UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

ANALYSE VILLANUEVA GAETE

PRODUÇÃO DE CELULASE POR *Bacillus smithii* QT03 UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE CARBONO

VOLTA REDONDA
2020

ANALYSE VILLANUEVA GAETE

PRODUÇÃO DE CELULASE POR *Bacillus smithii* QT03 UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE CARBONO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Sc. Carlos Eduardo de Sousa Teodoro
Co-Orientadora: Profa. Dra. Sc. Ana Paula Martinazzo

Volta Redonda, RJ
2020

Ficha catalográfica automática - SDC/BEM
Gerada com informações fornecidas pelo autor

G129p Gaete, Analyse Villanueva
Produção de celulase por Bacillus smithii QT03 utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono / Analyse Villanueva Gaete ; Carlos Eduardo de Sousa Teodoro, orientadora ; Ana Paula Martinazzo, coorientadora. Volta Redonda, 2020.
112 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2020.

DOI: http://dx.doi.org/10.22409/PGTA.2020.m.09071486117

1. Biotecnologia de microrganismos. 2. Otimização de meio de cultura. 3. Caracterização de celulase. 4. Endo-?-1,4glucanase. 5. Produção intelectual. I. Sousa Teodoro, Carlos Eduardo de, orientadora. II. Martinazzo, Ana Paula, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda. IV. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Andreia de Oliveira Paim - CRB7/5183

ANALYSE VILLANUEVA GAETE

PRODUÇÃO DE CELULASE POR *Bacillus smithii* QT03 UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE CARBONO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Aprovada em 25 de março de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sc. Carlos Eduardo de Sousa Teodoro – UFF
Orientador

LILIAN WEITZEL COELHO PAES

Profa. D. Sc. Lilian Weitzel Coelho Paes - UFF

Profa. D. Sc. Aline Chaves Intorne - IFRJ

Volta Redonda

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Virgem por sobre todas as coisas.

Aos meus pais e irmãos pela companhia e amor de sempre, mesmo estando longe.

Ao professor Carlos Eduardo pela confiança, ensinamentos e paciência. Por ter me aceitado para trabalhar e me orientar com muita dedicação durante todo o período do mestrado, só tenho a agradecer por tudo o que meu ensinou.

Às alunas de iniciação cientifica que me ajudaram na realização dos trabalhos no laboratório, Amanda, Thaíza e Ariany, por terem se mostrado solícitas em todo momento e com muito compromisso acompanhar os trabalhos.

Aos companheiros do laboratório de Biotecnologia que fizeram as horas de intenso trabalho muito mais amenas.

À professora Ana Paula Martinazzo, pela co-orientação e ajuda nas estatísticas.

Aos professores da Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental que contribuíram na minha formação, meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora, professoras Lilian e Aline, por aceitarem o convite para participar da defesa por videoconferência, devido a pandemia de Covid-19, e pelas valiosas contribuições para este trabalho.

À banca de qualificação, professores Adriano e Gilton, pelas recomendações.

Aos funcionários de limpeza, manutenção e aos guardas que possibilitaram o trabalho até nos finais de semana e feriados.

À Universidade Federal Fluminense por disponibilizar espaços de aprendizagem, laboratórios, equipamentos e insumos de trabalho para permitir aos alunos desenvolverem pesquisas de qualidade.

À Organização dos Estados Americanos e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (OEA – GCUB) pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período de realização desse mestrado.

Aos amigos maravilhosos que fizeram parte da minha caminhada no Brasil, que me fizeram sentir em casa e que viraram família, obrigada de coração.

RESUMO

Hoje em dia são estudadas tecnologias de utilização de resíduos agroindustriais no desenvolvimento de bioprocessos, por exemplo para produção de biocombustíveis, energia, plásticos e insumos nas indústrias de alimentos e bebidas. Um mercado de importância são as enzimas comerciais, produzidas por microrganismos que utilizam resíduos agroindustriais como nutrientes. A celulase é a terceira enzima mais utilizada em vários processos, detrás das proteases e amilases, cuja demanda está aumentando nas indústrias de detergentes, têxteis, de processamento de papel, de ração animal, de suco de frutas, alimentos e bebidas e biocombustíveis. As celulases são enzimas induzíveis sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias durante seu crescimento em materiais celulósicos. O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de cultivo da bactéria *Bacillus smithii* QT03, uma bactéria pouco estudada, porém com características interessantes para aplicações biotecnológicas, para induzir a produção da enzima celulase (endo – β – 1,4 glucanase) e a caracterização parcial de celulase por ela produzida. Primeiramente foram avaliados parâmetros nutricionais (resíduos agroindústrias como fonte de carbono, fontes de nitrogênio e concentração das fontes nutricionais no meio de cultura), e processos físicos (tempo de incubação, volume de inóculo, temperatura, pH e velocidade de agitação). Para a caracterização da enzima foram avaliados os efeitos do pH, temperatura e tempo de incubação, e as estabilidades térmica e de pH da celulase. A produção de celulase na presença de bagaço de malte como fonte de carbono na concentração de 2% foi superior aos demais resíduos agroindustriais estudados. O extrato de carne como fonte de nitrogênio na concentração de 1,5% foi considerado como o ideal para a produção de celulase. No que se refere às condições físicas, verificou-se o tempo de 48 h como o melhor para a incubação do microrganismo *B. smithii* QT03 na temperatura de 35°C e 200 rpm de agitação. O volume de inóculo ótimo foi de 2% da bactéria no meio de cultura. A celulase produzida por *B. smithii* QT03 alcançou a máxima atividade enzimática em 30 minutos com pH 7 de incubação do meio reacional e conservou o 70% de atividade por 24 h quando a celulase foi incubada em pH 6. Observou-se também a característica termofílica da enzima por ter alcançado a atividade máxima a 70°C no meio reacional e termoestável por conservar o 100% de atividade quando incubada a 55°C por 3 h e 58% de atividade a 60°C por 24 h. Segundo os resultados obtidos neste trabalho, a celulase produzida por *B. smithii* QT03 utilizando bagaço de malte como fonte de carbono apresenta características interessantes para continuar com a caracterização total e purificação de celulase para possíveis aplicações nas indústrias. Este é o primeiro trabalho que evidencia a produção de celulase pela bactéria *B. smithii* QT03, destacando seu potencial biotecnológico.

Palavras-chaves: Biotecnologia de microrganismos, otimização de meio de cultura, caracterização de celulase, endo-β-1,4 glucanase, microrganismos, bactérias, fontes de carbono, bagaço de malte.

ABSTRACT

Nowadays, technologies for the use of agro-industrial residues in the development of bioprocesses are being studied, for example for the production of biofuels, energy, plastics and inputs in the food and beverage industries. A market of importance is commercial enzymes, produced by microorganisms that use agro-industrial residues as nutrients. Cellulase is the third most used enzyme in several processes, behind proteases and amylases, whose demand is increasing in the detergents, textiles, paper processing, animal feed, fruit juice, food and beverage and biofuel industries. Cellulases are inducible enzymes synthesized by a wide variety of microorganisms, including fungi and bacteria during their growth in cellulosic materials. The objective of this work was to optimize the culture conditions of the bacterium *Bacillus smithii* QT03, a bacterium little studied but with interesting characteristics for biotechnological applications, to improve the production of the cellulase enzyme (endo - β - 1,4 glucanase) and the partial characterization of cellulase produced by it. Firstly, nutritional parameters were evaluated (agro-industrial waste as a carbon source, nitrogen sources and concentration of nutritional sources in the culture medium), and physical processes (incubation time, inoculum volume, temperature, pH and agitation speed). For the characterization of the enzyme, the effects of pH, temperature and incubation time and concentration of the enzyme and substrate on cellulase activity and thermal and pH stability of cellulase were evaluated. The production of cellulase in the presence of malt bagasse as a carbon source at a concentration of 2% was higher than the other agro-industrial residues studied. Meat extract as a source of nitrogen at a concentration of 1.5% was considered ideal for the production of cellulase. With regard to physical conditions, the 48 h time was found to be the best time for the incubation of the microorganism *B. smithii* QT03 at a temperature of 35°C and 200 rpm of agitation. The optimal inoculum volume was 2% of the bacteria in the culture medium. The cellulase produced by *B. smithii* QT03 reached maximum enzymatic activity in 30 minutes with pH 7 of incubation of the reaction medium and conserved 70% of activity for 24 h when the cellulase was incubated at pH 6. The thermophilic characteristic was also observed of the enzyme for having reached maximum activity at 70°C in the reaction medium and thermostable for conserving 100% activity when incubated at 55°C for 3 h and 58% activity at 60°C for 24 h. According to the results obtained in this work, the cellulase produced by *B. smithii* QT03 using malt bagasse as a carbon source presents interesting characteristics to continue with the total characterization and purification of cellulase for possible applications in the industries. This is the first study that shows the production of cellulase by the bacterium *B. smithii* QT03, highlighting its biotechnological potential.

Keywords: Biotechnology of microorganisms, optimization of culture medium, cellulase characterization, endo-β-1,4glucanase, microorganisms, bacteria, carbon sources, malt bagasse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Potencial de valorização de resíduos agroindustriais de origem vegetal e animal, p. 24

Figura 2. Estrutura da celulose, p. 26

Figura 3. Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose, p. 27

Figura 4. Estrutura dos principais açúcares que compõem a hemiceluloses, p. 28

Figura 5. Estrutura da lignina (polímero reticulado complexo de anéis aromáticos), p. 29

Figura 6. Produtos potenciais obtidos na biorrefinaria de materiais lignocelulósicos, p. 33

Figura 7. Estrutura da celulase, p. 36

Figura 8. Potencial celulolítico das cepas bacterianas: A. *B. amyloliquefaciens* VR002, B. *Geobacillus caldoxylociliticus* VR07, C. *B. smithii* QT03 D. *B. pumilus* VR001, incubadas em meio ágar LB contendo CMC 1% durante 48 h, 35°C submetidas ao teste Vermelho Congo, p. 57

Figura 9. Produção da enzima celulase por *B. smithii* QT03 crescido em diferentes intervalos de tempo, em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono (1,0%), a saber: bagaço de cana, bagaço de malte, casca de amendoim, casca de coco, aparas de papel e CMC. O microrganismo foi crescido em meio de cultura nas condições de 35 °C e 150 rpm de agitação. Tempos de incubação da bactéria: 24, 48, 72, 96 e 120 h, p. 59

Figura 10. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivada em meio de cultura contendo bagaço de malte como fonte de carbono em diferentes concentrações. Microrganismo crescido na temperatura de 35° C e 150 rpm de agitação por 48 h. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%, p. 62

Figura 11. Atividade da enzima celulase produzida por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono em diferentes temperaturas de cultivo. Microrganismo crescido por 48 h e 150 rpm de agitação. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%, p. 63

Figura 12. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono, em diferentes valores de pH. O microrganismo foi crescido por 48 h, a 35 °C e 150 rpm de agitação. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%, p. 65

Figura 13. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono, pH inicial do meio 7, inoculado com diferentes concentrações de inóculo. O microrganismo foi crescido por 48 h, a 35°C, 150 rpm. As barras representam o desvio padrão, p. 67

Figura 14. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 0,7% de diferentes fontes de nitrogênio. Microrganismo crescido por 48 h, a 35°C, 150 rpm em meio de cultura com pH inicial 7. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%, p. 69

Figura 15. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne e 2% de bagaço de malte como fonte de carbono. O microrganismo foi crescido por 48 h a 35°C, 150 rpm e pH inicial do meio de cultura 7. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%, p. 71

Figura 16. Produção de celulase de *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio em diferentes velocidades de agitação. Microrganismos crescido nas condições de 35°C por 48 h de crescimento. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%, p. 73

Figura 17. Atividade de celulase produzida por *B. smithii* QT03 em diferentes valores de pH. Microrganismo crescido no meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio, pH do meio de 7 a 35° C, 200 rpm por 48 h, p. 86

Figura 18. Efeito da temperatura sobre a atividade de celulase produzida por *B. smithii* QT03. O microrganismo foi crescido em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio, e pH inicial 7 a 35° C, 200 por 48 h, p. 89

Figura 19. Efeito do tempo de incubação do EBE na atividade de celulase. O microrganismo foi crescido em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio, e pH inicial 7 a 35° C, 200 por 48 h, p. 91

Figura 20. Estabilidade térmica de celulase produzida por *B. smithii* QT03. Microrganismo crescido no meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5 de extrato de carne como fonte de nitrogênio; pH inicial do meio de 7 a 35°C, 200 rpm por 48 h, p. 93

Figura 21. Estabilidade da enzima celulase de *B. smithii* QT03 a diferentes valores de pH. Microrganismo crescido no meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, pH do meio de 7, a 35° C, 200 rpm por 48 h, p. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de biomassa lignocelulósica e sua composição química, p. 25

Tabela 2. Principais enzimas industriais e suas aplicações comerciais, p. 35

Tabela 3. Aplicações de celulase em indústrias, p. 39

Tabela 4. Microrganismos produtores de celulase, p. 41

Tabela 5. Produção de celulase por diversos microrganismos utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono, p. 42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
B.	Bacillus
BG	β-glicosidases
CBH	Celobio-hidrolase
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EBE	Extrato Bruto Enzimático
EnG	Endoglucanases
ExG	Exoglucanases
GH	Glucano-hidrolase
GP	Grau de Polimerização
h	Hora
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
min	Minuto
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
rpm	Rotação por minuto
U	Unidade internacional de atividade enzimática
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 15

2 OBJETIVOS, p. 18

2.1 OBJETIVO GERAL, p. 18

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 18

CAPITULO I: UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE CELULASE: UMA REVISÃO DE LITERATURA, p. 19

1 INTRODUÇÃO, p. 21

2 REVISÃO BIBLIOGÁFICA, p. 23

2.1 VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, p. 23

2.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS, p. 24

2.2.1 Celulose, p. 26

2.2.2 Hemicelulose, p. 28

2.2.3 Lignina, p. 29

2.3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, p. 30

2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS, p. 34

2.5 ENZIMAS CELULASES, p.36

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 43

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 44

CAPITULO 2: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Bacillus smithii* QT03 PARA PRODUÇÃO DE CELULASE UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE COMO FONTE DE CARBONO, p. 49

1 INTRODUÇÃO, p. 51

2 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 53

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 57

3.1 SELEÇÃO DO MICRORGANISMO CELULOLÍTICO, p. 57

3.2 DETERMINAÇÃO DO MELHOR RESÍDUO AGROINDUSTRIAL COMO FONTE DE CARBONO E TEMPO DE INCUBAÇÃO ÓTIMO PARA PRODUÇÃO DA CELULASE, p. 59

3.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE CELULASE, p. 62

3.4 EFEITO DA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO NA PRODUÇÃO DE CELULASE, p. 63

3.5 EFEITO DO pH INICIAL DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE CELULASE, p. 65

3.6 TAMANHO DO INÓCULO, p. 67

3.7 EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE CELULASE, p. 69

3.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE CELULASE, p. 71

3.9 DETERMINAÇÃO DA MELHOR VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE CELULASE, p. 73

4 CONCLUSÃO, p. 75

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 76

CAPITULO 3: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA CELULASE PRODUZIDA POR *Bacillus smithii* QT03 CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE COMO FONTE DE CARBONO, p. 78

1 INTRODUÇÃO, p. 80

2 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 83

2.1 MICRORGANISMO E ENSAIOS ANALÍTICOS, p. 83

2.1.1 Ensaios da atividade enzimática, p. 83

2.1.2 Efeito do pH sobre a atividade de celulase, p. 84

2.1.3 Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade de celulase, p. 84

2.1.4 Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da celulase, p. 84

2.1.5 Estabilidade térmica da celulase produzida por *B. smithii* QT03, p. 84

2.1.6 Estabilidade da celulase produzida por *B. smithii* QT03 a diferentes valores de pH, p. 84

2.1.7 Análise estatística, p. 85

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 86

3.1 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DE CELULASE PRODUZIDA POR *B. Smithii* QT03, p. 86

3.2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DE CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03, p. 89

3.3 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA MISTURA REACIONAL SOBRE A ATIVIDADE DE CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03, p. 91

3.4 ESTABILIDADE TÉRMICA DA CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03, p.93

3.5 ESTABILIDADE DA CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03 A DIFERENTES VALORES DE pH, p. 96

4 CONCLUSÃO, p. 98

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 99

6 CONCLUSÃO FINAL, p. 101

7 REFERENCIAS BIBLIOGÁFICA GERAL, p. 102

ANEXOS, p. 109

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente população humana, o mundo está enfrentando uma enorme pressão para satisfazer as necessidades de alimentos, rações, produtos químicos e energia, bem como para equilibrar a oferta e demanda de acordo com as salvaguardas ambientais (BISWAS et al., 2014). Segundo o Painel Internacional sobre Recursos (IRP, 2019), desde a década de 1970, a população dobrou e o Produto Interno Bruto (PIB) global cresceu quatro vezes. Essas tendências exigiram grandes quantidades de recursos naturais para impulsionar o desenvolvimento econômico e as consequentes melhorias no bem-estar humano que isso trouxe ao mundo. No entanto, atualmente a extração e uso de recursos naturais aumenta mais do que o crescimento populacional. Até 2060, o uso global de materiais poderia dobrar e chegar a 190 bilhões de toneladas (na comparação com os atuais 92 bilhões de toneladas), enquanto as emissões de gases do efeito estufa poderiam aumentar em 43% (IRP, 2019).

A extração e o processamento de materiais, combustíveis e alimentos contribuem com a metade do total global de emissões de gases do efeito estufa e com mais de 90% da perda de biodiversidade e estresse hídrico. O desenvolvimento sustentável está entre as questões mais importantes da pesquisa global e da agenda política atual, a implementação da chamada bioeconomia promove o uso de recursos biológicos renováveis para produzir alimentos, materiais e energia, equilibrando, por exemplo, a produção de resíduos e/ou a emissão de gases de efeito estufa (IRP, 2019; MORENO et al., 2020).

O uso de resíduos derivados de alimentos têm atenção especial uma vez que a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2011), estimou a produção de cerca de 1,3 bilhões de toneladas em todo o mundo. O desperdício de alimentos pode ser de origem animal e vegetal e pode ser convertido em uma ampla gama de produtos, como antioxidantes, fibras alimentares, óleos essenciais, carotenoides, óleos ricos em ácidos graxos ômega-3 ou polímeros para aplicações biomédicas (MORENO et al., 2020).

Os materiais lignocelulósicos são a matéria prima mais promissora como recurso natural e renovável, uma quantidade considerável destes materiais está sendo gerada através de práticas agrícolas, principalmente de agroindústrias. Os materiais lignocelulósicos são compostos por três unidades principais, celulose, hemicelulose e lignina. Normalmente a maior parte da biomassa lignocelulósica agrícola é composta por cerca de 10 – 25% de lignina, 20 – 30% de hemicelulose e 40 – 50% de celulose. Enzimas hidrolíticas como celulases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β-1,4 presentes na celulose e

convertem as lignoceluloses em açúcares que podem ser fermentados por vários microrganismos em biocombustíveis e outros produtos de valor agregado. Além dos açucares gerados na degradação de lignocelulose, as enzimas produzidas durante o processo são também utilizadas em diversas industrias relacionadas a laticínios, cervejas, vinhos, detergentes, etc. (BISWAS et al., 2014; ANWAR et al., 2015; KAPOOR et al., 2016).

No entanto, o custo relativamente alto dessas enzimas continua a ser uma grande barreira à sua aplicação comercial nas indústrias, embora se tenha uma redução significativa no custo de produção nos últimos anos (MERINO E CHERRY, 2007). Tais custos dependem da escolha de microrganismos mais eficientes, de meios de cultivos mais baratos e/ou de processos fermentativos mais adequados que possibilitem aumentar a produtividade e o rendimento, viabilizando a produção (PENHA et al., 2016).

Estima-se que 40% do custo envolvido na produção de celulases estejam relacionados a composição do meio para cultivo dos microrganismos (CASTRO E PEREIRA, 2010). Vários estudos (BOECHAT, 2010; MRUDULA, 2011; SADHU et al., 2013; MENG et al. 2014; THOMAS et al., 2016) têm proposto a utilização de resíduos agroindustriais como fibra de coco, bagaço de cana de açucar, resíduos de papel, palha de arroz, palha de milho, farelo de trigo e outros resíduos agroindustriais como substratos indutores para a produção de enzimas, entre elas a celulase, como uma alternativa econômica e ecologicamente viável para a destinação desses resíduos e produção de enzimas em larga escala.

As celulases derivadas de fontes microbianas mostram diferenças significativas em sua estabilidade, no potencial catalítico e, consequentemente, na taxa de quebra de celulose. Portanto, a pesquisa mundial também tem sido focada no isolamento e exploração de novas espécies microbianas para a extração de enzimas celulolíticas com potencial catalítico desejável (HARSHVARDHAN et al., 2013).

Existem vários estudos com cepas de *Bacillus* sp. capazes de produzir celulases utilizando subprodutos da agroindústria, *B. subtilis, B. cereus, B. Vallismortis, B. halodurans, B. licheniformis, B. sonorensis* são alguns exemplos (GAUR et al., 2015; IRFAN et al., 2017; KAZEEM et al., 2017; AZADIAM et al., 2017 TABSSUM et al., 2018; ANNAMALAI et al., 2019). *B. smithii* é uma bactéria termofílica facultativamente anaeróbica, capaz de usar uma variedade de açúcares que podem ser derivados de matérias primas lignocelulósicas. A acessibilidade genética, uma ampla faixa de temperatura e pH e a capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono em um meio relativamente mínimo tornam esta bactéria

interessante para aplicações biotecnológicas (BOSMA et al., 2016). O uso desta bactéria para produção de enzimas só foi estudado por Gao et al., (2009), onde foi produzida a enzima endoinulinase, porém não existe evidencia na literatura sobre a produção de celulase por *B. smithii.*

A produção de celulase é induzida em bactérias de acordo com a composição nutricional do meio de cultura e de parâmetros físicos, como tempo de incubação, temperatura, pH e velocidade de agitação. Logo, a otimização das condições de fermentação pode melhorar consideravelmente a produção de celulase em bactérias e desempenha papel importante no desenvolvimento de bioprocessos industriais para produção de enzimas (PREMALATHA et al., 2015).

Portanto, o enfoque principal desta pesquisa foi avaliar as condições ideais de cultivo da bactéria *B. smithii* QT03 para a produção de celulase (endo-β-1,4 glucanase) e realizar a caracterização dessa enzima produzida pelo microrganismo, testando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

Neste sentido, a dissertação foi dividida em três capítulos. No Capítulo 1 será apresentado o estado da arte sobre o emprego de resíduos agroindustriais para produção de celulase; no Capítulo 2 serão apresentadas as condições de cultivo otimizadas de *B. smithii* QT03 para produção de celulase, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono; e no Capítulo 3 será apresentada a caracterização de celulase produzida por *B. smithii* QT03 utilizando bagaço de malte como fonte de carbono. Este é o primeiro estudo desse tipo com a bactéria *B. smithii* QT03.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de cultivo da bactéria *B. smithii* QT03 para melhorar a produção de celulase (endo-β-1,4glucanase) e a caracterização parcial dessa enzima produzida pelo microrganismo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar *Bacillus smithii* QT03 por fermentação submersa em diferentes resíduos agroindustriais, tais como: bagaço de cana, bagaço de malte, casca de coco, casca de amendoim e aparas papel para identificar a melhor fonte de carbono
- Avaliar o melhor tempo de incubação do microrganismo para produção de celulase;
- Avaliar a melhor fonte de nitrogênio para produção de celulase;
- Otimizar a produção de celulase identificando as melhores concentrações da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio;
- Otimizar a produção de celulase estudando a temperatura e agitação ideais de incubação do microrganismo para produção de celulase;
- Identificar o pH inicial ideal do meio de cultura para produção da enzima;
- Determinar o efeito do pH da mistura reacional (Extrato Bruto Enzimático + substrato) sobre a atividade da enzima celulase;
- Avaliar o efeito da temperatura de incubação do meio reacional sobre a atividade da enzima celulase;
- Determinar o melhor tempo de incubação da mistura reacional para maximizar a atividade enzimática;
- Avaliar a estabilidade térmica da celulase produzida;
- Avaliar a estabilidade ao pH da celulase produzida.

CAPITULO I: UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE CELULASE: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Analyse Villanueva Gaete[1], Carlos Eduardo de Souza Teodoro[2], Ana Paula Martinazzo[3]

RESUMO

Atualmente, as agroindústrias têm investido cada vez mais na capacidade de processamento, gerando quantidades enormes de subprodutos. Uma parte delas são aproveitadas, porém, em muitos casos, os subprodutos são considerados como custo operacional e são descartados, atuando como fonte de contaminação ambiental. Hoje em dia são estudadas tecnologias de utilização de resíduos agroindustriais no desenvolvimento de bioprocessos, por exemplo para produção de biocombustíveis, energia, plásticos e insumos nas indústrias de alimentos e bebidas. Um mercado de importância são as enzimas comerciais, produzidas por microrganismos que utilizam resíduos agroindustriais como nutrientes, que provaram ser uma opção viável quando comparadas as suas contrapartes químicas em diversos processos industriais. A celulase é a terceira enzima mais utilizada em vários processos, detrás das proteases e amilases, cuja demanda está aumentando em aplicações industriais, como nas indústrias de detergentes, têxteis, de processamento de papel, de ração animal, de suco de frutas, alimentos e bebidas e biocombustíveis. As celulases são enzimas induzíveis sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias durante seu crescimento em materiais celulósicos. Esses microrganismos podem ser aeróbios, anaeróbicos, mesófilicos, termofílicos ou psicrófilos. A definição da composição do meio de crescimento dos microrganismos pode afetar significativamente no rendimento e na produtividade das enzimas e é de importância central no desenvolvimento de bioprocessos industriais. O uso de resíduos agroindustriais é uma estratégia interessante para a redução dos custos associados à formulação do meio de cultura, como uma alternativa econômica e ecologicamente viável para a destinação desses recursos e produção de enzimas em larga escala. Bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo, farelo de trigo, palha de milho, fibra de coco, casca de arroz, casca de laranja e fibra de coco são só alguns resíduos agroindustriais estudados e utilizados para produção de celulase por diversos microrganismos. Neste capítulo será abordado o estado da arte sobre o emprego de resíduos agroindustriais para produção de celulase.

Palavras chaves: Biotecnologia agrícola, agroindústria, Biorrefinarias, lignocelulose, enzimas, microrganismos

---

[1] Aluna da Pós graduação em Tecnologia Ambiental – Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda

[2] Professor do programa de Pós graduação em Tecnologia Ambiental – Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda

[3] Professora do programa de Pós graduação em Tecnologia Ambiental – Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda

ABSTACT

Currently, agro-industries have increasingly invested in processing capacity, generating huge amounts of by-products, part of which is reused. However, in many cases, by-products are considered an operating cost and are discarded, acting as a source of environmental contamination. Nowadays, technologies for the use of agro-industrial residues in the development of bioprocesses are being studied, for example for the production of biofuels, energy, plastics and inputs in the food and beverage industries. A market of importance is commercial enzymes, produced by microorganisms that use agro-industrial residues as nutrients, which have proved to be a viable option when compared to their chemical counterparts in several industrial processes. Cellulase is the third most used enzyme in several processes, behind proteases and amylases, whose demand is increasing in industrial applications, such as in the detergents, textiles, paper processing, animal feed, fruit juice, food and drinks and biofuels. Cellulases are inducible enzymes synthesized by a wide variety of microorganisms, including fungi and bacteria during their growth in cellulosic materials. These microorganisms can be aerobic, anaerobic, mesophilic, thermophilic or psychrophilic. The definition of the composition of the growth medium of microorganisms can significantly affect the yield and productivity of enzymes and is of central importance in the development of industrial bioprocesses. The use of agro-industrial waste is an interesting strategy for reducing the costs associated with the formulation of the culture medium, as an economical and ecologically viable alternative for the destination of these resources and the production of enzymes on a large scale. Sugarcane bagasse, rice straw, wheat straw, wheat bran, corn straw, coconut fiber, rice husk, orange peel and coconut fiber are just a few agro-industrial residues studied and used for the production of cellulase by various microorganisms. In this chapter, the state of the art on the use of agro-industrial residues for the production of cellulase will be addressed.

Keywords: Agricultural biotechnology, agribusiness, biorefineries, lignocellulose, enzymes, microorganisms

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as agroindústrias têm investido cada vez mais na capacidade de processamento, gerando quantidades enormes de subprodutos, sendo parte reaproveitada como ração animal. Todavia, em muitos casos, os subprodutos são considerados custo operacional para as empresas, sendo descartado e atuando como fonte de contaminação ambiental. Esse desperdício tem como resultado perdas irrecuperáveis na economia, diminuindo a disponibilidade de recursos e fonte de renda para a população (NASCIMENTO e FRANCO, 2015).

Alguns resíduos das produções já possuem aplicabilidade na agricultura, minimizando os impactos da geração destes. Parte do resíduo, por exemplo, é usado para cobrir e proteger o solo, mantendo matéria orgânica e os nutrientes no campo. Entretanto, uma outra parte ainda não é utilizada e pode ser avaliado seu aproveitamento em bioprocessos (SILVA et al., 2018).

A Associação Brasileira das Indústrias de Biomassa e Energia Renovável (ABIB, 2016) estima que em 2015 tenham sidos gerados 202,18 milhões de toneladas de resíduos da agricultura, da pecuária, da silvicultura, das indústrias de beneficiamento de alimentos e bebidas, das indústrias de papel – celulose e do setor madeireiro – moveleiro, ou seja, enormes quantidades de subprodutos para serem aproveitadas. Além disso, Pedroso et al. (2018), destacam que a cadeia produtiva da biomassa e sua transformação, apresenta alta demanda de recursos humanos, por isso, do ponto de vista social, tem grande potencial de geração de empregos e renda, fortalecendo a cadeia produtiva da economia rural.

