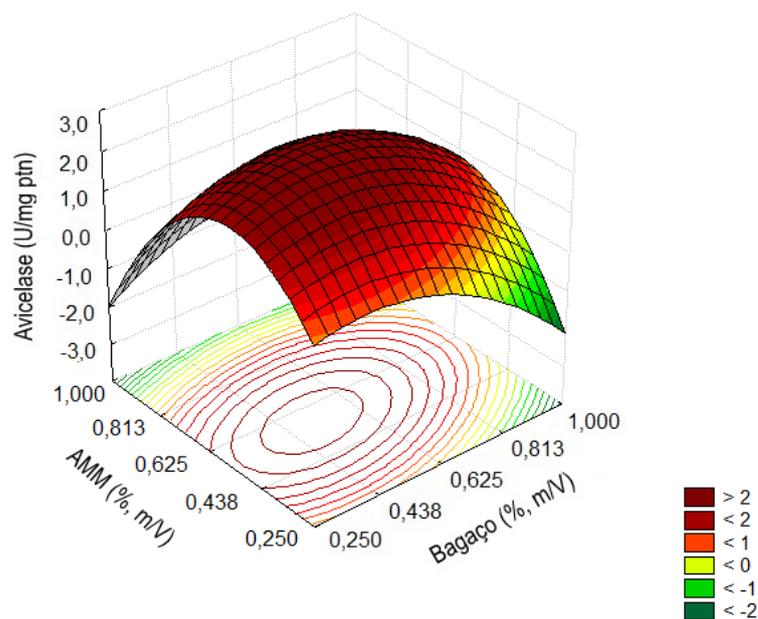


Figura 8 - Superfície de resposta: Efeitos das concentrações de água de maceração de milho (AMM) e bagaço de cana-de-açúcar na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a um tempo de incubação constante.

A partir deste estudo, notou-se que as quantidades de bagaço de cana e de água de maceração de milho presentes no meio de cultivo e o tempo de fermentação foram determinantes para se obter uma maior secreção da avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2. A atividade máxima da avicelase ocorreu quando o teor de bagaço de cana, o teor de água de maceração de milho e o tempo de incubação foram entre 0,438 e 0,625% (m/V), 0,438 e 0,625% (m/V), 144 e 168 horas, respectivamente.

Para a resposta atividade específica da CMCase, uma equação foi desenvolvida baseada na análise dos coeficientes de regressão dos dados

experimentais (Equação 2).

$$Y = 0,2880 + 0,0095 x_1 - 0,0466 x_1^2 - 0,0602 x_2 - 0,0315 x_2^2 - 0,1523 x_3 + 0,1089 x_3^2 - 0,0405 x_1x_2 + 0,0295 x_1x_3 - 0,0398 x_2 x_3 \quad (2)$$

Onde x_1 é a concentração de bagaço de cana-de-açúcar, x_2 representa a concentração de água de maceração de milho e x_3 é o tempo de cultivo.

A significância estatística do modelo foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de variância (ANOVA) para a produção da CMCase estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta atividade específica da CMCase de *Bacillus* sp. SMIA-2

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcal	Ftab (p<0,05)
Regressão	0,56945	9	0,06327	8,75268	3,68
Resíduo	0,50602	7	0,00723		
Falta de ajuste	0,04988	5	0,00997	27,7122	19,3
Erro puro	0,00072	2	0,00036		
Total	0,62005	16			
				R ² =	91,839

O teste F (p<0,05), para a variável dependente atividade específica da CMCase, foi altamente significativo, sendo o modelo ajustado adequado para descrever os resultados por meio da superfície de resposta. O valor do coeficiente de determinação foi R² = 91,84%.

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão ilustrados os gráficos tridimensionais de superfície de resposta para atividade específica da CMCase. As variáveis não explícitas foram fixadas no ponto central para a construção de uma superfície.

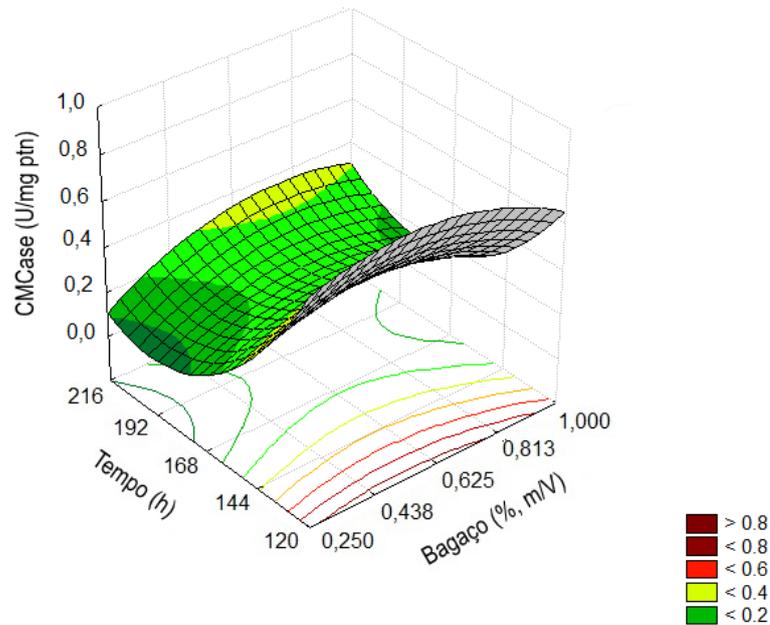


Figura 9 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de bagaço de cana-de-açúcar na secreção de CMCase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração água de maceração de milho constante.

Pela Figura 9 foi observado que a diminuição do tempo de incubação e da concentração de bagaço de cana-de-açúcar resultou em maior atividade específica da CMCase. Resultado semelhante foi obtido ao diminuir o tempo de incubação e a concentração água de maceração de milho (Figura 10).

