

FORMULAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO  
DE CELULASES POR *BACILLUS* SP E POTENCIAL DAS ENZIMAS  
PARA HIDROLISAR A CELULOSE

**EDITE ANDRADE COSTA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2017

FORMULAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO  
DE CELULASES POR *BACILLUS* SP E POTENCIAL DAS ENZIMAS  
PARA HIDROLISAR A CELULOSE

**EDITE ANDRADE COSTA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

031/2017

C837 Costa, Edite Andrade.

Formulação de um meio de cultura para a produção de celulases por *Bacillus sp* e potencial das enzimas para hidrolisar a celulose / Edite Andrade Costa – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Bibliografia: f. 54 – 62 .

Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. Celulases. 2. *Bacillus sp*. 3. Resíduos Agroindustriais. 4. Farinha da Casca de Maracujá. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 660.62

FORMULAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO  
DE CELULASES POR *BACILLUS* SP E POTENCIAL DAS  
ENZIMAS PARA HIDROLISAR A CELULOSE

EDITE ANDRADE COSTA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal.

Aprovada em 31 de março de 2017

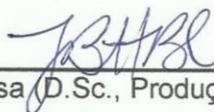
Comissão Examinadora



Prof. Eder Dutra de Resende (D.Sc., Engenharia Química) – UENF



Prof<sup>a</sup>. Luana Pereira de Moraes (Ph.D. Ciência e Tecnologia de Alimentos) –  
UENF



Prof. João Batista Barbosa (D.Sc., Produção Vegetal) – IFSE Campus Glória



Prof<sup>a</sup>. Meire Leis Leal Martins (Ph.D. Molecular Biology and Biotechnology) –  
UENF  
(Orientadora)

*A Deus,  
Aos meus pais (Milton e Terezinha),  
À Minha irmã (Laura),  
Ao Jonatas.  
Dedico com muito carinho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem dedico minha vida, por estar sempre presente nos bons momentos e nos mais difíceis, fazendo com que tenha força, disposição e saúde para seguir em frente;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À prof<sup>a</sup>. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins pela orientação, profissionalismo, incentivo, apoio e compreensão durante o curso;

Aos professores integrantes da banca examinadora Éder Dutra Resende, Luana Pereira de Moraes e João Batista Barbosa por aceitarem contribuir com esse trabalho.

A meu pai Milton, minha mãe Terezinha, pela minha criação, educação, por me apoiar em cada decisão tomada e amor em todos os momentos da vida;

À minha irmã Laura, pela amizade, carinho e amor constante;

Ao Jhony, pelo carinho, amizade, paciência e pelo amor que foi indispensável a cada instante e que me ajudou a enfrentar as dificuldades e obstáculos encontrados no caminho;

À minha família emprestada (Celinha, Natalia, Jucélia, Ninim, Saulo, Vicente), pela amizade, carinho e incentivo;

Às minhas amigas que se tornaram irmãs Thamires e Pamela, por esses dois de anos de convivência, por cada momento que passamos juntas, que se não fosse por vocês tenho certeza que teria desistido do mestrado. Neste momento me faltam palavras, não tenho como agradecer tudo o que fizeram por mim. Vocês estarão sempre em meu coração, porque fazem parte dele;

À amiga Erica por estar ao meu lado, no laboratório ou fora dele e tornar assim momentos de trabalho, cansaço e até mesmo de desespero em momentos divertidos e agradáveis;

À técnica Aninha, pelo apoio fornecido durante os experimentos e a amizade;

Aos amigos do LTA: Letícia, Lara, Samara, Andressa, Juliana, Dani, Raquel, Larissa Pacheco, Natânia, Larissa pela convivência e momentos de descontração;

Aos meus familiares e amigos de Tocantins, pela amizade, carinho e apoio;

A todos os amigos, companheiros de curso e laboratório, que mesmo não sendo citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 <i>Bacillus</i> .....	3
2.2 Celulases: Importância Industrial.....	5
2.3 Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar, da casca de maracujá e água de maceração de milho para a produção de enzimas.....	9
2.4 O Planejamento de Experimentos .....	12
3. OBJETIVOS .....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos .....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 Micro-organismo .....	15
4.2 Meio de Cultura .....	15
4.3 Ativação da linhagem e preparo do inóculo.....	16
4.4 Otimização do meio de cultivo para a produção das celulases utilizando o planejamento experimental .....	16
4.5 Obtenção do extrato enzimático .....	17
4.6 Ensaio Enzimáticos .....	17
4.6.1 Atividade enzimática da Avicelase e Carboximetilcelulase (EC 3.2.1.91).....	18

4.7	Otimização das condições de hidrólise utilizando planejamento fatorial .....	18
4.8	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	20
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1	Otimização da produção de celulases usando o termofílico <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 por meio de planejamento experimental. ....	21
5.1.1	Otimização da produção de avicelase usando bagaço de cana-de-açúcar, farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho.....	21
5.1.2	Otimização da produção de CMCase usando bagaço de cana-de-açúcar, farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho.....	29
5.2	Otimização das condições de hidrólise do papel de filtro e bagaço de cana tratado utilizando planejamento experimental. ....	35
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	49
6.	CONCLUSÕES .....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Representação do planejamento experimental DCCR com os níveis das variáveis independentes: bagaço, AMM e FCM na composição do meio de cultivo para a produção de celulases..... 17

**Tabela 2** - Representação do planejamento experimental do DCCR 2<sup>3</sup> com os níveis das variáveis independentes: extrato enzimático, tempo e substrato utilizando o papel de filtro. .... 19

**Tabela 3** - Representação do planejamento experimental DCCR com os níveis das variáveis independentes: extrato enzimático, substrato e tempo utilizando o bagaço tratado com solução de KOH e ácido sulfúrico 1,2%, m/V ..... 20

**Tabela 4** - Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> para a atividade da avicelase com os valores reais e codificados das variáveis independentes. .... 22

**Tabela 5** - ANOVA para a resposta da atividade da avicelase de *Bacillus* sp. SMIA-2..... 23

**Tabela 6** - Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para atividade da avicelase, obtidos para as diferentes concentrações de BCT, AMM e FCM, conforme DCCR. .... 24

<b>Tabela 7</b> - Matriz do DCCR 2 <sup>3</sup> para a atividade da CMCase com os valores reais e codificados das variáveis independentes. ....	30
<b>Tabela 8</b> - ANOVA para a resposta da atividade da CMCase de Bacillus sp. SMIA-2.....	31
<b>Tabela 9</b> - Coeficiente de regressão dos valores de atividade da CMCase, obtidos para as diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá, conforme DCCR.....	32
<b>Tabela 10</b> - Matriz do DCCR 2 <sup>3</sup> para Atividade específica com os valores reais e codificados das variáveis independentes utilizando o papel de filtro como substrato. ....	37
<b>Tabela 11</b> - ANOVA para a resposta da Atividade específica (µg açúcar/ mg.mL.h) da suspensão contendo celulasas utilizando o papel de filtro como substrato conforme modelo ajustado para o DCCR.....	38
<b>Tabela 12</b> - Coeficiente de regressão dos valores de Atividade específica da celulase para o papel de filtro, obtidos para as diferentes concentrações de extrato enzimático, substrato e tempo de reação, conforme DCCR.....	39
<b>Tabela 13</b> - Matriz do DCCR 2 <sup>3</sup> para Atividade específica do extrato de celulasas com os valores reais e codificados das variáveis independentes utilizando o bagaço de cana tratado.....	43
<b>Tabela 14</b> - ANOVA para a resposta da Atividade específica para o BCT. .	44
<b>Tabela 15</b> - Coeficiente de regressão dos valores de Atividade específica do extrato de celulasas para o substrato BCT, obtidos para as diferentes concentrações de extrato enzimático, substrato e tempo de reação, conforme DCCR.....	45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (Castro e Pereira, 2010). ..... 6
- Figura 2** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de bagaço de cana-de-açúcar e farinha da casca de maracujá na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de água de maceração de milho constante..... 25
- Figura 3** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de água de maceração de milho (AMM) e da farinha da casca de maracujá (FCM) na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de bagaço de cana-de-açúcar constante. .... 26
- Figura 4** - Superfície de resposta 3D: Efeitos das concentrações de água de maceração de milho (AMM) e bagaço de cana-de-açúcar na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de farinha da casca de maracujá constante. 27
- Figura 5** - Valores preditos e observados para a variável dependente atividade da CMC<sub>ase</sub> em função de diferentes concentrações de FCM, AMM, BCT, conforme DCCR 2<sup>3</sup>. ..... 33
- Figura 6** - Diagrama de Pareto para a produção da enzima CMC<sub>ase</sub>, ao nível de 5% de significância. .... 34

**Figura 7** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de extrato enzimático e substrato de papel de filtro na Atividade específica da celulase com o tempo de reação constante. .... 40

**Figura 8** - Superfície de resposta 3D: Efeito da concentração de extrato enzimático e tempo de reação na Atividade específica da celulase com a concentração do substrato papel de filtro constante..... 41

**Figura 9** - Superfície de resposta 3D: Efeito da concentração do substrato de papel de filtro e tempo de reação na Atividade específica da celulase com a concentração de extrato enzimático constante. .... 42

**Figura 10** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de extrato enzimático e substrato de bagaço de cana tratado na Atividade específica a um tempo de reação constante. .... 46

**Figura 11** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de extrato enzimático e tempo de hidrólise na Atividade específica a uma concentração de substrato de bagaço de cana tratado constante. .... 47

**Figura 12** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de substrato de bagaço tratado e tempo de reação na Atividade específica da celulase, com uma concentração de extrato enzimático constante..... 48

**Figura 13** - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivadas em água de maceração de milho em 0,6% (m / v) e bagaço de cana-de-açúcar com aumento de 3000 vezes (a1) bagaço de cana-de-açúcar com aumento de 5000 vezes (a2) e farinha da casca de maracujá com aumento de 3000 vezes (b1), farinha da casca de maracujá com aumento de 5000 vezes (b2) a 50 ° C por 120 horas..... 50

## RESUMO

COSTA, Edite Andrade; M. Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. FORMULAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES POR *BACILLUS SP* E POTENCIAL DAS ENZIMAS PARA HIDROLISAR A CELULOSE. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Meire Lelis Leal Martins. Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Luana Pereira de Moraes.

As celulases são enzimas utilizadas em diferentes setores industriais. Entretanto, o custo total da sua produção é muito elevado, devido ao alto custo de substratos e meios utilizados. Neste sentido, a utilização de resíduos agro-industriais, como fontes de carbono, nitrogênio e indutores no processo de produção de celulases reduz o custo de obtenção destas enzimas e ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes de sua eliminação. Neste trabalho as concentrações do bagaço de cana-de-açúcar tratado (BCT), água de maceração de milho (AMM) e farinha da casca de maracujá (FCM) foram estudadas para a produção de celulases usando a bactéria *Bacillus sp* SMIA-2, visando formular um meio de baixo custo, como alternativa aos meios caros usados atualmente. Além disso, o grau de degradação do bagaço de cana-de-açúcar e da farinha da casca de maracujá pelo *Bacillus sp*. SMIA-2 foram avaliados através da microscopia eletrônica de varredura. Finalmente, visando avaliar a capacidade das enzimas para hidrolisar a celulose, os efeitos do tempo de hidrólise, a concentração do substrato (bagaço de cana e papel de filtro) e do extrato enzimático sobre a Atividade específica da celulase foram estudados. A aplicação das diferentes concentrações do BCT, FCM e AMM no meio de cultivo usando um delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ), mostrou que atividades de avicelases foram melhores quando *Bacillus sp*. SMIA-2 foi cultivado em culturas submersas contendo BCT 1,00%

m/v, AMM 1,00% m/v e FCM 0,322% por 168 horas, à temperatura de 50 °C, com um limite de confiabilidade de 95%. Para as mesmas condições estudadas, foi observado que o modelo não foi significativo ao nível de 5% de significância para a enzima CMCase. Observações das células de *Bacillus* sp SMIA-2 em microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostraram que o microrganismo aderiu firmemente ao BC e que a FCM contribuiu para aumentar a população celular. As condições que proporcionaram melhores atividades específicas da celulase foram quando se utilizou 2,50 mL extrato enzimático, 2,00 mg/mL de papel de filtro e tempo de hidrólise de 12 h, com um limite de confiabilidade de 90%. Já para a hidrólise da celulose do BCT, as melhores atividades específicas das celulases foram obtidas quando se utilizou 2,50 mL a 10,00 mL de extrato enzimático, 2,00 mg/mL de bagaço tratado e tempo de reação de 12 horas, com um limite de confiabilidade de 95%.

Palavras-chave: Bagaço de cana; *Bacillus* sp.; celulases; delineamento experimental; farinha da casca de maracujá; resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

COSTA, Edite Andrade; M. Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2017. DEVELOPMENT OF A LOW-COST GROWTH MEDIUM FORMULATION TO CELLULASE PRODUCTION BY *BACILLUS* SP SMIA-2 AND PERFORMANCE OF ENZYMES TO CELLULOSE HYDROLYSIS. Advisor: Meire Lelis Leal Martins. Co-Advisor: Luana Pereira de Moraes.

Cellulases are enzymes used in different industrial sectors. However, the total cost of its production is very high, due to the high cost of substrates and media used. The use of agro-industrial waste such as carbon, nitrogen and inductors in the cellulase production process reduces the cost of obtaining these enzymes and helps to solve the environmental problems resulting from their elimination. In this work the concentrations of sugarcane bagasse treated (SBT), corn steep liquor (CSL) and passion fruit rind flour (PFRF) were studied for the production of cellulases using the bacterium *Bacillus* sp SMIA-2, with the objective to formulate a low cost medium as an alternative to the expensive medium currently used. In addition, the degree of degradation of the sugarcane bagasse and the passion fruit rind flour by *Bacillus* sp. SMIA-2 was evaluated through scanning electron microscopy. In order to evaluate the ability of the enzymes to hydrolyze cellulose, the effects of the hydrolysis time, the concentration of the substrate (sugarcane bagasse and filter paper) and the enzymatic extract on the cellulase activity were studied. The application of different concentrations of SBT, PFRF and CSL in the culture medium using a central rotational compound design ( $2^3$ ), showed that avicellase activities were better when *Bacillus* sp. SMIA-2 was grown in submerged cultures containing 1.00% m / v SBT, 1.00% m / v CSL and 0.322% PFRF for 168 hours at 50 ° C with a 95% confidence limit. For the same conditions studied, it was observed that the model was not significant at the 5% level of significance for the enzyme CMCase. Observations from scanning electron microscopy (SEM) provided qualitative

observations of the cell population and it was found that *Bacillus* sp SMIA-2 was tightly bound to sugarcane bagasse and that passion fruit peel meal improved the cell population. The conditions that provided the best specific activities of the cellulase were 2.50 mL of crude extract, 2.00 mg / mL of filter paper for 12 h with a 90% confidence limit. Using SBT as substrate, the conditions that provided the best specific activities of the cellulase were obtained when the crude extract, ranging from 2.50 mL to 10.00 mL and 2.00 mg / mL of treated bagasse were used and reaction time of 12 hours with a 95% confidence limit.

Keywords: Cellulase, *Bacillus* sp., agroindustrial waste, experimental design, passion fruit rind flour.

## 1. INTRODUÇÃO

As celulasas são as terceiras enzimas mais comercializadas atualmente e são utilizadas em diferentes setores industriais tais como aditivos em detergentes, na extração de sucos de frutas e processamento de amido, em indústrias têxteis, papel e de alimentos, na fabricação de cerveja, e ainda, no pré-tratamento de resíduos industriais.

