

ESTUDOS SOBRE A ESTABILIDADE DE CELULASES DE
Bacillus sp. SMIA-2

ERICA CRUZ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2017

ESTUDOS SOBRE A ESTABILIDADE DE CELULASES DE
Bacillus sp. SMIA-2

ERICA CRUZ

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 Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

024/2017

C957 Cruz, Erica.

Estudos sobre a estabilidade de celulases de *Bacillus* sp. Smia-2 /
Erica Cruz – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.
62 f. : il.

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

Bibliografia: f. 40 – 47.

Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. Enzimas. 2. *Bacillus* sp. 3. Detergentes. I. Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 668.14

ESTUDOS SOBRE A ESTABILIDADE DE CELULASES DE
Bacillus sp. SMIA-2

ERICA CRUZ

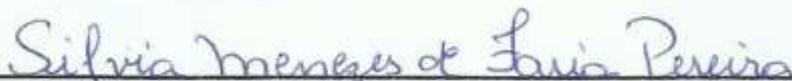
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal

Aprovada em 30 de março de 2017

Comissão Examinadora



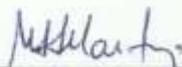
Prof^a. Luana Pereira de Moraes (Ph.D., Ciência e Tecnologia de Alimentos) UENF



Prof^a. Sílvia Menezes de Faria Pereira (DSc., Eng. e Ciência dos Materiais) - UENF



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



Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology) UENF
(Orientadora)

A Deus,
Ao meu pai Hermes in memoriam,
À minha mãe Isméria,
Aos meus filhos Tarsís e Pedro.

Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por mostrar-me o caminho certo e por ser o Senhor da minha vida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e pela concessão da bolsa de estudo – FAPERJ/UENF;

À prof^a. Meire Lelis Leal Martins pela orientação, profissionalismo, conduta e apoio durante o curso;

Aos professores integrantes da banca examinadora, João Batista Barbosa, Luana Pereira de Moraes e Sílvia Menezes de Faria Pereira por terem aceitado contribuir com este trabalho;

Aos meus filhos Tarsis e Pedro, pelo amor, pelo carinho, pelo respeito, pelo apoio e pela paciência em todos os momentos. Mamãe ama vocês!

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: João, Simone, Andréia, Natiele, Priscila, Vanessa, Larissa, Raquel, Letícia, Natânia, Mariana, Lara, Lorena, Thamires, Pâmela, Andressa, Samara, Juliana, Lázaro pela colaboração, troca de experiência e amizade;

Sou muito grata aos amigos João Batista, Simone, Silvania, Silvia e Aninha pelo companheirismo, pela parceria e pela imensa colaboração neste trabalho;

Em especial agradeço à amiga Edite que incansavelmente esteve comigo esses 2 anos de curso; como foi bom conhecer e conviver com uma pessoa como você!

A todos os funcionários da UENF e do LTA, pela disponibilidade em sempre nos atender bem e pela gentileza;

Às minhas amigas Ozinete Borba e Ana Cristina que sempre estiveram muito presentes em minha vida me dando todo apoio que precisei;

A minha mãe, irmãos e cunhado pelo imenso incentivo, respeito e amor sempre demonstrado. Agradeço por acreditarem em mim!

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Gênero <i>Bacillus</i>	3
2.2. <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	5
2.3 Enzimas de importância industrial	5
2.4. Estabilidade Enzimática.....	8
2.5. Desativação Mecânica da Celulase.....	11
2.6. Celulases.....	12
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral:.....	15
3.2 Objetivos Específicos:	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Crescimento do microrganismo e meio de cultivo	17
4.2. Ensaio enzimáticos.....	20
4.2.1. Obtenção das enzimas	20
4.2.2. Atividade enzimática da carboximetilcelulase (β -1,4-endoglicanase)	20
4.2.3. Atividade enzimática da Avicelase (Exo- β -1,4- Glucanase)	20
4.2.4. Atividade enzimática da Xilanase (endo-1,4- β -xilanase)	21
4.2.5. Atividade enzimática da α -amilase	22

4.2.6. Atividade enzimática da Poligalacturonase (Pectinase)	22
4.2.7. Estabilidade das enzimas durante a estocagem sob congelamento à temperatura de 3 ^o C	23
4.2.8. Influência de Aditivo estabilizante na atividade enzimática	23
4.2.9. Compatibilidade e estabilidade das enzimas com detergentes comerciais	23
4.2.10. Influência de íons na estabilidade e compatibilidade das enzimas.....	24
4.2.11. Influência da protease comercial na estabilidade das enzimas	24
4.3. Análises Estatísticas.....	25
4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Estabilidade das celulases durante estocagem.....	26
5.2. Influência de aditivos estabilizantes na atividade das celulases.....	27
5.3. Compatibilidade e estabilidade das enzimas com detergentes comerciais	28
5.4. Influência de íons metálicos na compatibilidade e estabilidade das enzimas	31
5.5. Influência da protease comercial na estabilidade das celulases	33
5.6. Microscopia eletrônica de varredura em culturas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 ..	36
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas microbianas e suas aplicações.	8
Tabela 2 – Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presentes no extrato bruto de culturas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em função do tempo de estocagem a 3 ^o C por 154 dias. (100% de atividade da avicelase = 1,20 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,50 U/mL).	26
Tabela 3 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 na presença de aditivos estabilizantes. (100% de atividade da avicelase = 1,07 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,48 U/mL).	28
Tabela 4 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 na presença de detergentes comerciais. (100% de atividade da avicelase = 1,18 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,47 U/mL).	29
Tabela 5 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 na presença dos detergentes Omo® e Bem-te-vi®. (100% de atividade da avicelase = 1,09 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,47 U/mL).	30
Tabela 6 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 na presença de íons metálicos. (100% de atividade da avicelase = 1,08 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,49 U/mL).	32