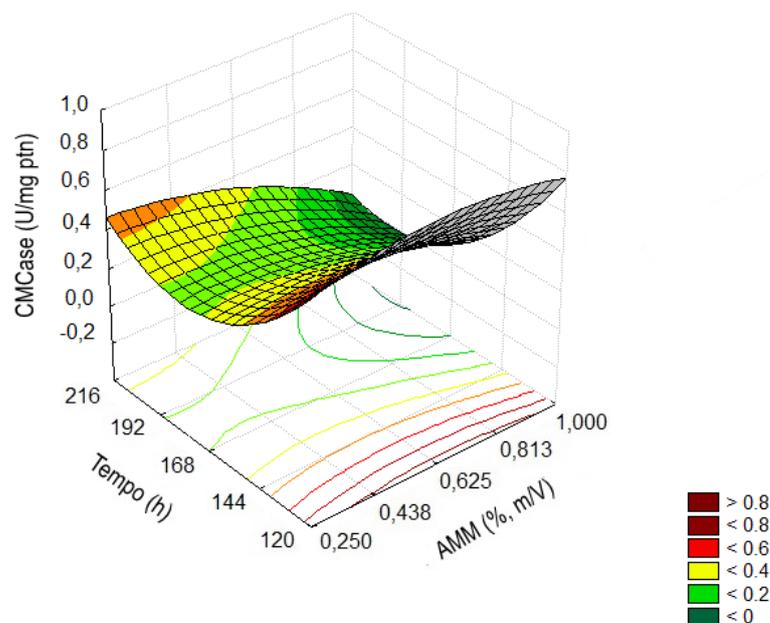


Figura 10 - Superfície de resposta: Efeitos do tempo de incubação e concentração de água de maceração de milho (AMM) na secreção de CMCase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de bagaço de cana-de-açúcar constante.

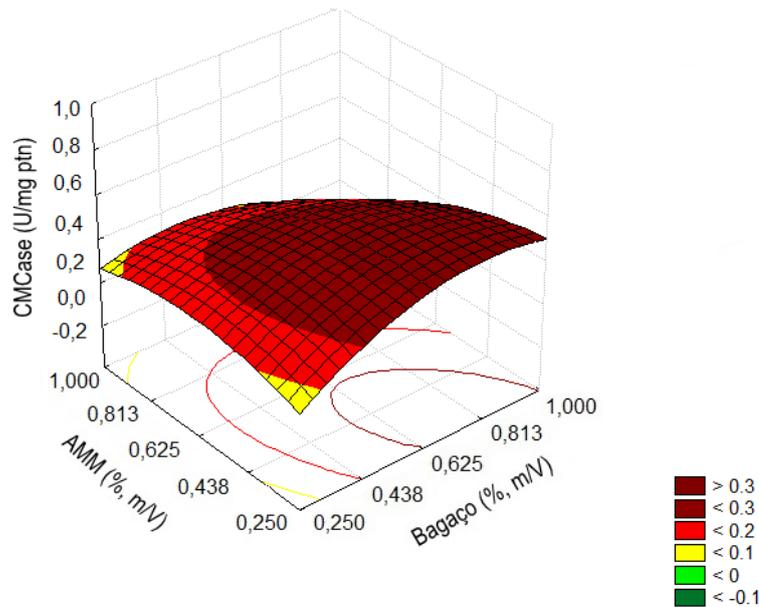


Figura 11 - Superfície de resposta: Efeitos das concentrações de água de maceração de milho (AMM) e bagaço de cana-de-açúcar na secreção de CMCCase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a um tempo de incubação constante.

A atividade máxima da CMCCase ocorreu quando o teor de bagaço de cana e o teor de água de maceração de milho foram, respectivamente, entre 0,625 e 1% (m/V), 0,250 e 0,625% (m/V), com o tempo de incubação de 120 h. No entanto, ressalta-se que em relação ao tempo de cultivo, novos estudos são necessários para otimizar este parâmetro, uma vez que não foi obtido um ponto máximo para a produção da enzima (Figura 11).

Ao estudar a variável resposta atividade específica da FPase, observou-se que o modelo não foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$) e o valor do coeficiente de determinação foi baixo ($R^2 = 50,07\%$).

Na Figura 12 está demonstrado o gráfico de valores preditos versus observados para a variável resposta atividade específica da FPase ($U \cdot mg \text{ ptn}^{-1}$). A qualidade do ajuste do modelo pode ser verificada pelo gráfico da figura. Quanto mais os dados se ajustam à reta identidade, melhor é a qualidade do ajuste. Logo, como os valores de atividade específica da FPase se apresentaram dispersos em relação à reta identidade, demonstrando fuga da normalidade, não foi possível construir as superfícies de resposta para esta variável dependente.

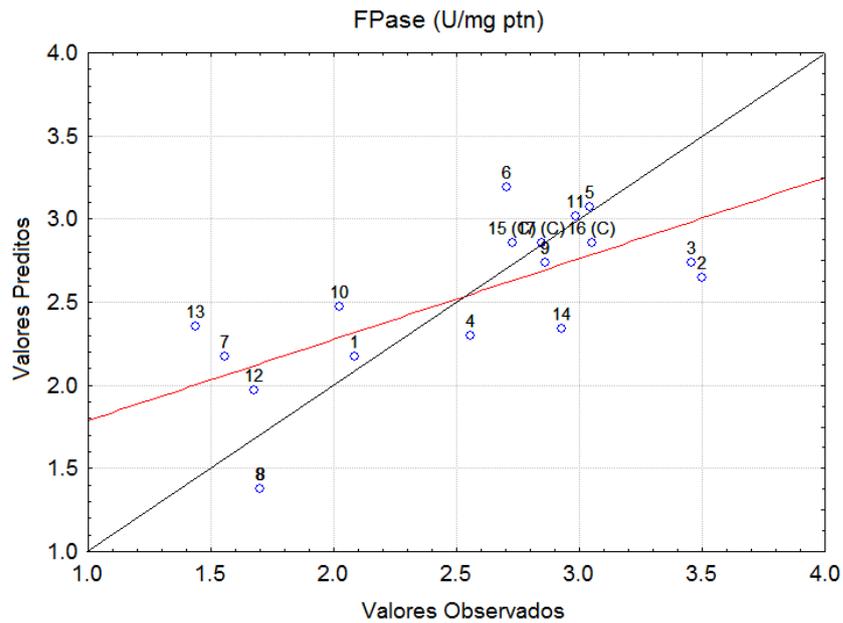


Figura 12 - Valores preditos e observados para a variável dependente atividade específica da FPase.