As celulasas constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Lynd, *et al.*, 2002; Tolan, 2002; Castro e Pereira Jr., 2010; Arantes & Saddler, 2011). A hidrólise da celulose é realizada pela ação de três grupos de celulasas: endoglucanases; exoglucanases e  $\beta$ -glicosidase (Sun & Cheng, 2002). As carboximetilcelulasas (endoglucanases) são enzimas do complexo celulolítico que clivam as ligações das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres. Já as avicelases (exoglucanases) agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não-redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos. Por outro lado, as  $\beta$ -glicosidases atuam nos resíduos de celobiose liberados e os hidrolisam a glicose (Castro; Pereira Jr., 2010; Binod *et al.*, 2012).

O custo da utilização de celulasas em processos industriais é bastante elevado devido ao alto custo de substratos e meios utilizados. No entanto, a utilização de resíduos agroindustriais, como fontes de carbono no processo de obtenção destas enzimas, além de diminuir o custo de produção, ajudam a resolver os problemas ambientais decorrentes de sua eliminação (Kuberan et al. 2010).

A substituição da celulose pura comumente utilizada como substrato indutor da síntese enzimática por substratos relativamente mais baratos como o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado efetiva para a redução do custo de produção das celulasas (Muthukrishnan, 2007). Da mesma forma, a substituição de fontes caras de nitrogênio no meio de cultura, como o extrato de levedura e extrato de carne, pela água de maceração de milho, um subproduto de baixo custo da indústria de moagem de milho e disponível em larga escala, tem sido explorada por diversos pesquisadores (Parekh et al., 1999).

Estudos prévios realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes, RJ, revelaram que a farinha da casca de maracujá, um subproduto da indústria processadora de suco de maracujá, rica em celulose e hemicelulose além de minerais e pectina, foi efetiva como co-substrato para a produção de celulasas pela bactéria *Bacillus* sp SMIA-2 (Costa et al., 2017).

A otimização dos processos biotecnológicos para a produção de celulasas é de grande importância, pois qualquer melhoria alcançada na produtividade do metabolismo microbiano, em geral, através da manipulação dos parâmetros físico-químicos e nutricionais, pode alterar significativamente o rendimento do produto de interesse. Esta otimização, pode ser conseguida através de metodologias estatísticas, como a superfície de resposta, para estabelecer as condições mais favoráveis para alcançar os máximos níveis de atividade das enzimas.

A demanda por celulasas mais estáveis é crescente, uma vez que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm um risco de contaminação reduzido (Haki & Rakshit, 2003). A hidrólise completa dos polissacáridos, que contêm resíduos agrícolas, requer um tempo de reação mais longo, que é frequentemente associado com os riscos de contaminação durante um

período de tempo. As celulasas termoestáveis são ativas e mantêm a estabilidade durante um período prolongado a temperaturas mais elevadas (Cai et al., 2011). Além disso, as temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Egorovae Antranikian, 2005).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um coquetel composto de bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá, para a produção de celulasas usando a cepa termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2. A fim de avaliar o potencial das enzimas na hidrólise da celulose, as condições para a obtenção de maiores atividades específicas das celulasas foram estudadas utilizando o papel de filtro Whatman nº 1 e bagaço de cana como substratos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Bacillus*

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é extremamente heterogêneo e constitui um grupo diversificado de bactérias. Apresenta-se em forma de bastonete com extremidades retas ou arredondadas, tamanhos variáveis, gram-positivos, esporulados e aeróbios ou anaeróbios facultativos. Muitos bacillus são organoheterotróficos e utilizam uma considerável escala de compostos orgânicos simples (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos), como substratos respiratórios. A maioria é mesófila, com temperatura ótima entre 30 e 45°C, porém o gênero contém um número de termofílicos representativos que crescem a temperaturas de 65°C ou mais altas (Madigan et al., 2010).

Os organismos capazes de viver em altas temperaturas são chamados de termofílicos, termofílicos extremos e hipertermofílicos. A adaptação de um determinado micro-organismo à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, do DNA e das proteínas às temperaturas acima da faixa mesofílica. Essa adaptação à termofilia tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses micro-organismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou, ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos (Gomes et al., 2007).

Enzimas produzidas por micro-organismos que crescem sob altas temperaturas apresentam tantas aplicações biotecnológicas quanto maior a termoestabilidade da biocatransformação. (Delatorre et al., 2010).

Bactérias do gênero *Bacillus* são notáveis produtoras de uma ampla gama de enzimas hidrolíticas extracelulares de grande interesse comercial. Por isso, o isolamento de espécies deste gênero para a produção de enzimas com novas propriedades é um tema de grande relevância para a comunidade científica. Estas bactérias são capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Wang et al., 2007). Além disso, são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas, típicas de resíduos. Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivas que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood et al., 1998).

Para produzir uma grande variedade de celulasas e hemicelulasas, fungos e bactérias foram fortemente explorados. No entanto, o foco tem sido mais para os fungos devido à sua capacidade de excretar quantidades abundantes de celulasas não complexas e hemicelulasas. Recentemente, esta tendência está mudando para as bactérias, devido às suas taxas de crescimento mais elevadas, à presença de multienzimas mais complexas e à presença em uma grande variedade de nichos ambientais (Acharya e Chaudhary, 2012). Não só essas bactérias podem sobreviver às condições severas, mas muitas vezes produzem enzimas estáveis que podem aumentar as taxas de processos de bioconversão.

Segundo Schallmey et al. (2004), a habilidade de produzir e secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares, apresentar espécies termófilas capazes de fermentar em uma ampla variedade de valores de pH, faz com que as cepas do gênero *Bacillus* sp. sejam dominantes nos processos de fermentação microbiológica gerando produtos enzimáticos comerciais com aplicabilidades específicas.

*Bacillus* sp SMIA-2, foi isolada de amostras de solo coletadas no

município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Souza et al., 2001). Uma bactéria formadora de esporos, termofílica, aeróbica estrita, gram-positivas, móvel e mediu 1,2  $\mu\text{m}$  de largura e 5,3  $\mu\text{m}$  de comprimento. O crescimento da bactéria ocorreu a valores de pH variando de 6,5 a 9,0 e o crescimento ótimo ocorreu em torno de pH 7,0. A temperatura ótima de crescimento foi em torno de 55°C e a máxima de 70°C. Os resultados da comparação de sequências de 16SrRNA indicaram que o isolado foi proximamente relacionado com o *Bacillus caldoolyolyticus* e *Bacillus* sp AK1 e estes três organismos exibiram níveis de homologia de 94% nas sequências de DNA ribossomal.

*Bacillus* sp SMIA-2 produziu níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira et al., 2010; Barbosa et al., 2014), amilases (Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b), pectinases (Cordeiro et al., 2009), xilanases (Cordeiro et al., 2011) e celulases (Ladeira et al., 2015), quando cultivada em culturas submersas contendo substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais.

Convencionalmente, múltiplas enzimas são produzidas por culturas mistas compostas por diferentes organismos ou pela mistura de várias enzimas diretamente através de micro-organismos geneticamente modificados dotados com múltiplas funções (Zhang et al., 2004; Zaghoul et al., 2000). *Bacillus* sp SMIA-2 possui a habilidade de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas, típicas de resíduos e produzir concomitantemente uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas em um único processo fermentativo (Barbosa, 2014), tornando esta bactéria atrativa para utilização industrial.

## **2.2 Celulases: Importância Industrial**

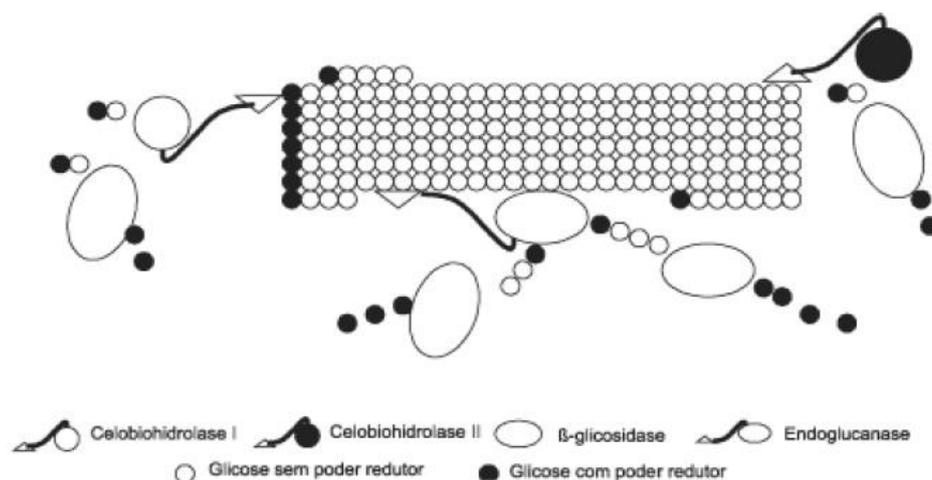
As enzimas hidrolíticas (que catalisam a reação de hidrólise de várias ligações covalentes) são as mais utilizadas nos processos industriais

destacando- se as proteases, amilases, pectinases, lipases e celulases.

As celulases são enzimas extracelulares capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. São biocatalisadores altamente específicos que atuam em conjunto para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial (Castro e Pereira Jr., 2010).

O complexo enzimático celulolítico, oriundo de micro-organismos, animais e plantas, é dividido em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico:  $\beta$ -1,4- endoglucanases (EC 3.2.1.4),  $\beta$ -1,4-exoglucanases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Jung et al., 2015).

A figura 1 ilustra a ação conjunta entre exoglucanases, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.



**Figura 1** - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (Castro e Pereira, 2010).

As carboximetilcelulases ( $\beta$ -1,4- endoglucanase) são responsáveis por iniciar a hidrólise. Clivam as ligações das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres liberando glicose, celobiose e celodextrinas, criando extremidades não redutoras para subsequente ação das exoenzimas. A carboximetilcelulase é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (Tomme et al., 1995; Lynd et al.

2002; Lee e Moon, 2003; Ogeda e Petri, 2010; Bano et al., 2013).

As exoglucanases, avicelases ou celobiohidrolases são responsáveis pela liberação de glicose e celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose (Lynd e Zhang, 2002; Castro e Pereira Jr., 2010). Elas agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não-redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise. Por outro lado, as  $\beta$ -glicosidases atuam nos resíduos de celobiose liberados e hidrolisam a glicose (Lee et al., 2003; Lynd et al., 2002; Zeilinger et al., 2000; Ogeda e Petri, 2010).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento maior do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. (Lynd et al., 2002).

Dentre as enzimas utilizadas em biotecnologia, as celulases têm atraído muito interesse devido a suas diversas aplicações. Tais enzimas têm mostrado um enorme potencial biotecnológico, pois podem ser usadas com diversas finalidades, como degradação de materiais lignocelulósicos e na desintoxicação de resíduos agroindustriais (El-sersy et al., 2010; Naraian et al., 2010).

A produção de celulases em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, cujo objetivo era de melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulases também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias: têxtil, em processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim); de polpa e papel; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o

desgaste das peças, após sucessivas lavagens. (Castro e Pereira Jr., 2010).

Na indústria de biocombustíveis, as celulases estão presentes durante a hidrólise da celulose, liberando os açúcares e facilitando assim o processo de fermentação e posterior formação do bioetanol (Limayen e Rick, 2012). O uso de celulases para este fim tem como entrave o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção das enzimas e a necessidade de produzir enzimas mais eficientes (Sun e Cheng, 2002).

Na indústria de detergentes se emprega a enzima parcialmente purificada e com atividade em condições alcalinas. Quando utilizadas melhoram o desempenho deste, pois permitem a remoção de pequenas fibrilas difusas do tecido, conferindo assim brilho e maciez ao tecido. Já no caso de tratamento de efluentes da indústria de papel, a aplicação direta do micro-organismo tem demonstrado resultados satisfatórios, além de um custo menor (Marco, 2012).

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

Na indústria de polpa e papel, as celulases estão presentes na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação de folhas de papel (Lima et al., 2001). As celulases são usadas misturadas com hemicelulase para melhorar a drenagem e execução de máquinas de papel (Cao e Tan, 2002).

### **2.3 Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar, da casca de maracujá e água de maceração de milho para a produção de enzimas**

Resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando o objetivo é a produção destas enzimas em larga escala (Hernandez et al., 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção estimada de 691 mil toneladas, na safra de 2016/2017. Esta produção é considerável levando ao conglomerado de subprodutos, principalmente de palha de cana, de folhas frescas e de bagaço (Conab, 2016).

Dentre as matérias-primas lignocelulósicas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo. Produzido na proporção de 280 kg t<sup>-1</sup> de cana moída, o bagaço de cana pode conter de 32 a 44% de celulose, 27 a 32% de hemicelulose, 20 a 24% de lignina e 4,5 a 9,0% de cinzas (Soccol et al., 2010). O bagaço é oriundo da moagem do material vegetal e é composto por fibras e resíduos de caldo. A palha é encontrada na superfície da área plantada após a colheita e neste resíduo encontram-se folhas, ponteiros, colmos e raízes. As fibras destes materiais são constituídas por celulose, hemicelulose e lignina (Cunha et al., 2005).

Embora o bagaço possa ser utilizado para geração de energia ou como suplemento animal, ainda há um grande excedente que pode ser utilizado para produção de diversos bens da sociedade. Algumas alternativas para sua utilização como matéria-prima são a produção de etanol, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, forragem para agricultura, álcool, alcaloides e enzimas (Carvalho et al., 2002; Carvalho, 2005).

Atualmente o excedente de bagaço disponível para outros usos, se situa entre 7 e 10% do bagaço total (aproximadamente 280 kg de bagaço por tonelada de cana). O restante do bagaço obtido no processamento da cana é empregado como combustível primário na geração de vapor e energia elétrica. (Conab, 2016).

A substituição da celulose pura comumente utilizada como substrato indutor da síntese enzimática por substratos relativamente mais baratos como o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado como efetiva para a redução do custo de produção das celulasas (Muthukrishnan, 2007). Humbird et al. (2011) em seu estudo têm sugerido que a fonte de carbono usada na produção de enzimas poderia representar mais de 50% do custo total da enzima, se fosse utilizada glicose pura.

Outro grande problema é a geração de resíduos na indústria de processamento de frutas que após o processamento, geram subprodutos, os quais muitas vezes, não possuem um destino específico, tornando-se contaminantes ambientais e, conseqüentemente, gerando custos operacionais às empresas, pois necessitam de tratamento para o descarte. Dentre os resíduos agroindustriais mais comumente encontrados destacam-se as cascas e as sementes de frutas.

O maracujá é uma fruta bastante consumida no mundo e no Brasil, sua polpa contém ácido ascórbico e carotenoides (Talcoot et al., 2003), sua casca contém pectina (21,5%), triptofano, ácidos graxos e aminoácidos (Guertzenstein e Srur, 2002). A maior relevância econômica dos frutos do maracujazeiro vem do produto industrializado sob a forma de suco integral ou concentrado, devido às suas características sensoriais e também aos seus aspectos nutritivos. (Castro e Kluge, 1998).

O Brasil é um grande produtor de maracujá. Uma grande parte desta produção é utilizada para a extração do suco obtendo como principais resíduos as cascas e as sementes, que correspondem de 65 a 70% do peso do fruto (Oliveira et al., 2002). Cerca de 90% das cascas e sementes de maracujá das indústrias de sucos e polpas são descartadas, embora apresentem grande quantidade de fibras, pectina e óleo, sendo o restante aproveitado para diversos fins como, por exemplo, na preparação de ração animal e na fabricação de doce (Oliveira et al., 2002).