Hoje em dia são estudadas tecnologias de utilização de resíduos agroindustriais como a biomassa lignocelulósica no desenvolvimento de bioprocessos. Por exemplo, as preocupações ambientais sobre a utilização de combustíveis fósseis e seu esgotamento levaram ao desenvolvimento de fontes alternativas e renováveis de energia. A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para gerar bioetanol por via enzimática a ser utilizada como combustível, ademais as enzimas são usadas em processos industriais, como panificação, fabricação de cervejas, detergentes, produtos fermentados, têxteis, farmacêuticos, processamento de couro, entre outras atividades. Portanto, essas iniciativas aumentaram a demanda de enzimas em várias aplicações industriais. (SINGH et al., 2016; PATEL et al., 2019).

Os custos relativamente altos da produção de enzimas são barreiras à sua aplicação comercial em indústrias. Esses custos dependem da escolha de microrganismos eficientes, de meios de cultivos baratos e/ou de processos fermentativos adequados que possibilitem aumentar a produtividade (MERINO e CHERRY 2007; PENHA et al., 2016). Os resíduos agroindustriais podem ser ricos em carboidratos, proteínas ou lipídios e podem estar disponíveis nas formas sólida ou líquida. Qualquer resíduo agrícola, se usado como um componente importante do meio de fermentação, pode reduzir o custo total de produção, diminuindo o custo da matéria-prima usada no processo de fermentação. Os custos para um bioprocesso típico variam de 10% a 50% do custo total de produção e, portanto, o uso de resíduos agroindustriais seria benéfico. (GOPALAN e NAMPOOTHIRI, 2016)

Vários estudos, como os de BOECHAT (2010), MRUDULA (2011), TRIVEDI et al., (2011) SADHU et al., (2013), SHAIKH et al., (2013), HARSHVADHAN et al., (2013), MENG et al., (2014), LADEIRA et al., (2014), THOMAS et al., (2016), AZADIAN et al., (2017), têm proposto a utilização de resíduos agroindustriais como fibra de coco, bagaço de cana, resíduos de papel, palha de arroz, palha de milho, farelo de trigo e outros resíduos lignocelulósicos como substratos indutores para a produção de enzimas, entre elas a celulase, como uma alternativa econômica e ecologicamente viável para a destinação desses recursos e produção de enzimas em larga escala. Neste sentido, no capítulo atual será abordado o estado da arte sobre o emprego de resíduos agroindustriais para produção de celulase.

2 REVISÃO BIBLIOGÁFICA

2.1 VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.

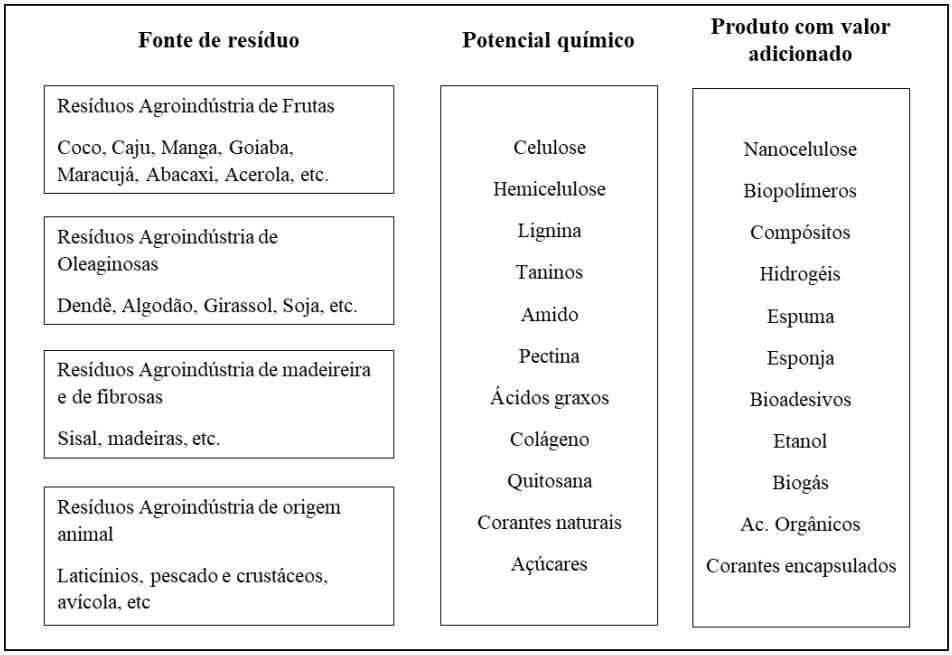
A AIBIB (2016) define como biomassa de resíduos agrícolas aquela constituída por todo material que é deixado no campo no processo de colheita das culturas, sendo formada por palhas, caules e folhas em geral. Existem também os resíduos agroindustriais, que são resultantes do processo de beneficiamento de algumas culturas, tendo-se como exemplos a casca de arroz e o caroço do algodão.

Considerando a superexplotação dos recursos naturais, uma atenção especial tem sido voltada à minimização ou reuso de resíduos e ao estabelecimento de novos usos de produtos e subprodutos agropecuários em substituição aos recursos não renováveis. Em razão disso, a química verde, química limpa, química ambientalmente benigna, ou química autossustentável já é realidade, especialmente em países com indústria química desenvolvida e que apresentam controle rigoroso na emissão de poluentes. Um bom exemplo é a adoção crescente do conceito de biorrefinaria, cuja lógica é análoga às refinarias de petróleo e integra processos visando à valorização total da matéria prima (LEISTRITZ et al., 2007).

De forma geral, os resíduos da agroindústria de processamento de produtos de origem vegetal (frutas, oleaginosas, fibrosas, madeireiras, etc.) e origem animal (laticínios, avicultura de corte, aquicultura, etc.) apresentam em suas composições diferentes constituintes, que abrem oportunidades de agregação de valor pela aplicação do conceito de biorrefinaria (ROSA et al., 2011). A Figura 1 apresenta de forma simplificada a visão conceitual e o potencial de valorização dos resíduos agroindustriais.

De acordo com Nascimento e Franco (2015), a indústria brasileira de alimentos é responsável por 15% do faturamento do setor industrial no país. Um dos principais entraves ocasionados pelo crescimento desse setor está associado à produção de resíduos. A quantidade de resíduos gerados pelas agroindústrias no Brasil acumula um enorme potencial, podendo ter uma finalidade benéfica ao homem e ao ambiente.

Figura 1. Potencial de valorização de resíduos agroindustriais de origem vegetal e animal



Fonte: adaptado de ROSA et al., 2011.

2.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A biomassa lignocelulósica é considerada uma alternativa sustentável e renovável quando comparada aos recursos fósseis. A pesquisa sobre o desenvolvimento de novos meios de aproveitamento de biomassa lignocelulósica para produção de combustíveis, energia e materiais aumentou na última década, à medida que ficou claro que o desenvolvimento de tecnologias deve estar centrado na mitigação das mudanças climáticas. Somado a isso, os materiais lignocelulósicos não são comestíveis e, portanto, não competem com as culturas alimentares e podem ser colhidas de várias fontes, como lixo municipal, resíduos agrícolas e resíduos de madeira e floresta (TU e HALLET, 2019).

O material lignocelulósico é composto principalmente por três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, juntamente com pequenas quantidades de outros componentes, como grupos acetil, minerais e compostos fenólicos. Dependendo do tipo de biomassa lignocelulósica, esses polímeros são organizados em estruturas tridimensionais não uniformes complexas, em diferentes graus e composição relativa variável (ISIKGOR e BECER, 2016).

A celulose é o maior componente estrutural das paredes celulares vegetais,

responsável pela resistência mecânica dos tecidos das plantas. As macromoléculas de hemicelulose, também encontradas na parede celular são formadas frequentemente por polímeros repetidos de pentoses e hexoses. A lignina, por sua vez, contém três álcoois aromáticos (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico) produzidos através de um processo biossintético e forma um selo protetor em torno dos outros dois componentes da parede celular vegetal, celulose e hemiceluloses (ANWAR et al., 2015).

As três macromoléculas celulose, hemicelulose e lignina não são distribuídas uniformemente dentro das paredes celulares. A estrutura e a quantidade desses componentes na planta variam de acordo com espécie, tecido e maturidade da parede celular. Por tanto, a composição do resíduo de lignocelulose depende muito da sua fonte, seja ela derivada de madeira, gramíneas, etc. Geralmente, a biomassa lignocelulósica consiste em 25 a 50% de celulose, 15 a 35% de hemicelulose e 5 a 30% de lignina (Tabela 1) (CASTRO e PEREIRA, 2010; ANWAR et al., 2015; ISIKGOR e BECER, 2016).

Tabela 1. Tipos de biomassa lignocelulósica e sua composição química.

Biomassa lignocelulósica		**Celulose (%)**	**Hemicelulose (%)**	**Lignina (%)**
Madeira	Álamo	50,8 – 53,3	26,2 – 28,7	15,5 – 16,3
	Carvalho	40,4	35,9	24,1
	Eucalipto	54,1	18,4	21,5
	Pinho	42,0 – 50,0	24,0 – 27,0	20,0
Resíduos agrícolas	Palha de trigo	35,0 – 39	23,0 – 30	12,0 – 16,0
	Palha de cevada	36,0 – 43,0	24,0 – 33,0	6,3 – 9,8
	Palha de arroz	29,2 – 34,7	23,0 – 25,9	17,0 – 19,0
	Palha de aveia	31,0 – 35,0	20,0 – 26,0	10,0 – 15,0
	Espigas de milho	33,7 – 41,2	31,9 – 36,0	6,1 – 15,9
	Bagaço de cana de açúcar	25,0 – 45,0	28,0 – 32,0	15,0 – 25,0
	Palha de sorgo	32,0 – 35,0	24,0 – 27,0	15,0 – 21,0
Gramíneas	Gramíneas	25,0 – 40,0	25,0 – 50	10,0 – 30,0

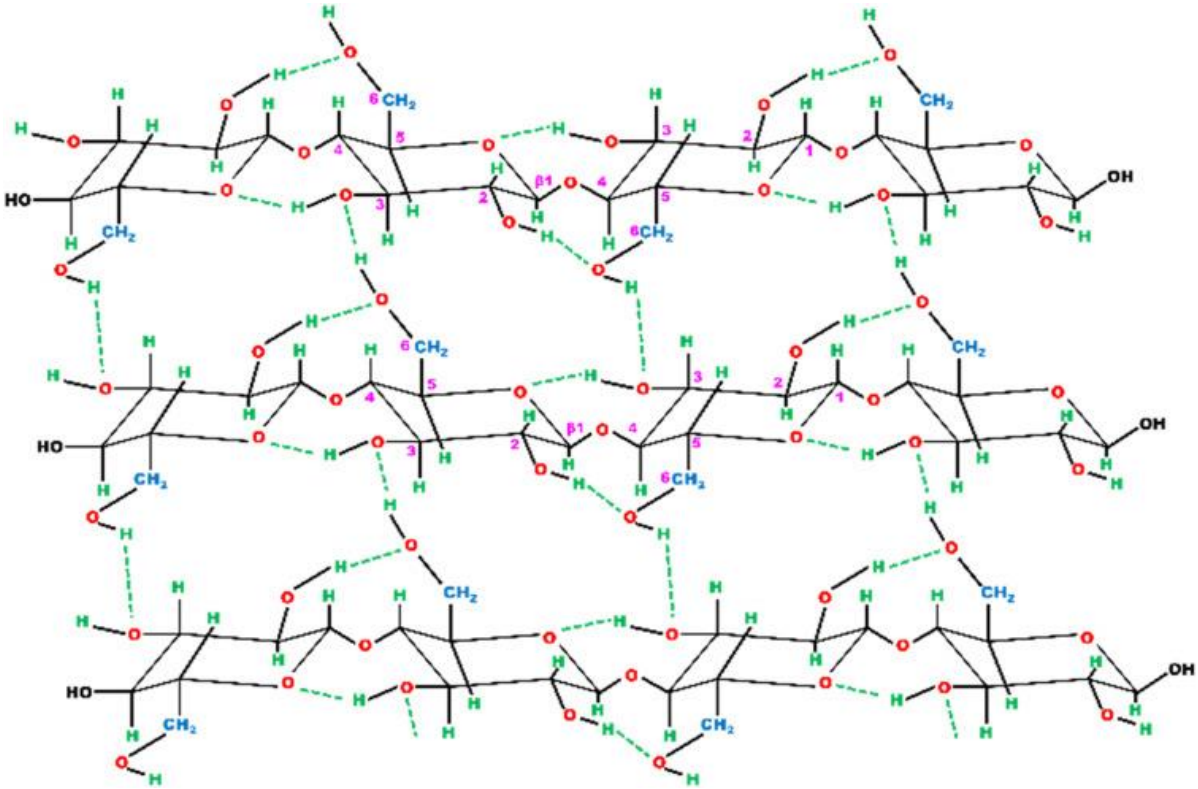
Fonte: adaptado de ISIKGOR e BECER, 2016

2.2.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na biosfera, representando a matéria-prima mais promissora para a bioconversão (YIN et al., 2010). Como cerca da metade do carbono orgânico na biosfera está presente na forma de celulose, a sua conversão em combustível e produtos químicos valiosos tem uma importância primordial (ISIKGOR e BECER, 2016).

A celulose é um polímero altamente estável, composto por moléculas de glicose e ligado a cadeias lineares de até 12.000 monômeros que são unidos por ligações glicosídicas β – 1,4. A biomassa vegetal contém 40 e 50% de moléculas de celulose que são mantidas juntas por ligações de hidrogênio no estado nativo, mas elas têm uma forte tendência a formar pontes de hidrogênio o que aumenta a rigidez da celulose e torna altamente insolúvel e resistente para a maioria dos solventes orgânicos. A fórmula química da celulose é $(C_6H_{10}O_5)_n$ e a estrutura de uma cadeia do polímero é apresentada na Figura 2 (ANWAR et al., 2015).

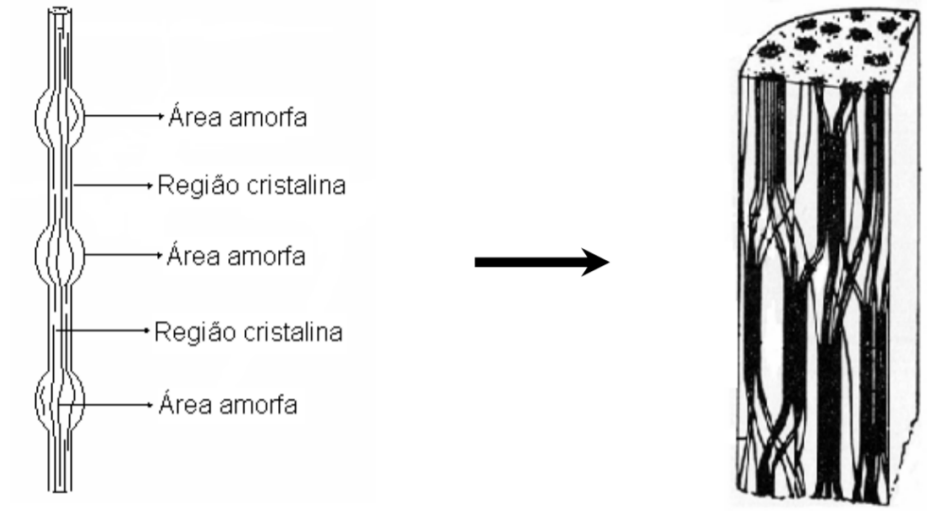
Figura 2. Estrutura da celulose



Fonte: WOICIECHOWSKI et al., 2020

O grau de polimerização da celulose pode ser da ordem 7.000 a 10.000 monômeros de glicose por molécula, o que lhe confere elevada massa molecular. As moléculas de celulose podem se alinhar lado a lado, em cadeias adjacentes, estendidas na mesma direção, formando micelas. As micelas podem se interligar através de pontes de hidrogênio, formando microfibrilas. Estas microfibrilas, com diâmetro médio de 1 a 30 nm, apresentam regiões cristalinas e amorfas (RAMOS, 2003). Embora não exista uma separação definitiva entre as duas regiões, há evidências de que as microfibrilas têm um núcleo cristalino rodeado e interrompido por áreas amorfas (Figura 3). Considera-se que essas áreas amorfas sejam formadas pela presença de moléculas de água, que evitam a cristalização da celulose. Ao passo que, as pontes de hidrogênio, inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas, tornando a celulose resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (RAMOS, 2003) Todavia, quando ocorre hidrólise, a celulose sofre despolimerização, liberando monômeros de glicose, que podem ser utilizados como intermediários na produção de insumos químicos (BEVILAQUA, 2010).

Figura 3. Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose

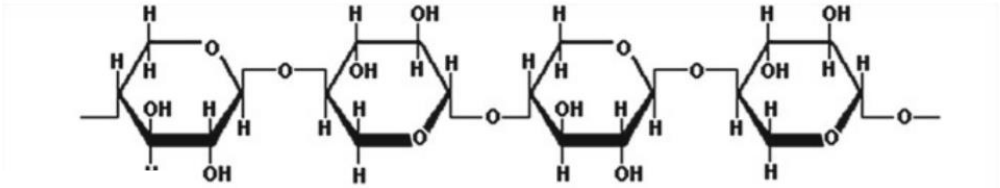


Fonte: BOECHAT, 2010.

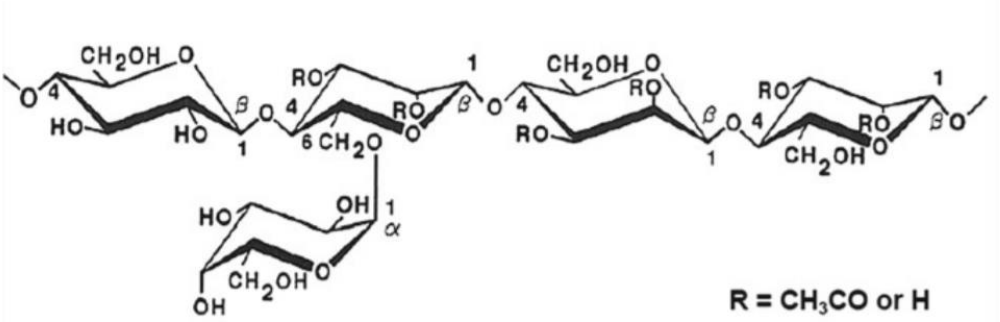
2.2.2 Hemicelulose

Hemiceluloses são polissacarídeos não celulósicos também denominados polioses. As hemiceluloses diferem da celulose pela composição de várias unidades de açúcar, com cadeias moleculares menores e ramificadas. Enquanto a celulose, como substância química, contém exclusivamente a D-glicose como unidade fundamental, as hemiceluloses são polímeros, em cuja composição podem aparecer condensadas em proporções variadas, as seguintes unidades de açúcar: D-glicose, D-manose e D-galactose (hexoses) e, em maior quantidade, por D-xilose, L-arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e grupos acetila, formando polímeros de estrutura ramificada e de cadeias mais curtas (Figura 4) (LINO, 2015; BEVILAQUA 2010).

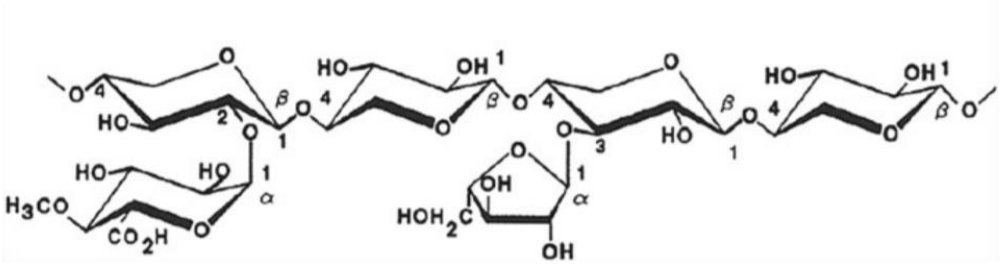
Figura 4. Estrutura dos principais açúcares que compõem a hemiceluloses



Xylana



Galactoglucomananos



Arabinoglucoronoxilano

Fonte: BAJPAI, 2016

O grau de polimerização das hemiceluloses está na faixa de 100 a 200 unidades, muito menor que o da celulose, mas pode apresentar um alto grau de substituições mais ou menos complexas. A hemicelulose é amorfa, com pouca foça física e pode ser prontamente

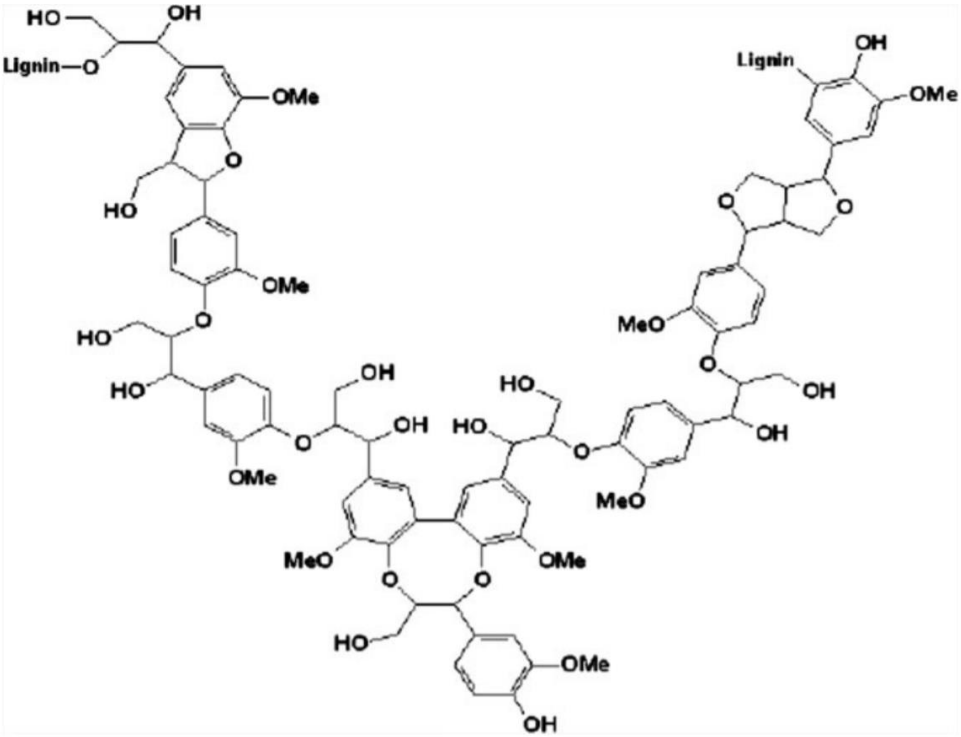
hidrolisada por ácidos ou bases diluídos, além das enzimas hemicelulase (ZOGHLAMI e PAES, 2019).

2.2.3 Lignina

A lignina é o segundo polímero mais abundante na biomassa lignocelulósica após a celulose. A composição da lignina depende de sua origem vegetal. As ligninas de madeiras de fibras longas (coníferas), madeiras de fibras curtas (folhosas) e gramíneas possuem estruturas básicas muito diferente entre elas (LINO, 2015; ZOGHLAMI e PAES, 2019).

É um heteropolímero amorfo muito complexo de fenilpropanóides que é responsável pela hidrofobicidade e rigidez estrutural da parede celular, ligando a hemicelulose à celulose. É sabido que a lignina desempenha um papel negativo na conversão da celulose por vários fatores, como o teor total de lignina e a composição/estrutura da lignina. Em primeiro lugar, a lignina pode limitar fisicamente a acessibilidade dos polissacarídeos: ela representa uma barreira física que bloqueia o acesso das enzimas à celulose. Além disso, pode absorver irreversivelmente celulases e outras enzimas durante a hidrólise enzimática devido a suas características estruturais hidrofóbicas, incluindo pontes de hidrogênio, grupos metoxi e estruturas poliaromáticas (ZOGHLAMI e PAES, 2019). A estrutura está representada na Figura 5.

Figura 5. Estrutura da lignina (polímero reticulado complexo de anéis aromáticos)



Fonte: BAJPAI, 2016

2.3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

As indústrias que processam qualquer tipo de biomassa geram resíduos com características específicas, variando em volume, estado físico e composição. Mesmo sendo resíduos, esses materiais ainda são biodegradáveis, no entanto, geralmente precisam ser tratados antes do descarte final, a fim de evitar danos ambientais. A reciclagem desses resíduos, por razões econômicas ou ambientais, também pode valorizá-los como produtos. A biotecnologia e o bioprocessamento fornecem alternativas importantes para o uso de resíduos biodegradáveis como matéria-prima em novos processos, através da bioconversão de suas moléculas constituintes, que são uma rica fonte de energia, carbono e nutrientes para novos produtos (WOICIECHOWSKI et al., 2020).

Os resíduos e materiais lignocelulósicos podem ser usados como matéria prima para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos. Propriedades como o teor de lignina, acessibilidade da celulose a enzimas e micro-organismos e o grau de cristalinidade da celulose determinam a digestibilidade total da biomassa e sua futura aplicabilidade. Alguns dos subprodutos da agropecuária, como bagaço e palha de cana de açúcar, arroz e trigo estão sendo utilizados biotecnologicamente na produção de produtos (RODRIGUES et al. 2013).

Beltrán-Ramírez et al., (2019), expõem que outro mercado relevante relacionado aos produtos de resíduos agroindustriais está nos fitoquímicos com a extração de carotenoides, flavonoides e antocianinas, entre outros com potencial uso na indústria alimentar. Mesmo na indústria farmacêutica, os peptídeos bioativos são considerados um mercado em crescimento e representam uma solução potencial para tratamentos eficazes de doenças.

Os resíduos agroindustriais também podem ser utilizados para produção de bioplásticos (HAWAS et al., 2015; RIÇA et al., 2017; CECCHINI, 2017; TRIPATHI et al., 2019). As tendências indicam que a crescente sensibilização das pessoas pela substituição de plásticos por alternativas biodegradáveis e ambientalmente favoráveis permite o crescimento do mercado dos resíduos agroindustriais (BELTRÁN-RAMÍREZ et al., 2019).

Outro mercado de importância são as enzimas comerciais, produzidas por microrganismos que utilizam resíduos agroindustriais como nutrientes indutores, que provaram ser uma opção viável quando comparadas as suas contrapartes químicas em diversos processos relacionados a laticínios, cervejas, vinhos e sucos, gorduras e óleos, panificação, detergentes, têxteis, couro, polpa e papel. O advento da tecnologia de

fermentação, possibilitou a produção de enzimas em grandes quantidades e de forma bem caracterizada (KAPOOR et al., 2016). Mas é importante destacar que os produtos biotecnológicos só podem competir com aqueles da indústria petroquímica quando os recursos de biomassa são processados através de sistemas otimizados em biorrefinarias (SANTOS et al., 2011).

2.3.1 Biorrefinaria

Biorrefinaria é uma unidade produtiva que integra geração de energia e produtos de valor agregado elevado obtidos a partir de biomassa, com pouco desperdício e emissões, trazendo novas oportunidades de ganho. O conceito de biorrefinaria é fundamentado na conversão integral de recursos renováveis como fonte de macromoléculas a exemplo da celulose, hemiceluloses, lignina, pectina, taninos, amido, colágeno, corantes naturais e outros constituintes químicos, em diferentes produtos intermediários ou finais, incluindo alimentos, produtos químicos, biomateriais e energia. Esse conceito preconiza ainda a minimização dos impactos ambientais negativos e maximização do uso do recurso renovável, considerando o ciclo de vida dos produtos obtidos, e melhorando a eficácia e sustentabilidade das cadeias agroindustriais (FERNANDO et al., 2006; ROSA et al., 2011).

Em seus estudos, REE e ANNEVELINK (2007) apontam a existência de sete tipos de biorrefinaria:

1. Biorrefinarias convencionais: de fato, muitas indústrias existentes já são uma espécie de biorrefinaria convencional (indústria açucareira, de amido, óleos vegetais, petroquímicas, indústrias convencionais de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biogás, etc.). Essas indústrias usam tecnologias de conversão para separar a biomassa em alguns produtos principais e materiais residuais.
2. Biorrefinarias verdes: baseia-se na pressurização de biomassa úmida, como gramíneas e culturas verdes (lucerna, trevo), resultando em um bolo de prensa rica em fibras e suco de prensa rico em nutrientes. Esse conceito de biorrefinaria difere dos demais porque a biomassa fresca é processada.
3. Biorrefinarias de cereais: é baseada na moagem a seco ou úmida de biomassa. As matérias-primas são cereais, como: centeio, trigo e milho. O primeiro passo é a separação mecânica em uma fração de grãos e palha; onde a porção de grão é aproximadamente 20% em peso e a porção de palha é 80% em peso. Ambos os fluxos serão processados posteriormente separadamente. O grão vai entregar

amido. O canudo (uma mistura de palha, nós, espigas e folhas) representa uma matéria-prima lignocelulósica e pode ser posteriormente processado na biorrefinaria de materiais lignocelulósicos.