Assim, a condição ótima de cultivo, determinada usando a técnica do planejamento composto central (2^3), foi utilizando as concentrações de 0,625% (m/V) de bagaço, 0,625% (m/V) de água de maceração de milho e os tempos de incubação de 120 horas para CMCase e de 168 horas para avicelase.

4.4. Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 e a atividade das celulases

Na Figura 13, estão apresentados os resultados da densidade ótica (D.O) e pH dos meios de cultivo contendo bagaço de cana-de-açúcar tratado com álcali adicionados de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, xilose, lactose, celobiose, farinha da casca de maracujá-FCM e pectina de maçã) e do meio controle (sem adição de uma nova fonte de carbono).

Foi observado que os monossacarídeos e os dissacarídeos testados ocasionaram poucas alterações nos valores de pH se comparados ao meio controle. Enquanto que a farinha da casca de maracujá e a pectina de maçã, por sua vez, promoveram um respectivo aumento do pH de 8,46 (controle) para 8,79 e 8,96. O valor do pH de um meio de cultivo tende a variar em resposta às atividades metabólicas dos microrganismos, seja por meio da produção de ácidos

ou do consumo de aminoácidos e peptídeos, que tendem a diminuir e elevar o pH respectivamente (RAIMBAULT,1998).

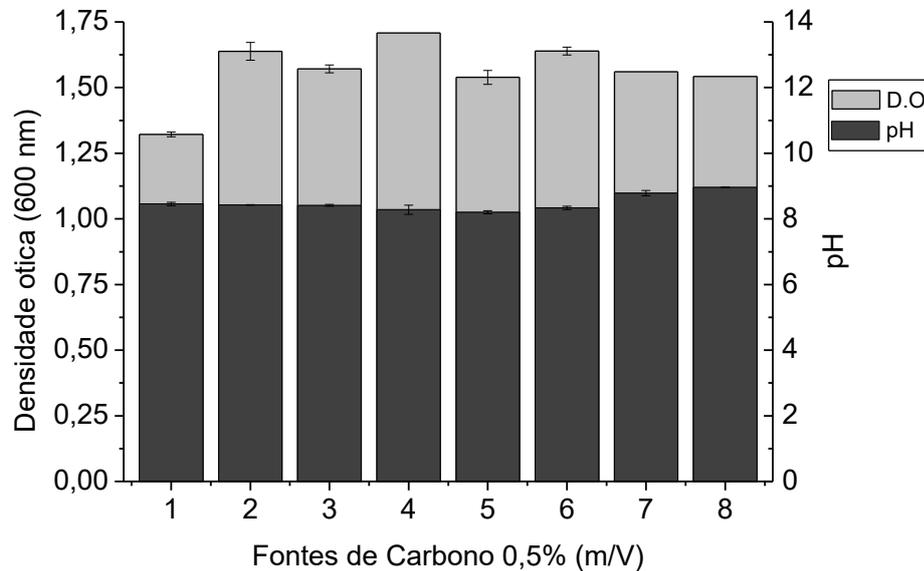


Figura 13 - Crescimento celular de *Bacillus* sp. SMIA-2 e pH dos meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono: Controle (1), Glicose (2), Frutose (3), Xilose (4), Lactose (5), Celbiose (6), FCM (7) e Pectina (8), após 168 horas de incubação a 50 °C.

Pela densidade ótica, observa-se que *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de metabolizar satisfatoriamente todas as fontes de carbono estudadas. Porém, a utilização da glicose, da xilose e da celbiose, em especial, promoveu um melhor crescimento celular (Figura 13). Os substratos tem a função de servir como fonte de carbono para o crescimento celular, bem como induzir a síntese enzimática. No entanto, a resposta das células aos diferentes substratos varia dependendo do tipo e concentração destes no meio de cultivo (GONG; TSAO, 1975).

Na Figura 14, estão apresentadas as atividades específicas das celulases em função das diferentes fontes de carbono testadas. De acordo com os resultados ilustrados, as atividades específicas da avicelase foram maiores durante o crescimento do microrganismo com a farinha da casca de maracujá, a pectina de maçã e a glicose, os níveis observados foram de 3,931 U.mg ptn⁻¹, 3,832 U.mg ptn⁻¹ e 3,527 U.mg ptn⁻¹, respectivamente. A frutose, a xilose e a lactose também foram capazes de promover um aumento da atividade específica da avicelase.