Tabela 7 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de Bário (Ba^{+2}) e Cobalto (Co^{+2}) (100% de atividade da avicelase = 1,12 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,47 U/mL).33

Tabela 8 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de Protease Comercial. (100% de atividade da avicelase = 1,11 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,46 U/mL).34

Tabela 9 - Atividade enzimática do extrato bruto obtido após 92 dias de fermentação presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2.....35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase. Fonte: Kumar et al. (2008)..... 12
- Figura 2 - Esquema da obtenção de celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 19
- Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células de *Bacillus* sp. SMIA-2. (A) Culturas contendo 0,65% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar; (B) Culturas contendo 0,65% m/m de bagaço de cana-de-açúcar e 0,65% (m/v) de água de maceração de milho a 50°C por 72 horas..... 37
- Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células de *Bacillus* sp. SMIA-2. (A) Culturas contendo 0,65% (m/v) de Farinha da casca de maracujá; (B) Culturas contendo 0,65% (m/m) de farinha da casca de maracujá e 0,65% (m/v) de água de maceração de milho a 50°C por 72 horas..... 38

RESUMO

CRUZ, Erica; M.Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. ESTUDOS SOBRE A ESTABILIDADE DE CELULASES DE *Bacillus* sp. SMIA-2. Orientadora: Prof^ª: Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

As enzimas são biocatalizadores específicos utilizados em vários campos de atuação desde a indústria de alimentos até a indústria química de detergentes. A viabilidade econômica para a aplicação de uma enzima em um processo industrial é determinada pela sua estabilidade durante o processo. Por isso, a estabilidade da conformação espacial das enzimas deve ser estudada para determinar a inter-relação dos parâmetros físicos, aditivos químicos, íons metálicos, surfactantes e outros compostos utilizados para manter a sua estrutura química. Neste trabalho, estudos sobre a estabilidade de celulases produzidas por culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de celulose, farinha da casca de maracujá como co-substrato e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, foram realizados. A estabilidade das celulases presentes nos extratos brutos da cultura se manteve durante a estocagem por 154 dias à temperatura de 3^o C. O estudo sobre a compatibilidade e estabilidade das celulases na presença de detergentes, revelou que as maiores atividades das celulases foram observadas na presença do detergente Bem-te- vi® e Omo® . A adição de íons como o Cobalto e o Bário (concentração final de 1mM) ao extrato bruto estimulou a atividade tanto da avicelase quanto da carboximetilcellulase.

Além disso, estudos sobre a estabilidade das celulases com proteases comerciais, amplamente usadas na formulação de detergentes, mostraram que as enzimas apresentaram estabilidade, sendo que a avicelase foi mais estável que a carboximetilcelulase. Além das celulases, o extrato bruto da cultura apresentou atividades de amilases, xilanases e poligalacturonases, mostrando que estas enzimas são também importantes no processo de degradação dos subprodutos utilizados como substratos para a produção de celulases. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo bagaço de cana, farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho mostraram que a bactéria aderiu firmemente ao bagaço de cana e que a farinha da casca de maracujá estimulou o seu crescimento. As características apresentadas pelas celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 mostram o potencial de aplicação das enzimas em processos industriais, tais como aditivos em formulações de detergentes.

Palavras-chaves: enzimas; *Bacillus* sp.; detergentes.

ABSTRACT

CRUZ, Erica; M. Sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2017. STUDIES ON STABILITY OF CELLULOSE *Bacillus* sp. SMIA-2. Advisor: Prof^a: Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Enzymes are specific biocatalysts that are used in various fields of action from the food industry to the chemical detergent industry. The economic viability for the application of an enzyme in an industrial process is determined by its stability during the process. Therefore, the stability of the spatial conformation of the enzymes should be studied to determine the interrelation of the physical parameters, chemical additives, metallic ions, surfactants and other compounds used to maintain their chemical structure. In this work, studies on the stability of cellulases produced by submerged cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2 containing sugarcane bagasse as a source of cellulose, passion fruit rind flour as co-substrate and corn steep liquor as nitrogen source were performed. The stability of the cellulases present in the crude extracts of the culture was maintained during storage for 154 days at 3°C. In addition to the cellulases, the crude extract of the culture presented amylase activities, xylanase and polygalacturonase, besides the avicellase (cellulases that hydrolyze avicel) and carboxymethylcellulose (cellulases which hydrolyse carboxymethylcellulose). The study on the compatibility and stability of cellulases in the presence of detergents revealed that the highest activities of cellulases were observed in the presence of detergent Bem-te-vi® and Omo®. The addition of ions such as Cobalt and Barium (final

concentration of 1 mM) to the crude extract stimulated the activity of both avicellase and carboxymethylcellulase. Furthermore, studies on the stability of cellulases with commercial proteases, widely used in the detergent formulation, showed that the enzymes showed stability, with avicellase being more stable than carboxymethylcellulose. In addition to the cellulases, the crude extract of the culture presented amylases, xylanases and polygalacturonases, showing that these enzymes are also important in the degradation process of by-products used as substrates for the production of cellulases. Scanning Electron Microscopy (SEM) images of *Bacillus* sp. SMIA-2 cultures containing sugarcane bagasse, passion fruit peel flour and corn steep liquor showed that the bacteria firmly adhered to sugarcane bagasse and that the passion fruit peel flour stimulated its growth. The characteristics presented by *Bacillus* sp. SMIA-2 cellulases show the potential for application of enzymes in industrial processes, such as additives in detergent formulations.