A casca do maracujá contém grande quantidade de compostos como celulose, pectina e outros, não sendo necessárias grandes complementações

nutricionais para o adequado desenvolvimento microbiano, pois funcionam como indutores para a produção de enzimas extracelulares, tais como celulases, xilanases, pectinases e outras (Medeiros et al., 2000). Assim, a produção de celulases através de bioprocessos utilizando a casca do maracujá é uma das muitas maneiras de explorá-los de forma lucrativa. A farinha da casca de maracujá, tem demonstrado os benefícios do uso de cosubstratos para aumentar a atividade enzimática. (Mesa et al., 2016).

Além disso, a água de maceração de milho, é um grande subproduto da indústria de moagem de milho, é um substrato barato disponível em larga escala (Parekh et al., 1999), capaz de fornecer uma fonte de nitrogênio adicional, proporcionando peptídeos e aminoácidos prontamente disponíveis para o metabolismo das células. Este subproduto da indústria do processamento do amido de milho é uma fonte de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, fosfato e íons metálicos (Rivas et al., 2004) e foi portanto, usado no meio de cultura em substituição ao extrato de levedura e peptona, fontes de nitrogênio de alto custo. Este resíduo tem sido satisfatoriamente usado para uma variedade de fermentações tais como produção de solventes, antibióticos e enzimas (Lima et al. 2001).

O processo industrial de moagem úmida é o segundo maior setor de consumo de grãos de milho após a alimentação animal, utilizando 12% do total produzido (Abimilho, 2016). Este envolve transformações químicas, bioquímicas e operações mecânicas com o objetivo de separar o grão do milho em suas frações relativamente puras: germe, fibra, amido (Singh et al., 1997).

Os produtos primários de moagem úmida são amidos alimentícios e industriais, os quais podem ser convertidos em xaropes e etanol. Os coprodutos incluem o óleo de milho e os produtos destinados à produção de rações animais, tais como, farelo do glúten de milho, farelo do germe de milho, fibras e água de maceração, sendo os últimos, sólidos solúveis removidos durante a maceração e concentrados por evaporação. A água resultante da maceração, usualmente vendida na base de 50% de sólidos, é rica em vitaminas, especialmente do complexo B. Combinados com outros ingredientes esses itens são usados na

formulação de rações específicas de acordo com a destinação dos animais (Abimilho, 2016).

Tendo em vista que o substrato para o crescimento do micro-organismo corresponde a 30-40% do custo da produção de enzimas em escala industrial (Joo e Chang, 2005). Vários estudos têm apresentado o potencial da utilização de água de maceração de milho como fonte de nitrogênio e carbono para produção de enzimas por micro-organismos termofílicos (Oliveira et al., 2014; Rodrigues et al., 2013; Ladeira, 2013; Andrade et al., 2011; Ladeira et al., 2010; Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b; Silva et al., 2007; Nascimento et al., 2007).

Makky (2009) investigou a produção de celulases (avicelase) pelo termofílico *Geobacillus stearothermophilus* quando cultivado no bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e tratado com álcali. A máxima atividade da enzima expressada foi 1,99U/mL e 1,06 U/mL no bagaço tratado e não tratado, respectivamente.

Ladeira et al. (2015) reportaram a produção de celulases por *Bacillus* sp. SMIA- 2 cultivado a 50°C em culturas submersas contendo bagaço de cana. A máxima atividade da avicelase (0.83 U/mL) e da carboximetilcelulase (0.29 U/mL) foi alcançada após 120 h e 168 h de incubação da cultura.

A produção e caracterização de celulases por *Bacillus* sp. C1AC5507 utilizando o bagaço de cana como fonte de carbono foi reportada por Padilha et al. (2012). A celulase (carboximetilcelulase) apresentou um peso molecular em torno de 55 kDa e sua atividade variou entre 0,14 e 0,37 U/mL.

## **2.4 O Planejamento de Experimentos**

O Planejamento de Experimentos (em inglês *Design of Experiments*, DOE) é uma técnica utilizada para, otimizar experimentos, ou seja, definir quais dados e em quais quantidades e condições deve ser coletado um determinado experimento, buscando satisfazer dois grandes objetivos: a maior precisão possível na resposta e o menor custo. É uma técnica considerada de extrema

importância na indústria, já que seu emprego permite resultados mais confiáveis, economizando dinheiro e tempo (Montgomery, 1976).

Aparentemente novas, as principais técnicas de planejamento de experimentos já existem há muitos anos, contudo, devido à maioria dessas técnicas requererem uma quantidade exaustiva de cálculos, tornou-se mais fácil utilizá-las após o desenvolvimento das ferramentas computacionais de análise estatística (Amaral, 1999).

Diversos trabalhos têm abordado a metodologia de superfície de resposta como ferramenta na otimização do processo de produção enzimática de celulasas. Alguns destes focaram sua atenção sobre o papel de uma variedade de fontes de carbono e nitrogênio na produção destas enzimas. Bagaço de cana, melaço de cana-de-açúcar, extrato de malte, extrato de levedura, licor de milho, farinhas, cascas de frutas já foram usados para a produção de celulasas.

França et al. (2014) utilizando o planejamento fatorial completo  $2^2$ , com uma fermentação semissólida, avaliaram o potencial da umidade e da proporção dos resíduos da casca de coco verde e sabugo de milho na produção das enzimas avicelase e xilanase pelo fungo *Aspergillus niger*.

Oliveira et. al (2015) avaliaram o uso simultâneo da casca de maracujá e do sabugo de milho como substratos para a produção das enzimas avicelase e xilanase em fermentação semissólida com o fungo *Aspergillus niger*. Para maior expressão das enzimas, realizou-se um planejamento experimental  $2^3$ , com repetições no ponto central, tendo como variáveis o pH, a umidade e a proporção dos resíduos.

Reinehr et al. (2016) produziram lipases com atividade de hidrólise pelo fungo *Aspergillus* utilizando resíduos agroindustriais e estudaram a influência da concentração do indutor e da umidade do processo conduzido via fermentação em estado sólido. Utilizaram dois planejamentos experimentais em sequência, um fatorial completo  $2^3$  (com três fungos do gênero *Aspergillus* e três indutores) e outro  $2^2$  com dois pontos centrais (com umidade variando entre 60% e 70% e concentração de indutor variando entre 0% e 4%).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Formular um meio de cultura para a produção de celulasas por *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo bagaço de cana-de-açúcar, farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho e avaliar a capacidade destas enzimas em hidrolisar a celulose.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar as concentrações da farinha da casca do maracujá, água de maceração de milho e bagaço de cana-de-açúcar para a produção de celulasas por *Bacillus* sp SMIA-2.
- Avaliar as concentrações do substrato (Bagaço de cana e papel de filtro), das enzimas e do tempo de reação (hidrólise) para a obtenção de maiores atividades específicas das celulasas.
- Visualizar o grau de degradação do bagaço de cana-de-açúcar e da farinha da casca de maracujá pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 através da microscopia eletrônica de varredura.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismo

A estirpe utilizada neste estudo foi uma bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2, anteriormente isolada a partir de uma amostra coletada de solo no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Souza e Martins, 2001).

O micro-organismo foi mantido em placas de Petri contendo meio TSY (triptona 20 g.L<sup>-1</sup>; cloreto de sódio (NaCl) 1,0 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>; ágar 20 g.L<sup>-1</sup> e água destilada, 1 L), sob temperatura de refrigeração (7 °C).

### 4.2 Meio de Cultura

Para produção das enzimas foi utilizado o meio de cultura constituído de (g.L<sup>-1</sup> de água destilada): farinha da casca de maracujá comercial – Imbiara (FCM) (variável); água de maceração de milho comercial - Sigma (AMM) (variável), bagaço de cana-de-açúcar (variável); KCl, 0,3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,87; MgSO<sub>4</sub>, 0,5; NaCl, 1,0; e traços de metais (CaCl<sub>2</sub>, 2,2x10<sup>-3</sup>; ZnO, 2,5x10<sup>-3</sup>; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2,7x10<sup>-2</sup>; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,0x10<sup>-2</sup>; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 8,5x10<sup>-4</sup>; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2,4x10<sup>-3</sup>; NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2,5x10<sup>-4</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3,0x10<sup>-4</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1,0x10<sup>-3</sup>). O pH final do meio foi ajustado com NaOH 1,0 M para 7,2. Posteriormente o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi obtido da Usina sucroalcooleira Paraíso (Campos dos Goytacazes - RJ) e tratado com uma solução de hidróxido de potássio (KOH - 10%) por Ladeira et al. (2015) no Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) em Lisboa - Portugal.

#### **4.3 Ativação da linhagem e preparo do inóculo**

O micro-organismo foi estriado em placas de Petri contendo meio TSY (g.L<sup>-1</sup> de água destilada): triptona 20; NaCl 10; extrato de levedura 10 e ágar 20. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS (modelo Q 315 D26) a 50°C por 18 horas. Após este período, 5 mL do meio de cultura contendo 0,575 % m/v de FCM, 0,575 % m/v AMM e 0,575 % m/v BC, foram transferidos para as placas para ressuspender as células que, com auxílio de uma pipeta estéril, foram posteriormente sugadas. Estas células foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por mais 18 horas a 50°C em incubadora “shaker rotatório” (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) sob a agitação de 150 rpm. Este meio foi denominado inóculo.

#### **4.4 Otimização do meio de cultivo para a produção das celulasas utilizando o planejamento experimental**

O meio de cultura (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 4 mL do inóculo e incubado a 50°C em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA), operando a 150 rpm durante 168 horas.

A otimização das condições do meio de cultivo foi elaborada seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>3</sup> (Rodrigues e Lemma, 2009) em relação às variáveis independentes, bagaço de cana-de-açúcar tratado (BCT), água de maceração de milho (AMM) e farinha da casca de maracujá (FCM), com cinco repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 19 ensaios. A temperatura e a agitação foram mantidas a 50 °C e 150 rpm, respectivamente. Os níveis das variáveis independentes em estudo

foram definidos a partir de testes preliminares e estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Representação do planejamento experimental DCCR com os níveis das variáveis independentes: bagaço, AMM e FCM na composição do meio de cultivo para a produção de celulases.

Variáveis		Níveis				
		- 1,68	- 1,0	0	+1,0	+ 1,68
<b>FCM (% m/V)</b>	X <sub>1</sub>	0,15	0,322	0,575	0,828	1,00
<b>BCT (% m/V)</b>	X <sub>2</sub>	0,15	0,322	0,575	0,828	1,00
<b>AMM (% m/V)</b>	X <sub>3</sub>	0,15	0,322	0,575	0,828	1,00

FCM - Farinha da Casca de Maracujá; BCT – Bagaço de cana Tratado; AMM - Água de maceração de milho; Condição de Fermentação : Temperatura – 50° C; Agitação – 150 rpm; Tempo 168 horas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA  $p < 0,05$ ), para análise estatística e após a análise do F calculado foi possível gerar um modelo e uma superfície de resposta, utilizando o programa Statistica, versão 5.0. As respostas avaliadas foram: atividades enzimáticas da avicelase (U/mL), carboximetilcelulase (U/mL).

A condição que permitiu a obtenção de melhor atividade enzimática foi selecionada, enquanto suas variáveis foram repetidas em um novo experimento, sob as mesmas condições descritas no item 4.4.

#### 4.5 Obtenção do extrato enzimático

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

#### 4.6 Ensaio Enzimáticos

#### **4.6.1 Atividade enzimática da Avicelase e Carboximetilcelulase (EC 3.2.1.91)**

As atividades das enzimas avicelase e carboximetilcelulase foram determinadas pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de avicel (Sigma) e carboximetilcelulase (Sigma) (Ghose, 1987). Uma mistura de 0,5 mL de solução de substrato (avicel, carboximetilcelulase) 1% (m/V) preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi incubada a 70 °C durante 10 minutos. Transcorrido este período, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado à mistura e esta deixada em ebulição em banho-maria durante 10 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e a absorbância foi medida a 540 nm (Miller, 1959). O controle foi realizado em paralelo com todos os ensaios, a mistura de 0,5 mL de tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático e o mesmo procedimento foi realizado, para excluir açúcares redutores encontrados no sobrenadante da enzima. Uma unidade (U) de atividade das enzimas foi definida como 1  $\mu$ mol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,3 mg/mL.

#### **4.7 Otimização das condições de hidrólise utilizando planejamento fatorial**

A otimização das condições de hidrólise foi elaborada seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^3$ , em relação às variáveis independentes, extrato enzimático (mL), concentração de substrato (mg) e tempo (horas), com três repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 17 ensaios, à temperatura de 45°C e agitação de 150 rpm.

Os níveis das variáveis independentes foram definidos a partir de testes preliminares e estão apresentados na Tabela 2 e 3.

A análise estatística dos dados obtidos das condições de hidrólise foi submetida à análise de variância (ANOVA  $p < 0,10$  para papel de filtro, ANOVA  $p < 0,05$  para o bagaço tratado), e posterior geração do modelo e gerado superfície de resposta utilizando o programa Statistica versão 5.0. A resposta

avaliada foi: Atividade específica ( $\mu\text{g}$  açúcar/mg.mL.h).

Dois substratos foram empregados separadamente para avaliar a formação de Atividade específica durante a hidrólise: papel de filtro Whatman nº 1 e bagaço de cana tratado (com solução de KOH e ácido sulfúrico 1,2%, m/V por Ladeira et al. (2015) no Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) em Lisboa – Portugal).

Para a hidrólise da celulose presente no BCT e no papel de filtro diferentes concentrações de substrato (m/v) foram suspensas em 10 mL de volume final contendo extrato enzimático e tampão Tris-HCl.

**Tabela 2** - Representação do planejamento experimental do DCCR 2<sup>3</sup> com os níveis das variáveis independentes: extrato enzimático, tempo e substrato utilizando o papel de filtro.

Variáveis		Níveis				
		- 1,68	- 1,0	0	+1,0	+ 1,68
<b>Extrato</b>	X <sub>1</sub>	2,5	4,02	6,5	8,48	10,0
<b>Enzimático (mL)</b>						
<b>Substrato</b>	X <sub>2</sub>	2,00	3,21	5,00	6,78	8,00
<b>(mg/mL)</b>						
<b>Tempo (horas)</b>	X <sub>3</sub>	12	17	24	31	36

Condição de Hidrólise: Temperatura – 45° C; Agitação – 150 rpm; Volume final – 10 mL.

**Tabela 3** - Representação do planejamento experimental DCCR com os níveis das variáveis independentes: extrato enzimático, substrato e tempo utilizando o bagaço tratado com solução de KOH e ácido sulfúrico 1,2%, m/V.

Variáveis		Níveis				
		- 1,68	- 1,0	0	+1,0	+ 1,68
Extrato	X <sub>1</sub>	2,5	4,02	6,5	8,48	10,0
Enzimático (mL)						
Substrato	X <sub>2</sub>	2,00	3,21	5,00	6,78	8,00
(mg/mL)						
Tempo (horas)	X <sub>3</sub>	12	19	30	41	48

Condição de Hidrólise: Temperatura – 45° C; Agitação – 150 rpm; Volume final – 10 mL.

#### 4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme (Dykstra, 1993), foi utilizada para visualizar o grau de degradação do bagaço de cana e da farinha da casca de maracujá pelas enzimas do *Bacillus* sp SMIA-2.