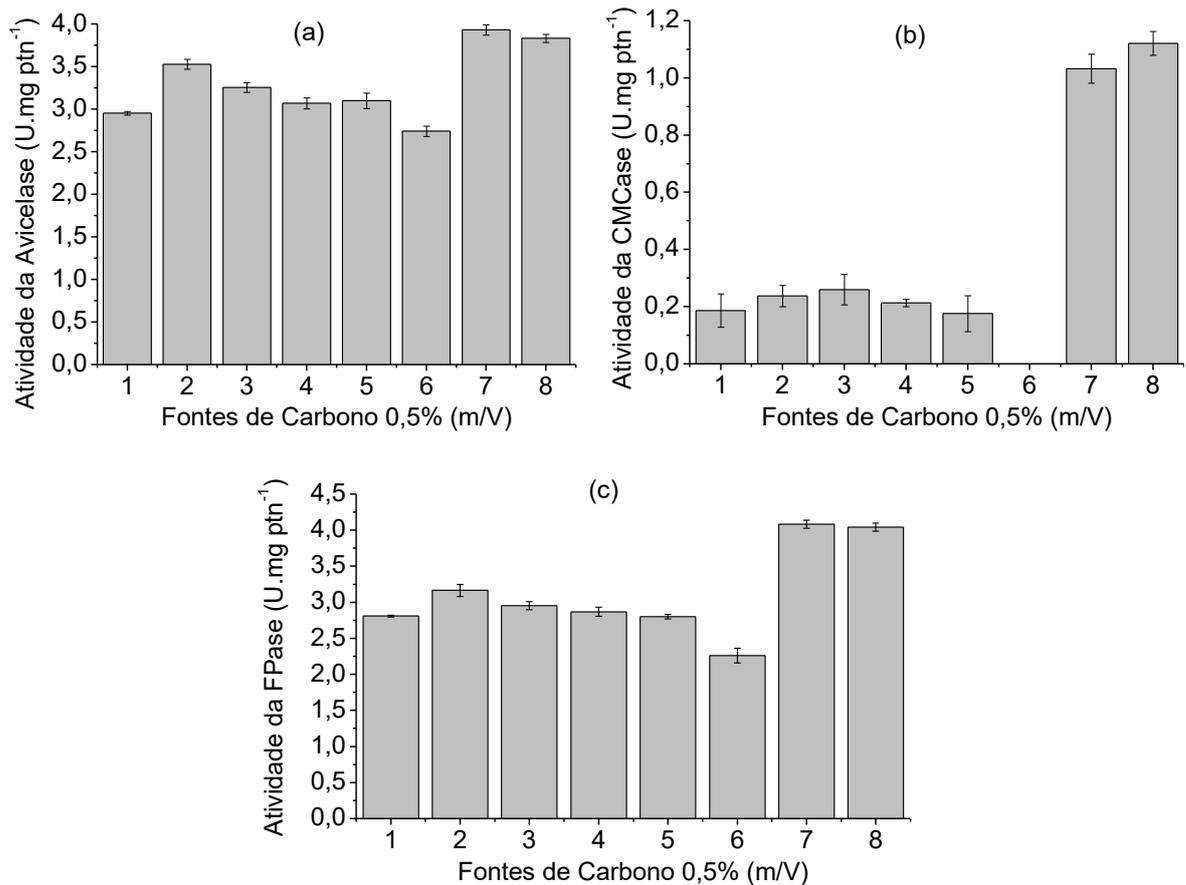


Figura 14 - Atividades específicas da avicelase (a), CMCase (b) e FPase (c) em função de diferentes fontes de carbono: Controle (1), Glicose (2), Frutose (3), Xilose (4), Lactose (5), Celobiose (6), FCM (7) e Pectina (8).

Para a CMCase foi verificado que a farinha da casca de maracujá e a pectina de maçã foram as fontes de carbono que promoveram as maiores atividades específicas da enzima, obtendo-se os respectivos valores de 1,032 U.mg ptn⁻¹ e 1,121 U.mg ptn⁻¹ (Figura 14).

Quanto à celulase total (FPase), esta enzima também apresentou as maiores atividades específicas quando *Bacillus* sp. SMIA-2 cresceu nos meios contendo a farinha da casca de maracujá e a pectina de maçã, sendo obtidos níveis iguais a 4,084 U.mg ptn⁻¹ e 4,043 U.mg ptn⁻¹, respectivamente (Figura 14).

Waeonukul et al. (2008), utilizaram a bactéria *Paenibacillus curdlanolyticus* e diferentes substratos indutores (celobiose, xilose, glicose, celulose, bagaço de cana, entre outros) para a produção e avaliação da produção de celulases. Os autores verificaram atividades específicas máximas de enzimas celulases ao utilizarem, como fontes de carbono, a celulose e resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana.

Jatinder et al. (2006) ao estudarem a enzima avicelase produzida por *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 em diferentes substratos obtiveram as maiores atividades com o farelo de trigo, seguido do bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e por último serragem.

Para todas as celulases estudadas, foi observado que a adição de celobiose ao meio de cultivo promoveu a inibição da síntese enzimática. Embora a celobiose apresente grande potencial para indução da produção destas enzimas, esta capacidade está ligada a sua concentração no meio.

As celulases podem ser inibidas em determinadas concentrações de produtos intermediários e finais da hidrólise da celulose, como a celobiose e a glicose. Este fenômeno, denominado repressão catabólica por carbono, é uma estratégia que o organismo adota, para que, quando houver alta disponibilidade de açúcares facilmente assimiláveis no meio, eles não necessitem produzir enzimas envolvidas na degradação da biomassa desnecessariamente. A síntese proteica é um processo oneroso para a célula, e produzi-las sem que haja real necessidade seria um desperdício energético para o organismo (SUTO et al., 2001; STRICKER et al., 2008).

Em contrapartida, a utilização do resíduo seco da casca do maracujá em conjunto com o bagaço de cana como fontes de carbono, favoreceu a maior secreção das enzimas celulolíticas pelo microrganismo *Bacillus* sp. SMIA-2. Visto que um dos aspectos que mais geram custos na produção industrial de enzimas é o meio de cultivo utilizado e que as celulases são enzimas que precisam ser induzidas, a escolha por estes resíduos agroindustriais abundantes e baratos como substratos indutores parece ser uma boa alternativa para a produção enzimática.

Wei et al. (2011) apresentaram resultados semelhantes ao estudarem celulases (endoglucanases) de *P. decumbens*, em cultivos com diferentes fontes de carbono. Os autores verificaram que os sacarídeos celobiose e glicose ocasionaram a repressão catabólica por carbono, enquanto que fontes mais complexas de carbono como a celulose e o farelo de trigo induziram a produção das enzimas.

4.5. Perfil do crescimento celular e atividade das celulases

A fim de determinar o tempo ideal de fermentação no qual se obtém produtividade enzimática máxima, *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado por 180 horas em meio de cultivo contendo bagaço de cana-de-açúcar e farinha da casca de maracujá suplementado com água de maceração de milho (Figura 15).