Keywords: Enzymes; *Bacillus* sp. SMIA-2; Detergents.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores específicos que são utilizados em inúmeros campos de atuação, desde a indústria de alimentos, até na formulação de detergentes em indústrias químicas. As enzimas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Muitos microrganismos estão envolvidos neste processo e, para isso, necessitam produzir uma diversidade de enzimas com diferentes especialidades (Lehninger et al.,2011).

Celulases e hemicelulases são grupos de enzimas que catalisam a hidrólise da celulose e da hemicelulose, respectivamente, transformando estes polímeros, presentes na parede celular vegetal, em açúcares de menores massas moleculares (Peixoto, 2006).

Dentre as principais aplicações industriais das celulases estão: fabricação de rações animal, indústria têxtil, indústria de bebidas (cerveja, vinhos e sucos), na indústria de papel e na produção de biocombustíveis (Bhat, 2000).

Enzimas como pectinases, proteases, amilases, celulases, xilanases, e outras isoladas de microrganismos termofílicos, devido às altas temperaturas em que atuam, têm sido extensamente utilizadas em setores industriais por prevenirem a contaminação microbiana por mesófilos, proporcionarem menor viscosidade ao meio, tornarem os reagentes mais solúveis facilitando a difusão dos mesmos e permitirem que concentrações maiores destes compostos sejam utilizadas. (Aguilar, 1996; Archana e Satyanarayana, 1997; Bruins et. al., 2001; Lee et. al., 2001; Van den Burg, 2003; Haki e Rakshit, 2003).

A principal vantagem da formulação de detergentes contendo enzimas é sua característica biodegradável, ideal para substituir produtos cáusticos, ácidos e

solventes, que agredem o ambiente e provocam o desgaste de materiais e instrumentos (Ereno, 2005).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, por um lado fornece substratos alternativos e, por outro, ajuda a solucionar os problemas de poluição que sua disposição no meio ambiente poderia causar. Com o advento de inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia de enzimas e fermentação, muitos caminhos novos têm sido abertos para sua utilização (Pandey et al., 2000).

A viabilidade econômica da aplicação de uma enzima em um processo industrial é determinada pela sua estabilidade durante o processo. Considerando que enzimas de microrganismos termofílicos podem realizar processos industriais nas quais proteínas convencionais são completamente desnaturadas, a demanda por essas enzimas para aplicação industrial tem crescido nos últimos anos (Gomes et al., 2007).

Na área industrial, especificamente em processos biotecnológicos na presença de enzimas, substâncias químicas estabilizadoras de cadeia proteica têm sido investigadas visando aumentar o tempo de meia-vida desses biocatalizadores, além de mantê-los ativos sob condições operacionais (Illanes, 2008).

Para manter a estabilidade da conformação espacial da enzima, geralmente são adicionados, além de substratos e inibidores que protegem o sítio ativo, agentes químicos como detergentes, sais, solventes, poliols, polímeros, dentre outros compostos. É primordial que esses aditivos sejam inócuos a todos os seres vivos para a aplicação em indústrias de alimentos e fármacos e que as condições do meio de formulação sejam selecionadas criteriosamente (Illanes, 2008).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade de celulasas presentes em extratos brutos de culturas submersas contendo o bagaço de cana-de-açúcar, a água de maceração de milho e a farinha da casca de maracujá de *Bacillus* sp. SMIA-2, em diferentes aditivos, visando à obtenção de um bioproduto estável capaz de ser comercializado. Também verificar através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) o processo de degradação do bagaço de cana e farinha da casca de maracujá, uma característica importante de degradação desses substratos de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias aeróbicas e gram-positivas que formam endósporos, resistentes a condições ambientais adversas tais como calor e dessecação, sendo tipicamente representados por células aeróbicas móveis por flagelos, mas podem também crescer em ambientes anaeróbicos (Madigan et al., 2010).

Segundo Gomes (2013), as espécies do gênero *Bacillus* são classificadas em três grupos, segundo a morfologia do esporo e do esporângio:

Grupo I: Formado por bacilos Gram-positivos que apresentam esporo central ou terminal; esféricos ou ovoides; não deformam a célula. O grupo I é subdividido em outros dois subgrupos: a) O grupo I é constituído de bacilos de diâmetro superior a 1 µm, apresentando inclusões de poli-beta-hidroxibutirato (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*); e b) O grupo I b constituído de bacilos com diâmetro inferior a 1 µm e desprovidos de inclusões de poli-beta-hidroxibutirato (*B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*);

Grupo II: Constituído de espécies Gram-variáveis; apresenta esporo oval, central ou terminal que deformam a parede celular (*B. circulans*, *B. stearothermophilus*);

Grupo III: Caracterizado por bacilos Gram-variáveis; apresentam um esporo esférico terminal ou subterminal que deformam a parede celular (*B. globisporus*, *B. insolitus*). O *B. thuringiensis*, sintetiza um cristal composto de toxinas letais para insetos. A elaboração do para-esporo não é única no gênero *Bacillus*, pois o *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae*,

Brevibacillus laterosporus e certas linhagens do *Paenibacillus lentimorbus* são capazes de produzir tais cristais.

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. Além disso, também são capazes de crescer sob condições extremas de pH e, por isso, originam produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Madigan et al., 2010).

Diversas fontes naturais complexas, como resíduos agrícolas e agroindustriais, têm sido utilizadas com o objetivo de obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos, mesmo quando produzem níveis menores de atividade (Lee et al., 2010). Estes resíduos, após serem devidamente moídos ou triturados servem como fontes de nutrientes, principalmente de carbono, em fermentações (Da Silva et al., 1994).

Bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Consequentemente, 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. Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitos inofensivos que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros GRAS (Generally Recognized as safe) (Marco, 2012).