Culturas do micro-organismo contendo bagaço de cana (0,6% m/V) ou farinha da casca de maracujá (0,6% m/V), obtidas após 120 horas de fermentação, foram fixadas pela imersão em 2,5 % de glutaraldeído preparado em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,1) durante 2 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão e foram submetidas à desidratação gradual em série de concentração alcoólica (20, 40, 60, 70, 80, 90, 96%, 100%), permanecendo 15 minutos em cada solução. Após a desidratação completa, as amostras foram secas pelo método de ponto crítico de secagem, utilizando para tal o aparelho Bal-tec CPD030. Após a secagem, as amostras foram montadas sobre porta-amostras de alumínio aderidas por meio de uma fita adesiva condutiva e revestidas com uma camada de paladium no aparelho Bal-tec SCD 050 sob atmosfera de argônio por 120 segundos. Posteriormente as amostras foram encaminhadas para observação no microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSEM 962 (Lichtenstein, Alemanha) do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da produção de celulases usando o termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 por meio de planejamento experimental.

#### 5.1.1 Otimização da produção de avicelase usando bagaço de cana-de-açúcar, farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho.

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^3$  e posterior construção das superfícies de resposta foram utilizados para avaliar os efeitos das concentrações de bagaço de cana-de-açúcar (BC), farinha da casca do maracujá (FCM) e água de maceração de milho (AMM) sobre a atividade da avicelase a fim de determinar as condições ótimas para se obter a máxima secreção dessas enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2.

Na Tabela 4 está apresentada a Matriz do DCCR para a atividade da avicelase (U/mL).

**Tabela 4** - Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> para a atividade da avicelase com os valores reais e codificados das variáveis independentes.

Ensaio	FMC (%m/V)	Bagaço (%m/V)	AMM (%m/V)	Avicelase (U/mL)
1	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,322 (-1)	1,961
2	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,322 (-1)	1,964
3	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,322 (-1)	1,044
4	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,322 (-1)	1,083
5	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,828 (+1)	1,214
6	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,857
7	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,828 (+1)	1,974
8	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,828 (+1)	1,379
9	0,150 (-1,68)	0,575 (0)	0,575 (0)	1,575
10	1,00 (+1,68)	0,575 (0)	0,575 (0)	1,752
11	0,575 (0)	0,150 (-1,68)	0,575 (0)	1,360
12	0,575 (0)	1,000 (+1,68)	0,575 (0)	1,741
13	0,575 (0)	0,575 (0)	0,150 (-1,68)	0,871
14	0,575 (0)	0,575 (0)	1,000 (+1,68)	1,662
15	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,849
16	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,820
17	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,916
18	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,920
19	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,852

FCM - Farinha da Casca de Maracujá; BCT – Bagaço de cana Tratado; AMM - Água de maceração de milho; Condição de Fermentação : Temperatura – 50° C; Agitação – 150 rpm; Tempo 168 horas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 a atividade da avicelase variou de 0,820 (Ensaio 16) a 1,974 U/mL (Ensaio 7). A significância estatística dos resultados foi verificada pela ANOVA através do F calculado para a produção da avicelase (Tabela 5). De acordo com a ANOVA, foi verificado que o

modelo ajustado para a produção da enzima foi significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ), e a porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi muito boa, cerca de 83,11%, podendo concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

**Tabela 5** - ANOVA para a resposta da atividade da avicelase de *Bacillus* sp. SMIA-2.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcal</b>
Regressão	2.149262	9	0.238807	3.771317
Resíduo	0.569897	9	0.063322	
Total	3.289056	18		

% variação explicada ( $R^2$ ) = 83,11;  $F_{9,9; 0,05} = 3,18$

A Tabela 6 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para as medidas do modelo de atividade da avicelase. Nota-se que os parâmetros significativos foram os termos quadráticos para a concentração de FCM, concentração de BCT e a interação da concentração do BCT e a AMM em 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6** - Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para atividade da avicelase, obtidos para as diferentes concentrações de BCT, AMM e FCM, conforme DCCR.

Fatores	Coef. de regressão	p – valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite Inferior	Limite Superior
<b>Média</b>	0,874863	<b>0,000028</b>	0,620588	1,129138
<b>X<sub>1</sub></b>	-0,044671	0,528216	-0,198708	0,109366
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	0,259512	<b>0,004152</b>	0,105438	0,413586
<b>X<sub>2</sub></b>	0,009221	0,895258	-0,144815	0,163258
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	0,219573	<b>0,010425</b>	0,065499	0,373648
<b>X<sub>3</sub></b>	0,051560	0,468287	-0,102477	0,205597
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	0,119182	0,114070	-0,034893	0,273256
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>2</sub></b>	-0,025154	0,783775	-0,226413	0,176104
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>3</sub></b>	-0,124228	0,196094	-0,325487	0,077030
<b>X<sub>2</sub> * X<sub>3</sub></b>	0,384825	<b>0,001918</b>	0,183566	0,586084

X<sub>1</sub>: FCM; X<sub>2</sub>: BCT; X<sub>3</sub>: AMM.

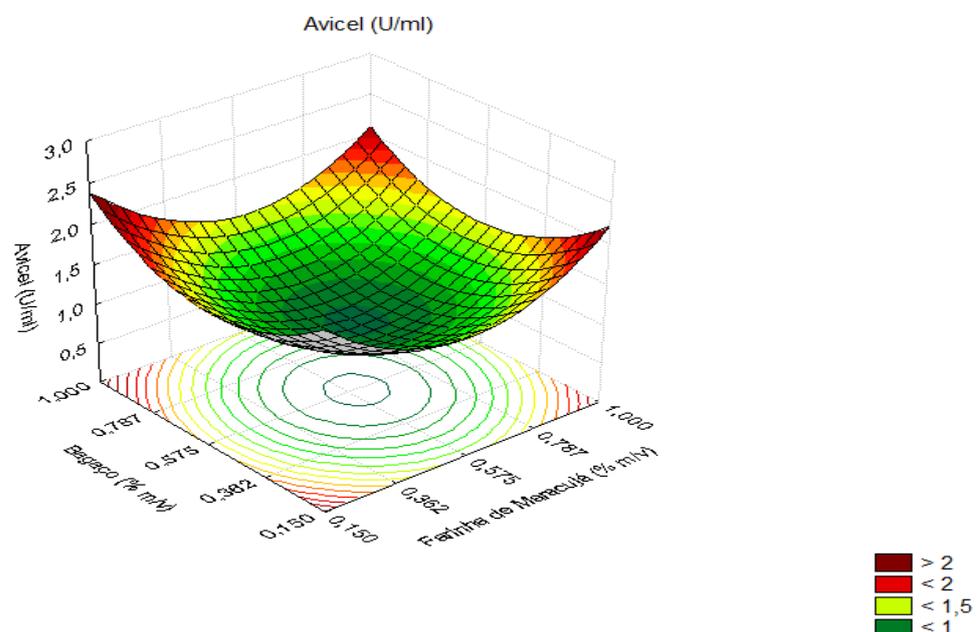
Observa-se que o modelo ajustado fica caracterizado pela equação (Equação 1).

$$\begin{aligned}
 Y \text{ (U/mL)} = & 0,874863 - 0,044671 x_1 + 0,259512 x_1^2 + 0,009221 x_2 + 0,219573 x_2^2 \\
 + & 0,051560 x_3 + 0,119182 x_3^2 - 0,025154 x_1 \cdot x_2 - 0,124228 x_1 \cdot x_3 + 0,384825 x_2 \cdot x_3
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Onde  $x_1$  é a concentração de FCM,  $x_2$  representa a concentração do BC e  $x_3$  é a concentração de AMM.

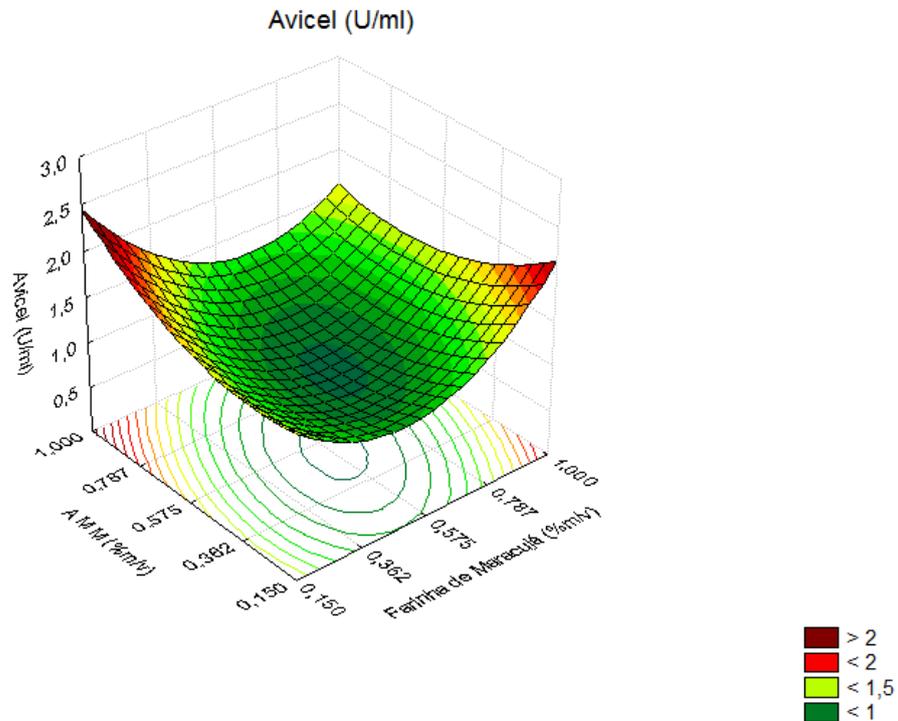
Após a análise dos resultados, superfícies de resposta para a variável atividade da avicelase foram construídas e os resultados ilustrados nas Figuras 2,

3 e 4 em função da concentração de farinha da casca de maracujá, água de maceração de milho e bagaço de cana-de-açúcar tratado. As variáveis não explícitas foram fixadas nos pontos centrais (nível 0) para a construção de uma superfície.



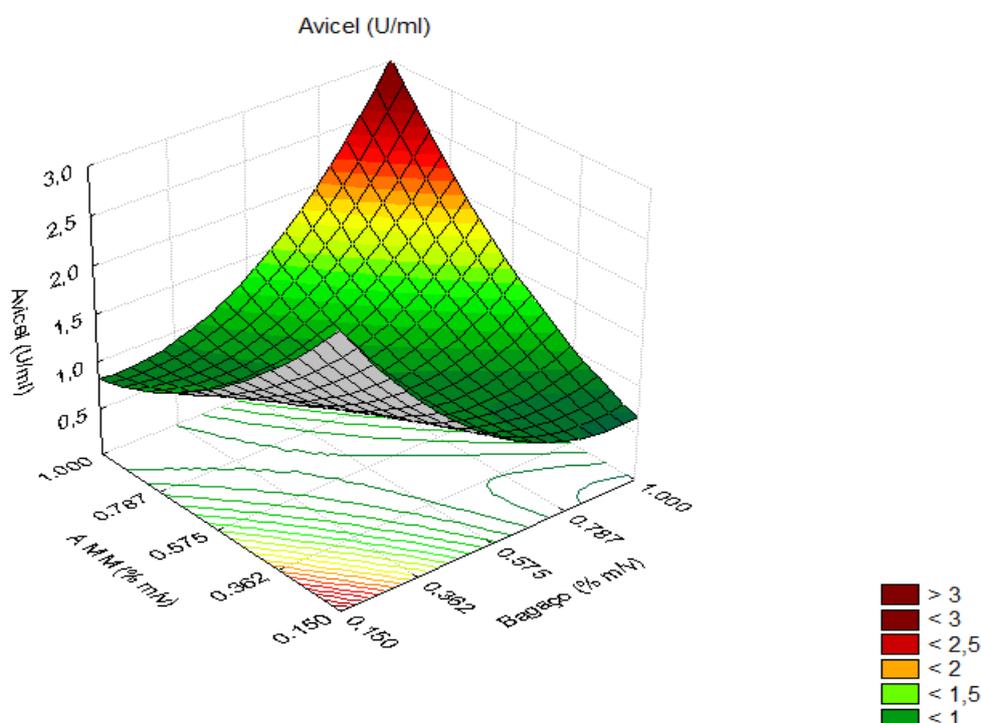
**Figura 2** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de bagaço de cana-de-açúcar e farinha da casca de maracujá na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de água de maceração de milho constante.

Na Figura 2 pode observar que com a AMM constante no nível central independente se diminuir ou aumentar as concentrações de BC e FCM, atinge maiores atividades da enzima avicelase. Isto é, com aumento simultâneo da concentração do BC e da FCM, ou então, se diminuir simultaneamente a concentração do BC e concentração da FCM ou quando aumenta a concentração do BC e diminui a concentração de FCM, ou se diminuir a concentração do BC e aumentar a concentração da FCM, temos uma maior atividade da avicelase.



**Figura 3** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de água de maceração de milho (AMM) e da farinha da casca de maracujá (FCM) na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de bagaço de cana-de-açúcar constante.

O aumento da concentração da água de maceração de milho e menor concentração da farinha da casca de maracujá resultam em uma maior produção de avicelase. E quando utiliza uma maior concentração de farinha da casca de maracujá e uma menor concentração de água de maceração de milho atinge uma melhor produção da enzima. Ambos os resultados foram obtidos quando fixada a concentração do bagaço de cana-de-açúcar no ponto central (Figura 3).



**Figura 4** - Superfície de resposta 3D: Efeitos das concentrações de água de maceração de milho (AMM) e bagaço de cana-de-açúcar na secreção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 a uma concentração de farinha da casca de maracujá constante.

Por fim, observou que quando fixada a concentração da farinha da casca de maracujá nos pontos centrais, a maior produção da enzima avicelase pode ocorrer quando utiliza as maiores ou menores concentrações de água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá simultaneamente. (Figura 4).

Com base neste estudo, observa que as quantidades de bagaço de cana, de água de maceração de milho e a farinha da casca de maracujá presentes no meio de cultura foram determinantes para se obter uma maior produção da avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2. A condição ótima para atividade máxima da avicelase ocorreu com a concentração do BCT, da AMM nos níveis máximos e da FCM no nível mínimo estudado.

Costa et al. (2017), relataram que a produção máxima da avicelase por *Bacillus* sp SMIA-2 foi obtida em culturas submersas contendo 0,625 % (m/v) de BC e 0,625 % (m/v) AMM e incubadas por 168 horas. Segundo estes autores a

adição da FCM (0,5 e 0,75%, m/v) ao meio de cultura, aumentou a atividade da enzima em 30%. Entretanto, a interação deste subproduto com os outros componentes do meio, BC e AMM não foi estudada.

Ladeira et al. (2015) relataram a produção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo 0,5% (m/V) de bagaço de cana *in natura* e 0,5% (m/V) de água de maceração de milho. Segundo esses autores, a atividade máxima de avicelase (0,83 U/mL) foi obtida após 120 h de incubação, resultado inferior ao encontrado no presente estudo, que obteve uma atividade máxima de avicelase de 1,974 U/mL durante 168 horas de fermentação. Estes resultados sugerem que o pré-tratamento do BC pode ter contribuído para a obtenção de maiores níveis de atividade da avicelase. A celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar é um polímero estrutural protegido contra ataque enzimático pela matriz circundante de lignina e hemicelulose. O pré-tratamento remove a lignina e reduz a cristalinidade da celulose e conseqüentemente pode aumentar a produção de celulasas por micro-organismos (Ashfaque et al., 2014).

O estudo de otimização da produção de avicelases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 mostrou que as concentrações de BC, AMM e FCM no meio de cultura foram fatores importantes que influenciaram a atividade desta enzima. A produção microbiana de celulasas é geralmente induzida pelo BC e, portanto, os resíduos ricos em celulose são explorados como substratos de crescimento abundantes e baratos para obter celulasas (Ashfaque, et al., 2014). AMM é uma fonte de aminoácidos, vitaminas e íons metálicos e tem sido utilizado com sucesso em meios de cultura para produção de celulasas (Oliveira et al., 2014; Cirigliano et al., 2013) em substituição de extratos de carne e levedura, que são fontes de nitrogênio de alto custo.