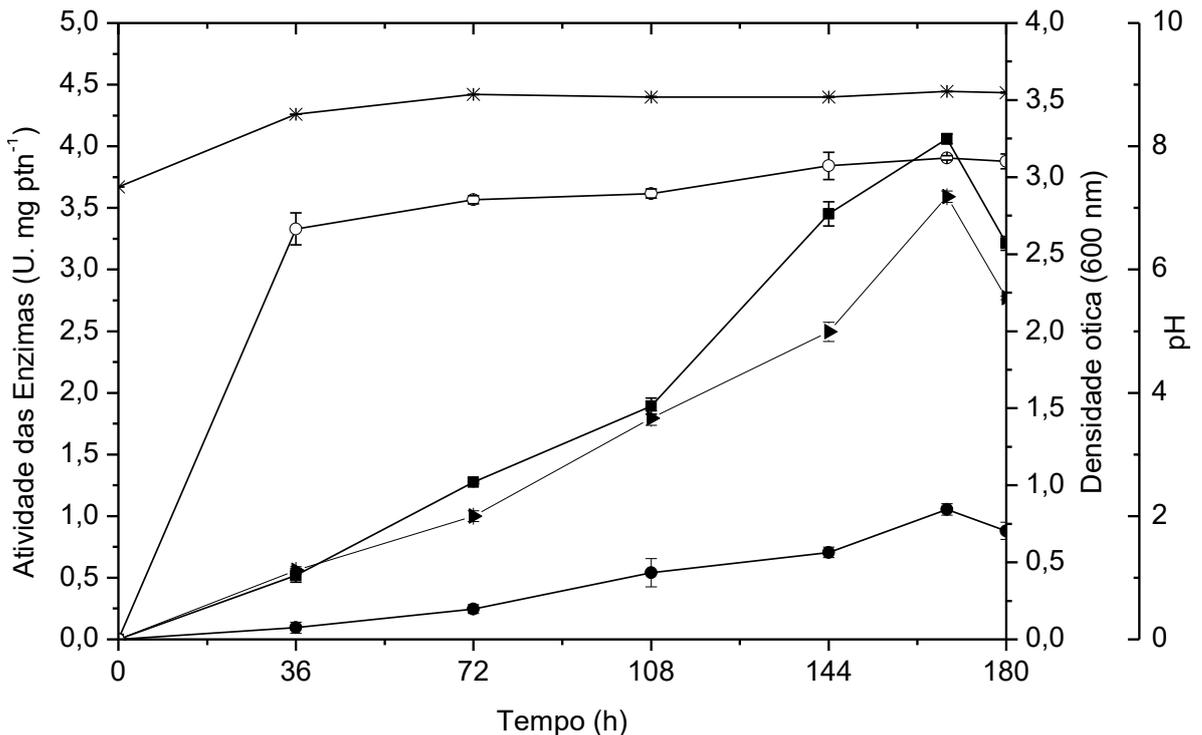


Figura 15 - Densidade ótica (○), pH (*) e atividades específicas da avicelase (►), CMCCase (●) e FPase (■) secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2, em cultivo submerso contendo bagaço de cana (5,0 g.L⁻¹), farinha da casca de maracujá (5,0 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5,0 g.L⁻¹) após 180 horas a 50 °C.

O crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2, após 36 horas de incubação, não apresentou alterações, uma vez que a bactéria já se encontrava na fase estacionária. O pH do meio de cultivo aumentou com o crescimento do microrganismo, provavelmente devido ao consumo de nitrogênio orgânico, como aminoácidos e peptídeos decorrentes da utilização da água de maceração de milho, e atingiu cerca de 8,9 ao final da fermentação.

A partir da Figura 15, pode-se observar, por meio de uma análise conjunta dos perfis de produção de avicelase, CMCCase e FPase ao longo do tempo de

cultivo da bactéria, que ambas as enzimas foram produzidas simultaneamente, embora os níveis de atividade da FPase tenham sido maiores. As atividades máximas para as enzimas celulolíticas foram encontradas no intervalo de 168 horas de incubação, os índices foram de 3,591 U.mg ptn-1 para avicelase, 1,055 U.mg ptn-1 para CMCCase e 4,060 U.mg ptn-1 para FPase. Segundo Chahal et al. (1992), o tempo necessário para serem atingidos os níveis máximos de atividade pode ser afetado por vários fatores, como os tipos de substratos celulolíticos e as condições de cultivo.

No estudo de Delatorre (2010), as atividades máximas das celulasas de *Bacillus* sp. SMIA-2 em meios contendo avicel e carboximetilcelulose, respectivamente para a secreção de avicelase e CMCCase, foram obtidas após 120 horas de incubação. No entanto, Ladeira et al. (2015) observaram que as celulasas de *Bacillus* sp. SMIA-2 quando cultivado em bagaço de cana, atingiram as atividades máximas em tempos de incubação diferentes, aproximadamente 168 horas para CMCCase e 120 horas para avicelase.

Rastogi et al. (2009) relataram a produção máxima de CMCCase por bactérias que degradam a celulose após 240 horas de fermentação, quando as culturas atingiram a fase de morte. Rocha (2010) ao avaliar a produção de celulasas por diferentes linhagens de *Aspergillus niger*, apontaram que as maiores produções dessas enzimas ocorreram com 72 horas de fermentação.

Próximo ao final da fermentação foi notado uma diminuição da atividade enzimática, esta pode ter ocorrido devido ao acúmulo de produtos resultantes da hidrólise da celulose, bem como o esgotamento de alguns nutrientes, que levam à repressão da secreção das enzimas.

4.6. Efeito das concentrações da farinha da casca de maracujá sobre o crescimento celular e atividade das celulasas

Na Figura 16, observa-se a influência de diversas concentrações da farinha da casca de maracujá no meio de cultivo, contendo bagaço de cana (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹), sobre o crescimento e atividade das enzimas durante 168 horas de incubação.

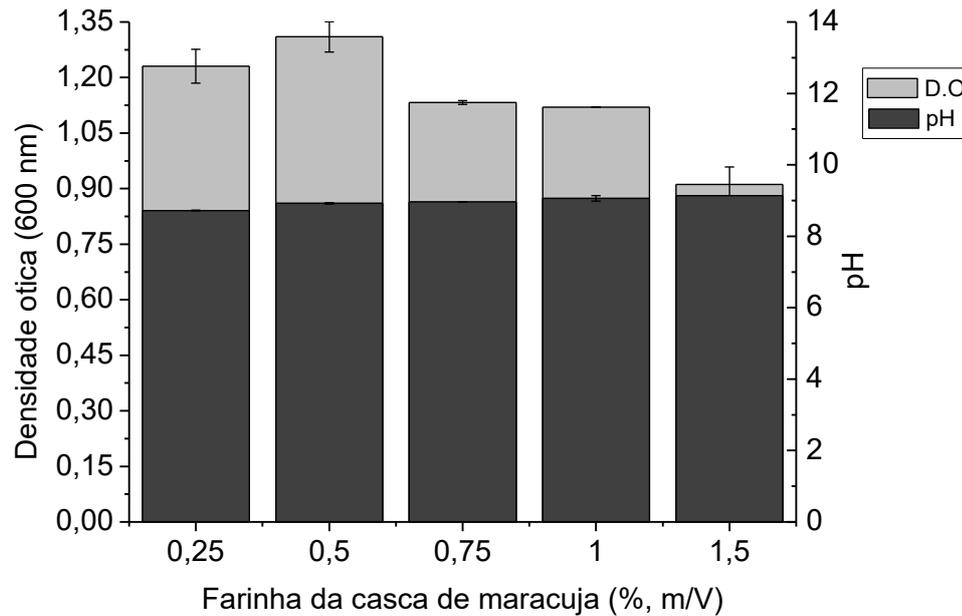


Figura 16 - Crescimento celular de *Bacillus* sp. SMIA-2 e pH dos meios de cultivo em função das concentrações da farinha da casca de maracujá, após 168 horas de incubação a 50 °C.