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.

O gênero *Bacillus* tem sido muito bem caracterizado quanto à produção de celulasas alcalinas, com grande interesse na indústria de detergentes. Devido à restrição da grande maioria das espécies deste gênero em produzir as três classes de celulasas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidases), os estudos envolvendo a caracterização enzimática de *Bacillus* sp. envolvem principalmente Carboximetilcelulose como substrato (Shabeb et al., 2010; Kim et al., 2011).

2.2. *Bacillus* sp. SMIA-2

A bactéria *Bacillus* sp. SMIA-2 foi isolada de amostras de solo coletadas no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil por Souza e Martins (2001). As colônias do microrganismo apresentaram bordas regulares e formas circulares, lisas, brilhantes e com elevação convexa e consistência cremosa após 24 horas de crescimento em ágar nutriente a 50°C. As células do microrganismo isolado apresentaram-se como bastonetes regulares, isolados e em cadeias.

As células deste organismo foram identificadas como Gram-positivas com esporos presentes em formas com localização terminais e subterminais. Apresentaram 1,2 µm de largura e 5,3 µm de comprimento de dimensão na forma vegetativa. O crescimento ocorre em ampla faixa de pH variando de 6,5 a 9,0 e o crescimento ótimo em torno de pH 6,8. A temperatura ótima de crescimento foi em torno de 55°C e a máxima de 70°C. O extrato de levedura, fonte de nitrogênio estimula o crescimento do organismo em glicose. O *Bacillus* sp. SMIA-2 são conhecidos por produzir uma variedade de enzimas extracelulares importantes tais como amilases, proteases, pectinases e celulasas (Wang et al., 2007). Com relação ao requerimento do oxigênio, o microrganismo foi classificado como aeróbico. Os resultados da comparação de sequências de 16SrRNA indicam que o isolado apresenta similaridade com as sequências de *Bacillus caldoxylolyticus* e *Bacillus* sp. AK1 e estes três organismos exibem níveis de homologia de 94% nas sequências de DNA ribossomal (Souza e Martins, 2001).

2.3 Enzimas de importância industrial

Enzimas possuem estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídios (Hartmeier, 1988). Esses heteropolímeros são formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A estrutura primária das enzimas corresponde à sequência de seus aminoácidos; sua estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha β . A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que provoca torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, o que é determinante para sua atividade biológica. Já a

estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (Santana Junior, 2001).

Nos últimos anos tem sido crescente pesquisas sobre produção de enzimas microbianas, devido às propriedades catalíticas superiores às dos catalisadores sintéticos, especificidade pelos substratos, e principalmente por serem produtos naturais, que contribuem para geração de subprodutos tóxicos ao meio ambiente (Sayali et al., 2013).

A tecnologia enzimática é um campo promissor dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (Fernandes et al., 2004). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria biotecnológica, as quais são empregadas em larga escala, principalmente, nas indústrias têxtil, de papel, detergente, couro e de alimentos (Kirk et al., 2002; Van Beilen, 2002).

As enzimas têm um ótimo poder catalítico, geralmente muito maior que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos, sendo denominados catalisadores proteicos das reações bioquímicas. A maioria destas reações ocorreria muito lentamente se não fossem a presença das enzimas. Cada enzima catalisa um pequeno número de reações, portanto, são catalisadores com alto grau de especificidade de reação para os seus respectivos substratos (Sayali et al., 2013).

Segundo a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas estão classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reação em que catalisam. As oxidorreduases catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons. As transferases transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil e carboxil. As hidrolases catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. As liases catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. As isomerases catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero e as ligases catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia (Santana Junior, 2001).

As enzimas podem ser secretadas por reações que ocorrem dentro (intracelulares) ou fora das células (extracelulares), sendo que as de natureza extracelular existem em maior quantidade. As enzimas intracelulares que são secretadas dentro das células e permanecem no citoplasma, são utilizadas quando

não há outra forma de síntese, principalmente quando a replicação do DNA é necessária. Portanto, as mais utilizadas industrialmente são as extracelulares, que são secretadas no ribossomo próximo à membrana celular e transferidas para fora da célula (Bourgaize et al., 2000).

A produção de enzima em escala industrial é realizada frequentemente por processo fermentativo submerso devido a este possuir relativa facilidade de cultivo, garantir homogeneidade do meio e facilidade de parâmetros de processo, entretanto possuiu a desvantagem de maior facilidade de contaminação devido à alta atividade de água e conseqüentemente possibilidade de desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Lima et al., 2001).

A demanda por enzimas de uso industrial, principalmente aquelas de origem microbiana, é crescente devido à sua aplicação em uma enorme variedade de processos e por possuírem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como ampla diversidade bioquímica, suscetibilidade à manipulação genética, menor tempo e custo de produção (Lima et al., 2001).

Segundo estudo “World Enzymes to 2017”, elaborado pela empresa de consultoria Freedonia Group Incorporated a previsão da demanda mundial de enzimas terá um aumento de 6,4% ao ano e a previsão de venda para 2017 será em torno de US \$ 6,9 bilhões. O aumento das rendas per capita nos países em desenvolvimento ajudará a impulsionar fortes ganhos em aplicações industriais relacionadas ao consumidor, como alimentos e bebidas, ração animal e produtos de limpeza. Os avanços tecnológicos na manipulação do DNA que resultam em menores custos de sequenciamento do DNA continuarão a impulsionar o crescimento acima da média na pesquisa e biotecnologia, bem como a demanda de enzimas diagnosticadas, principalmente em países desenvolvidos onde novos usos para a manipulação do DNA continuam a ser descobertos (Market Research Assistance, 2017).