A FCM em baixas concentrações, demonstrou os benefícios do uso de cosubstratos para aumentar a atividade enzimática. Frequentemente, são relatados que os açúcares simples atuam como repressores da atividade enzimática. No entanto, a mistura de substratos, incluindo açúcares simples, como cosubstratos, foi mostrada ser eficiente para a produção de enzimas com atividade celulolítica (Mesa et al., 2016).

### **5.1.2 Otimização da produção de CMCase usando bagaço de cana-de-açúcar, farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho.**

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^3$  foi utilizado para avaliar os efeitos das concentrações de bagaço de cana-de-açúcar, farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho sobre a atividade da CMCase, a fim de determinar as condições ótimas para se obter a máxima secreção dessa enzima por *Bacillus* sp. SMIA-2.

Na Tabela 7 são apresentados os valores reais e codificados das variáveis independentes e os valores obtidos para a variável dependente atividade da CMCase ( $\text{U. mL}^{-1}$ ) dos 19 ensaios.

**Tabela 7** - Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> para a atividade da CMCase com os valores reais e codificados das variáveis independentes.

<b>Ensaio</b>	<b>FCM (%m/V)</b>	<b>Bagaço (%m/V)</b>	<b>AMM (%m/V)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>
1	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,308
2	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,348
3	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,334
4	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,378
5	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,367
6	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,374
7	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,189
8	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,486
9	0,150 (-1,68)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,340
10	1,00 (+1,68)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,416
11	0,575 (0)	0,150 (-1,68)	0,575 (0)	0,331
12	0,575 (0)	1,000 (+1,68)	0,575 (0)	0,427
13	0,575 (0)	0,575 (0)	0,150 (-1,68)	0,352
14	0,575 (0)	0,575 (0)	1,000 (+1,68)	0,389
15	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,457
16	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,367
17	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,388
18	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,367
19	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,388

FCM - Farinha da Casca de Maracujá; BCT – Bagaço de cana Tratado; AMM - Água de maceração de milho; Condição de Fermentação : Temperatura – 50° C; Agitação – 150 rpm; Tempo 168 horas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, a atividade da CMCase variou de 0,189 (Ensaio 7) a 0,486 U/mL (Ensaio 8). A significância estatística dos resultados foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de

variância para a produção da CMCase estão apresentados na Tabela 8. De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para a produção da enzima CMCase não foi significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ). O coeficiente de determinação foi de 66,21%.

**Tabela 8** - ANOVA para a resposta atividade da CMCase de *Bacillus* sp. SMIA-2.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcal</b>
Regressão	0.046526	9	0.005170	2.017169
Resíduo	0.023065	9	0.002563	
Total	0.092656	18		

% variação explicada ( $R^2$ ) = 66,21;  $F_{9,9; 0,05} = 3,18$

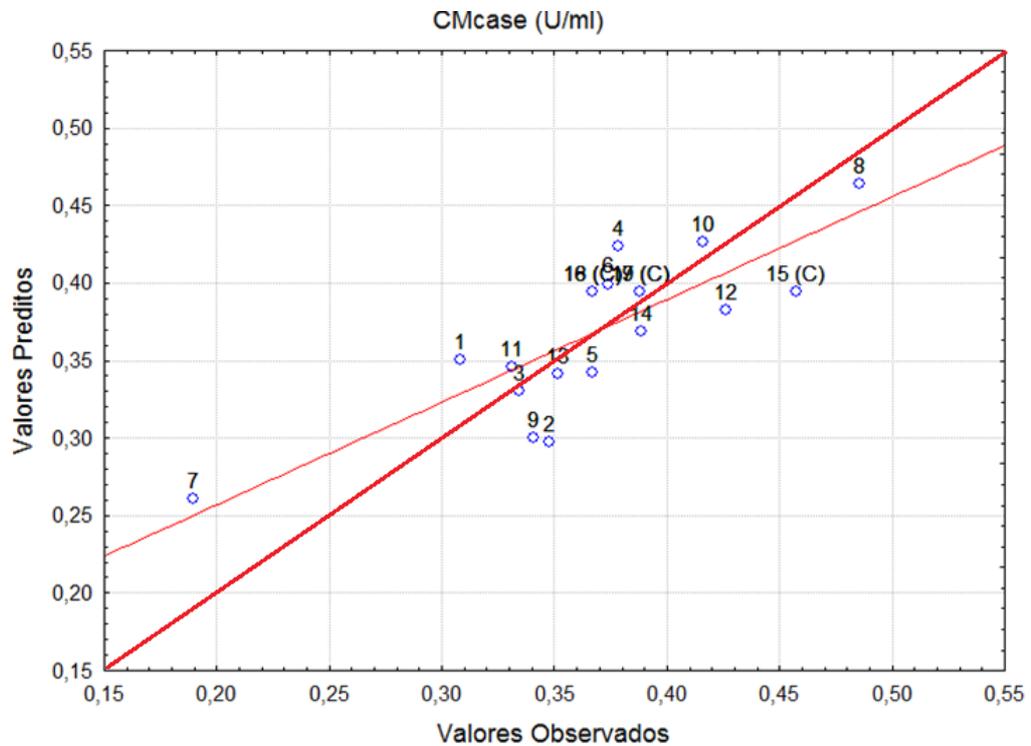
Pela Tabela 9, pode observar os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a medida de atividade da CMCase. Nota-se que o parâmetro linear de concentração de farinha da casca de maracujá foi significativo ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9** - Coeficiente de regressão dos valores de atividade da CMCase, obtidos para as diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá, conforme DCCR.

Fatores	Coef. de regressão	p - valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite Inferior	Limite Superior
<b>Média</b>	0,394689	<b>0,000000</b>	0,343535	0,445844
<b>X<sub>1</sub></b>	0,037629	<b>0,022591</b>	0,006640	0,068618
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	-0,011136	0,437342	-0,042132	0,019860
<b>X<sub>2</sub></b>	0,011013	0,442129	-0,019975	0,042002
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	-0,010845	0,449012	-0,041841	0,020151
<b>X<sub>3</sub></b>	0,008026	0,572332	-0,022962	0,039015
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	-0,013973	0,334457	-0,044970	0,017023
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>2</sub></b>	0,036677	0,070707	-0,003812	0,077166
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>3</sub></b>	0,027521	0,158524	-0,012968	0,068009
<b>X<sub>2</sub> * X<sub>3</sub></b>	-0,015278	0,415473	-0,055767	0,025211

X<sub>1</sub>: Farinha da Casca de Maracujá; X<sub>2</sub>: Bagaço de Cana Tratado; X<sub>3</sub>: Água de Maceração de Milho.

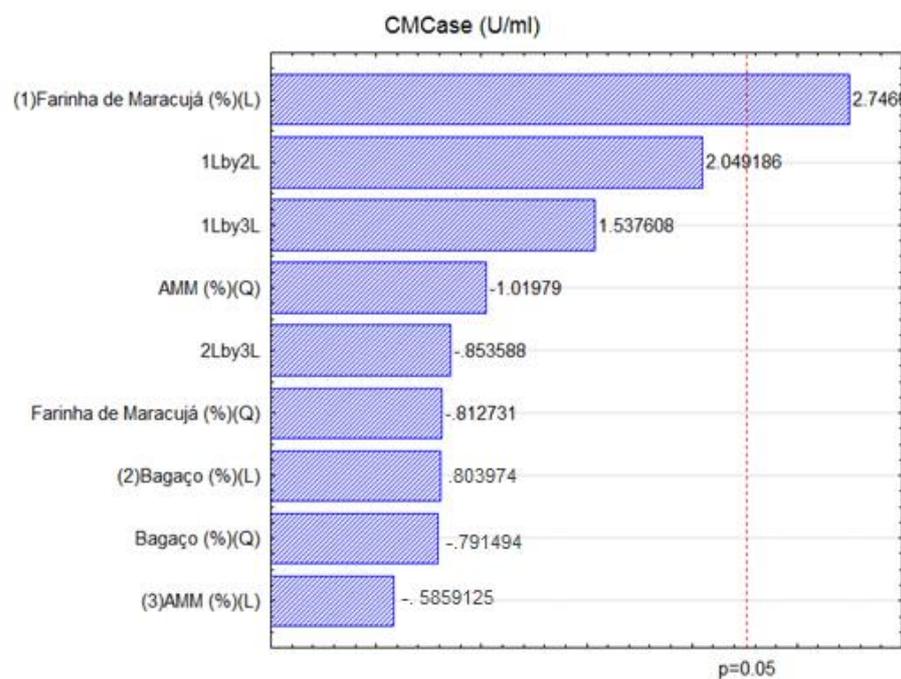
Na Figura 5 estão demonstrados o gráfico de valores preditos e observados para a variável resposta da atividade da CMCase (U/mL).



**Figura 5** - Valores preditos e observados para a variável dependente atividade da CMCase em função de diferentes concentrações de FCM, AMM, BCT, conforme DCCR 2<sup>3</sup>.

A qualidade do ajuste pode ser avaliada através do gráfico de valores preditos versus valores observados. Quanto mais os dados se ajustam à reta de identidade, melhor é a qualidade do ajuste. Logo, como os valores de atividade da CMCase se apresentaram dispersos em relação à reta de identidade, não foi possível gerar um modelo e construir as superfícies de resposta para esta variável dependente, o que pode ser confirmado pela figura 5.

Na Figura 6 está ilustrado o diagrama de Pareto para a atividade da CMCase.



**Figura 6** - Diagrama de Pareto para a produção da enzima CMCase, ao nível de 5% de significância.

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 6), a única variável que interferiu na secreção da CMCase foi a concentração da FCM ( $p < 0,05$ ), sugerindo que maiores concentrações deste subproduto resultam em uma maior produção da enzima. As demais variáveis não foram estatisticamente significativas ao nível de 5% de significância.

Cirigliano et al. (2013) otimizaram a produção de CMCase por *Streptomyces misionensis* estirpe PESB-25 usando a metodologia de superfície resposta. A maior atividade da CMCase (1,01 U/mL) foi encontrada no meio contendo BC (1,0% m/v) e AMM (1,2% m/v) durante 72 horas de fermentação. Em *Bacillus* sp. JS14 a atividade máxima de CMCase (2,04 U/mL) foi obtida quando este micro-organismo foi cultivado em farelo de trigo (400 g/L), pH 6,5 e temperatura de 40°C e período de incubação de 120 horas (Singh e Kaur, 2012). A otimização da produção de celulase de *Bacillus amyloliquefaciens* UNPDV-22

utilizando a metodologia de superfície de resposta resultou em um aumento de 96% na atividade enzimática quando comparado com o controle (meio não otimizado). A produção ótima da enzima (13 U/mL) foi obtida a 42,24 °C, pH 5,25 e concentração de inóculo de 4,95% (v/v) em meio de fermentação contendo farelo de trigo, farelo de soja e dextrina de malte como principais fatores nutricionais (Vasudeo e Lew, 2011). Os parâmetros ótimos para a produção de celulase por *Bacillus pumilus* EWBCM1 usando metodologia de superfície de resposta baseado no modelo de delineamento composto central rotacional foram concentração de galactose de 1,0 g/L, extrato de malte de 0,5 g/L e tempo de incubação de 72 hrs. A produção máxima de celulase encontrada pelo modelo foi 0,5751 U/mL (Shankar e Isaiarasu, 2012).

Diversos trabalhos publicados empregaram a metodologia de superfície de resposta como uma ferramenta para a otimização do processo de produção de celulasas. No entanto, a comparação entre as atividades obtidas com *Bacillus* sp. SMIA-2 e a literatura publicada não foi possível devido às diferentes definições de atividade enzimática utilizada.

## **5.2 Otimização das condições de hidrólise do papel de filtro e bagaço de cana tratado utilizando planejamento experimental.**

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>3</sup> e posterior construção de superfícies de resposta foram utilizados para avaliar os efeitos da concentração do extrato enzimático (mL), do substrato (mg) e do tempo (horas) de hidrólise a fim de determinar as condições ótimas para a hidrólise de papel de filtro Whatman n° 11 e BC tratado com solução de KOH e ácido sulfúrico 1,2%, m/V obtido por (Ladeira et al. 2015).

O extrato bruto utilizado nos experimentos foi obtido de culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo FCM (0,828 % m/v), AMM (0,828 m/v) e BC (0,828 % m/v). O extrato apresentou atividade de avicelase 1,379 U/mL e CMCase 0,487 U/mL.

Os valores de Atividade específica da hidrólise do papel de filtro e do BC foram calculados de acordo com a equação 2, proposta por Wu et al. (2006).

$$\text{Atividade Específica} = \frac{\text{Açúcar Redutor Formado}}{t \times [\text{enzima}] \times [\text{substrato}]} \quad (2)$$

Onde, t é o tempo de hidrólise (horas), [enzima] é o volume de extrato enzimático adicionado (mL) e [substrato] é a concentração (mg/mL) de substrato utilizado.

Na Tabela 10 está apresentada a Matriz do DCCR para Atividade específica utilizando como substrato o Papel de Filtro.

**Tabela 10** - Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> para Atividade específica com os valores reais e codificados das variáveis independentes utilizando o papel de filtro como substrato.

<b>Ensaio</b>	<b>Extrato Enzimático (mL)</b>	<b>Substrato (mg/mL)</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>Atividade Específica (µg açúcar / mg.mL.h)</b>
1	4,02 (-1)	3,21 (-1)	17 (-1)	10,88
2	8,48 (+1)	3,21 (-1)	17 (-1)	7,81
3	4,02 (-1)	6,78 (+1)	17 (-1)	4,92
4	8,48 (+1)	6,78 (+1)	17 (-1)	3,91
5	4,02 (-1)	3,21 (-1)	31 (+1)	6,35
6	8,48 (+1)	3,21 (-1)	31 (+1)	4,40
7	4,02 (-1)	6,78 (+1)	31 (+1)	2,58
8	8,48 (+1)	6,78 (+1)	31 (+1)	2,21
9	2,50 (-1,68)	5,00 (0)	24 (0)	5,71
10	10,00 (+1,68)	5,00 (0)	24 (0)	3,62
11	6,25 (0)	2,00 (-1,68)	24 (0)	8,31
12	6,25 (0)	8,00 (+1,68)	24 (0)	2,55
13	6,25 (0)	5,00 (0)	12 (-1,68)	7,21
14	6,25 (0)	5,00 (0)	36 (+1,68)	2,76
15	6,25 (0)	5,00 (0)	24 (0)	4,09
16	6,25 (0)	5,00 (0)	24 (0)	4,01
17	6,25 (0)	5,00 (0)	24 (0)	4,05

De acordo com a Tabela 10, a Atividade específica (µg açúcar/ mg.mL.h) da celulase variou de 2,21 (Ensaio 8) a 10,88 µg açúcar/ mg.mL.h (Ensaio 1). A significância estatística do modelo foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de variância para a Atividade específica são apresentados na Tabela 11. De

acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para a Atividade específica da suspensão contendo celulasas foi significativo pelo teste F ( $p < 0,10$ ), e a porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi muito boa, cerca de 99,18%, podendo concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

**Tabela 11** - ANOVA para a resposta da Atividade específica ( $\mu\text{g}$  açúcar/  $\text{mg.mL.h}$ ) da suspensão contendo celulasas utilizando o papel de filtro como substrato conforme modelo ajustado para o DCCR.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcal</b>
Regressão	92,68036	9	10,29782	96,39444
Resíduo	0,74781	7	0,10683	
Total	93,42817	16		

% variação explicada ( $R^2$ ) = 99,19;  $F_{9,7; 0,10} = 2,62$ .