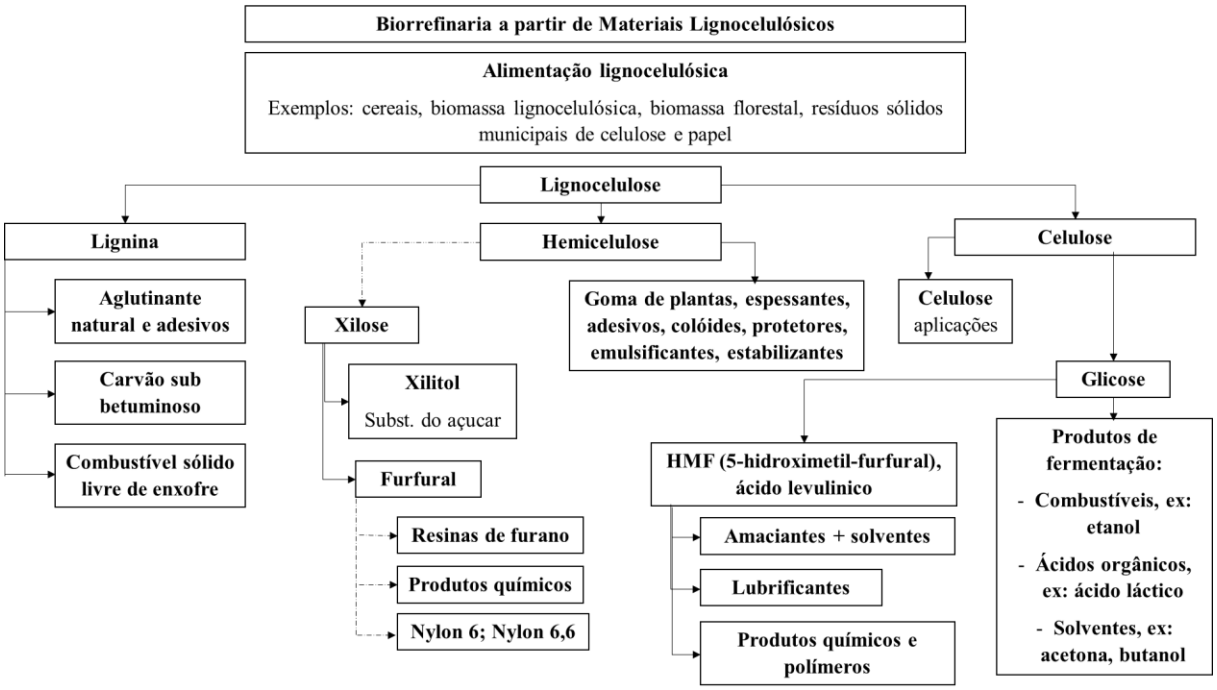
4. Biorrefinarias de duas plataformas: é baseado no fracionamento da biomassa em principalmente um açúcar e uma fração de lignina. A fração de açúcar será bioquimicamente convertida em um portfólio de possíveis produtos biológicos, tais como: materiais, produtos químicos e combustíveis. A fração de lignina (e os resíduos do processo bioquímico) será convertida termoquimicamente para a produção de um espectro de produtos de base biológica, incluindo energia e/ou calor, para atender às necessidades internas de energia e calor do processo.
5. Biorrefinarias termoquímicas: várias tecnologias podem ser aplicadas, como: torrefação, pirólise, gaseificação e/ou utilização térmica hídrica (HTU). Um tipo específico de biorrefinaria termoquímica é usar a infraestrutura petroquímica baseada em óleo bruto já existente. A biomassa bruta e/ou os intermediários derivados da biomassa podem ser condicionados e, em seguida, introduzidos nessas infraestruturas, substituindo combustíveis fósseis e matérias-primas pelas fontes sustentáveis. Esse tipo de "modernização ecológica" das infraestruturas convencionais existentes resultará potencialmente na realização das primeiras biorrefinarias térmicas químicas reais no mercado.
6. Biorrefinarias aquáticas: O potencial técnico das culturas marinhas para a redução de gases de efeito estufa é reconhecido há muitos anos, devido à sua capacidade de usar CO_2 e a possibilidade de alcançar produtividades mais altas do que as culturas terrestres. A produção de biocombustível a partir dessas culturas marinhas, incluindo aspectos gerais de sustentabilidade, é um tópico crescente de discussão.
7. Biorrefinarias de material lignocelulósico: é baseado no fracionamento de fontes de biomassa ricas em materiais lignocelulósicos, que podem ser posteriormente processados em um portfólio de produtos finais de base biológica, materiais, produtos químicos, combustíveis e energia ou calor (Figura 6). Esse tipo de biorrefinaria será aprofundado nos próximos capítulos deste trabalho já que os resíduos agroindustriais são uns dois maiores produtores de materiais lignocelulósicos.

Zuin e Ramin (2018), expõem um modelo holístico de biorrefinaria que integra o ciclo de biomassa, biocombustível, biomateriais e bioenergia, baseado em tecnologias verdes e sustentáveis no âmbito da bioeconomia e economia circular. Geissdoerfer et al., (2017), definem a economia circular como um sistema regenerativo no qual a entrada de recursos e o desperdício, a emissão e o vazamento de energia são minimizados pela desaceleração, fechamento e estreitamento de loops de material e energia. Isso pode ser alcançado por meio de projeto, manutenção, reparo, reutilização, remanufatura, reforma e reciclagem de longa duração.

2.3.2 Biorrefinaria de materiais lignocelulósico

A biorrefinaria a partir de materiais lignocelulósicos usa um mix de fontes de biomassa para a produção de uma série de produtos por meio de uma combinação de tecnologias. Esta biorrefinaria consiste de três frações químicas básicas: hemicelulose, celulose e lignina (SANTOS et al., 2011). A figura 6 apresenta os produtos que podem ser obtidos a partir destas frações químicas.

Figura 6. Produtos potenciais obtidos na biorrefinaria de materiais lignocelulósicos.



Fonte: adaptado de KAMM et al., 2006

Esses produtos de base biológica terão uma boa posição no mercado petroquímico tradicional. Espera-se que a biomassa rica em lignocelulósicos se torne a fonte de biomassa mais importante, porque ficará amplamente disponível a custos moderados, e seu cultivo e uso competem menos com alimentos e forragens. Assim, no futuro, diferentes cadeias de valor de biomassa (alimentos, alimentos para animais, combustíveis e produtos químicos) serão amplamente ligadas (REE e ANNEVELINK, 2007).

2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas com especificidade e reduzindo o tempo de reação. Essas reações são a base do metabolismo de todos os organismos vivos. O uso industrial de enzimas se desenvolveu rapidamente devido a suas funções específicas (VANDENBERGHE et al., 2016). As moléculas de enzima são complexas demais para serem sintetizadas por meios puramente químicos e, portanto, a única maneira de fazê-las é utilizar organismos vivos, o processo de fabricação de enzimas lida com o processo de fermentação no qual os processos enzimáticos geralmente são realizados em condições amenas (VIGNESWARAN et al., 2014). Com base na reação de catálise, as enzimas microbianas podem ser classificadas em seis tipos (LUI et al., 2017):

- Oxidoredutases: catalisam reações de oxidação/redução
- Transferases: transferem um grupo funcional
- Hidrolases: catalisam a hidrólise de várias ligações
- Lyases: clivam várias ligações por outros meios diferentes de hidrólise e oxidação
- Isomerases: catalisam alterações de isomerização dentro de uma única molécula
- Ligases: unem duas moléculas com ligações covalentes

As principais fontes de enzimas industriais são microrganismos. Atualmente, existem 510 enzimas microbianas úteis comerciais, das enzimas industriais, 75% são hidrolíticas (VIGNESWARAN et al., 2014; LIU et al., 2017). A primeira enzima produzida industrialmente foi a amilase takadiastase fúngica, empregada como agente farmacêutico nos Estados Unidos em 1894. Na década de 1950 foi observado um crescimento importante na produção de enzimas industriais e no uso de enzimas microbianas. Em 1969, o 80% de todos os detergentes para roupa continha enzimas, principalmente proteases. Enzimas adicionais, como lipases, amilases, pectinases e oxidoredutases, foram experimentadas posteriormente na

indústria de detergentes (VANDENBERGHE et al., 2016).

As enzimas mais utilizadas nas indústrias são as celulases, lacases, pectinases, xilanases, proteases, amilases e mananases, Kapoor et al., (2016), apresenta um resumo das aplicações industriais destas enzimas (Tabela 2).

Tabela 2. Principais enzimas industriais e suas aplicações comerciais

Enzima	Aplicação industrial
Celulases	Biocombustíveis, celulose e papel, têxteis, alimentos e bebidas, detergentes e ração animal
Lacases	Biorremediação, conversão de lignocelulose, têxteis, biossensores, alimentos, produtos farmacêuticos, síntese orgânica e papel
Pectinases	Frutas e vinho, tratamento de águas residuais pécticas, degomação de fibras vegetais, processamento têxtil e ração animal
Xilanases	Têxteis, alimentos, ração animal, panificação, bioconversão de lignoceluloses e celulose, papel, clarificação de mosto e sucos e liquefação de frutas e legumes
Proteases	Detergentes, fabricação de cerveja, carne, fotografia, laticínios, processamento de alimentos, couro, ração animal, papel e produtos farmacêuticos
Amilases	Hidrólise de amido, detergentes, panificação, biocombustíveis, produtos farmacêuticos e produtos químicos finos
Mananases	Ração, perfuração de petróleo e gás, branqueamento biológico de polpas de madeira macia, extração de óleo, clarificação de café, têxteis e produção de manooligossacarídeos prebióticos

Fonte: KAPOOR et al., (2016)

As vendas de proteases represemtam mais de 60% de todas as vendas de enzimas industriais no mundo e ainda constituiem o meior segmento de produtos no mercado global de enzimas industriais. As amilases representam cerca de 30% da produção mundial de enzimas e as lipases representam o outro grande segmento de produtos do mercado (LUI et al., 2017).

As enzimas do complexo celulolítico são centrais para a transformação da biomassa e produção de etanol e bioprodutos. O alto custo destas enzimas, porém, apresenta um obstáculo significativo à comercialização (BRIJWANI et al., 2010). O uso de resíduos agroindustriais é uma estratégia interessante para a redução dos custos associados à formulação do meio de cultura dos microrganismos produtores de enzimas (VANDENBERGHE et al., 2016).

Os bioprocessos tradicionais utilizam açúcares refinados como fontes de carbono e sais contendo grupos nitrato ou amônio como fonte de nitrogênio, e alguns processos usando

fontes indefinidas de nitrogênio, como extrato de levedura, peptona bacteriológica e extrato de carne bovina. Mais recente, buscando tornar os bioprocessos econômicos e encontrar fontes mais baratas de carbono, os materiais lignocelulósicos como os resíduos agroindustriais vieram à tona, e da mesma forma, fontes mais baratas de nitrogênio, como licor de milho e uréia se destacam. Qualquer resíduo agrícola, se usado como um componente importante do meio de fermentação, pode reduzir o custo total de produção, diminuindo o custo da matéria-prima usada no processo de fermentação já que os custos de matéria prima para um bioprocesso típico variam de 10% a 50% do custo total de produção (GOPALAN e NAMPOOTHIRI, 2016).

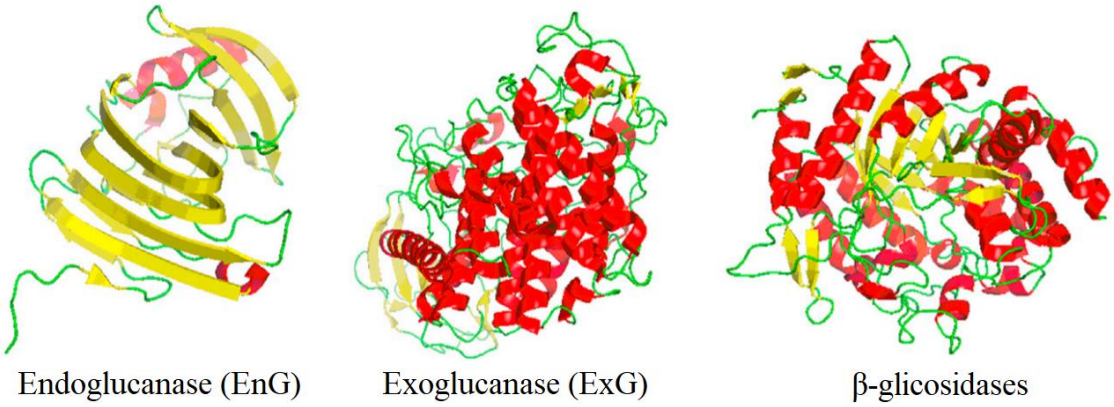
2.5 ENZIMAS CELULASES

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligação O-glicosídicas, sendo classificadas pela Enzime Comission (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Na natureza, a hidrólise completa da celulose é mediada por uma combinação de três tipos principais de celulases, a estrutura pode ser observada na Figura 7 (LIU et al., 2017). A classificação das celulases, segundo LYND et al., (2002) é de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico:

- Endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica
- Exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose
- β-glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose.

Figura 7. Estrutura da celulase



Fonte: adaptado de LUI et al., 2017

A EnG, está classificada como EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology – 1,4-β-D-glucana-4-glucano-hidrolase. Esta enzima é responsável por iniciar a hidrólise do complexo celulolítico. Tal enzima hidrolisa aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, consequentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (LYND et al., 2002).

O grupo das ExG é constituído por celobio-hidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH) (CASTRO e PEREIRA 2010). LYND et al., (2002) expõe que a CBH (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4-β-D-glucana-celobio-hidrolase. A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulases. A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4-β-D-glucana-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002).

O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a BG, ou β-glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), que é seu nome sistemático. A BG tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. É reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise como a CBH (LYND et al., 2002).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras (LYND et al., 2002). Tal efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases (CASTRO e PEREIRA 2010):

- Sinergia EnG-ExG, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente
- Sinergia ExG-ExG, CBH I e CBH II tem ação simultânea na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da EnG

- Sinergia ExG-BG e EnG-BG, como seus produtos de hidrólise, ExG e EnG liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a BG.

As atividades da celulase são expressas em termos dos substratos usados para quantifica-las, por exemplo, a hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) é medida como carboximetilcelulase (CMCase), hidrpolise de papel de filtro como unidades de papel de filtro, digestão de celulose Avicel como Avicelase, hidrólise de fibra de algodão como celulase de algodão, etc (BISWAS et al., 2014).

2.5.1 Aplicações de celulase nas indústrias

Desde o ano 1997, Bhat e Bhat mencionavam que as celulases possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. Desde a década passada, a celulase é a terceira enzima mais utilizada na indústria em vários processos, detrás das proteases e amilases, e é a segunda maior enzima industrial em volume de dólar, cuja demanda está aumentando por aplicações industriais, como indústria de detergentes, têxtil, de processamento de papel, de ração animal, de suco de frutas, alimentos e bebidas, biocombustíveis (BAJAJ e MAHAJAN, 2019; PATEL et al., 2019; KAPOOR et al., 2016). Na tabela 3 pode se observar as principais aplicações da celulase nas indústrias.

As celulases são enzimas induzíveis sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, durante seu crescimento em materiais celulósicos (LUI et al., 2017). Apenas um número limitado de organismos tem a capacidade de realizar decomposição completa da celulose devido à recalcitrância de suas ligações glicosídicas, exigindo uma enzima celulase complexa, composta por diferentes componentes que atuam em sinergia, de modo a hidrolisar completamente o polissacarídeo (PATEL et al., 2019).

A enzima celulase pode ser produzida por fermentação sólida ou submersa. Mas a maioria das empresas optaram pela fermentação submersa em lotes alimentados para produzir celulase de baixo custo (ZHANG et al, 2013). Prevê-se que a celulase será a enzima industrial de maior volume caso o etanol da biomassa lignocelulósica produzido via hidrólise enzimática se torne um importante combustível de transporte. O potencial comercial do uso de celulases para este fim reside em sua eficiência na conversão de biomassa lignocelulósica em glicose que pode ser utilizada para gerar uma série de produtos de valor agregado (PATEL et al., 2019).

Tabela 3. Aplicações de celulase em indústrias

Indústria	Função	Aplicação
Alimentos	Hidrólise de componentes da parede celular; diminuindo a viscosidade e mantendo a textura do suco de frutas	Extração de suco de frutas; alteração das propriedades sensoriais de frutas, legumes, óleo de azeitonas e sopas; redução da deterioração dos alimentos; extração de pigmentos aplicáveis como corantes naturais de alimentos
Ração animal	Pré-tratamento de silagem agrícola e ração de grãos para hidrólise parcial de materiais lignocelulósicos	Melhoria na qualidade nutricional de alimentação animal; melhoria na digestabilidade dos alimentos; ganho de peso de frangos de corte e galinhas; diminuição da colonização de bactérias patogênicas no intestino grosso
Cerveja e vinho	Hidrólise de polissacarídeos da parede celular de plantas; modificação de resíduos aromáticos	Melhoria na maceração da pele e extração de cor das uvas, qualidade, estabilidade e clarificação e aroma dos vinhos
Têxteis, lavanderia e detergentes	Atua no tecido de algodão e rompimento das pequenas extremidades da fibra no tecido de algodão, soltando o corantes após a lavagem	Produção de tecidos de alta qualidade; prevenção ou remoção permanente de formação de pelos e bolinhas. Aumenta a eficiência na limpeza de manchas e no cuidado de tecidos, remoção de sangue, proteínas, mucosas, gorduras, lípidos e carboidratos.
Polpa e papel	Polpação mecânica, biodificação de fibras, remoção de revestimentos de tinta e toners de papel	Amenta a resistência à tração e as altas qualidades das fibras, reduze o consumo de energia, melhora a drenagem das fábricas de papel e a fabricação de papéis macios
Agricultura	Solubilização de paredes celulares de plantas ou fungos; inibição da germinação de esporos e crescimento de fungos	Produção de protoplastos vegetais ou fúngicos, linhagens híbridas e mutantes, fertilidade do solo, crescimento das plantas
Biocombustíveis	Conversão de material celulósico em glicose e outros açúcares fermentáveis	Produção de proteínas unicelulares ou produtos de fermentação como etanol
Farmacêuticas	Digestão de fibra de celulose	Preparação de digestina, hidrólise rápida de celulase; degradação das paredes celulares de organismos patogênicos
Gestão de resíduos	Degradação de resíduos celulósicos	Redução da poluição ambiental

Fonte: BEHERA et al., 2016; JAYASEKARA e RATNAYAKE, 2019.

2.5.2 Microrganismos produtores de celulases

Em um ecossistema típico de degradação de celulose, uma variedade de bactérias e fungos trabalham em conjunto, nos consórcios microbianos, para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis que são então assimilados pelas células (LYND et al., 2002). As celulases são enzimas induzíveis sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias durante seu crescimento em materiais celulósicos. Esses microrganismos podem ser aeróbios, anaeróbicos, mesófilicos, termofílicos ou psicrófilos (KUHAD et al., 2011). Na Tabela 4 são expostos alguns microrganismos capazes de produzir celulase.

Atualmente, as fontes microbianas comuns de celulases para produção em escala industrial são microrganismos mesófilos cultivados na faixa de temperaturas de 30 – 35 °C, como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. No entanto, as enzimas produzidas por organismos termófilos crescidos nas faixas de 50 – 90°C, são mais vantajosas para processos industriais severos, têm taxas de reação mais rápidas e são menos propensas à contaminação. Alguns exemplos de microrganismos termófilos são: *Clostridium thermocellum, Thermoanaerobacter sp* e *Thermotoga marítima*. As enzimas dos psicrófilos, como *Clostridium* PXYL1 e *Pseudoalteromonas haloplanktis*, que crescem na faixa de temperatura de 5 – 20°C, também apresentam vantagens em aplicações onde a temperatura é prejudicial ao produto e reduz o consumo de energia no processo. Dessa forma, dependendo do produto desejado, um produtor microbiano apropriado de enzimas hidrolíticas pode ser selecionado a partir da ampla variedade disponível na natureza (WATANABE e TOKUDA, 2001).

Os microrganismos produzem as celulases dentro de suas células (enzimas intracelulares) e também podem secretar as enzimas para ação fora da célula (extracelulares). Os microrganismos são geralmente cultivados em grandes câmaras de fermentação sob condições controladas para maximizar a produção de enzimas. As enzimas são acumuladas no interior das células ou são secretadas no meio dos tanques de fermentação. Nas etapas subsequentes, as células rompidas ou o meio incluindo as enzimas são sujeitas a processos de purificação adicionais usando várias técnicas químicas, mecânicas e térmicas (VIGNESWARAN et al., 2014).

Tabela 4. Microrganismos produtores de celulase

Fungos	*Aspergillus niger; A. nidulans; A. oryzae; A. terreus; Fusarium solani; F. oxysporum; Humicola insolens; H. grisea; Melanocarpus albomyces; Penicillium brasilianum; P. occitanis; P. decumbans; Trichoderma reesei; T. longibrachiatum; T. harzian**um; Chaetomium cellulyticum; C.** thermophilum; Neurospora crassa; P. fumigosum;* ***Thermoascus*** *aurantiacus Mucor circinelloides; P. janthinellum; Paecilomyces inflat**us;** P. echinulatum; Trichoderma **atroviride** Coniophora puteana; Lanzites trabeum; Poria placenta; Tyro**myces palustris; Fomitopsis*** **sp.** *Phanerochaete chrysosporium; Sporotrichum thermophi**le; Trametes** versicolor; Agaricus arvensis; Pleurotus ostreatus; Phlebia gigantea*
Bactérias	**Aeróbicas** *Acinetobacter junii; A. amitratus; Acidothermus cellulolyticus; Anoxybacillus sp.; Bacillus subtilis; B. pumilus; B. amyloliquefaciens; B. licheniformis; B. circulan; B. flexus; Cellulomonas biazotea; Cellvibrio gilvus; Eubacterium cellulosolvens; Geobacillus* sp.*; Microbispora bispora; Paenibacillus curdlanolyticus*; *Pseudomonas cellulosa; Salinivibrio* sp. **Anaerobicas** *Acetivibrio cellulolyticus; Butyrivibrio fibrisolvens; Clostridium thermocellum; C. cellulolyticum; C. acetobutylium; C. papyrosolvens; Fibrobacter succinogenes; Ruminococcus albus*
Actinomicetes	*Cellulomonas fimi; C. bioazotea; C. uda; Streptomyces drozdowiczii; S. lividans; Thermomonospora fusca; T. curvata*

Fonte: KUHAD et al., 2011

A definição da composição do meio de crescimento dos microrganismos pode afetar significativamente no rendimento e na produtividade das enzimas e é de importância central no desenvolvimento de bioprocessos industriais. O uso de resíduos agroindustriais é uma estratégia interessante para a redução dos custos associados à formulação do meio de cultura (VANDENBERGHE et al., 2016). Bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo, farelo de trigo, palha de milho, fibra de coco, casca de arroz, casca de laranja e fibra de coco são só alguns resíduos agroindustriais estudados e utilizados para produção de celulase por diversos microrganismos (SADHU et al., 2013; MENG et al., 2014; LADEIRA et al., 2014; KAZEEM et al., 2017; ALITA et al., 2019). Na Tabela 5 são expostos exemplos de estudos de produção de celulase por vários microrganismos utilizando resíduos agroindústrias como fonte de carbono.

Tabela 5. Produção de celulase por diversos microrganismos utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono

Resíduo agroindustrial	**Microrganismo**	**Autor**
Fibra de coco	*Aspergillus niger*	Mrudula, 2011
Casca de laranja, bagaço de cana	*Bacillus* sp.	Sadhu et al., 2013
Palha de trigo e farelo de arroz	*Bacillus* sp. H1666	Harshvardhan et al., 2013
Palha de milho	*Bacillus subtilis* BY-3	Meng et al., 2014
Bagaço de cana e milho	*Bacillus* sp.	Ladeira et al., 2014
Bagaço de cana	*Bacillus vallismortis* RG07	Gaur et al., 2015
Farelo de milho	*Bacillus* sp. TMF-1	Salim et al., 2016
Casca de arroz	*Bacillus Licheniformis* 2D55	Kazeem et al., 2017
Alfafa palha	*Bacillus sonorensis*	Azadian et al., 2017
Casca de batata	*Bacillus subtilis* K18	Irfan et al., 2017
Bagaço de cana	*Paenibacillus polymyxa* ND24	Bohra et al., 2018
Resíduo de álamo	*Bacillus cereus*	Tabssum et al., 2018
Bagaço de cana	*Metarhizium anisopliae* IBCB 348	Alita et al., 2019
Farelo de arroz	*Bacillus halodurans CAS1*	Annamalai et al., 2019

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Globalmente, muitas indústrias geram grandes quantidades de resíduos agroindustriais que se acumulam e levam a problemas de segurança ambiental. Existe uma necessidade urgente de mudar a percepção global em relação aos resíduos agrícolas, pois eles podem ser utilizados como matéria prima de baixo custo para a produção sustentável de vários produtos de valor agregados. Atualmente, muitos laboratórios industriais e académicos estão estudando e implementando a utilização de resíduos agroindustriais como substratos econômicos para a produção de enzimas, entre elas, a celulase, que podem são utilizadas em diversos processos industriais através das biorrefinarias. Estes estudos ajudam no desenvolvimento de tecnologias verdes e na diminuição dos impactos ambientais gerados pelas agroindústrias.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIB – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE BIOMASSA E ENERGIA RENOVÁVEL. Atlas Brasileiro Biomassa e Energia. 2016. Curitiba, Paraná. 2016. Disponível em < https://es.calameo.com/read/0008953904f21ebb5e908> Acesso em: 27 jan 2020

ALITA, B.; SPANNEMBERG, S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G.; TRES, M.; KUHN, R; MAZUTTI, M. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2019. Vol 7. 7 p.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future of bio-energy: a brief review. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 2015. Vol. 7:2, 163 – 173 p

AZADIAN, F.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z.; HASSANSHAHIAN, M. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable celulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversión of lignocellulosic wastes. Journal of genetic engineering and biotechnology. 2017. Vol 15, p. 187 – 196.

BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. Vol 103, p 8711 – 8724.

BAJPAI, P. Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. Green chemistry for sustainability. SpringerBriefs in Molecular Science. 2016. P 7 -12.

RAMÍREZ, F.; TAMAYO, D.; CORONA, I.; CERVANTES, J.; CLAUDIO, J.; RODRÍGUEZ, E. Agro-industrial waste revalorization: the growing biorefinery. Biomass for bioenergy – Recent trends and future challenge. 2019. 20 p.

BEHERA, B.; SETHI B.; MISHRA, R.; DUTTA, S.; THATOI, H. Microbial cellulases – Diversity and biotechnology with reference to mangrove environment: A review. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017. Vol 15, p 197 – 210.

BEVILAQUA, D. Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz. Santa Maria, 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

BHAT, M. K. e BHAT, S. Cellulose degrading enzimes and their potencial industrial applications. 1997. Biotechnology Advances, Vol 14, 583-620.

BISWAS, R.; PERSAD, A.; BISARIA, V. Production of cellulolytic enzymes. Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts. Firs Edition. 2014.

BOECHAT, A. Produção de celulases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp SMIA-E. Campos dos Goytacazes-RJ, 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Centro de Ciências e tecnologias agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

BRIJWANI, K. e VADLANI, P. V. Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. Enzime Research. Vol 2011, 10 p.

CASTRO, A.; PEREIRA, N. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

CECCHINI, C. Bioplastics made from upcycled food waste. Prospects for their use in the field of design. The design journal. 2017. Vol 20, p 1596 – 1610.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. Energy & Fuels 2006, 20, 1727 1737.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *B. vallismortis* RG07. BMC Biotechnology. 2015. Vol 15:19, p 1 – 12.

GEISSDOERFER, M.; SAVAGET, P.; BOCKEN, N.; HULTINK, E. The circular economy – a new sustainability paradigm? Journal of Cleaner Production. 2017. Vol 143, p 757 – 768.

GOPALAN, N.; NAMPOOTHIRI, K. M. Biotechnological production of enzymes using agro-industrial wastes: Economic considerations, commercialization potential and future prospects.Agro-industrial wastes as feedstock for enzymes production. 2016. Chapter 14, p 313 – 330.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and caractherization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potencial agent for single step saccharification of seaweed biomass. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013, vol 93, p 51 – 56.

HAWAS, J. M.; BANNA, T.; BELAL, E.; AZIR, A. Production of bioplastic from some selected bacterial strains. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2016. Vol 5, n. 1, p 10 – 22.

ISIKGOR, F.; BECER, R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. 2016. Polym. Chem. Vol 6, p 4497 – 4559.

JAYASEKARA, S.; RATNAYAKE, R. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. Cellulose. 2019, 22 p.

KAMM, B.; GRUBER, P.; KAMM, M. Biorefineries – Industrial Processes and products: Status Quo and Future Directions. 2010. 949 p

KAPOOR, M.; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-wastes: Technical challenges and commercialization potencial. Agroindustrial wastes as feedstock for enzymes production.2016. Chapter 3, p 61 – 93.

KAZEEM, M.; SHAH, U. K.; BAHARUDDI, RAHMAN, N. A. Prospecting Agro-waste cocktail: supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *B. liccheniformis* 2D55. Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. Vol 182, p 1318 – 1340.

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

LEISTRITZ, L.; HODUR, N.; SENECHAL, D.; STOWERS, M.; McCALLA, D.; SAFFRON, C. Biorefineries Using Agricultural Residue Feedstock in the Great Plains, 2007.

LINO, A. G. 2015. Composição química e estrutural da lignina e lípidos do bagaço e palha da cana de açúcar. Viçosa, 2015. Tesse (Pós-graduação em agroquímica para obtenção do título de Doctor Scientiae). Universidade Federal de Vicoça, Minas Gerais.

LIU, X; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. Biotechnology of Microbial Enzymes. Production, Biocatalysis and Industrial Applications. 2017. Chapter 11, p 267 – 298.

LYND, L.; WEIMER, P.; ZYL, W.; PRETORIUS, I. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews, sep. 2002. Vol. 66, No. 3, p. 505 – 577.

MARCO, É.; HECK, K.; MARTOS, E.; VAN DER SAND, S. Purification and characterization of a termostables alkaline celulase produced by *B. licheniformis* 308 isolated from compost. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2017. 12 p.