As enzimas hidrolíticas possuem uma enorme aplicabilidade industrial e envolvem muito investimento e retorno financeiro com sua utilidade em indústrias, principalmente devido ao seu potencial em substituição aos processos que utilizam catalisadores químicos convencionais, assim tornam-se uma alternativa imprescindível ao desenvolvimento industrial sustentável (Vitolo, 2001).

As enzimas microbianas têm grande potencial biotecnológico, sendo empregadas na indústria têxtil (amilase, celulase, pectinase), de papel (lipase,

xilanase, oxiredutases), de detergentes (celulase, lipase, protease) e alimentícia (pectinase, lipase, protease) (Van Beilen, 2002; Oliveira, 2006). A tabela 1 apresenta as principais aplicações das enzimas microbianas.

Tabela 1 - Enzimas microbianas e suas aplicações.

Enzimas	Fonte	Aplicação	Indústria
Amilases	Fungos	Pães	Panificação
	Bactéria	Revestimento do amido	Papel
	Fungos	Fabricação de xaropes e glicose	Alimentícia
	Bactéria	Amido de lavanderia para desengomagem a frio	Amido
	Fungos	Auxiliar digestivo	Farmacêutica
	Bactéria	Remoção de revestimentos (desengomador)	Têxtil
	Bactéria	Remoção de manchas, detergentes	Lavanderia
Proteases	Fungos	Pães	Panificação
	Bactéria	Remoção de manchas	Lavagem a seco
	Bactéria	Amaciante de carnes	Carnes
	Bactéria	Limpeza de fermentos	Medicina
	Bactéria	Desengomador	Têxtil
	Bactéria	Detergentes domésticos	Lavanderia
Pectinases	Fungos	Prensagem, clarificação	Vinhos, sucos de frutas
Celulases	Bactéria	Amaciante e abrillantador de tecidos, detergentes	Lavanderia

Fonte: Mandigan et al. (2010).

2.4. Estabilidade Enzimática

A estabilidade enzimática, isto é, a capacidade de reter a atividade durante o tempo, é sem dúvida um dos fatores mais importantes em biotecnologia. A estabilidade na estocagem ou a vida útil de uma enzima refere-se à manutenção da sua capacidade catalítica entre o período de armazenagem e o seu eventual uso. A estabilização enzimática pode ser obtida por diferentes métodos: engenharia de proteínas, modificação química, uso de aditivos, uso de solventes orgânicos, imobilização e produção a partir de microrganismos extremófilos (Assis et al., 2010). Enzimas de microrganismos termofílicos são superiores às enzimas tradicionais porque podem realizar processos industriais nas quais proteínas convencionais são completamente desnaturadas (Delatorre et al., 2010).

Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um microrganismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Espera-se que microrganismos termófilos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente a, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento, ou seja, acima de 45°C. Estudos com enzimas de termófilos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento de novas linhagens termófilas, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam a sua termoestabilidade. Portanto, enzimas de microrganismos termofílicos têm grande relevância industrial (Gomes et al., 2007).

As enzimas para aplicações tecnológicas devem ser estáveis nas condições operacionais por um longo período de tempo. No entanto, a maior parte das enzimas não satisfaz este requisito. Para ultrapassar este problema podem ser investigadas novas fontes de enzimas, obtidas de microrganismos que vivem em condições extremas de pH e temperatura ou adicionar estabilizadores de enzimas, que a mantenham ativa durante o tempo necessário (Carneiro, 2003).

Ligações de hidrogênio, forças iônicas e de van der Waals, como também as interações hidrofóbicas precisam ser mantidas entre os aminoácidos para gerenciar a conformação espacial das enzimas, evitando desnaturação proteica. No processo de formulação, é necessário investigar a inter-relação de parâmetros físicos e aditivos químicos cujas variáveis são importantes para manter a estabilidade da conformação espacial, adicionando elementos como conservantes, sais, polímeros, surfactantes, solventes, detergentes e outros elementos para manter a estrutura da enzima (Silva, 2013).

Enzimas são estruturas muito instáveis devido às interações na estrutura da molécula: eletrostáticas (forças iônicas entre aminoácidos com cargas opostas), hidrofílicas (entre aminoácidos polares na superfície), hidrofóbicas (entre aminoácidos apolares internamente), ligações de hidrogênio (entre hidroxilas e átomos de hidrogênio), pontes dissulfeto (entre aminoácidos que contêm enxofre), forças de Van der Waals. As forças de atração e de repulsão entre as moléculas ou entre grupos dentro da mesma estrutura molecular interferem na estabilidade da atividade catalítica das enzimas (Campbell e Farrell, 2007).

A estabilidade enzimática é bastante dependente da estrutura tridimensional da enzima. Certas regiões instáveis denominadas de pontos fracos, isto é, regiões propensas a desdobrar, são determinantes na estabilidade enzimática e estão

localizadas normalmente perto da superfície da molécula de proteína, o que explica porque a região superficial da enzima é importante para sua estabilidade catalítica (Kumar, 2003).

A estabilidade térmica das proteínas tem sido atribuída a sua maior hidrofobicidade, maior enovelamento, redução dos pontos de ramificação, redução do número e tamanho das cavidades, substituição de resíduos aminoacídicos na estrutura secundária externa, aumento nos resíduos de prolina, redução da ocorrência de resíduos termolábeis, aumento na quantidade de pontes de hidrogênio e maior formação de pontes salinas (Kumar, 2003).