Na Tabela 12 estão apresentados os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a resposta da Atividade específica da celulase utilizando papel de filtro. Nota-se que todos os parâmetros foram significativos ao nível de 10% de significância ( $p < 0,10$ ).

**Tabela 12** - Coeficiente de regressão dos valores de Atividade específica da celulase para o papel de filtro, obtidos para as diferentes concentrações de extrato enzimático, substrato e tempo de reação, conforme DCCR.

Fatores	Coef. de regressão	p - valor	Estimativa por intervalo (90%)	
			Limite Inferior	Limite Superior
<b>Média</b>	4,03285	<b>0,000000</b>	3,67603	4,38967
<b>X<sub>1</sub></b>	-0,72561	<b>0,000078</b>	-0,89317	-0,55804
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	0,28376	<b>0,022501</b>	0,09933	0,46819
<b>X<sub>2</sub></b>	-1,86811	<b>0,000000</b>	-2,03568	-1,70055
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	0,55247	<b>0,000754</b>	0,36804	0,73690
<b>X<sub>3</sub></b>	-1,42614	<b>0,000001</b>	-1,59370	-1,25857
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	0,39584	<b>0,004772</b>	0,21141	0,58027
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>2</sub></b>	0,45425	<b>0,005669</b>	0,23532	0,67319
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>3</sub></b>	0,22040	<b>0,098154</b>	0,00146	0,43933
<b>X<sub>2</sub> * X<sub>3</sub></b>	0,48719	<b>0,003957</b>	0,26825	0,70612

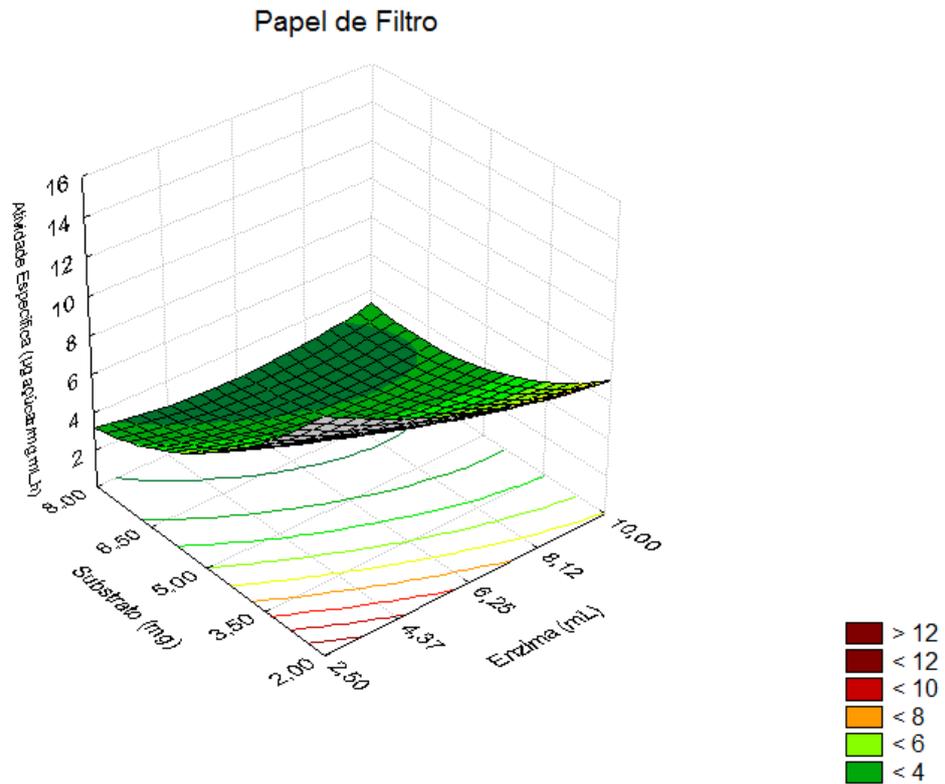
X<sub>1</sub>: Extrato Enzimático; X<sub>2</sub>: Substrato; X<sub>3</sub>: Tempo de reação.

O modelo ajustado está apresentado pela equação na Equação 3.

$$Y = 4,03285 - 0,72561 x_1 + 0,28376 x_1^2 - 1,86811 x_2 + 0,55247 x_2^2 - 1,42614 x_3 + 0,39584 x_3^2 + 0,45425 x_1 \cdot x_2 + 0,22040 x_1 \cdot x_3 + 0,488719 x_2 \cdot x_3 \quad (3)$$

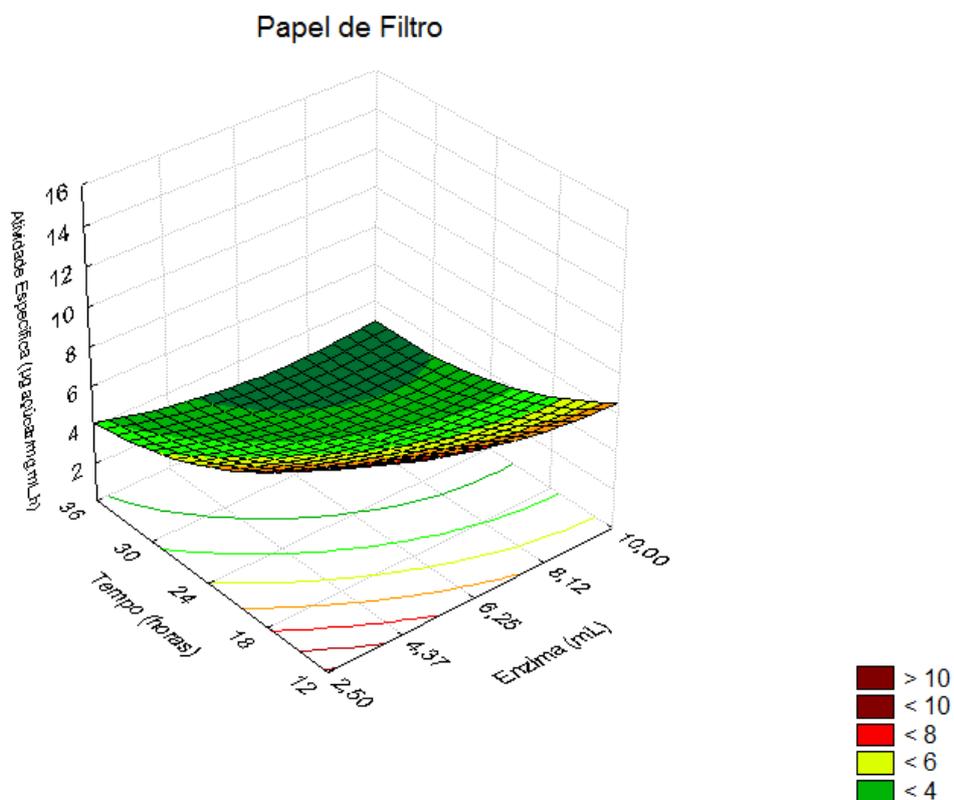
Onde  $x_1$  é a concentração de extrato enzimático (mL),  $x_2$  representa a concentração do substrato (mg/mL) e  $x_3$  é o tempo de reação (horas).

Após a análise dos resultados, superfícies de resposta para a Atividade específica do extrato de celulases foram construídas e os resultados estão ilustrados nas Figuras 7, 8 e 9 em função da concentração de substrato, extrato enzimático e tempo. As variáveis não explícitas foram fixadas nos pontos centrais (nível 0) para a construção de uma superfície.



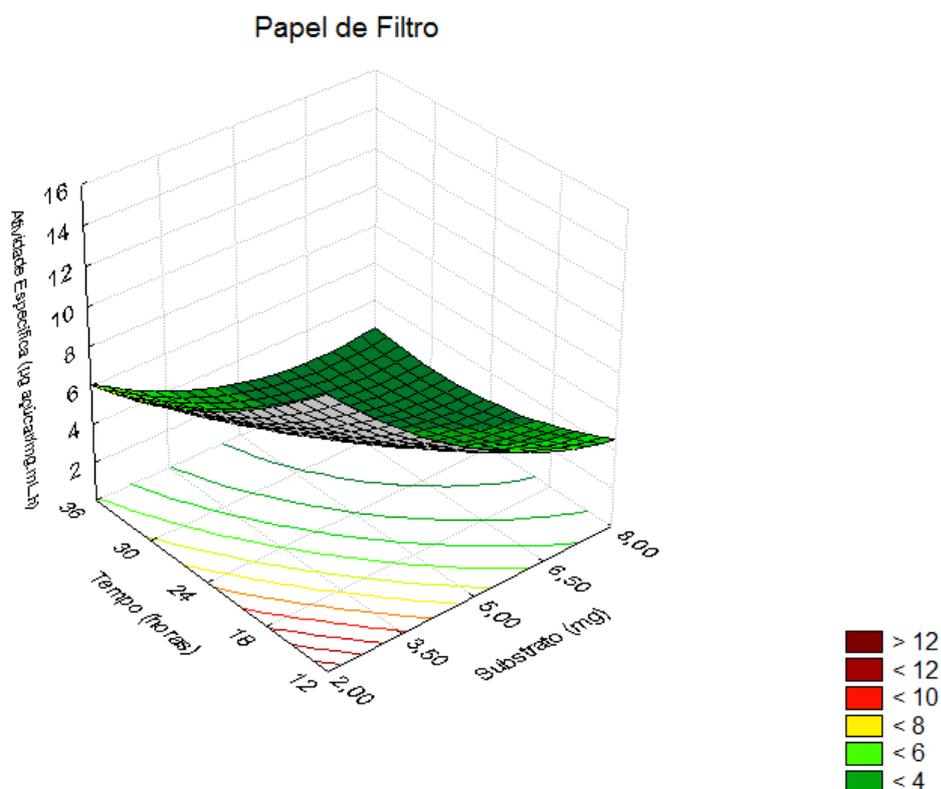
**Figura 7** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de extrato enzimático e substrato de papel de filtro na Atividade específica da celulase com o tempo de reação constante.

De acordo com a Figura 7, diminuindo simultaneamente a concentração do extrato enzimático e a concentração do substrato, com o tempo constante no nível central, melhores Atividades específicas são obtidas.



**Figura 8** - Superfície de resposta 3D: Efeito da concentração de extrato enzimático e tempo de reação na Atividade específica da celulase com a concentração do substrato de papel de filtro constante.

Uma diminuição da concentração de extrato enzimático em um menor tempo de hidrólise resultou em uma maior Atividade específica quando a concentração do substrato foi mantida constante. (Figura 8).



**Figura 9** - Superfície de resposta 3D: Efeito da concentração do substrato de papel de filtro e tempo de reação na Atividade específica da celulase com a concentração de extrato enzimático constante.

Maiores Atividades específicas foram obtidas com a diminuição simultânea da concentração do substrato e do tempo de reação, mantendo constante a concentração do extrato enzimático. Além disso, com maiores concentrações de substrato e tempo de reação, observou diminuição da Atividade específica. (Figura 9).

Na Tabela 13 está apresentada a Matriz do DCCR para a Atividade específica da celulase utilizando o bagaço de cana tratado (BCT) com KOH e solução de ácido sulfúrico 1,2%, m/v.

**Tabela 13** - Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> para Atividade específica do extrato de celulases com os valores reais e codificados das variáveis independentes utilizando o bagaço de cana tratado.

<b>Ensaio</b>	<b>Extrato enzimático (mL)</b>	<b>Substrato (mg/mL)</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>Atividade específica (µg açúcar / mg.mL.h)</b>
<b>1</b>	4,02 (-1)	3,21 (-1)	19 (-1)	4,50
<b>2</b>	8,48 (+1)	3,21 (-1)	19 (-1)	4,33
<b>3</b>	4,02 (-1)	6,78 (+1)	19 (-1)	2,20
<b>4</b>	8,48 (+1)	6,78 (+1)	19 (-1)	2,05
<b>5</b>	4,02 (-1)	3,21 (-1)	41 (+1)	2,37
<b>6</b>	8,48 (+1)	3,21 (-1)	41 (+1)	1,94
<b>7</b>	4,02 (-1)	6,78 (+1)	41 (+1)	1,18
<b>8</b>	8,48 (+1)	6,78 (+1)	41 (+1)	0,93
<b>9</b>	2,50 (-1,68)	5,00 (0)	30 (0)	2,38
<b>10</b>	10,00 (+1,68)	5,00 (0)	30 (0)	1,62
<b>11</b>	6,25 (0)	2,00 (-1,68)	30 (0)	4,44
<b>12</b>	6,25 (0)	8,00 (+1,68)	30 (0)	1,11
<b>13</b>	6,25 (0)	5,00 (0)	12 (-1,68)	4,53
<b>14</b>	6,25 (0)	5,00 (0)	48 (+1,68)	1,19
<b>15</b>	6,25 (0)	5,00 (0)	30 (0)	1,75
<b>16</b>	6,25 (0)	5,00 (0)	30 (0)	1,79
<b>17</b>	6,25 (0)	5,00 (0)	30 (0)	1,65

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, a Atividade específica (µg açúcar/ mg.mL.h) da celulase variou de 1,11 (Ensaio 12) a 4,53 µg açúcar/ mg.mL.h (Ensaio 13). A significância estatística do modelo foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de variância para a Atividade específica são apresentados na Tabela 14. De acordo com a ANOVA, foi verificado que o

modelo ajustado para a Atividade específica do extrato de celulase para hidrólise de BCT foi significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ), e a porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi muito boa, cerca de 98,91%, podendo concluir que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais.

**Tabela 14** - ANOVA para a resposta da Atividade específica para o BCT.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcal</b>
Regressão	26,14378	9	2,90486	72,58531
Resíduo	0,28014	7	0,04002	
Total	26,42392	16		

% variação explicada ( $R^2$ ) = 98,91;  $F_{9,7; 0,05} = 3,68$ .

A análise de correlação das variáveis está apresentada na Tabela 15, com os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a resposta de Atividade específica do extrato de celulase para o substrato BCT. Os parâmetros significativos foram os termos lineares para concentração de extrato enzimático, concentração de substrato e tempo de reação, também os termos quadráticos de concentração de substrato e tempo de hidrólise, e a interação entre a concentração de substrato e o tempo de hidrólise ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 15** - Coeficiente de regressão dos valores de Atividade específica do extrato de celulasas para o substrato BCT, obtidos para as diferentes concentrações de extrato enzimático, substrato e tempo de reação, conforme DCCR.