Foi observado que teores mais elevados da farinha da casca de maracujá ocasionaram um menor crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2. Em relação ao pH final, não foram observadas grandes alterações nos valores deste parâmetro nas diferentes concentrações testadas.

Os resultados das atividades das enzimas avicelase, CMCCase e FPase para os diferentes teores da farinha da casca de maracujá estão apresentados na Figura 17.

Foi observado que as enzimas celulolíticas apresentaram desempenhos semelhantes frente às concentrações de farinha avaliadas. O aumento no teor deste resíduo até 0,75% (m/V) contribuiu efetivamente para o aumento da produção enzimática. Nas concentrações mais elevadas foi verificado o efeito da repressão catabólica por carbono na secreção das enzimas.

As mais altas atividades de avicelase (3,78 e 4,01 U.mg ptn⁻¹), CMCCase (1,01 e 1,19 U.mg ptn⁻¹) e FPase (3,94 e 4,20 U.mg ptn⁻¹) foram obtidas com as concentrações de 0,5% e 0,75% (m/V) da farinha da casca de maracujá, respectivamente.

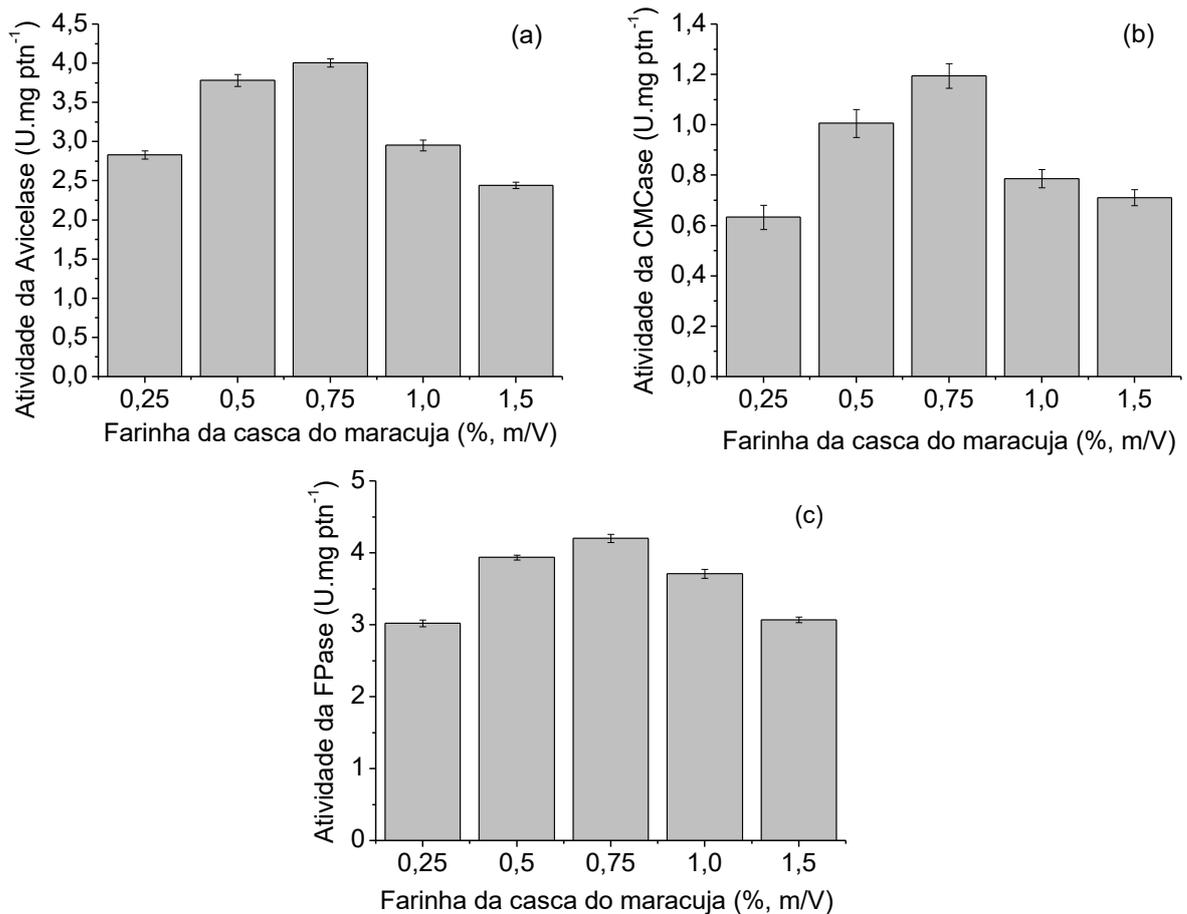


Figura 17 - Atividades da avicelase (a), CMCCase (b) e FPase (c) para diferentes concentrações de farinha da casca de maracujá.

Silva et al. (2009) observaram que a concentração da fonte de carbono apresentou efeito positivo significativo sobre a produção de celulases totais por *Aspergillus phoenicis*. Num outro estudo, para a produção de endoglucanases por *Aspergillus aculeatus* URM 4953, a maior atividade enzimática foi encontrada quando se utilizou a concentração de 1,5% (m/V) de bagaço de cana residual (SALLES et al., 2010).

A concentração da fonte de carbono é um fator muito importante, pois a produção da enzima se dá em função do substrato e a quantificação deste pode diminuir os custos para a indústria, já que será utilizada a quantidade exata, não havendo desperdício. Assim, como não foi notada diferença expressiva no presente trabalho entre os teores de 0,5% e 0,75% (m/V) do resíduo seco do maracujá, a utilização de menor quantidade desta fonte de carbono pode ser mais vantajosa do ponto de vista econômico.

5. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho, verificou-se que *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstrou boa capacidade de produzir celulasas em fermentação submersa a partir de resíduos agroindustriais de baixo custo. Uma opção viável, do ponto de vista econômico e ambiental, para a obtenção dessas enzimas.

Além disso, foi verificado que, a realização de um pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar, a adição de mais de uma fonte de carbono ao meio e o emprego do tempo ideal de fermentação e das concentrações ideais de substratos, são algumas alternativas capazes de promover um aumento da secreção das celulasas de *Bacillus* sp. SMIA-2.

Como perspectivas a novos trabalhos, sugerem-se estudos sobre as técnicas de purificação destas enzimas e suas aplicações, como por exemplo, uma análise da eficiência destas celulasas no processo de hidrólise de materiais celulósicos. Também seria interessante fazer uma avaliação técnico-econômica da produção das enzimas celulolíticas de *Bacillus* sp. SMIA-2, comparando o uso de substratos sintéticos com resíduos agroindustriais.

6. REFERÊNCIAS

- ADSUL, M.G., GHULE, J.E., SINGH, R., SHAIKH, H., BASTAWDE, K.B., GOKHALE D.V., VARMA A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2004.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim CEPPA**, v. 18, n.1, p. 57-70, 2000.
- AGUIAR FILHO, J.A.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, p.79, 2008.
- ANDRADE, MVV; DELATORRE, AB; SILVANIA ALVES LADEIRA, SA; MARTINS, MLL. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 2011.
- AYGAN, A.; KARCIOGLU, L.; ARIKAN, B. Alkaline Thermostable and halophilic andoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 789 – 796, 2011.
- BOURGAIZE, D., JEWELL, T.R., BUISER, R.G. **Biotechnology: Demystifying the Concepts**. Benjamin/Cummings, San Francisco, 2000.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, K. M. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504–510, 2007.
- BARBOSA, J. B. ; GENTIL, N.O. ; LADEIRA, S. A. ; MARTINS, M. L. L. . Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, p. 244-250, 2014.
- BARTON II, F. E. Chemistry of lignocellulose: Methods of analysis and consequences of structure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 21, n. 2-4, p. 279-286, 1988.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BINOD P.; KUTTIRAJA M.; ARCHANA M.; USHA J.K.; SINDHU R.; SUKUMARAN R.K.; PANDEY A. High temperature pré-treatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production, **Fuel**, v. 92, p. 340-345, 2012.

BON, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JR. N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-271, 2008.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291 – 1296, 2002.

CARVALHO, G.B.M., GINÓRIS, Y.P., CÂNDIDO, E.J., CANILHA, L., CARVALHO,W., ALMEIDA E SILVA, J.B. Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. **Revista Analitica**, 14:54-57, 2005.

CARVALHO, M. L. A. **Otimização da produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

CARVALHO, R.V., CORRÊA, T.L.R., SILVA, J.C.M., MANSUR, L.R.C.O., MARTINS, M.L.L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 102-107, 2008.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Levantamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2015/16**. Terceiro levantamento, dezembro/2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf. Acesso em: 03 jun. 2015.

CORRÊA, T.L.R., MOUTINHO, S.K.S., MARTINS, M.L.L., MARTINS, M.A. Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2011.

CORREIA, R.T.P.. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. 2004. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do

Rio Grande do Norte. Natal, 2004.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CUNHA, M. A. A.; SOLVA, S. S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J.C. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para a produção de xilitol a partir do bagaço de cana de açúcar. **Ciências Agrícolas**, Terezina, v. 26, p. 61-70, 2005.

DELATORRE, A. B. **Produção de celulases pelo microrganismo termofílico *Bacillus sp* SMIA-2**. 2010. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, 2010.

DKESHWANI, D. R.. Biomass to renewable energy processes. **Biomass chemistry**. New York, v.1, cap. 1, 2010.

EGÜÉS, I.; ECEIZA, A.; LABIDI, J. Effect of different hemicelluloses characteristics on film forming properties. **Industrial Crops and Products**, v. 47, n. 0, p. 331-338, 2013.

EL-SERRY, N.A, ELNABY, H.A., ABOU-ELELA, G.M., IBRAHIM, H.A.H., EL-TOUKHY, N.M.K. Optimization, economization and characterization of cellulose produced by marine *Streptomyces ruber*. **African Journal of Biotchnology**, v.9, p. 6355-6364, 2010.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p 21-26, 2010.

FASANELLA, C.C. **Ação de enzimas lignocelulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **New York: Walter de Gruyter**, 613 p., 1989.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology. **Industrial enzymology**. 2. ed. London: Macmillan Press, p. 120-138, 1996.

GONG, C.S.; TSAO, G.T.; Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Processes**, New York, v. 3, p. 111-139, 1975.

HAKI G.D. AND S.K. RAKSHIT. Developments in industrially important thermostable enzymes. Review. **Bioresource Technology**, 89: 1734, 2003.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018p., 2005.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 263 – 268, 2003.

JATINDER, K.; CHADHA., B.S.; SAINI. H. H. Optimization of medium components for production of cellulases by *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p. 15–22, 2006.

JENKINS, B. M.; BAXTER, L. L.; MILES JR, T. R.; MILES, T. R. Combustion properties of biomass. **Fuel Processing Technology**, v. 54, n. 1–3, p. 17-46, 1998.

JIANG, H.; CHEN, Q.; GE, J.; ZHANG, Y. Efficient extraction and characterization of polymeric hemicelluloses from hybrid poplar. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1005- 1012, 2014.

JOO, H., KUMAR, C.G., PARK, G., KIM, K.T., PAIK, S.R., CHANG, C. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 155-159, 2002.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

JUNG. Y. R.; PARK. J. M.; HEO. S.Y.; HONG. W. K.; LEE. S. M.; OH. B. R.; PARK. S. M.; SEO. J.W.; KIM. C. H. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v. 76, p. 66-71, 2015.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advanced**, v. 17, n. 4, p. 561-594, 1999.

KIM, J.; HUR, S.; HONG, J. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 313 – 316, 2005.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 345- 351, 2002.