MENG, F; MA, L; JI, S; YANG, W; CAO, B. Isolation and characterization of bacillus subtilis strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulose producing bacterium on untreated plant biomass. 2014. Letters in Applied Microbiology, 2014. Vol. 59, 306-312.

MERINO, S.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. Merino ST, Cherry J. 2007. Adv Biochem Eng Biotechnol, 108, 95–120.

MONTEIRO, V.; SILVA, R. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos. 2009, vol 3, n 5, p 10 – 23

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. Brazilian Journal of Microbiology. 2011, 42: 1119-1127.

NASCIMENTO, W. B.; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. Revista Virtual de Química. 2015, 7 (6), p 1968 – 1987.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Bioresourse Technology. 2019, vol 279, p 385 – 392.

PEDROSO, L.; SILVA, F. F.; MELO, A. M.; JUNIOR, M. E.; SHIMOYA, A. Demandas atuais e futuras da biomassa e da energia renovável no Brasil e no mundo. Brazilian Journal of Development. 2018. Vol 4, n 5, p 1980 – 1996.

PENHA, E.; VIANA, L.; GOTTSEHALK, L. M. F.; TERZI, S.; DE SOUZA, E. F.; CORDEIRO, S.; SANTOS, J.; SALUM, T. F. C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. Ciência Rural, Santa Maria. v 46, n4, p. 755-761, abr, 2016.

PREMALATHA, N.; GOPAL, N. O.; JOSE, P. A.; ANANDHAM, R.; KWON, S. Frontiers in Microbiology. 2015. Vol 6, Article 1046.

RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. Química Nova, 2003, Vol. 26, No. 6, p 863 – 871.

REE, R. VAN; ANNEVELINK, E. Status Report Biorefinery. Wageningen University & Research E-depot. 2007.

RIÇA, L. B.; MORAES, L. B.; SOUZA, D.; SOUZA, R.; MULLER, M. V. Aproveitamento de torta do tabaco gerado na produção de biodiesel para a obtenção de bioplásticos. Revista Jovens pesquisadores. 2016. Vol 6, n 2. 16 p.

RODRIGUES, C.; LORENCI A.; LETTI, L. Biotecnologia aplicada à agroindústria. Materiais lignocelulósicos como matéria prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. São Paulo, 2013.

ROSA, M. F.; SOUZA Filho, M S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T., Leitão, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais. Foz do Iguaçu, 2011.

SADHU, S.; SAHA, P.; SEM, S.; MAYILRAJ, S.; MAITI, T. K. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. SpringerPlus, 2013. Vol. 2 No. 10.

SANTOS, M. F.; BORSHIVER, S.; COUTO, M. A. P. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. Economia e Energia. 2011. vol 15, n 82.

SALIM, A. A.; GRBAVCIC, S.; SEKULJICA, N.; STEFANOVIC, A.; TANASKOVIC, S. J.; LUKOVIC, N.; JUGOVIC, Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid-state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. Bioresource Technology. 2016. Vol 228, p 193 – 200.

SHAIKI, N. M.; PATEL, A. A.; MEHTA, S. A.; PATEL N. D. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. Universal Journal of Environmental Research and Technology. 2013. Vol 3, p 39 – 49

SILVA, I.; LIMA, R. M.; RUZENE, D. S.; DA SILVA, D. P. Residuos agroindustriais como biomassa alternativa para geração de energia distribuída em comunidais rurais. Energias Alternativas: Tecnologias sustentáveis para o nordeste brasileiro. Aracaju: Associação Acadêmica de Propriedade Intelectual. 2019. P 189 – 211.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. 2016. Vol 6: 174. 15 p.

SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases: production, application and challenges. Journal os scientific and industrial research. 2005. Vol 64 (11) p 832 – 844.

THOMAS, L.; RAM, H.; KUMAR, A.; SINGH, V. P. Production, optimization and characterization of organic solvent tolerant cellulaes from lignocellulosic waste – degrading Actinobacterium, Promicromonospora sp VP111. Appl Biochem Biotechnol. 2016. 179 p 863 – 879

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacilus flexus* isolated from green seaweed Ulva lactuca. Carbohydrate Polymers. 2011. Vol 83, p 891 – 897.

TIPATHI, A.; YADAV, A.; JHA, A.; SRIVASTAVA, S. K. Utilizing of sugar refinery waste (cane molasses) for production of bio-plastic under submerged fermentation process. Journal of polymers and the environment. 2020. Vol 20, p 446 – 453.

TU, W-C; HALLET, J. P. Recent advances in the pretreatment of lignocellulosis biomass. Current opinion in green and sustainable chemistry. 2019. Vol 20, p 11 – 17.

VANDENBERGHE. L. P; CARVALHO, J. C.; LIBARDI, N.; Rodrigues, C.; SOCCOL, C.R. Microbial enzyme factories: current trends in production processes and commercial aspects. Agro-industrial wastes as feedstock for enzymes production. 2016. Chapter 1, p 1 – 22.

VIGNESWARAN, C.; ANANTHASUBRAMANIAN, M.; KANDHAVADIVU, P. Industrial Enzymes. Bioprecessing of Textiles. Fundamentals for Applications and Research Perspective. 2014, Chapter 2, p 23 – 52.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Animal cellulases. Cellular and Molecular Life Sciences. 2001. Vol 58, p 1167 – 1178.

WOICIECHOWSKI, A. L.; NETO, C. J. D.; VANDENBERGHE, L. P.; NETO, D. P. C.; SYDNEY, A. C. N.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; TORRES, L. A. Z.; SOCCOL, C. R. Lignocellulosic

biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional procssing and recent advances. Bioresourse Technology. 2020. Vol 304. 9p.

ZHANG, X-Z.; ZHANG, Y. H. P. Cellulases: characteristics, sources, production and applications. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals and Polymes. 2013. 1 Ed. P 131 – 146.

ZOGHLAMI, A.; PAES, G. Lignocellulosic biomass: understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. Frontiers in chemistry chemical and process engineering. 2018. Vol 7:874, 11 p.

ZUIN, V.; RAMIN, L. Green and sustainable separation of natural products from agro-industrial waste: challenge, potentialities and perspectives on emerging approaches. Top Curr. Chem. 2018. Vol 37, n 3. 54 p.

CAPITULO 2: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Bacillus smithii* QT03 PARA PRODUÇÃO DE CELULASE UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE COMO FONTE DE CARBONO

Analyse Villanueva Gaete[1], Carlos Eduardo de Souza Teodoro[2], Ana Paula Martinazzo[3], Amanda Rodríguez[4]

RESUMO

A celulase é uma das enzimas mais úteis da indústria. O potencial dessas enzimas foi revelado em vários processos, atuando na fabricação de alvejantes, detergentes, alimentos, bioplásticos, biocombustíveis, entre outros usos. O enfoque principal deste estudo foi a avaliação das condições ideais de cultivo de *Bacillus smithii* QT03, uma bactéria pouco estudada porém com características interessantes para aplicações biotecnológicas, para a produção de celulase (endo – β – 1,4 glucanase) utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Para isso, foram avaliados parâmetros nutricionais (fontes de carbono, fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio e a concentração destas fontes nutricionais no meio de cultura), e processos físicos (tempo de incubação, volume de inóculo, temperatura, pH e velocidade de agitação). Em termos dos parâmetros nutricionais, a produção de celulase na presença de bagaço de malte como fonte de carbono na concentração de 2% foi superior aos demais resíduos agroindustriais estudados. O extrato de carne como fonte de nitrogênio na concentração de 1,5% foi considerado como o ideal para a produção de celulase. No que se refere às condições físicas, verificou-se o tempo de 48 h como o melhor para a incubação do microrganismo *B. smithii* QT03 na temperatura de 35°C e 200 rpm de agitação. O volume de inóculo ótimo foi de 2% da bactéria no meio de cultura. A atividade enzimática foi aumentando conforme a otimização do meio de cultura. Este é o primeiro trabalho que evidencia a produção de celulase pela bactéria *B. smithii* QT03, destacando seu potencial biotecnológico para produção de enzimas.

Palavras-chave: Biotecnologia de microrganismos, otimização de meio de cultura, carboximetilcelulase, endo-β-1,4glucanase, produção de enzimas, resíduos agroindustriais, fontes de carbono.

---

[1] Aluna da Pós graduação em Tecnologia Ambiental – Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda

[2] Professor Orientador do programa de Pós graduação em Tecnologia Ambiental – Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda

[3] Professora do programa de Pós graduação em Tecnologia Ambiental – Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda

[4] Aluna de graduação em Engenharia em Agronegócios – Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda

ABSTRACT

Cellulase is one of the most useful enzymes in the industry. The potential of these enzymes was revealed in several processes, working in the manufacture of bleaches, detergents, food, bioplastics, biofuels, among other uses. The main focus of this study was the evaluation of the ideal culture conditions of *Bacillus smithii* QT03, a little studied bacterium but with interesting characteristics for biotechnological applications, for the production of cellulase (endo-β-1,4 glucanase) using agroindustrial residues as a source of carbon. For this, nutritional parameters (carbon sources, organic and inorganic sources of nitrogen and the concentration of these nutritional sources in the culture medium), and physical processes (incubation time, inoculum volume, temperature, pH and agitation speed) were evaluated . In terms of nutritional parameters, the production of cellulase in the presence of malt bagasse as a carbon source at a concentration of 2% was higher than the other studied agro-industrial residues. Meat extract as a source of nitrogen at a concentration of 1.5% was considered ideal for the production of cellulase. With regard to physical conditions, the 48 h time was found to be the best time for the incubation of the microorganism *B. smithii* QT03 at a temperature of 35 ° C and 200 rpm of agitation. The optimal inoculum volume was 2% of the bacteria in the culture medium. The enzymatic activity increased according to the optimization of the culture medium. This is the first study that shows the production of cellulase by the bacterium B. smithii QT03, highlighting its biotechnological potential.

Keywords: Biotechnology of microorganisms, optimization of culture medium, carboxymethylcellulase, endo-β-1,4glucanase, production of enzymes, agro-industrial residues, carbon sources.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores que podem ser vantajosas para aplicações industriais criando a possibilidade de desenvolver um processamento mais ecológico (PATEL et al., 2019). A celulase é uma das enzimas mais úteis da indústria, sendo revelado seu potencial em vários processos, como amaciamento de algodão e acabamento de denim na indústria têxtil, na descoloração, na melhoria da drenagem e na modificação de fibras nas indústrias de papel e celulose, bem como em detergentes para a roupa, agentes anti-pilling e reavivadores de cores (LADEIRA et al., 2014). O mercado mundial de enzimas é estimado em US$ 4 bilhões, com uma tendência crescente de 5,7% ao ano (SOUII et al., 2018).

A celulase é o grupo mais proeminente de enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β-1,4 presentes na celulose. Estas enzimas são principalmente produzidas na natureza por fungos, bactérias e até mesmo alguns protozoários, moluscos e nematoides (BISWAS et al., 2014). A hidrólise enzimática completa de materiais celulósicos precisa de pelo menos três tipos de celulase, incluindo: endoglucanase EC 3.2.1.4 (Carboximetilcelulase ou CMCase), exoglucanase EC 3.2.1.91 (celobiohidrolase, avicelase, celulase microcristalina, β-exoglucanase) e β-glicosidase (EC 3.2.1.21). Essas três enzimas agem sinergicamente para degradar os materiais celulósicos (AZADIAN et al., 2017).

Um progresso considerável foi feito para caracterizar novas cepas microbianas produtoras de celulases, vários gêneros foram relatados para produção da enzima por meio da utilização de resíduos agroindustriais como uma alternativa econômica e ecologicamente viável para a destinação desses recursos, para citar alguns exemplos, Bohra et al., (2011) testaram a bactéria *Paenibacillus polymyxa* ND24 para produzir celulase utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato; Ladeira et al., (2014) estudaram a produção de celulase por *Bacillus* sp. utilizando bagaço de cana de açúcar e licor de milho como substrato; também Gaur e Tiwari (2015) testaram a bactéria *Bacillus vallismortis* RG-07 para produção de celulase utilizando bagaço de cana de açucar como fonte de carbono; Marco et al., (2017), estudaram a produção de celulase por *Bacillus licheniformis* 380 utilizando palha de trigo e casca de arroz; Salim et al., (2016) estudaram a produção de celulase com *Bacillus* sp. TMF-1 utilizando diferentes resíduos agrícolas, obtendo como resultado a produção máxima com farelo de milho como fonte de carbono.

Bacillus smithii é uma bactéria termofílica aeróbica facultativa, capaz de usar uma variedade de açúcares que podem ser derivados de matérias primas lignocelulósicas. A

acessibilidade genética, uma ampla faixa de temperatura e pH e a capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono em um meio relativamente mínimo tornam esta bactéria interessante para aplicações biotecnológicas (BOSMA et al., 2016), porém não existe evidencia na literatura sobre a produção de celulase por essa bactéria.

A otimização do processo para produção de enzimas visa manter condições ótimas e homogêneas de reação, qualidade consistente do produto, minimizar o estresse microbiano e aumentar a precisão metabólica (KAPOOR et al., 2016). A otimização dos parâmetros nutricionais e do processo, como período de incubação, temperatura, pH e velocidade de agitação pode melhorar consideravelmente a produção de celulase em bactérias e desempenha papel significativo no desenvolvimento de bioprocessos industriais para produção de enzimas (PREMALATHA et al., 2015).

Considerando que existem vários estudos com cepas de *Bacillus* sp. capazes de produzir celulases utilizando subprodutos da agroindústria (DAS et al., 2010; SHAIKH et al., 2013; MENG et al., 2014; SALIM et al, 2016; KAZEEM et al., 2017), este estudo teve como objetivo a avaliação das condições ideais de cultivo de *B. smithii* QT03 para a produção de celulase (endo-β-1,4glucanase) utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Este é o primeiro estudo desse tipo com *B. smithii* QT03.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda-RJ.

2.1 SELEÇÃO DO MICRORGANISMO E ENSAIOS ANALÍTICOS

Para a seleção do microrganismo produtor da enzima celulase, foi realizado o teste de Vermelho Congo para observar a capacidade de hidrolise de Carboximetilcelulose (CMC) pelas cepas bacterianas *Geobacillus caldoxylociliticus* VR07, *Bacillus pumilus* VR001, *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 e *Bacillus smithii* QT03 pertencentes à coleção de culturas do laboratório. As cepas bacterianas foram incubadas em meios de cultura ágar Luria Bertani (LB) contendo CMC na concentração de 1% a 35°C por 48h. Após o tempo de incubação as placas de ágar LB com CMC foram inundadas com uma solução aquosa de 0,1% de Vermelho Congo, deixando atuar por 20 minutos. Em seguida, as placas foram cobertas com NaCl (1 $mol.L^{-1}$) por outros 20 minutos. A atividade celulolítica foi revelada pelo tamanho da zona clara ao redor das colônias de bactérias. Foi selecionada a cepa que cresceu vigorosamente e mostrou potencial celulolítico para hidrolisar a CMC com o fim de continuar com os estudos de produção da enzima. A metodologia aplicada foi realizada de acordo com Harshvardhan et al., (2013) com modificações.

2.1.1 Meio de cultura e condições de crescimento inicial

Para a produção de celulase, foi utilizado o meio de cultura com a seguinte composição: 0,7% de extrato de levedura, 4g/L KH_2PO_4, 4g/L Na_2HPO_4, 0,2g/L $MgSO_4.7H_2O$, 0,001g/L $CaCl_2.2H_2O$, 0,004g/L $FeSO_4.2H_2O$ e H_2O destilada 1L (HARSHVARDHAN et al., 2013 com modificações). O pH do meio foi ajustado para 7,0 e adicionado 1% das fontes de carbono: bagaço de malte, bagaço de cana, casca de amendoim, casca de coco e CMC. O bagaço de malte, bagaço de cana de açúcar e casca de coco foram doações de agroindústrias localizadas na região, a casca de amendoim e as aparas de papel foram coletadas de forma particular. Os resíduos foram macerados para diminuir o tamanho das partículas a serem colocadas nas amostras, as quais foram constituídas por frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura e 1% das fontes de carbono. As amostras foram esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 minutos, posteriormente foram inoculados com 1% de uma cultura de *Bacillus smithii* QT03 crescida por 24h em meio de cultura LB. Os frascos foram colocados em agitador rotativo a 150 rpm sob temperatura de 35°C. A cultura estoque foi mantida em placas contendo meio ágar LB, com 24h de

crescimento a 35°C e mantidas em refrigério.

Conforme os avanços do estudo, os parâmetros nutricionais e físicos de crescimento do microrganismo foram adaptados de acordo com os resultados obtidos. Os quais consistiram nas fontes de carbono e nitrogênio e suas respectivas concentrações, tempo, temperatura, velocidade de agitação e pH do meio incubado e tamanho de inóculo.

2.1.2 Determinação da atividade celulolítica

Para a remoção das células, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posterior a centrifugação, o sobrenadante (extrato bruto enzimático – EBE) foi mantido a 4°C até a realização dos testes de dosagem da atividade enzimática.

A atividade de endo-β-1,4-glucanase (EG) foi determinada, incubando-se 0,5 mL de CMC a 1% em solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) com 0,25 mL do EBE sob temperatura de 55°C. Após de 30 min, 0,75 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado a mistura reacional e, em seguido, aquecido em banho-maria a 100°C por 5 minutos. As amostras resultantes foram resfriadas à temperatura ambiente e adicionou-se 2 mL de água destilada. Em seguida fez-se a leitura da absorbância a 540 nm. A metodologia aplicada foi realizada de acordo com Tabssum et al., (2018) com modificações.

Para a determinação da atividade enzimática foi elaborada uma curva padrão com concentrações conhecidas de glicose. Uma unidade de atividade da enzima celulase foi definida como a quantidade de enzima que poderia hidrolisar CMC e liberar 1 µmol de glicose por minuto a 55°C (NELSON, 1944).

2.1.3 Resíduos agroindustriais como fontes de carbono para a produção de celulase

A determinação da melhor fonte de carbono foi realizada incubando-se *Bacillus smithii* QT03 em meio de cultura (descrito no item 2.1.1) contendo 1% dos seguintes resíduos: bagaço de cana, bagaço de malte, casca de coco, casca de amendoim, aparas de papel e CMC, como controle.

As amostras foram retiradas nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 h a fim de identificar o melhor tempo de incubação da bactéria para a produção da enzima.

2.1.4 Efeito da concentração de bagaço de malte como fonte de carbono na produção de celulase

Uma vez identificado o melhor resíduo agroindustrial, foram realizados testes para determinar a concentração ideal da fonte de carbono para a produção de celulase. A bactéria foi cultivada em meio de cultura (descrito no ítem 2.1.1) com as seguintes concentrações de bagaço de malte: 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4%, sob temperatura de 35°C e 150 rpm durante 48 horas.

2.1.5 Efeito da temperatura de crescimento do microrganismo na produção da celulase

A influência da temperatura de incubação da bactéria para a produção enzimática foi realizada cultivando-se o microrganismo em diferentes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C por 48 h e agitação a 150 rpm, considerando as condições otimizadas nos testes anteriores.

2.1.6 Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de celulase

A bactéria foi cultivada em meio de cultura com valores de pH de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0 para verificar o efeito do pH inicial do meio de cultura na produção da enzima celulase. Os valores de pH do meio foram ajustados com HCl e NaOH (1 $mol.L^{-1}$) antes da esterilização.

2.1.7 Efeito do tamanho do inóculo na produção de celulase

A bactéria foi inoculada em diferentes volumes para estudar a influência da concentração do inoculo no meio de cultura na produção da enzima celulase. As concentrações testadas foram: 1; 2; 5 e 10% de inoculo.

2.1.8 Efeito da fonte de nitrogênio do meio de cultura na produção de celulase

A influência do nitrogênio na produção de celulase foi estudada utilizando-se diferentes fontes na concentração de 0,7% no meio de cultura, a saber: extrato de levedura, nitrato de sódio, extrato de carne, molibdato de amônio, peptona bacteriológica, sulfato de amônio e triptona.

2.1.9 Efeito da concentração de extrato de carne como fonte de nitrogênio na produção de celulase

Após a obtenção da melhor fonte de nitrogênio na produção de celulase, foi estudada a melhor concentração da fonte de nitrogênio no meio de cultura, avaliando-se os percentuais de 0,5; 0,7; 1; 1,5 e 2%.

2.1.10 Efeito da velocidade de agitação do meio de cultura para a produção de celulase

A influência da aeração do meio de cultura para a produção de celulase foi avaliada testando diferentes velocidades de agitação do meio de cultura, a saber: 100; 150; 200 e 250 rpm por 48 h na temperatura de 35°C.

2.1.11 Análise estatística

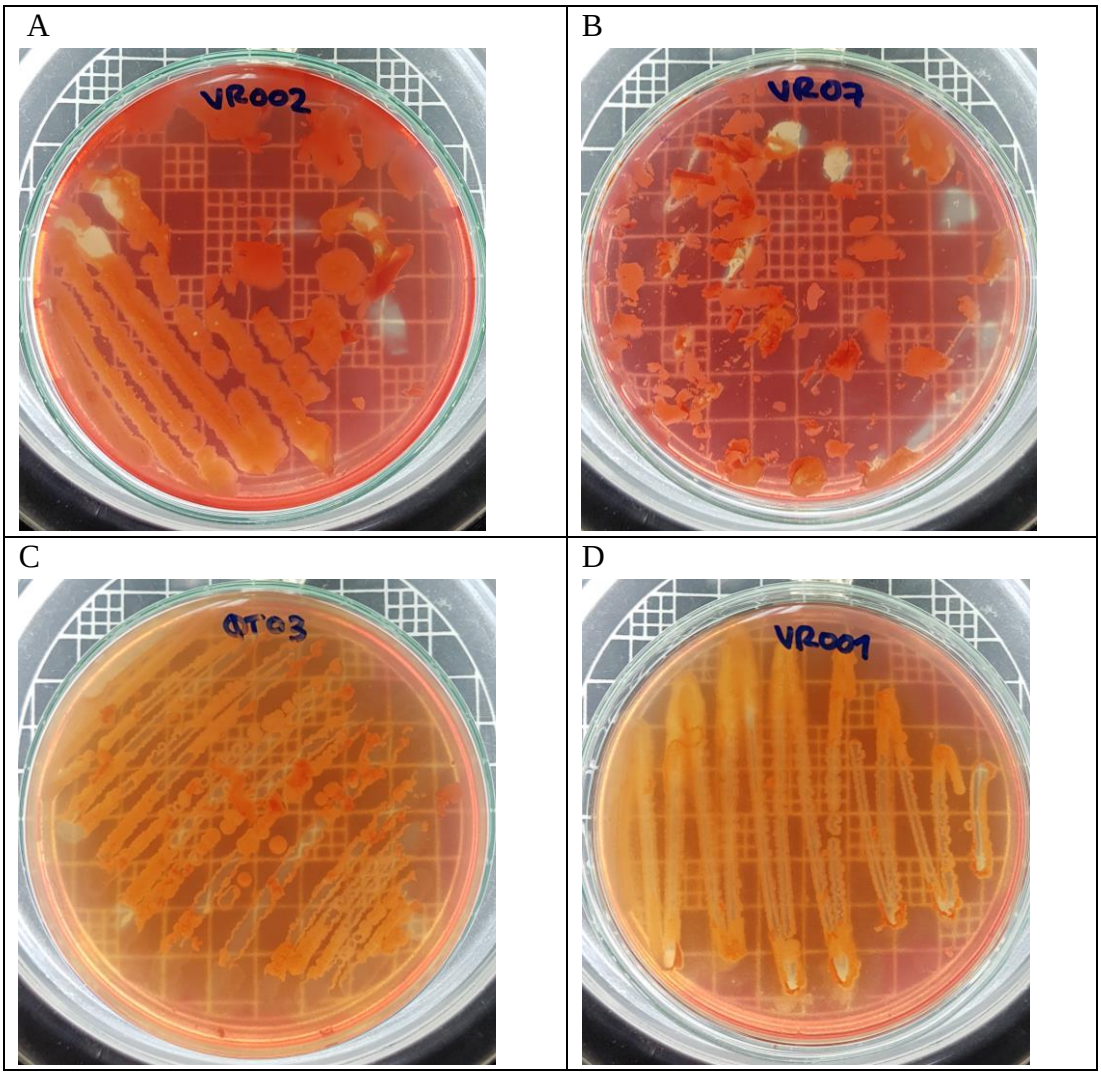
Todos os experimentos foram realizados em triplicata em delineamento inteiramente ao acaso e submetidos a análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tuckey com significância de 5% utilizando o software para cálculos estatísticos SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DO MICRORGANISMO CELULOLÍTICO

Após incubação de 4 cepas bacterianas (*Geobacillus caldoxylociliticus* VR07, *Bacillus pumilus* VR001, *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, *Bacillus smithii* QT03) no meio de cultura ágar LB contendo CMC 1% a 35°C por 48 h, foi selecionada a cepa que cresceu vigorosamente e mostrou potencial para hidrolisar a CMC com o intuito de continuar com os estudos de produção da enzima celulase (Figura 8). A atividade hidrolíticas do CMC foi revelada pelo tamanho da zona clara ao redor das bactérias.

Figura 8. Potencial celulolítico das cepas bacterianas: A. *B. amyloliquefaciens* VR002, B. *Geobacillus caldoxylociliticus* VR07, C. *B. smithii* QT03 D. *B. pumilus* VR001, incubadas em meio ágar LB contendo CMC 1% durante 48 h, a 35°C submetidas ao teste Vermelho Congo



Como é possível observar na Figura 8, *B. amyloliquefaciens* VR002 (Fig. 8A) possui apenas umas pequenas áreas claras no meio de cultura ao redor do crescimento, demonstrando pouco potencial para hidrolisar a CMC presente no meio. Esta bactéria é amplamente estudada para a produção de enzimas. Silva e Santos (2012), avaliaram a produção de enzimas amilolíticas por fermentação submersa utilizando a *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 obtendo valores de 3,4 $U.mL^{-1}$ com farinha de pupunha e 196 $U.mL^{-1}$ com a torta de macaúba como substratos. Corbolan (2019) avaliou o desempenho de *B. amyloliquefaciens* VR002 para produção de α-amilase demonstrando que a otimização das condições de cultivo e do meio de cultura influenciaram positivamente a produção e a atividade da enzima. Também existe evidência de produção de celulase com *B. amyloliquefaciens* UNPDV-22, no estudo de Vasudeo e Lew (2011), foi demonstrada uma ótima produção de celulase obtida na fermentação do meio contendo farelo de trigo, farelo de soja e dextrina de malte, alcançando uma produção de 11,23 $U.mL^{-1}$ após o processo de purificação da enzima, contrário ao teste desenvolvido nesta pesquisa, onde não foi visualizada o potencial para produzir celulase.

Por outro lado, *G. caldoxylociliticus* VR07 (Fig. 8B) presentou pequenas áreas claras ao redor de sua zona de crescimento, demostrando assim pouca atividade hidrolítica do CMC. Até o momento, não existe na literatura evidência de produção de enzima celulase com esta bactéria.

A cepa do *B. smithii* QT03 (Fig. 8C) apresentou áreas claras não apenas na zona de crescimento, mas em toda a placa, alterando a cor do reagente Congo Vermelho para uma cor laranja clara, demonstrando ser uma cepa bacteriana com alto potencial para hidrolisar CMC, por tanto foi selecionada para continuar com o trabalho de produção da enzima celulose. Na literatura não existe evidência de produção da enzima celulase com esta bactéria, porém existem estudos de produção e purificação de lipase (LAILAJA e CHANDRASEKARAN, 2013) e endoinulinase (GAO et al, 2009), o que torna interessante para continuar os estudos de produção de celulase com esta bactéria.

B. pumilus VR001 (Fig. 8D), apresentou áreas muito claras no espaço de crescimento bacteriano, o que demostra bom potencial hidrolítico de CMC. Esta bactéria também é muito estudada para produção de enzimas, por exemplo Battam et al., (2007), estudaram a produção de xylanase com cepas de *Bacilus pumilus*, depois da otimização de vários parâmetros de produção e a purificação da enzima, foi obtida uma atividade de 5.4 $U.mL^{-1}$. Poorna e Prema, (2007) também estudaram a produção de enzimas com esta bactéria utilizando farelo de trigo

como substrato, obtendo resultados favoráveis na produção de xylanase. Em relação a produção de celulase, Ariffin et al., (2006) testaram a cepa *Bacillus pumilus* EB3 utilizando CMC como substrato, alcançando uma produção máxima de 0,079 $U.mL^{-1}$ da enzima crua. No entanto, Kotchoni et al., (2003) alcançaram uma produção de 1,2 $U.mL^{-1}$ de celulase com a mutação genética de *B. pumilus* BpCRI6.

3.2 DETERMINAÇÃO DO MELHOR RESÍDUO AGROINDUSTRIAL COMO FONTE DE CARBONO E TEMPO DE INCUBAÇÃO ÓTIMO PARA PRODUÇÃO DA CELULASE

A bactéria *B. smithii* QT03 foi cultivada em meio de cultura contendo diferentes resíduos agroindustriais como substratos na concentração de 1% nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 h. As condições de cultivo foram 35 °C, pH 7,0 e 150 rpm.

Figura 9. Produção da enzima celulase por *B. smithii* QT03 crescido em diferentes intervalos de tempo, em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono (1,0%), a saber: bagaço de cana, bagaço de malte, casca de amendoim, casca de coco, aparas de papel e CMC. O microrganismo foi crescido em meio de cultura nas condições de 35 °C e 150 rpm de agitação. Tempos de incubação da bactéria: 24, 48, 72, 96 e 120 h.