Fatores	Coef. de regressão	p - valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite Inferior	Limite Superior
<b>Média</b>	1,739439	<b>0,000001</b>	1,46686	2,012014
<b>X<sub>1</sub></b>	-0,166664	<b>0,017846</b>	-0,29467	-0,038660
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	0,061449	0,336687	-0,07944	0,202336
<b>X<sub>2</sub></b>	-0,905632	<b>0,000001</b>	-1,03364	-0,777629
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	0,334843	<b>0,000799</b>	0,19396	0,475730
<b>X<sub>3</sub></b>	-0,898562	<b>0,000001</b>	-1,02657	-0,770558
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	0,364919	<b>0,000479</b>	0,22403	0,505806
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>2</sub></b>	0,023865	0,745695	-0,14338	0,191109
<b>X<sub>1</sub> * X<sub>3</sub></b>	-0,046121	0,535161	-0,21337	0,121124
<b>X<sub>2</sub> * X<sub>3</sub></b>	0,297369	<b>0,004013</b>	0,13012	0,464614

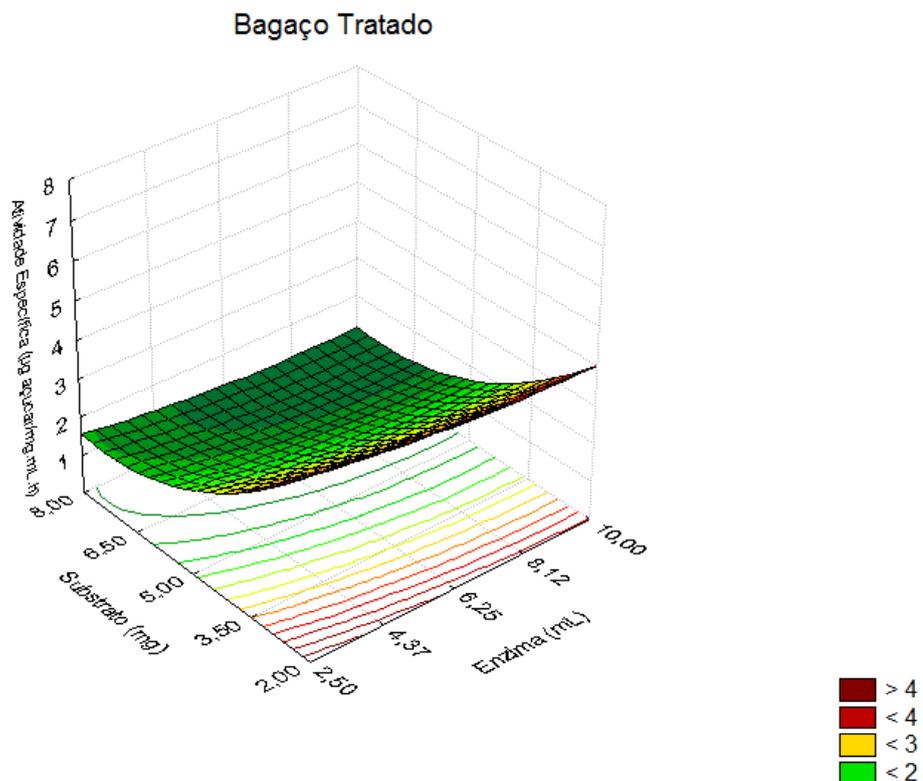
X<sub>1</sub>: Extrato Enzimático; X<sub>2</sub>: Substrato; X<sub>3</sub>: Tempo de hidrólise.

O modelo ajustado ficou caracterizado pela equação Equação 4.

$$Y = 1,739439 - 0,166664 x_1 + 0,061449 x_1^2 - 0,905632 x_2 + 0,334843 x_2^2 - 0,898562 x_3 + 0,364919 x_3^2 + 0,023865 x_1 \cdot x_2 - 0,046121 x_1 \cdot x_3 + 0,297369 x_2 \cdot x_3 \quad (4)$$

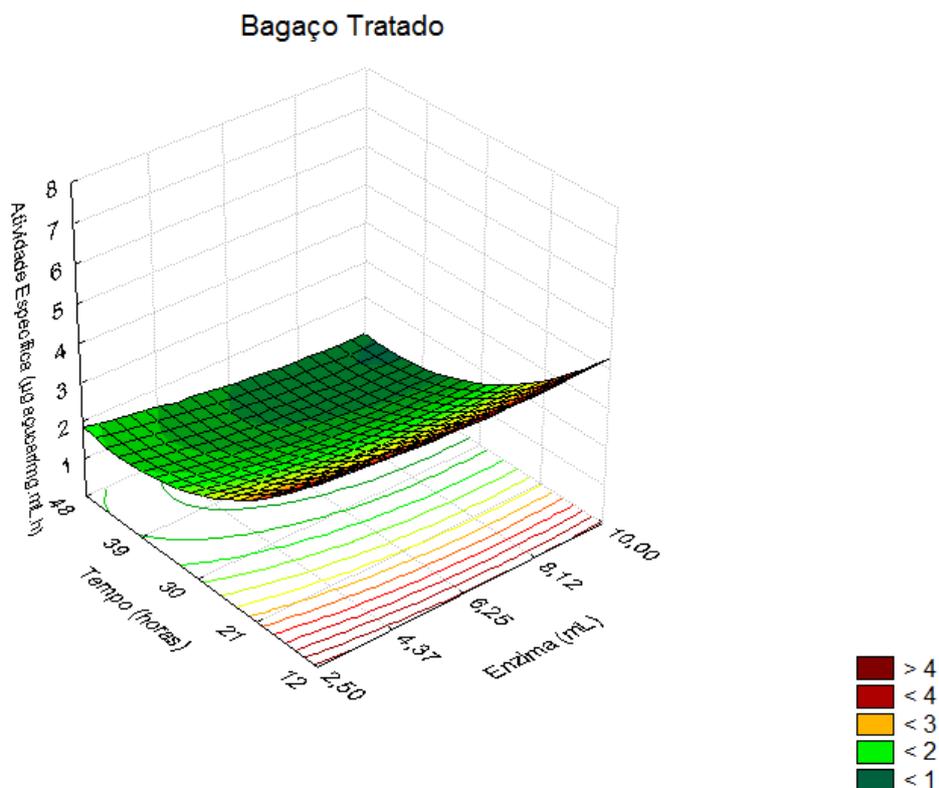
Onde  $x_1$  é a concentração de extrato enzimático (mL),  $x_2$  representa a concentração do substrato (mg/mL) e  $x_3$  é o tempo de reação (horas).

Após a análise dos resultados, superfícies de resposta para Atividade específica do extrato de celulasas foram construídas e os resultados ilustrados nas Figuras 10, 11 e 12 em função de concentrações de substrato, extrato enzimático e tempo. As variáveis não explícitas foram fixadas nos pontos centrais (nível 0) para a construção de uma superfície.



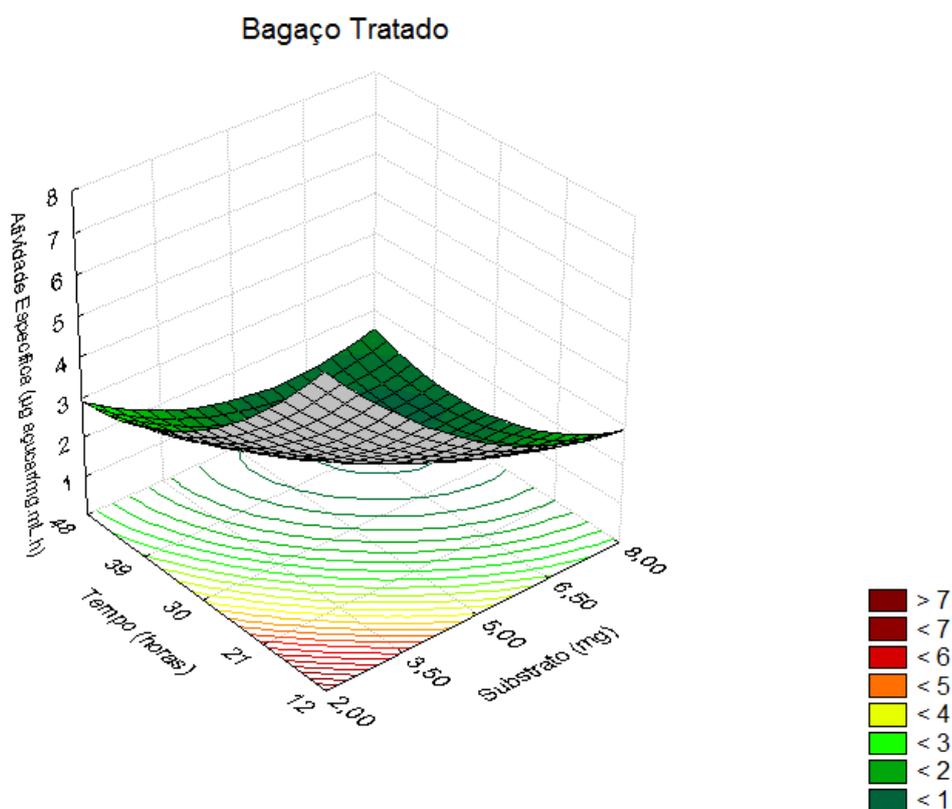
**Figura 10** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de extrato enzimático e substrato de bagaço de cana tratado na Atividade específica a um tempo de reação constante.

De acordo com a Figura 10, melhores Atividades específicas do extrato enzimático são obtidas quando menores concentrações de substrato são utilizadas, independente da concentração de extrato enzimático, mantendo constante o tempo de reação no nível central.



**Figura 11** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de extrato enzimático e tempo de hidrólise na Atividade específica a uma concentração de substrato de bagaço de cana tratado constante.

De acordo com a Figura 11, quando o substrato está fixado no ponto central e se utiliza um menor tempo de reação, independente da concentração de extrato enzimático, maiores Atividades específicas são obtidas.



**Figura 12** - Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de substrato de bagaço tratado e tempo de reação na Atividade específica da celulase, com uma concentração de extrato enzimático constante.

Por fim, quando a concentração de extrato enzimático foi fixada nos pontos centrais, maiores Atividades específicas do extrato enzimático foram obtidas quando a concentração de substrato e o tempo de reação foram reduzidos concomitantemente (Figura 12).

Wu et al. (2006) realizaram estudos sobre a hidrólise de celulose de papel de filtro (Whatman nº 1) por celulases de fungo *Trichoderma pseudokoningii* S-38. Estes autores relataram que quando foi utilizada uma concentração fixa de papel de filtro (0,2 mg/mL) e diferentes concentrações de celulase (0,25 mL a 1,25 mL de extrato bruto) e diferentes tempos de reação (1 a 30h) o valor máximo encontrado para os açúcares redutores liberados foi de 0,25 mg/mL. Quando diferentes concentrações de papel de filtro (0,08 a 0,4 mg/mL) foram utilizadas com uma quantidade fixa de celulase (0,25 mL) e fixando o tempo de reação, o

valor máximo de açúcar redutor liberado foi de 0,23 mg/mL. Ambos os valores obtidos pelas diferentes condições foram inferiores aos encontrados neste trabalho para liberação de açúcar redutor que foi de 19,02 mg/mL quando utilizando o papel de filtro como substrato e 11,16 mg/mL quando foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar tratado.

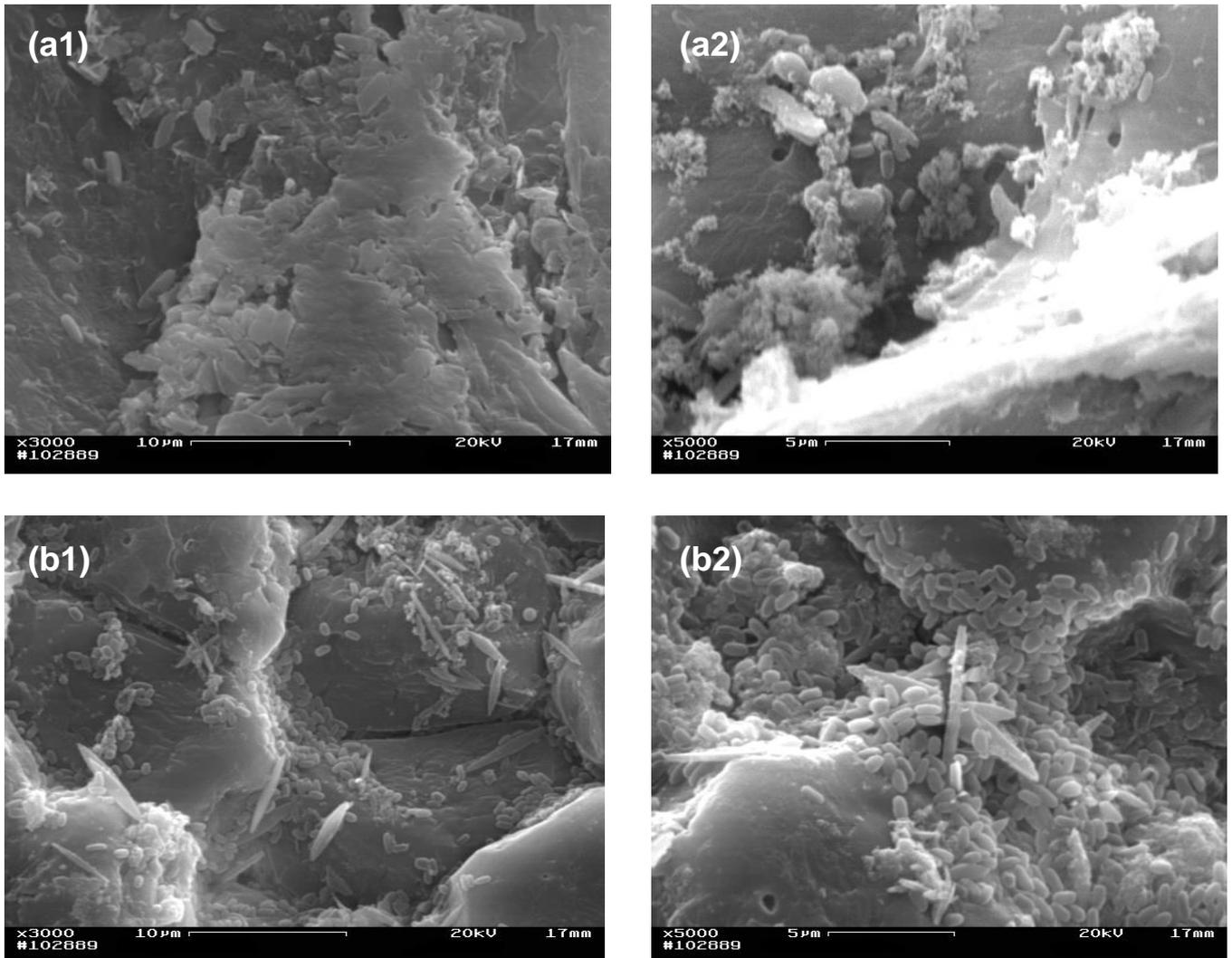
Em relação ao valor da Atividade específica da celulase obtida para o BCT, foi observado que o mesmo foi inferior ao encontrado para o papel de filtro.

Apesar do bagaço utilizado neste trabalho ter sido tratado e, portanto passado pela etapa de deslignificação, esperava-se obter um valor mais próximo de Atividade específica ao encontrado para o papel de filtro. No entanto, estudos futuros deverão ser conduzidos para estudar a influência do pH e da temperatura na Atividade específica das celulases, considerando que estes fatores são determinantes para a atuação satisfatória das enzimas sobre o substrato, no caso, BCT.

### **5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A visualização das células de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivadas em BC e FCM foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como pode ser visto na Figura 13, *Bacillus* sp SMIA-2 aderiu firmemente a ambos, BC e FCM, que é uma característica importante no processo de degradação desses substratos. Além disso, as imagens fornecem observações qualitativas da população de células. Apesar da dificuldade em diferenciar as células microbianas do BC (Figura 13 a), um substrato insolúvel, o número de células observadas neste substrato foi mais baixo comparado com a FCM (Figura 13 b). De acordo com Maurosa et al. (2016), as medidas de crescimento de bactérias em substratos insolúveis são problemáticas por várias razões. Uma delas é que contagens viáveis em placas de meios de ágar são complicadas pela tendência de células em decomposição aderirem ao seu substrato, frustrando esforços para diluir com precisão as culturas. Estes autores descreveram um procedimento de

coloração dupla para visualizar e enumerar células na presença de substratos de biomassa de plantas insolúveis.



**Figura 13** - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivadas em água de maceração de milho a 0,6% (m / v) e bagaço de cana-de-açúcar com aumento de 3000 vezes (a1) bagaço de cana-de-açúcar com aumento de 5000 vezes (a2) e farinha da casca de maracujá com aumento de 3000 vezes (b1) farinha da casca de maracujá com aumento de 5000 vezes (b2) a 50 ° C por 120 horas.