Muitas enzimas são mais estáveis em presença de seus substratos, coenzimas ou moduladores. Baixas concentrações de cátions bivalentes como os metais Ba^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} e Zn^{+2} , possuem um papel específico no aumento da estabilidade de certas enzimas. Glicerol, sorbitol, etileno glicol e polímeros como polietilenoglicol (PEG), dextranas e proteínas também mantiveram a estabilidade das enzimas. Os metais promovem a manutenção da estrutura terciária de algumas enzimas. Os íons cálcio são ligantes de grupos carboxílicos de asparagina e glutamina e aumentam a estabilidade térmica por redução da flexibilidade das enzimas além de reduzir os efeitos negativos de cargas na molécula de proteína (Wiseman, 1985).

Para manter a estabilidade da conformação espacial da enzima, geralmente são adicionados, além de substratos e inibidores que protegem o sítio ativo, agentes químicos: conservantes microbiológicos, detergentes, sais, solventes, poliols, polímeros, dentre outros compostos. É primordial que esses aditivos sejam inócuos a todos os seres vivos para a aplicação em indústrias de alimentos e fármacos e que as condições do meio de formulação sejam selecionadas criteriosamente (Illanes, 2008).

A glicose, sacarose, glicerol, manitol, sorbitol e xilitol, além do etilenoglicol são veículos utilizados na formulação de enzimas por proteger os aminoácidos glicina e asparagina da reação de desaminação como também, por inibir a oxidação da proteína ao captar os radicais hidroxilas do meio, evitando a propagação da reação. Essas substâncias causam também efeito protetor na enzima devido à complexação de íons metálicos que podem inibir a atividade catalítica. São substâncias inócuas e de baixo custo, amplamente utilizadas na estabilização de enzimas. Sacarose ou manitol a pH neutro, adicionados à formulação de enzimas, reduzem a reação de desaminação. Observa-se que a taxa dessa reação diminui apenas na presença da

sacarose quando o bioproduto com atividade catalítica é formulado no estado sólido. Esse açúcar, agente estabilizante muito utilizado, causa hidratação na proteína e estabiliza a enzima (Macgoff et al., 2008).

Os polímeros são adicionados na formulação de enzimas para diminuir a atividade de água do meio. São agentes estabilizantes de proteínas ao minimizarem a reação de desaminação. Na presença desses compostos, há um aumento da viscosidade do produto formulado e imobilização da estrutura proteica. Os bioprodutos formulados em estado sólido apresentam maior estabilidade da atividade catalítica devido à ausência da água (Illanes, 2008). Um outro mecanismo da estabilidade da estrutura terciária das enzimas pela adição de polímeros é a formação de uma matriz sólida com prevenção do fenômeno de agregação entre proteínas (Bummer, 2008).

A adição de Polietilenoglicol a extrato enzimático protege a conformação terciária da proteína. Com esse mesmo mecanismo de estabilização de enzimas, sais inorgânicos e sorbitol são também utilizados como suportes (Macgoff et al., 2008).

2.5. Desativação Mecânica da Celulase

Acredita-se que geralmente as enzimas celulolíticas sejam suscetíveis à desativação quando o líquido reacional é exposto a uma agitação severa. Ohlson et al. (1984) afirmaram que as celulases apresentam uma boa estabilidade mecânica em um meio reacional agitado com o substrato livre, havendo uma perda de 8% da atividade da endoglicanase e de 10% da atividade da β -glicosidase após 1 semana.

Ganesh et al. (2000) mostraram que, quando as enzimas celulase foram submetidas à agitação, a desativação aumentou com um aumento na velocidade da agitação.

Reese e Ryu (1980) sugeriram que essa desativação da enzima na interface gás-líquido é causada pelo desdobramento das moléculas da enzima nesta interface. Na ausência de agitação, a quantidade de enzima na interface é pequena comparada à concentração da enzima total, e conseqüentemente o efeito é insignificante. A agitação renova continuamente a superfície, sujeitando mais enzimas ao desdobramento, e conseqüentemente levando a um aumento da desnaturação e desativação (Kaya et al., 1996).

A perda de atividade depende das condições de incubação da preparação enzimática. Os mecanismos que levam à perda de atividade podem ser vários: Desnaturação térmica das proteínas, Oxidação, Proteólise e Outras reações com compostos do meio (Silva, 2013).

2.6. 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, 2010). O complexo enzimático celulolítico é dividido em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: β -1,4- endoglucanases (EC 3.2.1.4), β -1,4-exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Jung et al., 2015). Celulase é o nome dado a um complexo de enzimas capaz de formar glicose a partir da hidrólise de celulose. As endoglucanases clivam ligações glicosídicas β -1,4 internas da fibra celulósica; as exoglucanases atuam na região externa da celulose; e as β -glicosidases hidrolisam celooligossacarídeos solúveis em glicose (Castro e Pereira, 2010).