Considerando a Figura 9 pode-se observar que a produção de celulase na presença de bagaço de malte no meio de cultura foi superior as demais fontes de carbono estudadas, além de mais é possível afirmar que em todos os tempos de incubação estudados, o bagaço de malte apresenta a maior produção de celulase. Pode-se observar que a produtividade da casca de coco foi a menor em todos os tempos estudados em comparação com o bagaço de malte, igualmente o bagaço de cana e os restos de papel apresentam produtividade menor de celulase comparando com o bagaço de malte. A casca de amendoim também apresentou produtividade menor ao bagaço de malte nas 120 h testadas, porém após as 24 h de incubação a produção foi superior ao bagaço de cana, casca de coco e papel, mostrando-se um substrato interessante para maiores estudos.

Quanto ao tempo de incubação e a produtividade de celulase quando cultivada em bagaço de malte, pode-se observar que nas 48h a produção de enzima aumentou consideravelmente. Manteve-se estável nas 72 e 96h e apresentou uma leve diminuição nas 120 h de incubação, definido-se o tempo de 48h como ideal para a experimentação.

Atualmente, são desenvolvidas várias pesquisas sobre produção de enzimas utilizando materiais lignocelulósicos e é possível observar que a celulase pode ser produzida utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, incluindo o bagaço de malte, utilizado nesta pesquisa.

Mrudula (2011), estudou a produção de celulase com o fungo *A. niger* sob fermentação submersa e sólida utilizando fibra de coco como substrato. A máxima produção de celulase foi obtida depois de 72 h de incubação em SSF (estado sólido de fermentação) e 96 h em SmF (fermentação submersa), as atividades máximas de CMCase foram de 8,89 $U.mg^{-1}$ e 3,29 $U.mL^{-1}$ respectivamente, demonstrando-se grande capacidade de produção da enzima crua (sem purificação). A maioria das celulases comerciais e de laboratório foram produzidas por fungos devido as suas altas atividades enzimáticas, mas vários estudos recentes sugerem que as bactérias também têm um excelente potencial de produção de celulase (SHAIKH et al., 2013; KAZEEM et al., 2017; AZADIAN et al., 2017; SALIM et al., 2017; TABSSUM et al., 2018; SOUII et al., 2018).

Em termos de estudos com bactérias, Sadhu et al., (2013), verificaram que a produção de celulase com *Bacillus* sp. depende da natureza da fonte de carbono usada nos meios de cultura. A CMC promoveu o rendimento máximo (0,93 $U.mg^{-1}$) em comparação

com os resíduos agrícolas ou restos de papel. Embora a CMC tenha apresentado o maior rendimento e produção de enzimas, os resíduos como casca de laranja (0,60 $U.mL^{-1}$) e bagaço de cana (0,12 $U.mL^{-1}$), também podem ser utilizados para a produção de celulases. Comparando os resultados obtidos neste trabalho, a bactéria *B. smithii* QT03 também produziu celulase com CMC como fonte de carbono, porém, utilizando bagaço de malte a produção foi maior em todos os tempos estudados.

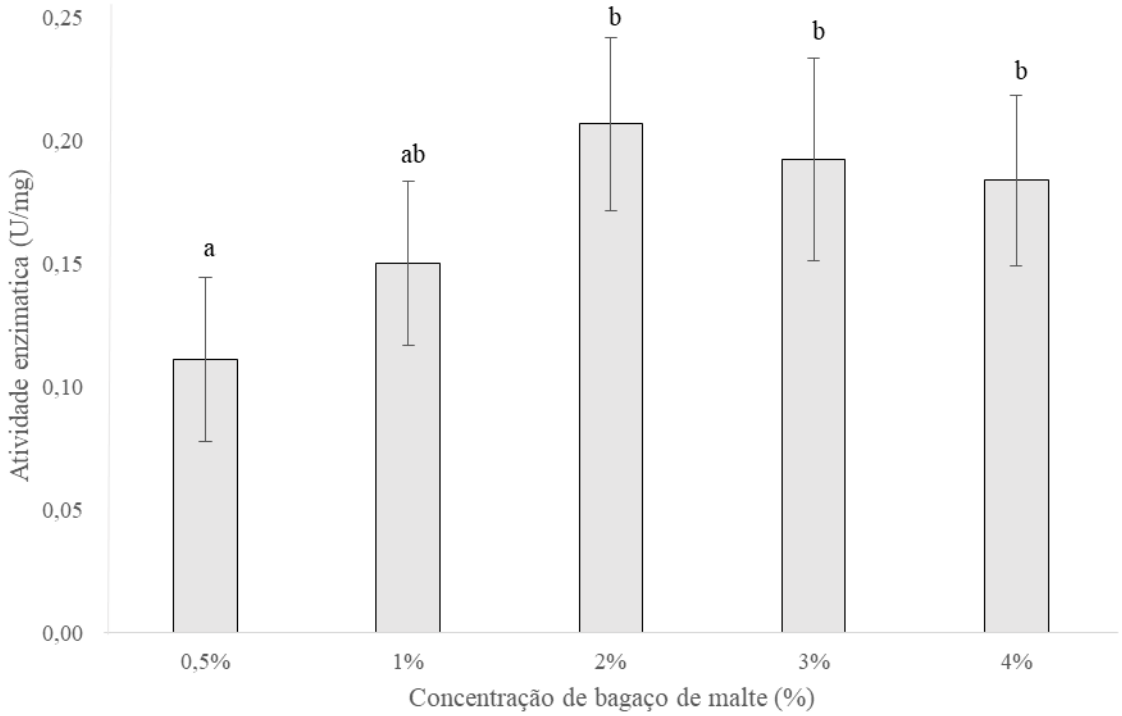
De acordo com os resultados de Ladeira et al., (2014), a bactéria *Bacillus* sp. produz a enzima celulase no meio de cultura líquido contendo bagaço de cana e milho como fontes de carbono. A atividade máxima da enzima crua (0,83 $U.mL^{-1}$) foi obtida após de 120 h de incubação da bactéria no meio de cultura. Salim et al., (2016) estudaram a produção da enzima celulase com *Bacillus* sp. TMF-1 com diferentes resíduos agrícolas, obtendo como resultado uma atividade máxima de 1,19 $U.mL^{-1}$ de enzima crua utilizando farelo de milho como fonte de carbono após 72 h de incubação. Pode-se observar que os tempos de incubação para produção máxima são na maioria nos tempos de 72 a 120 h, neste estudo com *B. smithii* QT03, foi possível obter a produção máxima nas 48 h de incubação.

No estudo de Alita et al., (2019), foi testada a produção de celulases com o fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 348 utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono (bagaço de cana, bagaço de malte e casca de arroz) suplementados com licor de milho, farelo de soja e quitina. O bagaço de malte suplementado com farelo de soja foi o substrato que proporcionou a maior atividade da β-1,3-glucanase e a maior atividade endocelulase foi obtida com bagaço de malte sem suplementação. A produção máxima das enzimas foram obtidas após de 192 h em estado sólido de fermentação. Tempo muito maior em comparação com os resultados nesta pesquisa, onde a produção máxima de celulase foi obtida nas 48 h de incubação utilizando bagaço de malte como fonte de carbono.

3.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE CELULASE

Uma vez que o bagaço de malte foi identificado como melhor fonte de carbono, foram testadas as concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 4% deste resíduo no meio de cultura descrito no item 2.1.2 para avaliar a melhor concentração para produção de celulase. Os resultados são representados na Figura 10 e a ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tuckey (5%) são apresentadas no Anexo 1.

Figura 10. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivada em meio de cultura contendo bagaço de malte como fonte de carbono em diferentes concentrações. Microrganismo crescido na temperatura de 35° C e 150 rpm de agitação por 48 h. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%.



De acordo com os resultados obtidos na análise de variância e na comparação de médias (Anexo 1) pode-se observar que a variação das concentrações de fonte de carbono influenciou na produção de celulase. Não foi observada diferença estatística entre as concentrações 1, 2, 3 e 4%, porém a concentração de 0,5 é igual estatisticamente com 1% e difere das restantes com menor produção de celulase.

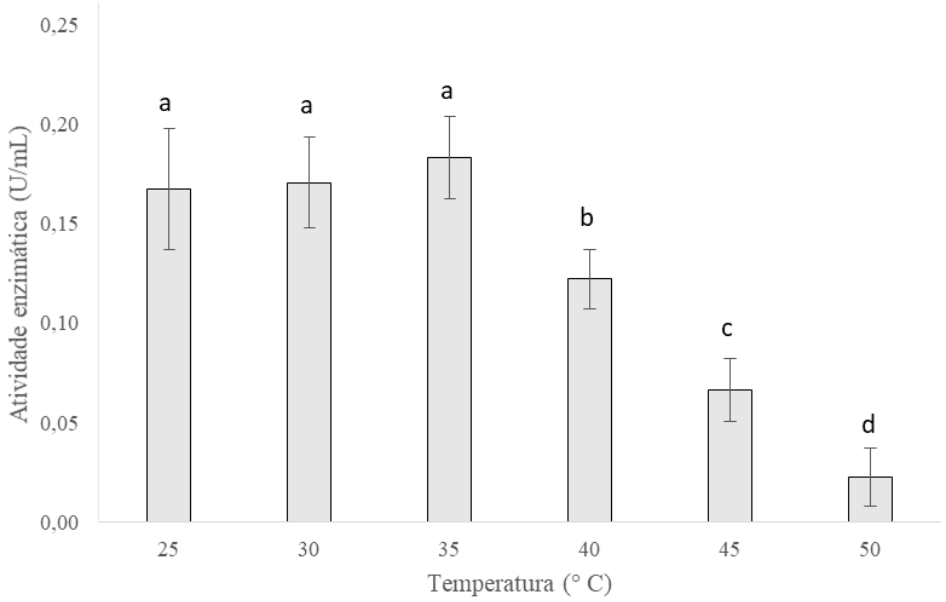
Observa-se a semelhança com outros estudos de produção de celulase, onde foram utilizados diversos resíduos agroindustriais na concentração de 2%. Por exemplo, Gaur e Tiwari (2015) e Bohra et al., (2018) utilizaram 2% de bagaço de cana para produção de celulase por *B. vallismortus* e *Paenibacillus polymyxa* respectivamente. Também o estudo de Irfan et al., (2017) coincide com a concentração de 2% de casca de batata como fonte de carbono com *B. subtilis* K-18 para produção de celulase.

Neste trabalho foi considerada a concentração de 2% da fonte de carbono como a melhor para produção de celulase com *B. smithii* QT03.

3.4 EFEITO DA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO NA PRODUÇÃO DE CELULASE

Para a definição da temperatura ótima de cultivo da bactéria *Bacillus smithii* QT03 visando a melhor produção da enzima celulase, incubou-se o microrganismo nas temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45°C pelo período de 48 h a 150 rpm. Os resultados estão representados na Figura 11 e a ANOVA e comparação de médias no Anexo 2.

Figura 11. Atividade da enzima celulase produzida por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono em diferentes temperaturas de cultivo. Microrganismo crescido por 48 h e 150 rpm de agitação. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%.



De acordo com os resultados da análise de variância e a comparação de médias (Anexo 2), observou-se que o as temperaturas 25, 30 e 35°C não apresentam diferenças significativas para a produção de celulase. Porém, a partir de 40°C de incubação a atividade enzimática diminuiu com o aumento da temperatura apresentando diferenças significativas entre cada tratamento. As a menor produção foi observada a 50°C.

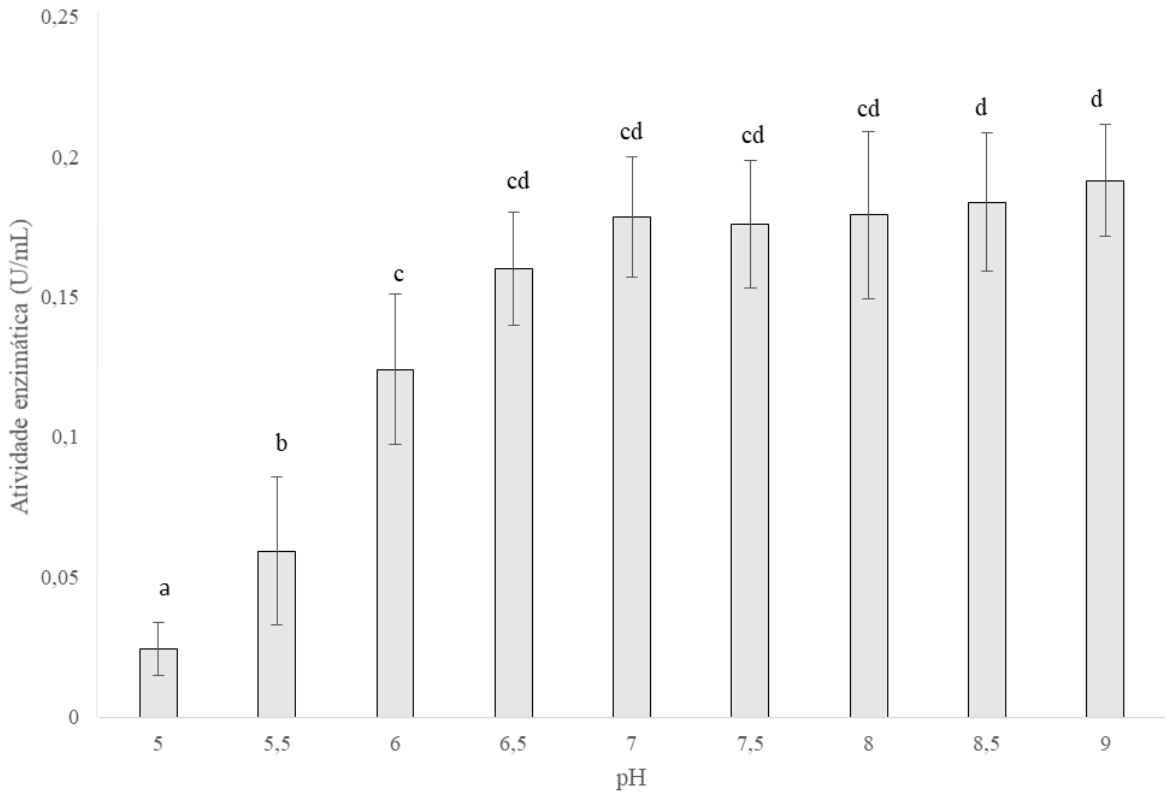
Na literatura é possível verificar que existe uma amplia variação de temperaturas ideais de produção de celulase dependendo da espécie do microrganismo. Irfan et al., (2012) observaram a temperatura ótima de 60°C para produção de celulase com *Cellulomonas sp*. ASN2 utilizando casca de batata como fonte de carbono; Sethi et al., (2013) e Das et al., (2010) utilizaram as temperaturas de 40 e 42°C para as bactérias *B. subtilis* e *Bacillus* sp. e Kazeem et al., (2017) produz a máxima quantidade de celulase a 50°C com *Bacillus licheniformis* 2D55, diferentes ao resultado obtido neste trabalho, onde temperaturas acima dos 35°C diminuíram a produção da enzima.

Segundo a literatura, observou-se que as temperaturas ótimas de crescimento para produção de celulase varia dependendo do microrganismo produtor, nesta pesquisa foi considerada a temperatura ideal de crescimento 35°C por ser a melhor para a solubilidade do substrato e facilitar o crescimento da bactéria *B. smithii* QT03, que tem como temperatura ótima de crescimento 55°C (BOSMA et al., 2016).

3.5 EFEITO DO PH INICIAL DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE CELULASE

Para a determinação do pH ótimo para a produção da enzima celulase por *Bacillus smithii* QT03, os valores de pH do meio de cultura foram ajustados antes da esterilização. Os valores de pH testados foram: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0 no meio de cultura com bagaço de malte (2%). Os resultados são expostos na Figura 12 e a ANOVA e comparação de médias no Anexo 3.

Figura 12. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono, em diferentes valores de pH. O microrganismo foi crescido por 48 h, a 35 °C e 150 rpm de agitação. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%.



De acordo com os resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tuckey 5% (Anexo 3), existe evidência estatística de que a produção de celulase por *Bacillus smithii* QT03 é menor em faixas de pH ácidos e aumenta com as faixas de pH neutras e alcalinas. Assim, na comparação de médias, não são observadas diferenças estatísticas entre os pH 6,5 a 9, obtendo a produção máxima de celulase em toda essa faixa de pH do meio de cultura.

Como pode ser observado na Figura 12, os meios de cultura com pH inicial ácido 5 e 5,5 apresentaram médias de produção de enzimas inferiores e com diferenças significativas entre as demais. A partir do pH 6,5 foi obtida a máxima produção de celulase e não foi observada diferencia estatística na faixa até o pH 9.

Em comparação com outros estudos de produção de celulases com bactérias, Meng et al., (2014) e Irfan et al., (2017) observaram melhores rendimentos de produção de celulase por *B. subtilis* com o pH 5,5 e 5 respectivamente, ao contrário da bactéria *Bacillus smithii* QT03 que apresenta baixa produção de celulase nessa faixa de pH.

Quanto a resultados com pH neutro, Irfan et al., (2012) mostram que o pH ideal para a atividade da endoglucanase com a bactéria *Cellulomonas* ASN2 foi 7,5. Aumentar ou diminuir o pH além disso resultou em declínio na atividade enzimática. De acordo aos resultados de Das et al., (2010), o pH ótimo do meio de cultura para a produção de celulases com *Bacillus sp* foi de 7. Ao contrário dos resultados com *B. smithii* QT03 que foi obtida a produção máxima na faixa de pH 6,5 – 9, nos estudos citados, a produção de celulase era menor com pH acima de 7. Porém também existem registros de produção de celulase em meios alcalinos. No estudo de Tabssum et al., (2018), foi testada a bactéria *B. cereus*, observando o pH ótimo do meio igual a 9.

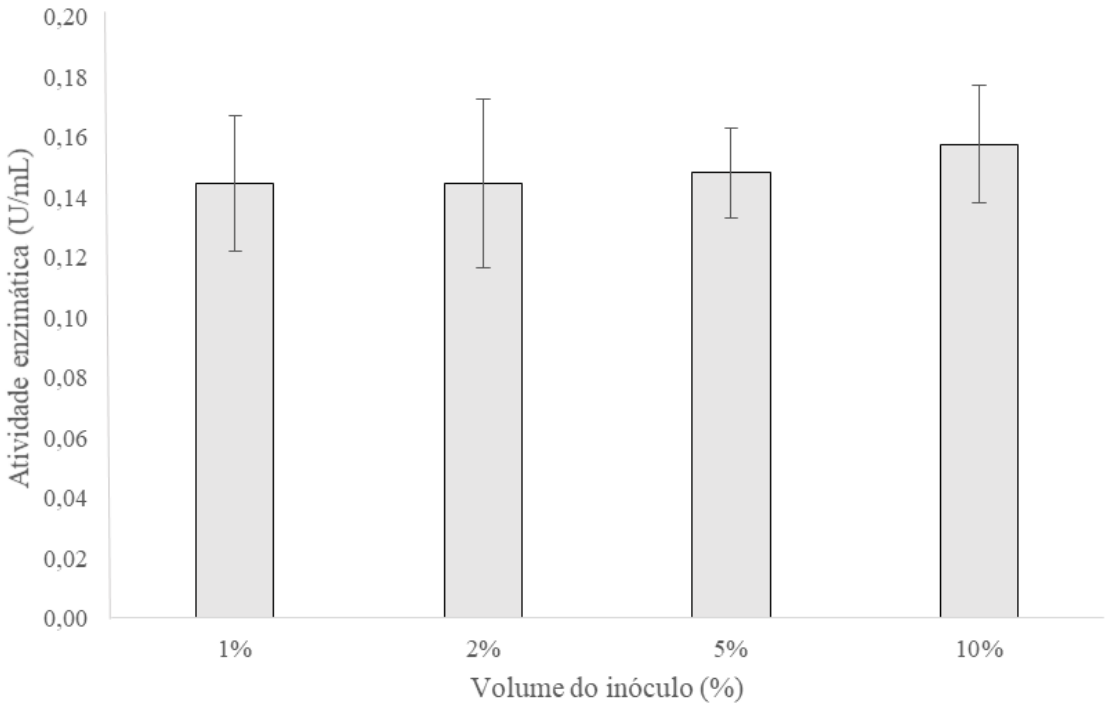
Os resultados desta e as outras pesquisas, demonstra que o pH inicial ótimo do meio de cultura para produção de celulases varia de acordo as espécies produtoras. Conforme aos resultados obtidos, selecionou-se o pH inicial 7 considerando que o meio de cultura sem ajustar apresenta valor aproximado de pH 7. Procurando simplificar o procedimento para obter os resultados máximos com eficiência, foi escolhido esse valor de pH como o melhor para produção de celulase com *B. smithii* QT03.

3.6 TAMANHO DO INÓCULO

A influência da concentração de tamanho do inoculo no meio de cultura na produção de celulase foi determinada adicionando as concentrações de 1; 2; 5 e 10% ao meio de cultura nas condições descritas no item 2.1.2, porém com as condições otimizadas dos testes anteriores.

Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 13. A ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tuckey (5%) são apresentados no Anexo 4.

Figura 13. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono, pH inicial do meio 7, inoculado com diferentes concentrações de inóculo. O microrganismo foi crescido por 48 h, a 35°C, 150 rpm. As barras representam o desvio padrão.



Como pode ser observado na Figura 13, a produção da enzima celulase manteve-se igual em todas as concentrações de inóculo. Segundo os resultados da ANOVA (Anexo 4) também foi possível observar que não existe diferença significativa entre os tratamentos aplicados, sendo a produção de celulase a mesma com todos os volumes de inóculo.

O tamanho do inóculo evidencia a capacidade de uma população microbiana de iniciar o crescimento em um ambiente nutritivo específico. Uma quantidade menor de inóculo pode levar a uma fase de atraso mais longa e atrasar a síntese enzimática. Por outro lado, um número maior de células resulta em rápida proliferação e exaustão do substrato, o que pode não resultar em maior produção da enzima (Kapoor et al., 2016).

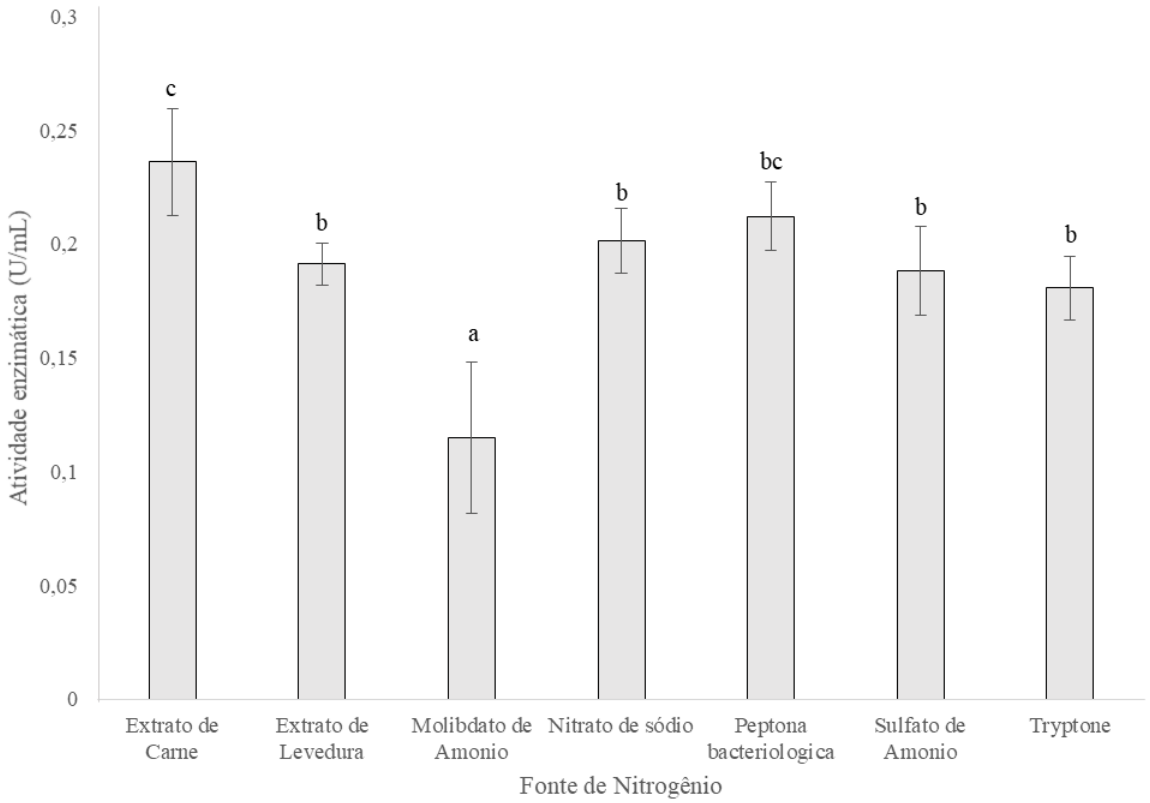
Segundo Das et al., (2010), a quantidade de inóculo usada para cultivo também afeta a produção de celulase. O efeito do tamanho do inóculo na produção de celulase pela bactéria *Bacillus* sp. foi examinado e verificou-se que 7% de inóculo resulta em maior atividade enzimática. Em comparação com os resultados obtidos neste trabalho com *B. smithii* QT03, onde não foram observadas diferencias entre as concentrações testadas. Os autores apontam que a distribuição do oxigênio dissolvido e a absorção mais eficaz de nutrientes contribuem para a alta produção da enzima. Quando o tamanho do inoculo é muito pequeno, um número insuficiente de bactérias leva à redução da quantidade de celulase secretada. Nos tamanhos de 10 e 13% de inoculo, a atividade diminui, sugerindo que tamanhos maiores de inóculo resultam em redução de oxigênio dissolvido.

Nos trabalho de Shaikh et al., (2013), Tabssum et al., (2018) e Irfan et al., (2017), foram obtidos resultados similares no tamanho de inóculo para produção de celulase, relatam que o inóculo a 2% deu a melhor produção de celulase com as bactérias *Pseudomonas* sp e *Bacillus* sp (SHAIKH et al., 2013), *B. cereus* (TABSSUM et al., 2018) e *B. subtilis* K-18 (IRFAN et al., 2017). No entanto, Korany et al., (2017) observou a concentração de 1% do inoculo no meio de cultura como o ótimo para a produção de celulase com *Halobacillus sp* QLS 31. Em conformidade com os resultados obtidos com *B. smithii* QT03, o tamanho do inoculo não apresentou grandes variações entre as porcentagens testadas, considerando os resultados de pesquisas anteriores, foi determinada a concentração de 2% como o volume representativo e adequado de inóculo para produção da celulase.

3.7 EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE CELULASE

A fim de se verificar a melhor fonte de nitrogênio para otimizar a produção de celulase por *B. smithii*, foram testadas diferentes fontes de nitrogênio na concentração de 0,7%, a saber: extrato de carne, molibdato de amônio, nitrato de sódio, peptona bacteriológica, sulfato de amônio e triptona. O resultado pode ser observado na Figura 14 e a ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tuckey (5%) no Anexo 5.

Figura 14. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 0,7% de diferentes fontes de nitrogênio. Microrganismo crescido por 48 h, a 35°C, 150 rpm em meio de cultura com pH inicial 7. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%.



Na Figura 14, observasse que o molibdato de amônio foi a fonte de nitrogênio que apresentou a média de atividade enzimática menor entre todas as testadas. Triptona, sulfato de amônio, extrato de levedura, nitrato de sódio não apresentaram diferença estatística entre elas na produção de celulase. A peptona bacteriológica apresentou a média igual e maior das fontes anteriormente mencionadas e o extrato de carne apresentou média estatisticamente igual a peptona bacteriológica e maior das restantes. A tabela de comparação de médias pode-se observar no Anexo 5. De acordo aos resultados estatísticos, foi considerado o extrato de carne na concentração de 0,7% a melhor fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultura para obter a máxima produção de enzimas.

Fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico são fatores importantes que sustentam o crescimento bacteriano e a produção de enzimas. De acordo com os estudos de Azadian et al., (2016) e Sethi et al., (2013) para produção de celulase por *Bacillus sonorensis* HSC7 e *Pseudomonas fluorescens*, entre as diferentes fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico testadas, $(NH_4)_2SO_4$ (Sulfato de Amonio) foi considerada a fonte de nitrogênio apropriada para a produção de celulase. No entanto, no estudo com *B. smithii* QT03 o $(NH_4)_2SO_4$ teve como resultado uma produção menor ao extrato de carne.

Com relação às fontes de nitrogênio testadas por Meng et al., (2014) para produção de celulase com *B. subtilis* BY-3 a atividade da enzima foi indetectável quando a fonte de nitrogênio inorgânico $(NH_4)_2SO_4$ foi utilizada, no entanto, estudo com *B. smithii* QT03, foi observada a produção de celulase com todas as fontes de nitrogênio testadas, mesmo com o molibdato de amônio, que foi a fonte que apresentou menor produção (0,11 $U.mL^{-1}$). No estudo de Meng et al., (2014) o farelo de soja foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de celulase, evidenciando que os resíduos agroindustriais também podem ser utilizados como fontes de nitrogênio para produção de enzimas.