Desta forma, as imagens de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivadas na FCM mostraram o potencial deste subproduto ser utilizado como cosubstrato para melhorar o crescimento celular e a produção de celulases.

O uso combinado do BC, FCM e da AMM para a produção de celulases por *Bacillus* sp SMIA-2 é, portanto, atraente, uma vez que esses materiais estão frequentemente disponíveis em países tropicais como o Brasil em grandes quantidades e seus usos podem muito reduzir o custo de produção dessas enzimas.

## 6. CONCLUSÕES

A aplicação das diferentes concentrações de BCT, FCM e AMM no meio de cultivo usando um delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ), mostrou que atividades de avicelases foram melhores quando *Bacillus sp.* SMIA-2 foi cultivado em culturas submersas contendo BCT 1,00% m/v, AMM 1,00% m/v e FCM 0,15% por 168 horas, à temperatura de 50 °C, com um limite de confiabilidade de 95%. Para as mesmas condições estudadas, foi observado que o modelo não foi significativo ao nível de 5% de significância para a enzima CMCase, sugerindo para trabalhos futuros a análise em outras faixas de concentrações.

A otimização do volume de extrato enzimático, concentração de substrato e tempo de reação para hidrólise da celulose do papel de filtro foi conduzida utilizando um delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ). As condições que proporcionaram melhores atividades específicas da celulase foram quando se utilizou extrato enzimático 2,50 mL, 2,00 mg/mL de papel de filtro como substrato, durante 12 horas de hidrólise, com um limite de confiabilidade de 90%. Já para a hidrólise da celulose do BCT, as melhores atividades específicas das celulases foram obtidas quando se utilizou qualquer valor dentro da faixa estudada variando de 2,50 mL a 10,00 mL de extrato enzimático, 2,00 mg/mL de bagaço tratado como substrato e tempo de reação de 12 horas com um limite de confiabilidade de 95%.

Observações durante a microscopia eletrônica de varredura (MEV), forneceram observações qualitativas da população de células e foi verificado

que o *Bacillus* sp SMIA-2 estava firmemente unido ao bagaço de cana-de-açúcar e a farinha da casca de maracujá, que é uma característica importante no processo de degradação desses substratos, mostrando o potencial de FCM ser utilizado como co-substrato para estimular o crescimento celular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, S., Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012: 844-856.
- Amaral, D. DOE (Design of Experiments). Núcleo de Manufatura Avançada,1999. Disponível em:  
<[http://www.numa.org.br/conhecimentos/conhecimentos\\_port/pag\\_conhec/DOE.html](http://www.numa.org.br/conhecimentos/conhecimentos_port/pag_conhec/DOE.html)>. Acesso em: 23 ago. 2016
- Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2011). Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMI-A-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 31(004171), 204–208.
- Arantes, V.; Saddler, J. N., (2011) Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*, 4:3.
- Ashfaq M, Solomon S, Pathak N. (2014). Optimization of pretreatment and fermentation conditions for production of extracellular cellulase complex using sugarcane bagasse. *Journal Bioinformation*. 10: 606–610
- Associação Brasileira das indústrias de moagem de milho (ABIMILHO). Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/setor.html> . Acesso em 21 fev. 2017.
- Bano,S.,Qader, S.A.,Aman, F., Syed, M.N., Durrani, K. (2013) High production of cellulose degrading endo-1,4-glucanase using bagasse as a substrate from

*Bacillus subtilis*. *Carbohydrate Polymers*, 91:300–304.

- Barbosa, J.B., Gentil, N.O., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2014). Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalysis and Biotransformation*, Early Online: 1–7.
- Bath, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 8:355-383.
- Binod P.; Kuttiraja M.; Archana M.; Usha J.K.; Sindhu R.; Sukumaran R.K.; Pandey A. (2012). High temperature pré-treatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production, *Fuel*. 92: 340-345.
- Cai, H.; Shi, P.; Bai, Y.; Huang, H.; Yuan, T.; Yang, P.; Luo, H.; Meng, K.; Yao, B. 2011. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1. *Process Biochem*. 46: 2341–2346.
- Cao, Y.; Tan, H. (2002). Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohidrate Research*. 337: 1291 – 1296.
- Carvalho, W.; Silva, S. S.; Converti, A.; Vitolo, M.; Felipe, M. G. A.; Roberto, I. C.; Silva, M. B.; Mançilha, I. M. (2002). Use of immobilized *Candida* Yeast cells for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton. 98-100:489-496,
- Carvalho, G.B.M., Ginóris, Y.P., Cândido, E.J., Canilha, L., Carvalho, W., Almeida E Silva, J.B. (2005). Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. *Revista Analyca*. 14:54-57.
- Carvalho, R.V., Correa, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008a) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28:1-7.
- Carvalho, R.V., Côrrea, T.L.R.C., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. (2008b) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:102-107.
- Castro, A. M.; Pereira Jr. (2010). Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 33:181-188.
- Castro, P.R.C., Kluge, R.A. (1998) Ecofisiologia de fruteira tropicais: abacaxizeiro, maracujazeiro, mangueira, bananeira e cacauzeiro. 1:111.

- Cirigliano F, Novaes M, Rezende RC, Gravina MPO, Pereira PHF, Nascimento RP, Bon EPS, Macrae A, Coelho RRR.(2013). *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. *BioMed Research International*. 2013: 2013.
- Companhia Nacional De Abastecimento (CONAB). *Levantamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2016/17*. Primeiro levantamento, abril/2016. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_18\\_14\\_27\\_15\\_boleti\\_m\\_cana\\_portugues\\_-\\_1o\\_lev\\_-\\_16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_18_14_27_15_boleti_m_cana_portugues_-_1o_lev_-_16.pdf) Acesso em: 23 ago. 2016.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., Silva, R.F., (2011). Production and Properties of Xylanase from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 45. n.4: 413-418.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. (2009). Produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29:1-7.
- Costa, E.A., Fernandes, R.N., Cruz, E., Moraes, L.P., Carvalho, R.V., Martins, M.L.L. (2017). Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2: 1-8
- Cunha, M. A. A.; Solva, S. S.; Carvalho, W.; Santos, J.C. (2005). Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para a produção de xilitol a partir do bagaço de cana de açúcar. *Ciências Agrícolas*, Terezina, 26: 61-70.
- Delatorre, A.B., Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2010). Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. *Revista Perspectivas online*, vol. 4.16:132–145.
- Dykstra, M.J. (1993). A manual of applied techniques for biological electron microscopy. New York: Plenum Press. p. 257
- Egorova, K. & Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* v.8. 6: 649-655.
- El-serry, N.A, Elnaby, H.A., Abou-elela, G.M., Ibrahim, H.A.H., El-toukhy, N.M.K. (2010). Optimization, economization and characterization of cellulose produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotchenology*, 9 : 6355-6364.
- Fernandes, R. N. (2016). *Utilização do bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá para a produção de*

*celulases pelo termofílico Bacillus sp. SMIA-2*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Alegre – ES, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 65p.

- França, R. L. S., Araújo, M. L., Abud, A. K. S., Oliveira Jr, A. M. (2014) Avaliação do potencial de produção de enzimas celulolíticas por fermentação semi-sólida por meio de planejamento experimental. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2., 2014. Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, p.1-7.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 59, 2: 257-268.
- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N., Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Revista Química Nova*. 30:136-145.
- Guertzenstein, S.M.J., Srur, A.U.O.S. (2002). Uso da casca de maracuja (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*, DEG) cv amarelo na alimentação de ratos (*rattus norvergicus*) normais e diabéticos. *Rev. Cadernos do Centro Universitário Sao Camilo*, 10(2) 213-218.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89:17-34.
- Hernández, M.S., Rodríguez, M.R., Gerra, N.P., Rosés, R.P. (2006). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 73: 93-100.
- Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M, Sexton D, Dudgeon D. (2011). Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Volume NREL/TP-51.
- IAL – Instituto Adolfo Lutz. (2005). *Métodos físico-químicos para análises de alimentos*. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018p.
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*. 40:1263-1270.
- Jung. Y. R.; Park. J. M.; Heo. S.Y.; Hong. W. K.; Lee. S. M.; OH. B. R.; Park. S. M.; Seo. J.W.; KIM. C. H. (2015). Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. *Renewable Energy*. 76: 66-71.
- Kuberan, T., Sangaralingam, S., Arasu, S.T. (2010). Isolation and optimization of Protease producing Bacteria from Halophilic soil. *J. Biosci. Res.* 1(3):163-

174.

- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010). Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Revista Química Nova*, Vol. 1,1-5.
- Ladeira, S.A. (2013). *Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanases por espécies de Bacillus* sp. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 164p.
- Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18:110–115.
- Lee, K.; Moon, S.H. (2003) Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam,102: 261-268.
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., Chang, H.N. (2003). Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 26:63-67.
- Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. (2001). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. *Edgard Blucher Ltda*. São Paulo: vol. 3.
- Limayen, A. , Ricke, S.C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospect. *Prog. Energy. Comb. Sci.* 38:449-467.
- Lynd, L. R.; Zhang, Y. H. (2002). Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 77:467-475.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. *American Society for Microbiology.*, n.3, 66: 506-577.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (Eds.). (2010). *Microbiologia de Brock*. 12ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Mahmood, A.U., Greenman, J., Scragg, A.H. (1998). Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of

- extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial Technol.*, 22: 130-137.
- Makky, E. A. (2009) Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse World Academy of Science, Engineering and Technology 57.
- Marco, G.E. (2012) *Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de Bacillus sp.* Dissertação-Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS, 87p.
- Maurosa AJG, Lee SJ, Hazen SP, Leschine SB. (2016). Direct imagebased enumeration of *Clostridium phytofermentans* cells on insoluble plant biomass growth substrates. *Appl Environ Microbiol* 82:972–978.
- Medeiros, A.B.P., Pandey, A., Freitas, R.J.S., Christen, P., Soccol, C.R. (2000). Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 6: 33-39.
- Mesa L, Salvador CA, Herrera M, Carrazana DI, Gonzalez E. (2016). Cellulases by *Penicillium sp.* in different culture conditions. *Bioethanol*. 2: 84–93.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem* 3: 426-428.
- Montgomery, D. C. (1976). Design and analysis of experiments. 1ª edição. ed. Nova Iorque: Wiley.
- Muthukrishnan, R. (2007) Characterisation of cellulase from organisms isolated from rumen fluid. *Pharmaceutical Reviews*, 3.
- Naraian R., Singh D., Verma A. and Garg S.K. (2010). Studies on in vitro degradability of mixed crude enzyme extracts produced from *pleurotus spp.* *Journal of Environmental Biology*. 31;945-951.
- Nascimento, W.C.A., Carvalho, R.V., Silva, C.R., Martins, M.L.L. (2007). Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* termofílico. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27:417-421.
- Ogeda, T. L.; Petri, D. F. S. (2010). Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, 7: 1549-1558.
- Oliveira, L.F., Nascimento, M. R. F., Borges, S.V., Ribeiro, P.C.N., Ruback, V.R.

- (2002). Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.22, 3: 259-262.
- Oliveira, J. H. S.; Costa, M. T.; Abud, A. K. S.;(2015). Uso do planejamento experimental para avaliar a produção de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v.1, 2: 959-966 .
- Oliveira, L.R.C., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L., Martins, M. (2014). Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2, *Acta Scientiarum Biological Sciences*, Maringá, v. 36, 2: 215-222
- Padilha, I.Q.M., Carvalho, L.C.T., Dias, P.V.S.,Grisi, T.C.S.L., Silva, F.L.H., Santos, S.F.M., Araújo, D.A.M. (2012). Produção e caracterização parcial de celulase termofílica de *Bacillus* sp. utilizando bagaço de cana. In: Congresso Brasileiro de Química, 52., 2012. Recife. Anais ... Recife, p. 1-7.
- Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H.P. (1999) Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium. *Applied Microbiol. Biotechnol*, 51:152-157.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 83: 346-356.
- Polonen, I. (2004) Preservation efficiency of formic acid and benzoic acid in the ensiling of slaughterhouse by-products and their subsequent metabolism in farmed fur animals. Academic dissertation - Faculty of Agriculture and forestry of the University of Helsinki.. 63p.
- Reinehr, C. O.; Bortoluzzi, L.; Morais, V. Q.; Smaniotto, T. M.; Zen, C. K.; Oliveira, D.; Treichel, H. (2016). Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 18, 1: 97-115.
- Rivas, B.; Moldes,A.B.; Dominguez, J.C.(2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Inter.J of Food Microbiol*. 97:93-98.
- Rodrigues, P.M., Andrade, V.V.V., Martins, M.L.L. (2013). Stability and activity of the partially purified spray-dried protease from *Bacillus* sp. SMIA-2 and its characterization as a laundry detergent additive. *International Journal of Bioassays*. 02 (03), 562-567.

- Rodrigues M.I, Lemma A.F. 2009. *Planejamento de Experimentos e otimização de processos*. Casa do Espírito Amigo Fraternidade, Fé e Amor. Campinas, SP 2th Ed .pp.358.
- Schallmeyer, M., Singh, A.; Ward, O.P. (2004) Developments in the use of Bacillus species for Industrial Production, *Canadian J. Microb.*, 50, 1-17.
- Shankar T, Isaiarasu 2L. 2012. Statistical Optimization for Cellulase Production by Bacillus pumilus EWBCM1 Using Response Surface Methodology. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 7: 01-06,
- Silva, V. L. M. M.; Gomes, W. C. O.; Alsina, L. S. (2007). Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista eletrônica de materiais e processos*, v. 2, 1:27-32.
- Singh, S.K., Johnson, L.A., Pollak, L.M., Fox, S.R., Bailey, T.B. (1997) Comparison of laboratory and pilot-plant corn wet-milling procedures. *Cereal Chem*. 74:40-48.
- Singh J, Kaur P. (2012). Optimization of Process Parameters for Cellulase Production from *Bacillus* sp. JS14 in Solid Substrate Fermentation Using Response Surface Methodology. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 55: 505-512.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S, Medeiros, A.B.P, Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bom, E.P.S., Moraes, L.M.P., Araújo, J.A., Torres, F.A.G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol.*, 101:4820– 4825.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275.
- Sun, Y. Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresouce Technology*, 83: 1-11.
- Talcoot, S.T., Percival, S.S., Pittet-Moore, J., Celoria, A.C. (2003) Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passifora edulis*). *J. Agric. Food Chem.*, 51: 935-941.
- Tolan, J. S. (2002). Logens process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 3, 4:339-345.
- Tomme, P., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G., Gilkes, N.R. (1995) Cellulose-binding domains: classification and properties. *ACS Symposium Series*, 618:143-163.
- Vasudeo Z, Lew C. 2011. Optimization of Culture Conditions for Production of Cellulase by a Thermophilic Bacillus Strain. *J. Chem. Chem. Eng*. 5: 521-527.

- Zaghloul T.I., Wahab A.E., Mostafa M.H. (2000). Enhanced alkaline protease production in addition to  $\alpha$ -amylase via constructing a *Bacillus subtilis* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 319-27
- Zeilinger, S., Haller, M., Mach, R., Kubicek, C. P. (2000). Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 277: 581-588.
- Zhang, C., Xing, X.H., Liu, M.S. (2004). Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. *Biochem. Eng. J.* 19: 181-187.
- Wang, F.; Podell, E.R.; Zaug, A.J.; Yang, Y.; Baciou, P.; Cech, T.R.; Lei, M. (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor, *Nature*, 445: 506-510.
- Wu, B., Zhao, Y., and Gao, P. J. (2006). "A new approach to measurement of saccharifying capacities of crude cellulase," *Bioresources.* 1(2): 189-200.