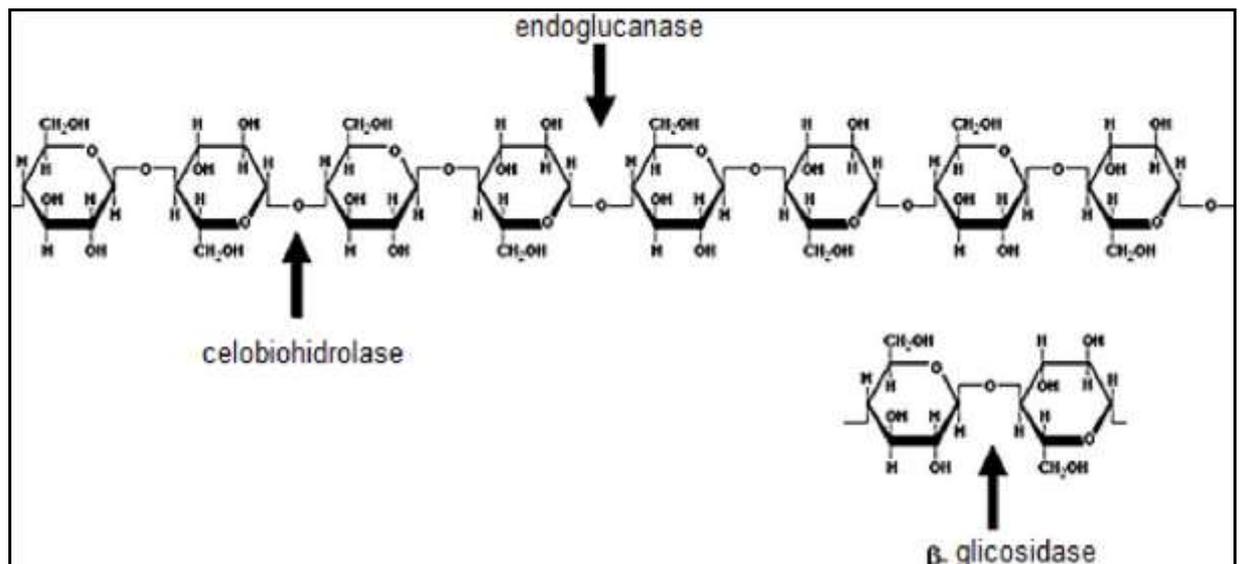


Figura 1 - Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase. Fonte: Kumar et al. (2008).

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

As celulases possuem uma ampla faixa de aplicações e são utilizadas nas indústrias de alimentos em processos de extração de suco de frutas, óleos de sementes e clarificação de sucos; na produção de rações animais, aumentando assim sua digestibilidade; em indústrias têxteis para desfribilação de tecidos e desbotamento de brim; nas indústrias de detergentes e nas indústrias de papel e celulose (Bhat, 2000).

As avicelases (exoglicanases) 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. São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando cadeias do polissacarídeo (Lynd et al., 2002). As exoglicanases não atuam sobre celuloses solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos. As exoglicanases atuam sobre celulose cristalina (Avicel), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Deste modo, ensaios de atividade sobre Avicel caracterizam as exoglicanases (Martins, 2005), enquanto que para a atividade de endoglicanases usa-se Carboximetilcelulase (CMCase), tornando possível a diferenciação entre essas enzimas (Sánchez, 2009).

As carboximetilcelulases (endoglicanases) 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. Endoglucanase, classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase, também conhecida por carboximetilcelulase (CMCase). É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, quebra as ligações dentro da cadeia de celulose, liberando glicose,

celobiose e celodextrinas, criando extremidades não redutoras para subsequente ação das exoenzimas. A endoglicanase é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (Ogeda e Petri, 2010; Bano et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Estudar a estabilidade de celulases presentes em extratos brutos de culturas de *Bacillus* sp. SMA-2, em diferentes aditivos, visando à obtenção de um bioproduto estável capaz de ser comercializado.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a estabilidade das celulases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em função do tempo de 154 dias de estocagem sob congelamento em freezer à temperatura de 3°C;
- Avaliar a influência de aditivos estabilizantes sobre a estabilidade das celulases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2;
- Avaliar a estabilidade e compatibilidade das celulases com diferentes detergentes comerciais como Omo[®], Bem-te-vi[®], Surf[®], Barra[®], Ariel[®], Ultra Biz[®], Invicto[®], Tide[®], Tixan[®] e Cheer[®];

- Avaliar a influência de íons metálicos Ca^{+2} , K^{+1} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cs^{+1} , Co^{+2} , Na^{+1} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Mg^{+2} sobre a compatibilidade e estabilidade das celulases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2;
- Avaliar o efeito da protease comercial na atividade e estabilidade das celulases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2;
- Avaliar através de imagens de microscopia eletrônica de varredura o processo de degradação de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo bagaço de cana e farinha da casca de maracujá.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Crescimento do microrganismo e meio de cultivo

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

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

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

O meio de cultivo para a produção do complexo enzimático (Avicelase, Carboximetilcelulase, Xilanase, Amilase e Pectinase) continha os seguintes nutrientes (g.L⁻¹ de água destilada): peptona, 1,0; KCl, 0,3; K₂HPO₄, 0,87; MgSO₄, 0,5; NaCl, 10,0; e traços de metais (CaCl₂, 2,2x10⁻³; ZnO, 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O,

$2,7 \times 10^{-2}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $1,0 \times 10^{-2}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $8,5 \times 10^{-4}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $2,4 \times 10^{-3}$, $\text{NiCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $2,5 \times 10^{-4}$, H_3BO_3 , $3,0 \times 10^{-4}$; Na_2MoO_4 , $1,0 \times 10^{-3}$). A este meio basal foi adicionado 0,8% (m/V) de água de maceração de milho (Sigma Aldrich) e 0,8% (m/V) de bagaço de cana-de-açúcar e 0,8% (m/V) de farinha da casca de maracujá. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,5 com NaOH 1,0 M e esterilizado por autoclavagem a 121 °C a 1 atm, durante 15 minutos.

O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura. Os frascos foram inoculados com 5 mL do pré-inóculo e posteriormente incubados a 50 °C em um agitador orbital (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm por 168 horas. Nos intervalos de tempo definidos, o crescimento celular foi determinado em função da densidade ótica do meio a 600 nm com a utilização de um espectrofotômetro (UVmini-1240, SHIMADZU, Kyoto, Japão).

O esquema geral para a obtenção das celulases está apresentado na Figura 2.