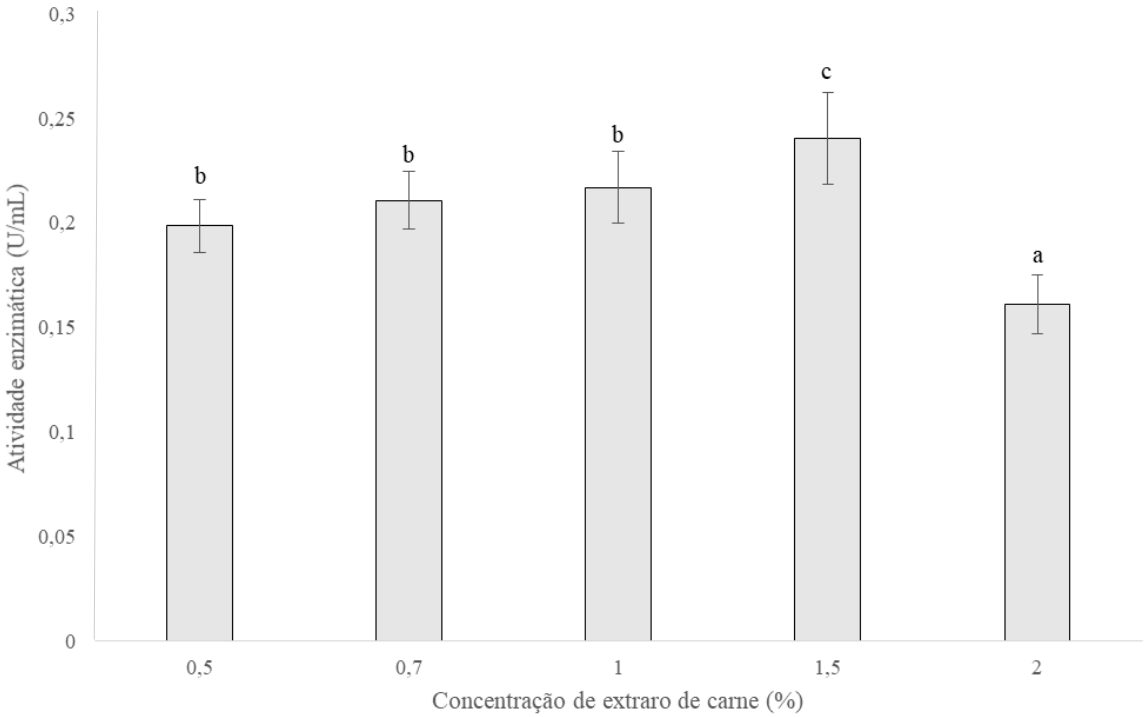
Assim, Shankar e Isaiarasu (2011), testaram a bactéria *B. pumilus* para produção de celulase, onde a melhor fonte orgânica de nitrogênio foi o extrato de malte e a melhor fonte inorgânica foi o molibdato de amônio, contrário com os resultados deste trabalho com *B. smithii* QT03, o qual o molibdato de amônio foi a fonte de menor produção. Neste estudo, o bagaço de malte foi utilizado como fonte de carbono, porém no estudo de Shankar e Isaiarasu (2011), o extrato de malte foi a melhor fonte de nitrogênio, observando que os resíduos derivados do malte podem ser utilizados como fontes de carbono e nitrogênio para produção de celulase.

3.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE CELULASE

Para a otimização do meio de cultura para a produção de celulase, foram testadas diferentes concentrações de extrato de carne no meio de cultura: 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 e 2,0%. O extrato de carne foi identificado como a melhor fonte de nitrogênio.

Os resultados foram representados pela média dos valores obtidos e apresentados na Figura 15. Os resultados da ANOVA e comparação de médias do teste de Tuckey (5%) são apresentados no Anexo 6.

Figura 15. Produção de celulase por *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne e 2% de bagaço de malte como fonte de carbono. O microrganismo foi crescido por 48 h a 35°C, 150 rpm e pH inicial do meio de cultura 7. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%.



Pode-se observar na Figura 15 que a concentração de extrato de carne influenciou positivamente na produção da enzima. A concentração de 2% de extrato de carne teve uma atividade enzimática estatisticamente menor as demais concentrações; as concentrações de 0,5; 0,7 e 1,0% de extrato de carne apresentaram médias maiores quando comparadas com a concentração de 2% e iguais entre elas. A concentração de 1,5% de extrato de carne no meio de cultura apresenta a média superior de produção enzimática. A tabela da comparação de médias é apresentada no Anexo 6.

Foi considerada a concentração de 1,5% de extrato de carne no meio de cultura como a ideal por apresentar a máxima produção de celulase em comparação com as outras concentrações testadas (0,24 $U.mL^{-1}$). Em comparação com outros estudos, pode se observar uma grande variação entre as concentrações de fontes de nitrogênio utilizadas para produção de celulases.

De acordo com o estudo de Das et al., (2010) para a produção de celulase por *Bacillus* sp., verificou-se que a concentração de peptona como fonte de nitrogênio a 2% foi mais eficaz para a produção ideal da enzima. No estudo com *B. smithii* QT03, com a concentração de 2% da fonte de nitrogênio a produção de celulase era significativamente menor a 1,5% (0,16 $U.mL^{-1}$).

A diferença dos resultados obtidos neste trabalho, Tabssum et al., (2018) e Irfam et al (2017), observaram melhor produção de celulase utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Tabssum et al., (2018), verificaram o extrato de levedura na concentração de 0,5% como a concentração ótima no meio de cultura para produção de celulase com *B. cereus*. No entanto, Irfan et al., (2017), observaram melhor produção de celulase por *B. subtilis* K-18 com o meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura. Neste trabalho com *B. smithii* QT03, as concentrações da fonte de nitrogênio de 0,5 e 1% apresentaram produções menores de celulase (0,19 e 0,21 $U.mL^{-1}$) comparando com a concentração de 1,5%.

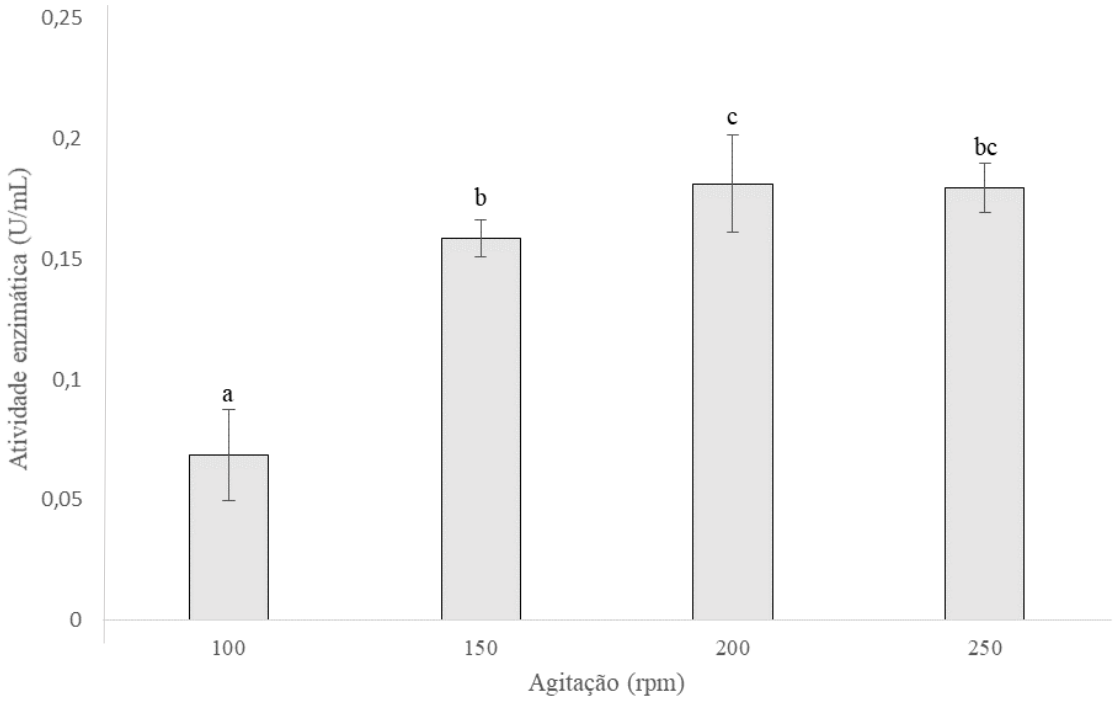
Gao et al., 2009 estudaram a produção da enzima inulinase por *B. smithii* T7. Nos resultados da otimização do meio de cultura acharam que o nitrato de amônio na concentração de 0,5% foi ótimo para a produção da enzima. Em comparação com a pesquisa desenvolvida com *B. smithii* QT03, a produção de inulinase por *B. smithii* T7 com extrato de carne foi a menor entre todas as fontes de nitrogênio testadas. E a concentração de 0,5% da fonte de nitrogênio apresentou médias de produção de celulase menores a de 1,5%.

3.9 DETERMINAÇÃO DA MELHOR VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE CELULASE

Para a otimização das condições de cultivo da bactéria *B. smithii* QT03 para aumentar a produção de celulase, foram estudadas diferentes velocidades de agitação. A velocidade de agitação é um parâmetro físico que influencia o nível de aeração do meio de cultivo, afetando o crescimento da bactéria. Para isso, a bactéria foi crescida no meio de cultura nas seguintes velocidades de agitação: 100, 150, 200 e 250 rpm.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram representados pela média dos valores obtidos, como pode ser observado na Figura 16. Os resultados foram submetidos a ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tuckey com grau de significância de 5% e são apresentados no Anexo 7.

Figura 16. Produção de celulase de *B. smithii* QT03 cultivado em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio em diferentes velocidades de agitação. Microrganismos crescido nas condições de 35°C por 48 h de crescimento. As barras representam o desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tuckey com significância de 5%.



É possível observar na Figura 16 que a velocidade de agitação do meio de cultura influenciou significativamente na produção de celulase. Segundo o teste de comparação de médias (Anexo 7), a velocidade de agitação de 100 rpm foi significativamente menor a todas as velocidades testadas. As velocidades 150 rpm e 250 rpm apresentam médias estatísticas iguais, mas 150 rpm difere de 200 rpm apresentando média de produção de celulase inferior. No entanto a velocidade de 200 rpm e 250 rpm são estatisticamente iguais na produção de enzima.

Foi considerada a velocidade de 200 rpm como a ótima para o cultivo de *B. smithii* QT03 já que a partir dessa velocidade de agitação é alcançada a maior produção de celulase.

Foram achadas na literatura registros da agitação utilizada para o crescimento de diversas bactérias para a produção de celulase, no caso de Vijayaraghavan e Vincent (2011), incubaram *Bacillus* sp. a 150 rpm. Também Tabssum et al., (2018) otimizaram as condições nutricionais e de crescimento do *B. cereus*, considerando a velocidade de agitação de 120 rpm como a melhor para produção de celulases. Similarmente, Souii et al., (2018) otimizaram o crescimento de quatro bactérias do gênero *Bacillus*, a saber: *B. mojavensis* AG21, *B. vallismortis* J77; *B. sonorensis* 7.26 e *B. safiensis* AJ49, utilizando a velocidade de agitação de 120 rpm para o crescimento de todas as bactérias. No entanto, no estudo com *B. smithii* QT03, o meio na faixa de 100 e 150 rpm de agitação resultou com uma produção de celulase significativamente menor comparada a 200 rpm.

Gao et al., (2009), testaram a produção de inulinase com *B. smithii* T7. Os resultados de agitação coincidem com este estudo de produção de celulase por *B. smithii* QT03, onde observaram um aumento significativo da produção de enzima em estado de agitação a 200 rpm. Os autores expõem que a taxa de rotação não afeta apenas a disponibilidade de oxigênio, mas também influencia a disponibilidade dos nutrientes no meio.

4 CONCLUSÃO

A otimização das condições do meio de cultivo influenciou positivamente a produção de celulase por *Bacillus smithii* QT03.

As condições ótimas do meio de cultura para produção de celulase por *B. smithii* QT03 foram: 2% de bagaço de malte como fonte de carbono, 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio e o pH do meio com valor 7. Além disso a concentração do inóculo favorável foi de 2%. Para o cultivo da bactéria, a temperatura adequada foi de 35° C, 200 rpm de agitação por 48 h de incubação. Esses resultados mostraram que todos os parâmetros com suas interações têm efeito significativo na produção de celulase.

A produção de celulase por *B. smithii* QT03 apresentou um aumento importante de atividade enzimática com a otimização do meio de cultivo, foi obtida uma produção máxima de 0,20 $U.mL^{-1}$ de celulase crua, demonstrando qualidades importantes de produção de celulase para continuar com a caracterização e purificação da enzima a fim de aumentar a produção até alcançar volumes industriais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALITA, B.; SPANNEMBERG, S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G.; TRES, M.; KUHN, R.; MAZUTTI, M. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2019. Vol 7. 7 p.

ARIFFIN, H.; ABDULLAH, N.; SHAH, U. K.; SHIRAI, Y. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus*. International Journal of Engeneering and Technology. Vol 3, n 1, p 47 – 53.

AZADIAN, F.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z.; HASSANSHAHIAN, M. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable celulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversión of lignocellulosic wastes. Journal of genetic engineering and biotechnology. 2017. v 15, p. 187 – 196.

BATTAN, B.; SHARMA, J.; DHIMAN, S. S.; KUHAD, R. C. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. Enzyme and Microbial Technology. 2007. Vol 41, p 733 – 739.

BISWAS, R.; PERSAD, A.; BISARIA, V. Production of cellulolytic enzymes. Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts. Firs Edition. 2014.

BOHRA, V.; TIKARIHA, H.; DAFALE, N. Genomically Defined *Paenibacillus polymyxa* ND24 for Efficient Cellulase Production Utilizing Sugarcane Bagasse as a Substrate. Appl. Biochem. Biotechnol. 2019. Vol 187, p 266 – 281.

BOSMA, E.; KOEHORST, J.; HIJUM. S.; RENCKENS, B.; VRIESENDORP, B.; WEIJER, A.; SCHAAP, P.; VOS, W.; OOST, J.; KRANENBURG, R. Complete genome sequence of thermophilic *Bacillus smithii* type strain DSM 4216. Extended genome report. 2016. Vol 11:52, 11 p.

CORBOLAN, B. C. Otimização da produção e caracterização de α-amilase produzida por *Bacillus amyloloquefaciens*. Volta Redonda, 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnología Ambiental) – Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2012. Disponível em < http://www.pgta.uff.br/images/stories/dissertacoes/pgta%20042.brisabella%20clara%20corbolan%20coca.pdf> Acesso em 15 ago 2018

DAS, A.; BHATTACHARYA, S.; MURALI, L. Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from cow dung. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2010. Vol 8, n 6, p 685 – 691.

GAO, W.; BAO, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; AN, L. Characterization of thermostable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. Applied biochemistry and biotechnology. 2009. Vol 157, p 498 – 506.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *B. vallismortis* RG07. BMC Biotechnology. 2015. Vol 15:19, p 1 – 12.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and caractherization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potencial agent for single step saccharification of seaweed biomass. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013, vol 93, p 51 – 56.

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. 2012. Turkish Journal of Biochemistry; 37 (3); 287 – 293.

IRFAN, M.; MUSHTAQ, Q.; TABSSUM, F.; SHAKIR, H.; QAZI, J. Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* k-18 for sacccharification using response surface methodology. AMB Express. 2017. Vol 7, 9 p.

KAZEEM, M.; SHAH, U. K.; BAHARUDDI, RAHMAN, N. A. A. Prospecting Agro-waste cocktail: supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *B. liccheniformis* 2D55. Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. Vol 182, p 1318 – 1340.

KAPOOR, M; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-wastes: Technical challenges and commercialization potencial. Agroindustrial wastes as feedstock for enzymes production.2016. Chapter 3, p 61 – 93.

KOTCHONI, O. S.; SHONUKAN, O.; GACHOMO, W. *Bacillus pumilus* BpCRI6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. African Journal of Biotechnology. 2003. Vol 2 (6), p 140 – 146.

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

LAILAJA, V. P.; CHANDRASEKARAN, M. Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS11. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013. Vol 29, p 1349 – 1360.

MARCO, E.; HECK, K.; MARTOS, E.; VAN DER SAND, S. Purification and characterization of a termostables alkaline celulase produced by *B. licheniformis* 308 isolated from compost. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2017. 12 p.

MENG, F; MA, L; JI, S; YANG, W; CAO, B. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulose producing bacterium on untreated plant biomass. 2014. Letters in Applied Microbiology, 2014. Vol. 59, 306-312.

MERINO, S.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. Merino ST, Cherry J. 2007. Adv Biochem Eng Biotechnol, 108, 95–120.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. Brazilian Journal of Microbiology. 2011, 42: 1119-1127.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Cincinnati, 1944. Institute for Medical Research of the Jewish Hospital, Deparment of Biological Chemistry, College of Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati, 1944.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Bioresourse Technology. 2019, vol 279, p 385 – 392.

PENHA, E.; VIANA, L.; GOTTSEHALK, L. M. F.; TERZI, S.; DE SOUZA, E. F.; CORDEIRO, S.; SANTOS, J. O.; SALUM, T. F. C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. Ciência Rural, Santa Maria. v 46, n4, p. 755-761, abr, 2016.

PREMALATHA, N.; GOPAL, N. O.; JOSE, P. A.; ANANDHAM, R.; KWON, S-W. Frontiers in Microbiology. 2015. Vol 6, Article 1046.

SADHU, S.; SAHA, P.; SEM, S.; MAYILRAJ, S.; MAITI, T. K. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. SpringerPlus, 2013. Vol. 2 No. 10.

SALIM, A. A.; GRBAVCIC, S.; SEKULJICA, N.; STEFANOVIC, A.; TANASKOVIC, S.; LUKOVIC, N.; JUGOVIC, Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus sp.* TMF-1 in solid-state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. Bioresource Technology. 2016. Vol 228, p 193 – 200.

SOUII, A.; GUESMI, A.; OUERTANI, R.; CHERIF, H.; CHOUCHANE, H.; CHERIF, A.; NEIFAR, M. Carboxymethyl cellulase production by extremotolerant bacterial in low cost media and application in enzymatic saccharification of stevia biomass. Waste and Biomass Valorization. 2018.

SILVA, I. F.; SANTOS, A. S. Produção de amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta de macaúba (Acrocomia aculeata) e farinha de pupunha (Bactris gasipaes) como substratos. 2012. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012.

SETHI, S.; DATTA, A.; GUPTA, B. L.; GUPTA, S. Optimization os celulase production from bactéria isolated from soil. Hindawi Publishing Corporation. ISRN Biotechnology. Volume 2013. 7 p.

SHAIKI, N. M.; PATEL, A. A.; MEHTA, S. A.; PATEL N. D. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. Universal Journal of Environmental Research and Technology. 2013. Vol 3, p 39 – 49

SHANKAR, T.; ISAIARASU, L. Cellulase production by B. pumilus EWBCM1 under varying cultural conditions. Middle East Journal of Scientific Research. 2011. Vol 8, p 40 – 45.

TABSSUM, F.; IRFAN, M.; SHAKIR, H. A.; QAZI, J. O. RSM based optimization of nutricional conditions for cellulase mediated saccharification by *Bacillus cereus.* Journal of Biological Engineering. 2018. Vol 12, n 7, 10 p.

VASUDEO, Z.; LEW, C. Statistical analysis of cellulase production in *Bacillus amyloliquefaciens* UNPDV-22. Extreme Life, Biospeology & Astrobiology. 2011, Vol 3, p 38 – 45.

VIJAYARAGHAVAN, P.; VICENT, P. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. Isolated from a paddy field. Polish Journal of Microbiology. 2012. Vol 61, n 1, p 51 – 55.

CAPITULO 3: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA CELULASE PRODUZIDA POR *Bacillus smithii* QT03 CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA UTILIZANDO BAGAÇO DE MALTE COMO FONTE DE CARBONO

Analyse Villanueva Gaete[1], Carlos Eduardo de Souza Teodoro[2], Ana Paula Martinazzo[3], Thaíza Coutinho[4], Ariany Franco de Oliveira[5]

Resumo

A celulase é uma enzima muito utilizada nas industrias de alimentos, bebidas, detergentes, têxteis, ração animal, entre outros processos. Para melhorar a atuação das enzimas nos processos industriais, é imprescindível que sejam determinadas suas propriedades, especialmente no que tange a fatores cinéticos e físico-químicos. O objetivo principal desta investigação foi realizar a caracterização parcial da celulase produzida pelo microrganismo *Bacillus smithii* QT03, uma bactéria pouco estudada para produção de enzimas, porém com características interessantes para ser utilizada em processos biotecnológicos. Foram avaliadas algumas propriedades bioquímicas da enzima a fim de se explorar seu potencial para aplicações industriais. A bactéria foi cultivada em meio contendo bagaço de malte como fonte de carbono. O efeito do pH na atividade da celulase foi avaliado nas faixas de 5,0 a 9,0. Para avaliar o efeito da temperatura na produção da enzima celulase foi incubada a mistura de reação nas temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80° C. Além disso foram avaliadas as estabilidades térmica e do pH da celulase por um período de tempo de 24 h. *B. smithii* QT03 alcançou a máxima atividade enzimática em 30 minutos com pH 7 de incubação do meio reacional e conservou o 70% de atividade por 24 h quando a celulase foi incubada em pH 6. Observou-se também a característica termofílica da enzima por ter alcançado a atividade máxima a 70°C no meio reacional e termoestável por conservar o 100% de atividade quando incubada a 55°C por 3 h e 58% de atividade a 60°C por 24 h. Segundo os resultados obtidos neste trabalho, a celulase produzida por *B. smithii* QT03 utilizando bagaço de malte como fonte de carbono apresenta características interessantes para continuar com a caracterização total e purificação de celulase para possíveis aplicações nas indústrias.

Palavras chaves: Biotecnologia de microrganismos, caracterização de celulase, endo-β-1,4glucanase, produção de enzima, bactérias, fontes de carbono, resíduos agroindustriais.

[1] Aluna da Pós graduação em Tecnologia Ambiental – UFF, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica, VR
[2] Professor Orientador do programa de Pós graduação em Tecnologia Ambiental – UFF, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica, VR
[3] Professora do programa de Pós graduação em Tecnologia Ambiental – UFF, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica, VR
[4] Aluna de graduação Engenharia em Agronegócios – UFF, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica, VR
[5] Aluna de graduação Engenharia em Agronegócios – UFF, Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica, VR

ABSTRACT

Cellulase is one of the most useful enzymes in the industry. To improve the performance of enzymes in industrial processes, it is essential to determine their properties, especially with regard to kinetic and physical-chemical factors. The main objective of this investigation was to carry out the partial characterization of cellulase produced by the microorganism Bacillus smithii QT03 using malt bagasse as a carbon source. Some biochemical properties of the enzyme were evaluated in order to explore its potential for industrial applications. The effect of pH on cellulase activity was evaluated in the range of 5.0 to 9.0. To evaluate the effect of temperature on the production of the cellulase enzyme, the reaction mixture was incubated at temperatures of 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 and 80 ° C. In addition, the thermal and pH stability of cellulase were evaluated for a period of 24 h. B. smithii QT03 reached the maximum enzymatic activity in 30 minutes with pH 7 of incubation of the reaction medium and conserved 70% of activity for 24 h when the cellulase was incubated in pH 6. The thermophilic characteristic of the enzyme was also observed for having maximum activity was reached at 70 ° C in the reaction medium and thermostable by conserving 100% activity when incubated at 55 ° C for 3 h and 58% activity at 60 ° C for 24 h. According to the results obtained in this work, the cellulase produced by B. smithii QT03 using malt bagasse as a carbon source presents interesting characteristics to continue with the total characterization and purification of cellulase for possible applications in the industries.

Key words: Biotechnology of microorganisms, cellulase characterization, endo-β-1,4glucanase, enzyme production, bacteria, carbon sources, agro-industrial waste.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve uma apreensão notável sobre a segurança ambiental, que levou ao desenvolvimento de bioprocessos ecológicos. Essas iniciativas aumentaram a demanda de enzimas em várias aplicações industriais (PATEL et al., 2019). O potencial da enzima celulase foi revelado em vários processos industriais, como amaciamento de algodão na indústria têxtil, na remoção de tintas, na melhoria da drenagem e na modificação de fibras nas indústrias de papel e celulose, bem como em detergentes para a roupa como amaciadores, agentes revigorantes de cores (KUHAD et al., 2011). Embora existam várias aplicações industriais de celulases, a indústria de etanol lignocelulósico é a mais relevante (SUKUMARAN et al., 2005).

Talvez a maior dificuldade da indústria seja encontrar enzimas que possam suportar algumas condições industriais como variação de temperatura e pH. Diante desse fato, as pesquisas de melhoramento da catálise de enzimas se faz necessário (MONTEIRO e SILVA, 2009). Para melhorar a atuação das enzimas em processos industriais, é imprescindível que sejam determinadas suas propriedades, especialmente no que tange a fatores cinéticos e físico-químicos (CASTRO e PEREIRA, 2010).

A maioria das celulases comerciais são de origem fúngica; no entanto, as bactérias também foram consideradas como produtoras de enzimas versáteis devido à sua alta taxa de crescimento, estabilidade em condições extremas e presença de complexos multi-enzimas. Entre as bactérias, as espécies do género *Bacillus* podem produzir várias enzimas hidroliticas, que incluem a celulase (LADEIRA et al., 2014).

Por exemplo, existem vários estudos com bactérias capazes de produzir celulases utilizando subprodutos da agroindústria, as quais foram caracterizadas e purificadas para obter a máxima atividade de celulases. A caracterização das enzimas consiste na determinação dos efeitos e estabilidade da temperatura e pH da enzima, efeito de íons metálicos, solventes, aditivos e detergentes comerciais na atividade de celulases (DAS et al., 2010; IRFAN et al., 2012; SHAIKH et al., 2013; MENG et al., 2014; LADEIRA et al., 2015; SALIM et al, 2016; AZADIAN et al, 2017; HARSHVARDHAN et al., 2017; KAZEEM et al., 2017, PATEL et al., 2019). Entre os estudos mencionados, pode-se observar grande participação de bactérias do género *Bacillus*.

A bactéria *Bacillus smithii* é termofílica, aeróbica facultativa e capaz de usar uma variedade de açúcares que podem ser derivados de materiais lignocelulósicos. Essa bactéria apresenta características que a tornam interessante para aplicações biotecnológicas, como a acessibilidade genética, uma ampla faixa de temperatura e pH e a capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono em um meio relativamente mínimo (BOSMA et al., 2016).

Por tanto, o enfoque principal deste trabalho de investigação foi realizar a caracterização parcial da celulase produzida por *B. smithii* QT03 utilizando bagaço de malte como fonte de carbono. Foram avaliadas algumas propriedades bioquímicas da enzima a fim de se explorar seu potencial para aplicações industriais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biotecnología da Escola de Engenharia Industrial Metalurgica de Volta Redonda da Unversidade Federal Fluminense (EEIMVR-UFF).

2.1 MICRORGANISMO E ENSAIOS ANALÍTICOS

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Bacillus smithii* QT03, a bactéria foi isolada a partir de amostras de solo coletas no Sul Fluminense e é mantida sob refrigeração em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Luria Bertani.

Para a produção de celulase foi utilizado o meio de cultura com a seguinte composição: 4g/L KH_2PO_4, 4g/L Na_2HPO_4, 0,2g/L $MgSO_4.7H_2O$, 0,001g/L $CaCl_2.2H_2O$, 0,004g/L $FeSO_4.2H_2O$ e H_2O destilada 1L. Contendo bagaço de malte como fonte de carbono (2%) e extrato de carne como fonte de nitrogênio (1,5%), o meio foi ajustado com valor inicial de pH 7 e inoculado com 2% de uma cultura de *B. smithii* QT03 crescida por 24 h em meio Luria Bertani (LB). O microrganismo foi crescido por 48 h, a de 35°C e 200 rpm. As amostras foram constituídas por frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura.

2.1.1 Ensaios da atividade enzimática

Para a remoção das células, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posterior a centrifugação, o sobrenadante (extrato bruto enzimático – EBE) foi mantido a 4°C e utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

A atividade de endo-β-1,4-glucanase (EnG) foi determinada, incubando-se 0,5 mL de CMC a 1% em solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) com 0,25 mL do EBE sob temperatura de 55°C. Após de 30 min, 0,75 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS), Reagente de Miller (1959), foi adicionado a mistura reacional e, em seguida, aquecida em banho-maria a 100°C por 5 min. As amostras resultantes foram resfriadas à temperatura ambiente e adicionou-se 2 mL de água destilada. Em seguida se fez a leitura da absorbância a 540 nm. A metodologia aplicada foi baseada no trabalho de Tabssum et al., (2018) com modificações.

Para a quantificação da atividade enzimática foi elaborada uma curva padrão com concentrações conhecidas de glicose. Uma unidade de atividade de EnG foi definida como a

quantidade de enzima capaz de hidrolisar CMC e liberar 1 µmol de glicose por minuto a 55°C, exceto quando foi determinado o efeito da temperatura na atividade enzimática, onde foram testadas outas temperaturas além de 55° C (Nelson, 1944).

2.1.2 Efeito do pH sobre a atividade de celulas

O efeito do pH da mistura reacional na atividade da celulase foi avaliado nas faixas de 5,0 a 9,0 com intervalos de 0,5 unidade. Para as faixas ácidas de pH (5,0 – 6,5) foi utilizado o tampão Citrato-ácido cítrico e para as faixas de pH de 7 a 9 o tampão Tris HCl. Para determinar o pH ótimo foi preparada a solução de Carboximetilcelulose (CMC) utilizando os tampões para ajustar os valores de pH e incubando-se 0,25 mL do EBE em Banho Maria a 55°C por 30 minutos. Após este período, foi determinada a atividade enzimática (item 2.1.1).

2.1.3 Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade de celulase

Para avaliar a temperatura ótima de atividade da enzima celulase, a mistura reacional (0,25 mL de EBE e 0,5 mL de solução de CMC) foi incubada nas temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80° C por 30 minutos, em seguida foi determinada a atividade enzimática conforme descrita no item 2.1.1.

2.1.4 Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da celulase

Foram testados diferentes tempos de incubação da enzima para avaliar qual o melhor para a atividade da celulase. Foi incubada a enzima com o CMC nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Após os tempos estabelecidos foram realizados os testes para determinar a atividade enzimática nas condições descritas no item 2.1.1.