KUBERAN, T.; SANGARALINGAM, S.; ARASU, S.T. Isolation and optimization of Protease producing *Bacteria* from Halophilic soil. **Journal of Biosciences Research**, Vol. 1(3):163-174, 2010.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377–391, 2008.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Pelo Termofílico *Bacillus* sp. em Fermentação Submersa: Otimização Do Meio De Cultura Usando A Técnica De Planejamento Experimental. **Química Nova** (online). Vol. 33, Nº 2, p. 324-328, 2010.

LADEIRA, A. B. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de *Bacillus* sp.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, 2013.

LADEIRA, S.A., CRUZ, E., DELATORRE, A.B., BARBOSA, J.B., MARTINS, M.L.L. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.18, p.110–115, 2015.

LEHNINGER, A. L. et al. **Bioquímica: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2006.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. **Edgard Blucher Ltda**. São Paulo: vol. 3, 2001.

LIMAYEN, A. and RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospect. **Progress in Energy and Combustion Science**, 38:449-467, 2012.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 corn cob residue. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 259-262, 2004.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. H. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 467-475, 2002.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506 – 577, 2002.

MAKKY, E.A. Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse. **World Academy Science Engineering Technology**, 57:487-491, 2009.

MARCO, E. G. **Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Porto Alegre – RS, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul – UFRGS, 2012.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JOHSSIM, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, p. 274–282, 2002.

MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. (Ed.). Enzymatic conversion of biomass for fuels production. Washington: **American Chemical Society**, p. 292–324, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry** 3: 426-428, 1959.

MING CHU, I., LEE, C., LI, T.S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 4, p. 755-761, 1992.

MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. **Modern biotechnology: connecting innovations in microbiology and biochemistry to engineering fundamentals**, 1. ed. Wiley-AIChE, 2009.

MURPHY, J.D.; MCCARTHY, K. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. **Applied Energy**, n. 82, p. 148-166, 2005.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. **Revista Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NARAIAN R., SINGH D., VERMA A. and GARG S.K. Studies on in vitro degradability of mixed crude enzyme extracts produced from *Pleurotus* spp. **Journal of Environmental Biology**, 31;945-951, 2010.

NASCIMENTO, W.C.A., CARVALHO, R.V., SILVA, C.R., MARTINS, M.L.L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27:417-421, 2007.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de α -Amilases por *Penicillium* sp. e caracterização da enzima. **Revista Eletrônica Biociências**, Biotecnologia e Saúde, v. 1, p. 43– 54, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n.1, p. 69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81-84, 2003.

PARK, Y.S., KANG, S.W., LEE, J.S., HONG, S.I., KIM, S.W. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58:761–766, 2002.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 701-720, 2014.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, 83: 346-356, 1977.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 175-188, 1998.

RAMIRES, E. C.; MEGIATTO JR, J. D.; GARDRAT, C.; CASTELLAN, A.; FROLLINI, E. Biobased composites from glyoxal-phenolic resins and sisal fibers. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1998-2006, 2010.

RASTOGI G, MUPPIDI GL, GURRAM RN, ADHIKARI A, BISCHOFF KM, HUGHES SR, APEL WA, BANG SS, DIXON DJ, SANI RK. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. **J Ind. Microbiol Biotechnology**, 36:585–598, 2009.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, S.F.M.; NÓBREGA, J.E.; PINTO, G.A.S.; MACEDO, G.R.; SILVA, F.L.H. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju para obtenção de pectinases por fermentação semi-sólida. **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Recife, 2005.

SHABEB, M.S.A., YOUNIS, M.A.M., HEZAYEN, F.F., NOUR-ELDEIN, M.A. Production of cellulase in low cost médium by *Bacillus subtilis* KO strain. **Word Applied Science Journal**, 8:35-42, 2010.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C. O.; ALSINA, L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, n. 1, p. 28-41, 2009.

SILVA, L.D.; LOPES, F.C.; SILVEIRA, S.T.; BRANDELLI, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.152, p.295-305, 2009.

SINGH, V. K.; KUMAR, A. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* vs-1. **IUBMB Life**, v. 45, p. 443 – 452, 1998.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolated, *Bacillus sphaericus* JS1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p.51 - 56, 2004.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. **International Journal of Environmental Science and Engineering**, 1:1, 2009.

SRIDEVI, A., NARASIMBA, G., REDDY, B.R. Production of cellulases by *Aspergillus Niger* on natural na pretreated lignocellulosic wastes. **The internet Journal of Microbiology**, 2009.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering – Basic Concepts. Prentice Hall Int. **Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences**. New Jersey, 1992.

SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S, MEDEIROS, A.B.P, KARP, S.G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L.P., PITARELO, A.P., FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L.M.F., FERRARA, M.A., BOM, E.P.S., MORAES, L.M.P., ARAÚJO, J.A., TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, 101:4820–4825., 2010.

SOUZA, A.N., MARTINS, M.L.L. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32, 271-275, 2001.

STRICKER, A. R., MACH, R. L. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases- encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology Biotechnology**, 78, 211 – 220, 2008.

SUN, Y. CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, p. 1-11, 2002.

SUTO, M., TOMITA, F. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol. 92, No. 4, 305- 311, 2001.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 25 (4), p. 315-330, 2004.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 4, p. 338-344, 2002.

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G.; MORGAN, T. J. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. **Fuel**, v. 94, n. 0, p. 1- 33, 2012.

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G. An overview of the composition and application of biomass ash. Part 1. Phase–mineral and chemical composition and classification. **Fuel**, v. 105, n. 0, p. 40-76, 2013.

WEI, X.; ZHENG, K.; CHEN M.; LIU, G.; LI J.; LEI, Y.; QIN, Y.; QU, Y. Transcription analysis of lignocellulolytic enzymes of *Penicillium decumbens* 114-2 and its catabolite-repression-resistant mutant. **Comptes Rendus Biologies**, p.806-811, 2011.

WAEONUKUL, R.; Kyu, K. L.; Sakka, K., RATANAKHANOKCHAI, K. Effect of Carbon Sources on the Induction of Xylanolytic-Cellulolytic Multienzyme Complexes in *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 72 (2), 321– 328, 2008.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility; Dumitriu, S., ed.; **Dekker**: New York, cap. 43. 2005.