2.1.5 Estabilidade térmica da celulase produzida por *B. smithii* QT03

Para os testes de estabilidade térmica de celulase, o EBE foi incubado em temperaturas diferentes, a saber: 4, 25, 55, 60, 65, 70 e 75°C. O EBE (0,25 mL) foi retirado nos períodos de tempos de 0', 30', 60', 90', 120', 150', 180' e 24 h para a determinação da atividade enzimática, conforme descrito no item 2.1.1.

2.1.6 Estabilidade da celulase produzida por *B. smithii* QT03 a diferentes valores de pH.

Para os testes de estabilidade de pH, o EBE foi mantido nos valores de pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 na temperatura ambiente de 25°C. O EBE (0,25 mL) foi retirado nos períodos de tempos de 0', 30', 60', 90', 120', 150', 180' e 24 h e incubados na solução de CMC 1% por 30 minutos. Em seguida foi determinada a atividade enzimática nas condições descritas no item 2.1.1.

2.1.7 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em delineamento inteiramente ao acaso e submetidos a análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tuckey com significância de 5% utilizando o software para cálculos estatísticos SISVAR.

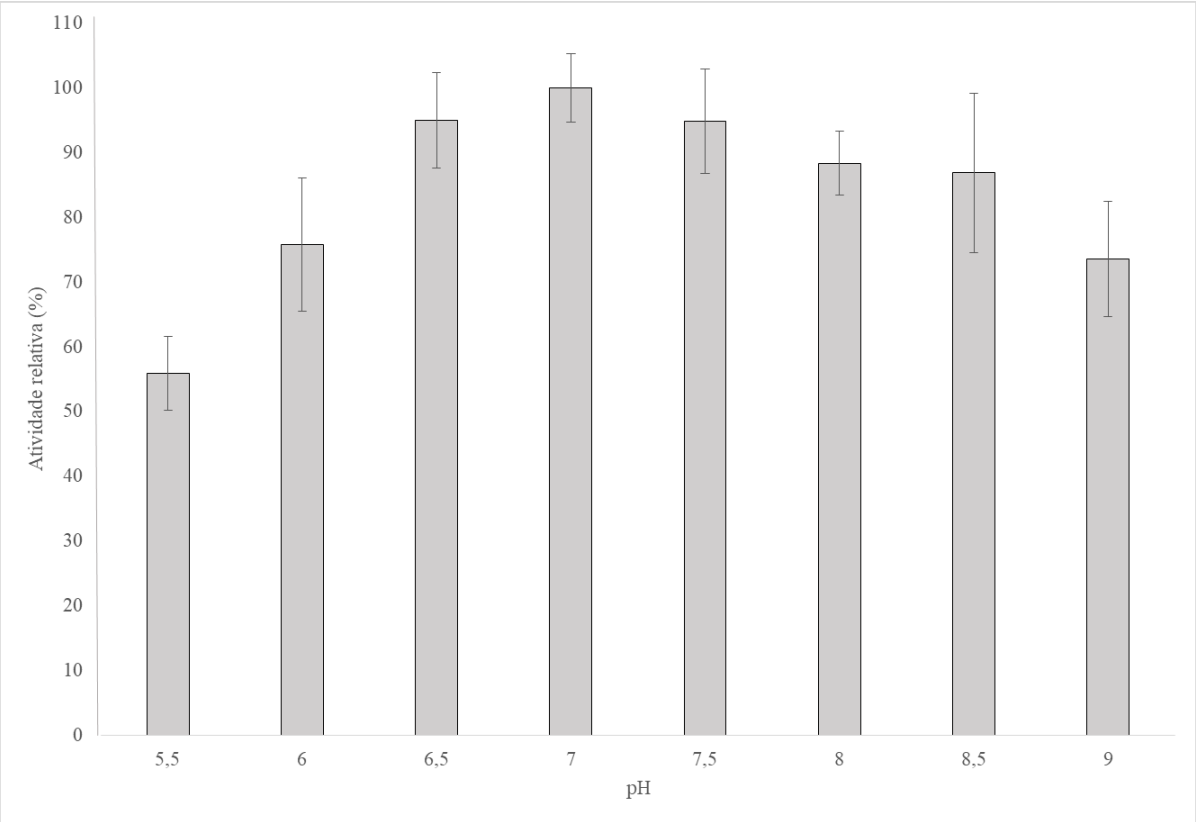
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DE CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03

Foram realizados os experimentos para determinar o melhor pH para a atividade de celulase, para isso, foi ajustado o pH do substrato (CMC) nos valores de 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9. Os resultados obtidos são demostrados na Figura 17, representados pela média das repetições.

Foi realizada a análise de variância para avaliar o efeito do pH no meio reacional sobre a atividade enzimática (Anexo 8).

Figura 17. Atividade de celulase produzida por *B. smithii* QT03 em diferentes valores de pH. Microrganismo crescido no meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio, pH do meio de 7 a 35° C, 200 rpm por 48 h.



De acordo com a Figura 17, observa-se a máxima atividade enzimática nas faixas de pH 6,5 e 7,0, as quais não apresentam diferença estatística na atividade de celulase (Anexo 8). Foi considerado pH 7,0 como o 100% por apresentar o valor máximo de atividade. Observa-se um aumento de atividade desde o pH 5,5 (58%) até o 6,5 e 7,0. Seguidamente foi observado leve decaimento até o pH 9,0 (76% de atividade), os pH de 7,5; 8,0 e 8,5 apresentam médias iguais aos pH 6,5 e 7,0. Foi selecionado o pH 7,0 como o ótimo para a atividade de celulase considerando que a tendência de atividade foi diminuindo conforme aumentava o pH 7,0.

As observações obtidas neste estudo coincidem com os resultados do Harshvardhan et al., (2013), onde a atividade máxima da celulase produzida com *Bacillus sp* utilizando palha de trigo como fonte de carbono, foi encontrada no tampão fosfato de sódio a pH 7,0, sendo caracterizada como enzima de pH neutro.

Outros trabalhos com resultados similares de atividade máxima de celulase no pH 7,0 como neste estudo com *B. smithii* QT03 são os de Shaikh et al., (2013) e Gaur et al., (2015). No trabalho de Shaikh et al., (2013), foram otimizados os parâmetros de atividade de celulase produzida por *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. Os valores de pH de incubação que atingiram a atividade enzimática máxima foram pH 7 para *Pseudomonas* sp. e pH 7,5 para *Bacillus* sp. Gaur et al., (2015), observaram a máxima atividade de celulase com pH 7,0 para a celulase produzida por *B. vallismortis* utilizando bagaço de cana como fonte de carbono.

Similarmente, Irfan et al., (2012) na produção de celulases com *Cellulomonas* sp. ASN2 determinaram o valor de pH ideal para a atividade da enzima crua como sendo 7,5 (0,5 $U.mL^{-1}$). Observou-se que aumentar ou diminuir o pH além disso resultava em declínio na atividade enzimática, em concordância com os resultados obtidos no trabalho com *B. smithii* QT03, onde a atividade enzimática também apresentou variações significativas de acordo com o pH testado.

No entanto, na literatura são evidenciadas grandes variações das características bioquímicas das celulases produzidas por diferentes microrganismos. Em comparação aos resultados obtidos com *B. smithii* QT03, existem estudos onde se observam celulases com máximas atividades quando incubadas em pH ácidos. Por exemplo no estudo de Meng et al., (2014) para a produção de celulase com *B. subtilis* BY-3 utilizando palha de milho como fonte de carbono, a atividade máxima da celulase bruta foi observada em pH 5,5. Balasubramanian e Simoes (2014), acharam a atividade máxima de celulase produzida por *B.*

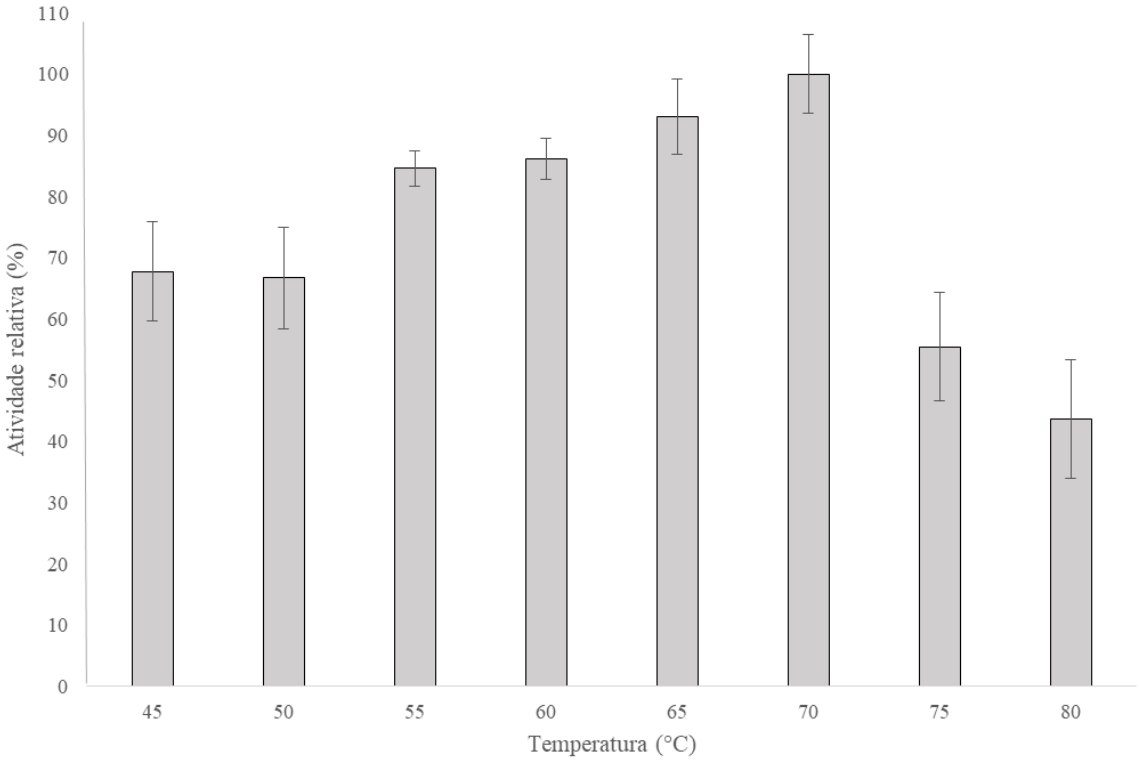
pumilus 2144A no pH 6. No estudo de Azadian et al., (2017), demostra-se que a atividade máxima da celulase produzida por *B. sonorensis* HSC7 foi observada em pH 4, diferente da celulase produzida por *B. smithii* QT03.

Também existem celulases alcalinas, como as produzidas por *B. licheniformis* AU01 e *B. subtilis* AS3 nos estudos de Annamalai et al., (2012) e Deka et al., (2013), onde as celulases produzidas obtiveram a atividade máxima no pH 9,0, no entanto, a celulase produzida por *B. smithii* QT03 diminuiu sua atividade no pH 9,0. Quanto as enzimas produzidas por *B. smithii*, a pesquisa desenvolvida por Lailaja e Chandrasekaram (2013) estudou a purificação da enzima lipasa por *B. smithii* BTMS 11, achando a máxima atividade no pH 8 nas condições otimizadas, sendo caracterizada como uma enzima alcalina, porém a celulase produzida por *B. smithii* QT03 apresentou uma diminuição da atividade no pH 8,0, tendo a máxima atividade no pH 7,0.

3.2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DE CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03

Foi realizado o teste para avaliar a melhor temperatura de incubação da mistura reacional (EBE + CMC) para a atividade de celulase. As temperaturas testadas foram: 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80° C. O meio reacional foi incubado nessas temperaturas por 30 minutos e seguidamente foi determinada a atividade enzimática conforme descrito anteriormente (item 2.1.1). Os resultados são apresentados na Figura 18, representados pela média das repetições. Foi realizada a análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tuckey (significância de 5%) são apresentados no Anexo 9.

Figura 18. Efeito da temperatura sobre a atividade de celulase produzida por *B. smithii* QT03. O microrganismo foi crescido em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio, e pH inicial 7 a 35° C, 200 por 48 h.



De acordo com a Figura 18, observa-se a influência da temperatura de incubação do meio reacional na atividade enzimática, no Anexo 9 é representada a tabela da comparação de médias pelo teste de Tuckey (5%). A temperatura de 70°C foi considerada o 100% de atividade relativa por apresentar a maior média. O aumento da atividade enzimática foi

gradual desde a temperatura de 45°C até a temperatura de 70°C. Seguidamente, nas temperaturas de 75 e 80°C já é observada uma redução na atividade.

A temperatura de incubação de celulase a 65 e 70°C apresentam as maiores médias de atividade enzimática, sem diferença estatística. Porém, foi considerada a temperatura de 70°C como a melhor para a atividade de celulase produzida por *B. smithii* QT03 já que atividades máximas em altas temperaturas é uma das características mais desejadas de qualquer enzima industrial. As celulases termofílicas oferecem vários benefícios, como tempos de hidrólise reduzidos, menor risco de contaminação e menores custos de resfriamento após pré-tratamento térmico. Todos os benefícios acima resultam no aumento da utilização econômica das celulases (PATEL et al., 2019).

Resultados similares evidenciaram-se na caracterização da enzima celulase produzida por *Bacillus sp*, no trabalho de Ladeira et al., (2014), observa-se que a atividade enzimática aumenta com o incremento da temperatura, entre 30 e 70°C. Foi observada uma redução na atividade de celulase acima de 70°C. Os autores verificaram que a temperatura ideal de atividade da celulase era de 70°C.

Conforme os estudos de Shaikh et al., (2013) na caracterização da enzima celulase, foram testadas diferentes temperaturas de incubação da celulase produzida por *Pseudomonas sp* e *Bacillus* sp. As temperaturas que atingiram a atividade máxima da enzima foram de 40°C para *Pseudomonas* sp. e de 50°C para *Bacillus* sp. Resultados similares foram obtidos por Harshvardhan et al., (2017), que caracterizaram a celulase produzida por *Bacillus* sp., tendo como resultado uma alta atividade na temperatura de 50°C, considerada a temperatura ideal. Os autores relatam que as atividades da celulase também aumentaram concomitantemente com a temperatura de até 50°C e depois diminuíram. Os autores consideram a celulase de origem bacteriana como sensível à mudança de temperatura, em semelhança com os resultados obtidos neste trabalho com *B. smithii* QT03, onde pode-se observar diferenças de atividade de celulase conforme a temperatura variava de 45 a 80°C

No entanto, existem outros estudos onde se apresenta a máxima atividade de celulase na temperatura de 60°C. De acordo com os resultados de Meng et al., (2014) sobre a atividade de celulase com *B. subtilis* BY-3, a temperatura ideal observada pelos autores foi de 60°C, seguida de 50 e 70°C com uma ligeira diminuição na atividade. Similarmente, Irfan et al., (2012) observaram que a enzima celulase de *Cellulomonas* sp. ASN2 apresenta atividade ótima a 60°C. À medida que a temperatura aumentava a partir de 30°C, a atividade enzimática

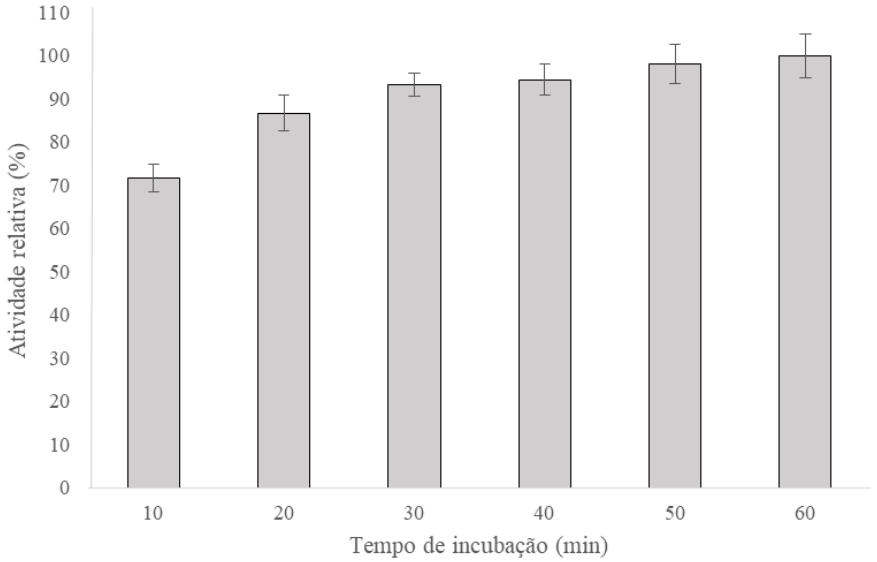
também melhorava, mas a atividade começou a diminuir depois de que a temperatura ultrapassou os 60°C e tornou-se completamente desnaturada a 100°C. Também Marco et al., (2017) determinou a atividade máxima de celulase produzida por *B. licheniformis* na temperatura de 60°C, concordando com os estudos que demostram que a celulase pode ser uma enzima termofílica, com atividades máximas entre 50 e 70°C.

Destaca-se o resultado com *B. smithii* QT03, onde a celulase apresenta a máxima atividade a 70°C, podendo ser caracterizada como uma enzima termofílica. Nos trabalhos anteriormente mencionados, a celulase tem atividade ótima entre 40 e 60°C, a 70°C a maioria já têm uma redução na atividade.

3.3 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA MISTURA REACIONAL SOBRE A ATIVIDADE DE CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03

Foi realizado o teste para determinar o melhor tempo de incubação da mistura reacional para a atividade da enzima celulase. O meio reacional, com pH 7, foi incubado nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos em banho Maria a uma temperatura de 70°C (considerando os resultados obtidos nos testes anteriores). O teste foi realizado em triplicata e os resultados são representados pela média dos valores, na Figura 19. Foi realizada a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tuckey com significância de 5% (Anexo 10).

Figura 19. Efeito do tempo de incubação do EBE na atividade de celulase. O microrganismo foi crescido em meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio, e pH inicial 7 a 35° C, 200 por 48 h.



Observa-se na Figura 19 o efeito do tempo de incubação do meio reacional na atividade enzimática. O tempo de 60 minutos foi considerado como o 100% por apresentar a maior média de atividade.

A atividade foi aumentando conforme o tempo de incubação, aos 10 minutos a atividade relativa foi do 72%, sendo estatisticamente menor a todos os tempos estudados (Anexo 10). Não foi observada diferença estatística entre os tempo 30 a 60 minutos, assim, pode-se afirmar que nos 30 minutos, foi alcançada a atividade máxima de celulase por *B. smithii* QT03

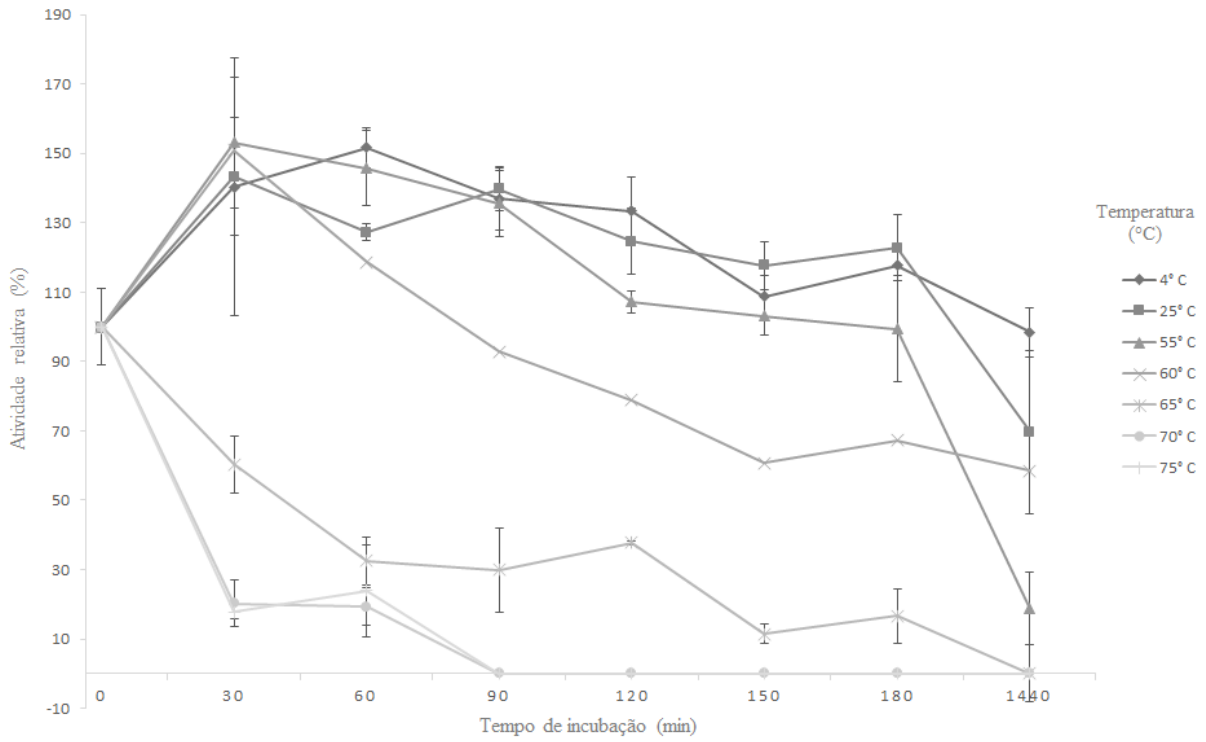
Nos trabalhos de investigação similares, o tempo de incubação das enzimas variam de acordo com a metodologia aplicada pelos autores. Ladeira et al., (2014) e Das et al., (2010), medem a atividade enzimática após 10 minutos de incubação do meio reacional para alcançar a máxima atividade enzimática. No entanto, Shaik et al., (2013), Azadian et al., (2017) e Marco et al., (2017) em concordância com os resultados obtidos nesta pesquisa, incubaram o meio reacional por 30 minutos. Contudo, Trivedi et al., (2011) incubou o EBE por 50 minutos para alcançar a máxima atividade de celulase.

3.4 ESTABILIDADE TÉRMICA DA CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03

Foi realizado o experimento para determinar a estabilidade térmica da celulase produzida por *B. smithii* QT03. Para tanto, o EBE foi incubado em diferentes temperaturas, a saber: 4, 25, 55, 60, 65, 70 e 75° C. Amostras do EBE (0,25 mL) foram retirados nos períodos de tempos de 0', 30', 60', 90', 120', 150', 180' e 24 h e incubados na solução de CMC 1% com pH 7 em banho Maria a 70° C por 30 minutos, em seguida foi determinada a atividade enzimática nas condições como descrito no item 2.1.1

Os testes foram realizados em triplicata e resultados são representados pela média dos valores na Figura 20. A atividade de celulase no tempo 0 foi considerada como o 100%.

Figura 20. Estabilidade térmica de celulase produzida por *B. smithii* QT03. Microrganismo crescido no meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5 de extrato de carne como fonte de nitrogênio; pH inicial do meio de 7 a 35°C, 200 rpm por 48 h.



De acordo com a Figura 20, pode-se observar que a atividade de celulase a 4, 25, 55 e 60°C aumentou entre 40 e 60% nos primeiros 30 minutos e foi diminuindo ao longo do tempo. Na temperatura de 4°C a celulase conservou 98% da atividade após 24 h, e o 69% de atividade a 25°C.

A celulase na temperatura de 55°C foi estável, mantendo a atividade no 100% até 180 h e após 24 h a atividade diminuiu 80%. Quanto à atividade da celulase na temperatura de 60°C, pode-se observar que a enzima conservou o 93% de atividade até os 90 min, e uma diminuição de 42% de atividade após 24 h.

A enzima na temperatura de 65°C apresentou baixa atividade em comparação as temperaturas menores, após 30 minutos observou-se a diminuição do 40% da atividade. Nos 180 minutos foi observada a diminuição do 84% da atividade, e acontecendo 24 h a atividade diminuiu 100% da atividade inicial. A atividade da enzima a 70 e 75°C foram as menores, atingindo sua nulidade nos 90 minutos.

No estudo de Harshvardhan et al., (2017) foi testada a estabilidade térmica da celulase produzida por *Bacillus sp*, a atividade da enzima foi considerada estável a 25°C por 24 h, sem perda de atividade. Da mesma forma, 100% de atividade foi mantida por 8 h a 30°C. Nas temperaturas mais altas (70°C), a enzima perdeu sua atividade de 90% em 30 minutos, semelhante com os resultados obtidos com *B. smithii* QT03, onde a enzima perdeu 100% da sua atividade em 90 min nas temperaturas de 70 e 75° C.

Enquanto a estabilidade térmica da celulase produzida pela bactéria *Bacillus flexus*, Trivedi et al., (2011), revelou o declino da atividade enzimática com o aumento da temperatura. A celulase exibiu 100% de atividade a 4°C por 30 minutos e declinou para 47% a 35° C. Assim, foi capaz de reter 28% de atividade a 75°C no mesmo tempo de estudo. Em comparação com neste estudo com *B. smithii* QT03, a atividade a 4°C foi também mantida por 30 minutos, mas na temperatura de 75°C a atividade era quase nula.

O efeito da temperatura na estabilidade térmica da celulase produzida por *Bacillus* sp. SMIA-A, Ladeira et al., (2014), demostrou que as enzimas permanecem 100% estáveis até 60°C por 1 h e passaram a sofrer desnaturação a partir de então. No entanto, no estudo com *B. smithii* QT03, a celulase a 60° C após 1 h conservou 84% de atividade enzimática e 41% por 24 h.

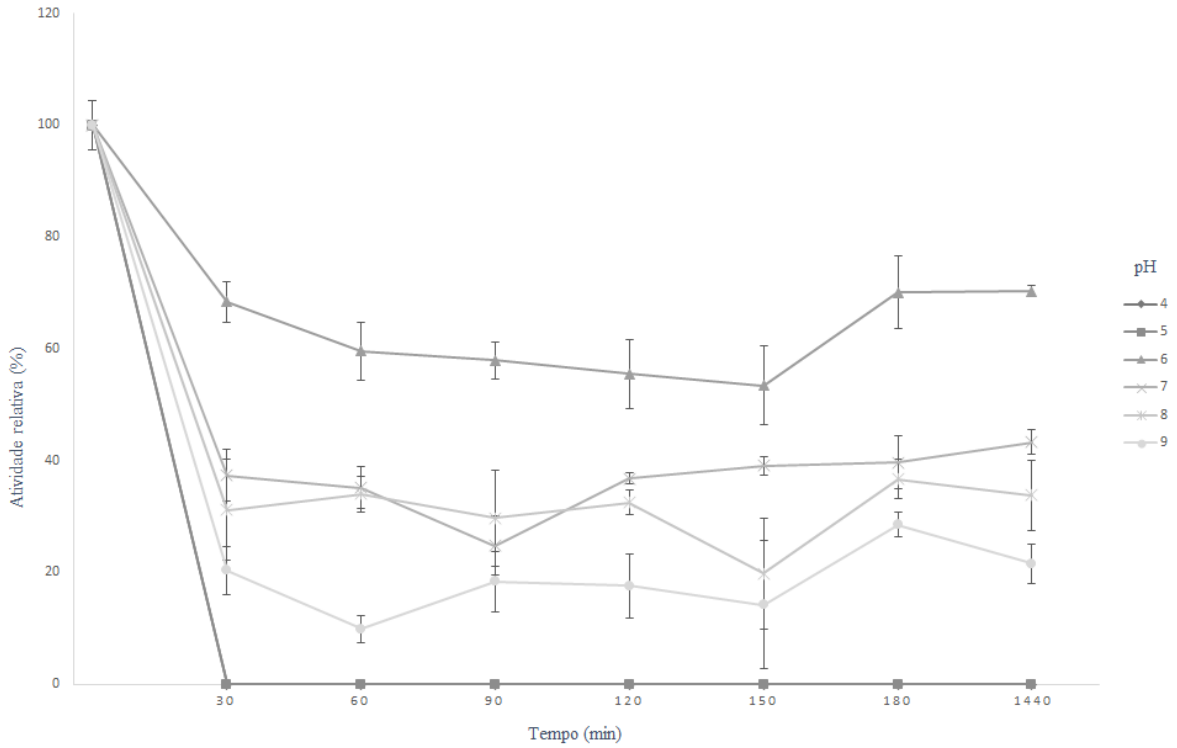
No estudo de Azadian et al., (2017), foi produzida e caracterizada a enzima celulase por *B. sonorensis* HSC7. Os resultados mostraram que a meia-vida de celulase era de cerca de 30 minutos a 70°C. Esses resultados são diferentes aos obtidos neste trabalho com *B. smithii* QT03 pois a celulase produzida neste trabalho perdeu mais do 80% da atividade em 30 minutos a 70°C. Também Gao et al., (2009), utilizaram a bactéria *B. smithii* T7 para caracterizar a enzima endoinulinase. A enzima não mostrou perda significativa de atividade após 6 h e reteve cerca de 51% de atividade após 9 h a 70°C. No entanto, a incubação prolongada a 70°C resultou em uma perda gradual de atividade, mas ainda manteve 37% da atividade, mesmo após 12 h, contrário aos resultados com *B. smithii* QT03 onde a enzima nessa temperatura chegou a nulidade nos 90 min.

Com os resultados obtidos pode-se observar a característica termoestável da celulase produzida por *B. smithii* QT03, a qual conserva o 100% de atividade a 55°C por 3 h e 58% de atividade a 60°C após 24 h.

3.5 ESTABILIDADE DA CELULASE PRODUZIDA POR *B. smithii* QT03 A DIFERENTES VALORES DE pH

Foram realizados os testes de estabilidade de pH da celulase produzida por *B. smithii* QT03. Para isso, a enzima foi encubada nos valores de pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 na temperatura de 25°C. Amostras da enzima (0,25 mL) foram retiradas nos períodos de tempos de 0', 30', 60', 90', 120', 150', 180' e 24 h e incubados na solução de CMC 1% com pH 7 em banho Maria a 70°C por 30 minutos. Em seguida, foi determinada a atividade enzimática como descrito no item 2.2.1. Os testes foram realizados em triplicata e resultados são representados pela média dos valores na Figura 21. A atividade de celulase no tempo 0 foi considerada como o 100%

Figura 21. Estabilidade da enzima celulase de *B. smithii* QT03 a diferentes valores de pH. Microrganismo crescido no meio de cultura contendo 2% de bagaço de malte como fonte de carbono e 1,5% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, pH do meio de 7, a 35° C, 200 rpm por 48 h.



De acordo com a Figura 21, pode-se observar que a celulase no pH 4 e 5 não possui atividade enzimática durante todo o período estudado.

No entanto, a celulase com pH 6 foi o que apresentou a maior atividade enzimática durante as 24 horas do experimento, um ligeiro declínio da atividade é observado nos tempos de 30 a 150 minutos e um aumento de atividade no tempo de 180 minutos, permanecendo

estável após 24 h. Pode se observar que a celulase conservou o 70% de atividade com pH 6 até o tempo de 24 h.

A enzima em pH 7 e 8 oscilou de maneira semelhante durante todo o tempo do estudo e não atingiu a nulidade da atividade enzimática após 24 horas de estudo, observou-se 40% de atividade no pH 7 e 36% no pH 8 nas 24 h de estudo. No entanto, com pH 9 foi observada a diminuição de 78% de atividade após 24 h.

Ladeira et al., (2014), no teste da estabilidade do pH da celulase produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2, revelou que a estabilidade máxima foi observada em uma faixa de pH entre 7 e 9, onde reteve mais de 70% de sua atividade máxima, após incubação a temperatura ambiente por 3 h. No entanto, no estudo com *B. smithii* QT03, no pH 9 após as 3 h a celulase conservou o 76% da sua atividade e ainda conservou 57% da atividade após 24 h.

Trivedi et al., (2011) na caracterização da enzima celulase produzida por *Bacillus flexus*, observaram que a enzima reteve 100% de sua atividade mesmo após a pré-incubação por 30 minutos a pH 10. Verificou-se que a atividade era estável na faixa de pH 8 a 12 nos 30 minutos estudados. No estudo com *B. smithii* QT03 não foram realizados os testes com pH maiores a 9, mas pode se observar que com o aumento do pH acima de 7 a tendência da atividade foi a reduzir.

No entanto, no estudo de Azadian et al., (2017), observou-se a estabilidade ao pH da celulase produzida por *Bacillus sonorensis*, os resultados mostraram que e estabilidade máxima da enzima foi encontrada em pH 5, o tempo do teste foi de 60 minutos a temperatura ambiente. Porém, no estudo com *B. smithii* QT03, a atividade de celulase em pH 4 e 5 foi totalmente nula.

Annamalai et al., (2013), no estudo de purificação e caracterização de celulase produzida por *B. halodurans*, caracterizaram a enzima como alcalina por observar o pH 9 como o ideal para atividade e exibir mais do 60% de atividade entre pH 6 e 11. Diferente aos resultados deste trabalho com *B. smithii*, onde o pH 7 foi o ideal para a atividade de celulase (resultado do item 3.1.1), e conserva o 70% de atividade até as 24 h.

4 CONCLUSÃO

A bactéria *B. smithii* QT03 produziu níveis promissores de celulase, alcançando a máxima atividade enzimática em 30 minutos de incubação do meio reacional (0,24 $U.mL^{-1}$). A celulase apresentou a máxima atividade com pH 7 no meio reacional e conservou o 70% de atividade por 24 h quando incubada em pH 6. Observou-se também a característica termofílica da enzima por ter alcançado a atividade máxima nos 70°C no meio reacional e termoestável por conservar o 100% de atividade quando incubada a 55°C por 3 h e 58% de atividade a 60°C por 24 h.

Segundo os resultados obtidos neste trabalho, a celulase produzida por *B. smithii* QT03 utilizando bagaço de malte como fonte de carbono apresenta características interessantes e promissoras para continuar com a caracterização total e purificação da enzima para possíveis aplicações comerciais em indústrias.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; ELAYARAJA, BALASUBRAMANIAN, T. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS1 by conversion of lignocellulosic waste. Carbohydrate Polymers. 2013. Vol 94, p 409 – 415.

AZADIAN, F.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z.; HASSANSHAHIAN, M. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable celulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversión of lignocellulosic wastes. Journal of genetic engineering and biotechnology. 2017. v 15, p. 187 – 196.

BOSMA, E.; KOEHORST, J.; HIJUM, S.; RENCKENS, B.; VRIESENDORP, B.; WEIJER, A.; SCHAAP, P.; VOS, W.; OOST, J.; KRANENBURG, R. Complete genome sequence of thermophilic *Bacillus smithii* type strain DSM 4216. Extended genome report. 2016. Vol 11:52, 11 p.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

DAS, A.; BHATTACHARYA, S.; MURALI, L. Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from cow dung. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2010. Vol 8, n 6, p 685 – 691.

DEKA, D.; JAWED, M.; GOYAL, A. Purification and Characterization of an alkaline cellulase produced by *B. subtilis* AS3. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2013. Vol 43:4, p 224 – 233.

GAO, W.; BAO, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; AN, L. Characterization of thermostable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. Applied biochemistry and biotechnology. 2009. Vol 157, p 498 – 506.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *B. vallismortis* RG07. BMC Biotechnology. 2015. Vol 15:19, p 1 – 12.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and caractherization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potencial agent for single step saccharification of seaweed biomass. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013, vol 93, p 51 – 56.

IRFAN, M.; NADEEM, M. SYED, Q. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. 2012. Turkish Journal of Biochemistry; 37 (3); 287 – 293.

IRFAN, M.; MUSHTAQ, Q.; TABSSUM, F.; SHAKIR, H.; QAZI, J. Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* k-18 for sacccharification using response surface methodology. AMB Express. 2017. Vol 7, 9 p.

KAPOOR, M; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-wastes: Technical challenges and commercialization potencial. Agroindustrial wastes as feedstock for enzymes production.2016. Chapter 3, p 61 – 93.

KAZEEM, M.; SHAH, U. K.; BAHARUDDI, RAHMAN, N. A. Prospecting Agro-waste cocktail: supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *B. liccheniformis* 2D55. Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. Vol 182, p 1318 – 1340.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulase and their industrial applications. Enzyme Research. 2011. Vol 2011, 10 p.

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

LAILAJA, V. P.; CHANDRASEKARAN, M. Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS11. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013. Vol 29, p 1349 – 1360.

MENG, F; MA, L; JI, S; YANG, W; CAO, B. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulose producing bacterium on untreated plant biomass. 2014. Letters in Applied Microbiology, 2014. Vol. 59, 306-312.

MONTEIRO, V.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos. 2009, vol 3, n 5, p 10 – 23

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Bioresourse Technology. 2019, vol 279, p 385 – 392.

SALIM, A. A.; GRBAVCIC, S.; SEKULJICA, N.; STEFANOVIC, A.; TANASKOVIC, S. J.; LUKOVIC, N.; JUGOVIC, Z. Production of enzymes by a newly isolated Bacillus sp. TMF-1 in solid-state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. Bioresource Technology. 2016. Vol 228, p 193 – 200.

SHAIKI, N. M.; PATEL, A. A.; MEHTA, S. A.; PATEL N. D. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. Universal Journal of Environmental Research and Technology. 2013. Vol 3, p 39 – 49

SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases: production, application and challenges. Journal os scientific and industrial research. 2005. Vol 64 (11) p 832 – 844.

TABSSUM, F.; IRFAN, M.; SHAKIR, H. A.; QAZI, J. O. RSM based optimization of nutricional conditions for cellulase mediated saccharification by *Bacillus cereus*. Journal of Biological Engineering. 2018. Vol 12, n 7, 10 p.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacilus flexus* isolated from green seaweed Ulva lactuca. Carbohydrate Polymers. 2011. Vol 83, p 891 – 897

6 CONCLUSÃO FINAL

Segundo os resultados obtidos neste trabalho, a celulase produzida por *B. smithii* QT03 utilizando bagaço de malte como fonte de carbono apresenta características promissoras para futuras aplicações nas indústrias.

As condições ótimas do meio de cultura para produção de celulase por *B. smithii* QT03 foram: 2% de bagaço de malte como fonte de carbono, 1,5% de extrato de carne como fonte de nitrogênio e o pH do meio com valor 7. A concentração do inóculo favorável foi de 2%. Para o cultivo da bactéria, a temperatura adequada foi de 35°C, 200 rpm de agitação por 48 h de incubação.

A celulase produzida por *B. smithii* QT03 alcançou a máxima atividade enzimática em 30 minutos de incubação do meio reacional. Assim, apresentou a máxima atividade com pH 7 no meio reacional e conservou 70% de atividade por 24 h quando incubada em pH 6. Observou-se também a característica termofílica da enzima por ter alcançado a atividade máxima nos 70°C no meio reacional e termoestável por conservar o 100% de atividade quando incubada a 55°C por 3 h e 58% de atividade a 60°C por 24 h.

Recomenda-se para futuras pesquisas a caracterização total da enzima para testar o efeito de íons metálicos e detergentes comerciais, além de outras características de interesse industrial. Também se recomenda a purificação da celulase produzida por *B. smithii* QT03 para alcançar quantidades industrialmente requeridas.

7 REFERENCIAS BIBLIOGÁFICA GERAL

ABIB – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE BIOMASSA E ENERGIA RENOVÁVEL. Atlas Brasileiro Biomassa e Energia. 2016. Curitiba, Paraná. 2016. Disponível em < https://es.calameo.com/read/0008953904f21ebb5e908> Acesso em: 27 jan 2020

ALITA, B.; SPANNEMBERG, S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G.; TRES, M.; KUHN, R.; MAZUTTI, M. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2019. Vol 7. 7 p.

ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; ELAYARAJA, BALASUBRAMANIAN, T. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS1 by conversion of lignocellulosic waste. Carbohydrate Polymers. 2013. Vol 94, p 409 – 415.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future of bio-energy: a brief review. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 2015. Vol. 7:2, 163 – 173 p

ARIFFIN, H.; ABDULLAH, N.; SHAH, U. K.; SHIRAI, Y. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus*. International Journal of Engeneering and Technology. Vol 3, n 1, p 47 – 53.

AZADIAN, F.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z.; HASSANSHAHIAN, M. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable celulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversión of lignocellulosic wastes. Journal of genetic engineering and biotechnology. 2017. Vol 15, p. 187 – 196.

BAJPAI, P. Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. Green chemistry for sustainability. SpringerBriefs in Molecular Science. 2016. P 7 -12.

BATTAN, B.; SHARMA, J.; DHIMAN, S. S.; KUHAD, R. Ch. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. Enzyme and Microbial Technology. 2007. Vol 41, p 733 – 739.

BEHERA, B.; SETHI B.; MISHRA, R.; DUTTA, S.; THATOI, H. Microbial cellulases – Diversity and biotechnology with reference to mangrove environment: A review. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017. Vol 15, p 197 – 210.

BEVILAQUA, D. B. Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz. Santa Maria, 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

BHAT, M. K. e BHAT, S. Cellulose degrading enzimes and their potencial industrial applications. 1997. Biotechnology Advances, Vol 14, 583-620.

BISWAS, R.; PERSAD, A.; BISARIA, V. Production of cellulolytic enzymes. Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts. Firs Edition. 2014.

BOECHAT, A. D. Produção de celulases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-E. Campos dos Goytacazes-RJ, 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Centro de Ciências e tecnologias agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

BOHRA, V.; TIKARIHA, H.; DAFALE, N. Genomically Defined *Paenibacillus polymyxa* ND24 for Efficient Cellulase Production Utilizing Sugarcane Bagasse as a Substrate. Appl. Biochem. Biotechnol. 2019. Vol 187, p 266 – 281.

BOSMA, E.; KOEHORST, J.; HIJUM, S.; RENCKENS, B.; VRIESENDORP, B.; WEIJER, A.; SCHAAP, P.; VOS, W.; OOST, J.; KRANENBURG, R. Complete genome sequence of thermophilic *Bacillus smithii* type strain DSM 4216. Extended genome report. 2016. Vol 11:52, 11 p.

BRIJWANI, K.; VADLANI, P. V. Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. Enzime Research. Vol 2011, 10 p.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

CECCHINI, C. Bioplastics made from upcycled food waste. Prospects for their use in the field of design. The design journal. 2017. Vol 20, p 1596 – 1610.

CORBOLAN, B. C. Otimização da produção e caracterização de α-amilase produzida por *Bacillus amyloloquefaciens*. Volta Redonda, 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnología Ambiental) – Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2012.

DAS, A.; BHATTACHARYA, S.; MURALI, L. Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from cow dung. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2010. Vol 8, n 6, p 685 – 691.

DEKA, D.; JAWED, M.; GOYAL, A. Purification and Characterization of an alkaline cellulase produced by *B. subtilis* AS3. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2013. Vol 43:4, p 224 – 233.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. 2011. Rome, Italy. Disponível em < http://www.fao.org/3/a-i2697e.pdf>

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. Energy & Fuels 2006, 20, 1727 1737.

GAO, W.; BAO, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; AN, L. Characterization of thermostable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. Applied biochemistry and biotechnology. 2009. Vol 157, p 498 – 506.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *B. vallismortis* RG07. BMC Biotechnology. 2015. Vol 15:19, p 1 – 12.

GEISSDOERFER, M.; SAVAGET, P.; BOCKEN, Nancy; HULTINK, Erik Jan. The circular economy – a new sustainability paradigm? Journal of Cleaner Production. 2017. Vol 143, p 757 – 768.

GOPALAN, N.; NAMPOOTHIRI, K. M. Biotechnological production of enzymes using agro-industrial wastes: Economic considerations, commercialization potential and future prospects.Agro-industrial wastes as feedstock for enzymes production. 2016. Chapter 14, p 313 – 330.

GUPTA, P., SAMANT K., SAHU A. Isolation of celulose-degrading bactéria and determination of their cellulolytic potencial. International Journal of Microbiology. Volume 2012, p 1-5.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and caractherization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potencial agent for single step saccharification of seaweed biomass. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013, vol 93, p 51 – 56.

HAWAS, J. M. BANNA, T.; BELAL, E.; AZIR, A. Production of bioplastic from some selected bacterial strains. INternational Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2016. Vol 5, n. 1, p 10 – 22.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário. 2017. Disponível em < https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/resultados-censo-agro-2017.html> Acesso em 27 jan 2020

IRFAN, M. NADEEM, M. SYED, Q. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. 2012. Turkish Journal of Biochemistry; 37 (3); 287 – 293.

IRFAN, M.; MUSHTAQ, Q.; TABSSUM, F.; SHAKIR, H.; QAZI, J. Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* k-18 for sacccharification using response surface methodology. AMB Express. 2017. Vol 7, 9 p.

IRP – PAINEL INTERNACIONAL SOBRE RECURSOS. Panorama de los Recursos Globales 2019: Recursos Naturais para o Futuro. Informe do Painel Internacional sobre Recursos. Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. Nairobi, Kenia. Disponível em <https://www.resourcepanel.org/reports/global-resources-outlook> Acesso em: 02 fev 2020.

ISIKGOR, F.; BECER, R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. 2016. Polym. Chem. Vol 6, p 4497 – 4559.

JAYASEKARA, S.; RATNAYAKE, R. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. Cellulose. 2019, 22 p.

KAMM, B.; GRUBER, P.; KAMM, M. Biorefineries – Industrial Processes and products: Status Quo and Future Directions. 2010. 949 p

KAPOOR, M; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-wastes: Technical challenges and commercialization potencial. Agroindustrial wastes as feedstock for enzymes production.2016. Chapter 3, p 61 – 93.

KOTCHONI, O. S.; SHONUKAN, O.; GACHOMO, W. *Bacillus pumilus* BpCRI6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. African Journal of Biotechnology. 2003. Vol 2 (6), p 140 – 146.

KAZEEM, M.; SHAH, U. K.; BAHARUDDI, RAHMAN, N. A. A. Prospecting Agro-waste cocktail: supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *B. liccheniformis* 2D55. Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. Vol 182, p 1318 – 1340.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulase and their industrial applications. Enzyme Research. 2011. Vol 2011, 10 p.

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

LAILAJA, V. P.; CHANDRASEKARAN, M. Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS11. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013. Vol 29, p 1349 – 1360.

LEISTRITZ, L.; HODUR, N.; SENECHAL, D.; STOWERS, M.; McCALLA, D.; SAFFRON, C. Biorefineries Using Agricultural Residue Feedstock in the Great Plains, 2007.

LINO, A. G. 2015. Composição química e estrutural da lignina e lípidos do bagaço e palha da cana de açúcar. Viçosa, 2015. Tesse (Pós-graduação em agroquímica para obtenção do título de Doctor Scientiae). Universidade Federal de Vicoça, Minas Gerais.

LYND, L.; WEIMER, P.; van ZYL, W.; PRETORIUS, I. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews, sep. 2002. Vol. 66, No. 3, p. 505 – 577.

MARCO, E.; HECK, K.; MARTOS, E.; VAN DER SAND, S. Purification and characterization of a termostables alkaline celulase produced by *B. licheniformis* 308 isolated from compost. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2017. 12 p.

MENG, F; MA, L; JI, S; YANG, W; CAO, B. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulose producing bacterium on untreated plant biomass. 2014. Letters in Applied Microbiology, 2014. Vol. 59, 306-312.

MERINO, S.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. Merino ST, Cherry J. 2007. Adv Biochem Eng Biotechnol, 108, 95–120.

MONTEIRO, V.; SILVA, R. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos. 2009, vol 3, n 5, p 10 – 23

MORENO, A.; SUSMOZAS, A.; OLIVA, J.; NEGRO, M. J. Overview of bio-based industries. Biobased Products and Industries, Capítulo 1, p 1 – 40.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. Brazilian Journal of Microbiology. 2011, 42: 1119-1127.

NASCIMENTO, W. B. filho; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. Revista Virtual de Química. 2015, 7 (6), p 1968 – 1987.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Cincinnati, 1944. Institute for Medical Research of the Jewish Hospital, Deparment of Biological Chemistry, College of Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati, 1944.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. Bioresourse Technology. 2019, vol 279, p 385 – 392.

PEDROSO, L. L. A.; da SILVA, F. F.; MELO, A. M; JUNIOR, M. E.; SHIMOYA, A. Demandas atuais e futuras da biomassa e da energia renovável no Brasil e no mundo. Brazilian Journal of Development. 2018. Vol 4, n 5, p 1980 – 1996.

PENHA, E. M.; VIANA, L. A.; GOTTSEHALK, L. M. F.; TERZI, S. C.; DE SOUZA, E. F.; CORDEIRO, S.; SANTOS, J. O.; SALUM, T. F. C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. Ciência Rural, Santa Maria. v 46, n4, p. 755-761, abr, 2016.

PREMALATHA, N.; GOPAL, N. O.; JOSE, P. A.; ANANDHAM, R.; KWON, S-W. Frontiers in Microbiology. 2015. Vol 6, Article 1046.

RAMÍREZ, F. B.; TAMAYO, D.; CORONA, I.; CERVANTES, J. L.; CLAUDIO, J. J.; RODRIGUEZ, E. Agro-industrial waste revalorization: the growing biorefinery. Biomass for bioenergy – Recent trends and future challenge. 2019. 20 p.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the stream treatment of lignocellulosic materials. Quimica Nova. 2003. Vol 26, n 6, p 863 – 871.

REE, R. VAN; ANNEVELINK, E. Status Report Biorefinery. Wageningen University & Research E-depot. 2007.

RIÇA, L. B.; MORAES, L. B.; SOUZA, D.; SOUZA, R.; MULLER, M. V. G. Aproveitamento de torta do tabaco gerado na produção de biodiesel para a obtenção de bioplásticos. Revista Jovens pesquisadores. 2016. Vol 6, n 2. 16 p.

RODRIGUES, C.; LORENCI A.; LETTI, L. Biotecnologia aplicada à agroindústria. Materiais lignocelulósicos como matéria prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. São Paulo, 2013.

ROSA, M. F.; SOUZA Filho, M S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T., Leitão, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais. Foz do Iguaçu, 2011.

SADHU, S.; SAHA, P.; SEM, S.; MAYILRAJ, S.; MAITI, T. K. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. SpringerPlus, 2013. Vol. 2 No. 10.

SALIM, A. A.; GRBAVCIC, S.; SEKULJICA, N.; STEFANOVIC, A.; TANASKOVIC, S. J.; LUKOVIC, N.; JUGOVIC, Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid-state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. Bioresource Technology. 2016. Vol 228, p 193 – 200.

SANTOS, M. F.; BORSHIVER, S.; COUTO, M. A. P. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. Economia e Energia. 2011. vol 15, n 82.

SETHI, S.; DATTA, A.; GUPTA, B. L.; GUPTA, S. Optimization os celulase production from bactéria isolated from soil. Hindawi Publishing Corporation. ISRN Biotechnology. Volume 2013. 7 p.

SHAIKI, N. M.; PATEL, A. A.; MEHTA, S. A.; PATEL N. D. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. Universal Journal of Environmental Research and Technology. 2013. Vol 3, p 39 – 49

SHANKAR, T.; ISAIARASU, Lurdu. Cellulase production by *B. pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. Middle East Journal of Scientific Research. 2011. Vol 8, p 40 – 45.

SILVA, I. P.; LIMA, R. M.; RUZENE, D. S.; DA SILVA, D. P. Residuos agroindustriais como biomassa alternativa para geração de energia distribuída em comunidais rurais. Energias Alternativas: Tecnologias sustentáveis para o nordeste brasileiro. Aracaju: Associação Acadêmica de Propriedade Intelectual. 2019. P 189 – 211.

SILVA, I. F.; SANTOS, A. S. Produção de amilase por Bacillus amyloliquefaciens utilizando torta de macaúba (Acrocomia aculeata) e farinha de pupunha (Bactris gasipaes) como substratos. 2012. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. 2016. Vol 6: 174. 15 p.

SOUII, A.; GUESMI, A.; OUERTANI, R.; CHERIF, H.; CHOUCHANE, H.; CHERIF, A.; NEIFAR, M. Carboxymethyl cellulase production by extremotolerant bacterial in low cost media and application in enzymatic saccharification of stevia biomass. Waste and Biomass Valorization. 2018.

SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases: production, application and challenges. Journal os scientific and industrial research. 2005. Vol 64 (11) p 832 – 844.

TABSSUM, F.; IRFAN, M.; SHAKIR, H. A.; QAZI, J. O. RSM based optimization of nutricional conditions for cellulase mediated saccharification by *Bacillus cereus*. Journal of Biological Engineering. 2018. Vol 12, n 7, 10 p.

THOMAS, L.; RAM, H.; KUMAR, A.; SINGH, V. Production, optimization and characterization of organic solvent tolerant cellulaes from lignocellulosic waste – degrading *Actinobacterium, Promicromonospora* sp VP111. Appl Biochem Biotechnol. 2016. 179 p 863 – 879

TIPATHI, A.; YADAV, A.; JHA, A.; SRIVASTAVA, S. K. Utilizing of sugar refinery waste (cane molasses) for production of bio-plastic under submerged fermentation process. Journal of polymers and the environment. 2020. Vol 20, p 446 – 453.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacilus flexus* isolated from green seaweed Ulva lactuca. Carbohydrate Polymers. 2011. Vol 83, p 891 – 897.

TU, W-C; HALLET, J. P. Recent advances in the pretreatment of lignocellulosis biomass. Current opinion in green and sustainable chemistry. 2019. Vol 20, p 11 – 17.

VANDENBERGHE. L. P; CARVALHO, J. C.; LIBARDI, N.; Rodrigues, C.; SOCCOL, C.R. Microbial enzyme factories: current trends in production processes and commercial aspects. Agro-industrial wastes as feedstock for enzymes production. 2016. Chapter 1, p 1 – 22.

VASUDEO, Z.; LEW, C. Statistical analysis of cellulase production in *Bacillus amyloliquefaciens* UNPDV-22. Extreme Life, Biospeology & Astrobiology. 2011, Vol 3, p 38 – 45.

VIJAYARAGHAVAN, P.; VICENT, P. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. Isolated from a paddy field. Polish Journal of Microbiology. 2012. Vol 61, n 1, p 51 – 55.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Animal cellulases. Cellular and Molecular Life Sciences. 2001. Vol 58, p 1167 – 1178.

WOICIECHOWSKI, A. L.; NETO, C. J. D.; VANDENBERGHE, L. P.; NETO, D. P. C.; SYDNEY, A. C. N.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; TORRES, L. A. Z.; SOCCOL, C. R. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional procssing and recent advances. Bioresourse Technology. 2020. Vol 304. 9p.

ZHANG, X-Z; ZHANG, Y. H. P. Cellulases: characteristics, sources, production and applications. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals and Polymes. 2013. 1 Ed. P 131 – 146.

ZOGHLAMI, A.; PAES, G. Lignocellulosic biomass: understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. Frontiers in chemistry chemical and process engineering. 2018. Vol 7:874, 11 p.

ZUIN, V.; RAMIN, L. Green and sustainable separation of natural products from agro-industrial waste: challenge, potentialities and perspectives on emerging approaches. Top Curr. Chem. 2018. Vol 37, n 3. 54 p.

ANEXOS

Anexo 1. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da produção de celulases com diferentes concentrações de bagaço de malte no meio de cultura da bactéria *Bacillus smithii* QT03 pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Hs_incubação	4	0,106678	0,0000
Erro	75	0,245602	
Total	79		
CV = 34,06			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias			
0,5	0,110588	a		
1	0,150588	a	b	
4	0,169091		b	
3	0,202222		b	
2	0,205882		b	

Anexo 2. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da produção de celulases com diferentes temperaturas de incubação do meio de cultura da bactéria *Bacillus smithii* QT03 pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Temperatura	5	0,036790	0,0000
Erro	42	0,000319	
Total	47		
CV = 16,89			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias				
50	0,022500	a			
45	0,066667		b		
40	0,122000			c	
25	0,167500				d
30	0,170000				d
35	0,182222				d

Anexo 3. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da produção de celulases com diferentes valores de pH do meio de cultura da bactéria *Bacillus smithii* QT03 pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Ph	8	0,070847	0,0000
Erro	175	0,000524	
Total	183		
CV = 15,56			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias				
5,0	0,024211	A			
5,5	0,059313		B		
6,0	0,124100			C	
6,5	0,160067			C	D
7,5	0,175870			C	D
7	0,178400			C	D
8	0,179222			C	D
8,5	0,183714				D
9	0,191481				D

Anexo 4. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da produção de celulases com diferentes concentrações de pré-inoculo no meio de cultura da bactéria *Bacillus smithii* QT03 pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Volume inoculo	3	0,000752	0,2042
Erro	75	0,000480	
Total			
CV = 14,69			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Anexo 5. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da produção de celulases com diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura da bactéria *Bacillus smithii* QT03 pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Fonte de N	6	0,009712	0,0000
Erro	47	0,000417	
Total	53		
CV = 10,79			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias			
Molibdato de amônio	0,121330	a		
Tryptone	0,180604		b	
Sulfato de amônio	0,188243		b	
Extrato de levedura	0,191261		b	
Nitrato de sódio	0,201352		b	
Peptona bacteriológica	0,212056		b	c
Extrato de carne	0,236152			c

Anexo 6. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da produção de celulases com diferentes concentrações de extrato de levedura (0,5; 0,7; 1,0; 1,5 e 2%) no meio de cultura da bactéria *Bacillus smithii* QT03 pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Concentração Fonte de N	4	0,007619	0,0000
Erro	40	0,000263	
Total	44		
CV = 7,89			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias			
2%	0,160966	a		
0,5%	0,198569		b	
0,7%	0,210782		b	
1%	0,217039		b	
1,5%	0,240221			c

Anexo 7. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da produção de celulases com diferentes níveis de aeração do meio de cultura da bactéria *Bacillus smithii* QT03 pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Velocidade de Agitação	3	0,023653	0,0000
Erro	26	0,000242	
Total	29		
CV = 10,98			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias			
100	0,068574	a		
150	0,163204		b	
250	0,181075		b	c
200	0,188557			c

Anexo 8. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da atividade de celulases com solução CMC com diferentes valores de pH pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
pH – caracterização enzima	7	0,007082	0,0000
Erro	33	0,000444	
Total	40		
CV = 10,31			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias				
5,5	0,135900	a			
9,0	0,178908	a	b		
6,0	0,184334		b		
8,5	0,211245		b	c	
8	0,214940		b	c	
7,5	0,232380		b	c	
6,5	0,233535				d
7	0,236191				d

Anexo 9. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da atividade de celulases de *B. smithii* QT03 sob efeito de diferentes temperaturas de incubação da mistura reacional pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Temperatura	7	0,021830	0,0000
Erro	64	0,000347	
Total	71		
CV = 10,19			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste				
80	0,107489	a				
75	0,136702		b			
50	0,164329		b	c		
45	0,167008			c		
55	0,208414				d	
60	0,212422				d	
65	0,232287				d	e
70	0,246424					e

Anexo 10. Resumo da análise de variância dos dados obtidos da atividade de celulases de *B. smithii* QT03 sob efeito de diferentes tempos de incubação da mistura reacional pelo Teste de Tuckey (significância de 5%) realizado com o software SISVAR.

Fonte de Variação	**GL**	**QM**	**P>0,05**
Tempo de incubação	5	0,002738	0,0000
Erro	18	0,000093	
Total	23		
CV = 4,31			

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste		
10	0,175000	a		
20	0,215000		b	
30	0,230000		b	c
40	0,235000		b	c
50	0,242500			c
60	0,245000			c