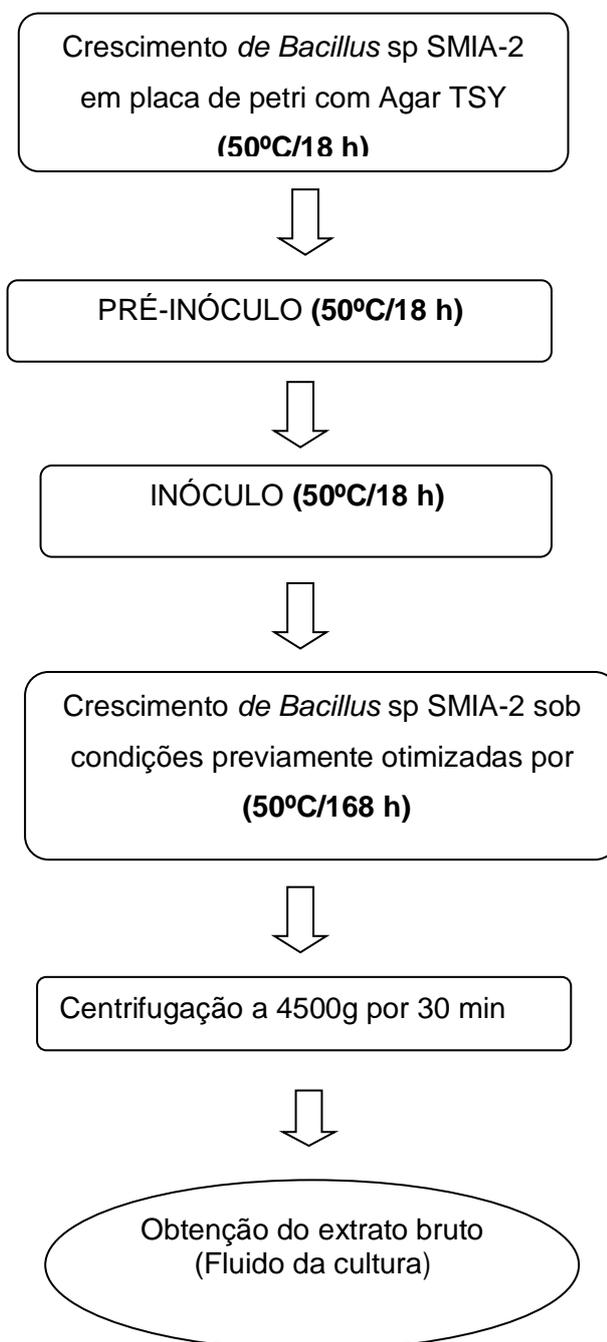


Figura 2 - Esquema da obtenção de celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2

4.2. Ensaaios enzimáticos

4.2.1. Obtenção das enzimas

As amostras após o processo fermentativo 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.

4.2.2. Atividade enzimática da carboximetilcelulase (β -1,4-endoglicanase)

A atividade da enzima CMCase foi determinada por meio da quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de carboximetilcelulose (Sigma Aldrich) (Ghose, 1987). Uma mistura que continha 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 1% (m/V) 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 mantida 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 por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda a 540 nm (Miller, 1959). Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, no entanto sem o extrato livre de células. Uma unidade (U) de atividade de CMCase foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,3 mg/mL.

4.2.3. Atividade enzimática da Avicelase (Exo- β -1,4- Glucanase)

A atividade da enzima Avicelase foi determinada pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de avicel (Sigma Aldrich) (Ghose, 1987). Uma

mistura que continha 0,5 mL de solução de avicel 1% (m/V) 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 mantida em ebulição em banho-maria durante 10 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e a absorvância foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda a 540 nm (Miller, 1959). Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a avicel em suspensão. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, no entanto sem o extrato livre de células. Uma unidade (U) de atividade de Avicelase foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,3 mg/mL.

4.2.4. Atividade enzimática da Xilanase (endo-1,4- β -xilanase)

A atividade da enzima xilanase será determinada segundo Miller (1959). A reação consiste na mistura contendo 0,5 mL do extrato enzimático, 1 mL de solução de xilana 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) e 0,5 mL do mesmo tampão. Esta mistura será incubada em banho-maria a 70°C durante 30 minutos. Após este período, a reação será paralisada com adição de 1,0mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura. Em seguida, esta mistura será colocada em água em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo por 5 minutos. A coloração desenvolvida será medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda a 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém a adição de 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) no lugar do extrato enzimático, e esta mistura foi mantida em ebulição, como descrito anteriormente. Uma unidade de xilanase será definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de xilose por minuto por mL da enzima sob a condição de ensaio acima descrita, usando uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,05 a 0,17 mg/mL.

4.2.5. Atividade enzimática da α -amilase

A atividade amilolítica do microrganismo foi determinada segundo a metodologia do ácido 3,5-dinitrossalicílico ou Reagente de Miller (DNS) (Miller, 1959) que determina o incremento dos açúcares redutores na solução como resultado da ação da α -amilase sobre o amido. A reação continha 0,5 mL do extrato enzimático, 1,0 mL da solução de amido em 1,0% preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) e 0,5 mL do mesmo tampão. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 90°C por 10 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL da solução de DNS (Miller, 1959) à mistura. Em seguida esta mistura foi mantida em ebulição durante 10 minutos e resfriada em banho de gelo por 5 minutos.

A coloração desenvolvida será medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento será realizado com o controle, porém a adição de 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) no lugar do extrato enzimático, e esta mistura foi mantida em ebulição, como descrito anteriormente. Uma unidade de amilase será definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcares redutores por minuto por mL da enzima a partir do amido solúvel nas condições do ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,3 mg/mL.

4.2.6. Atividade enzimática da Poligalacturonase (Pectinase)

A atividade da poligalacturonase foi determinada no extrato enzimático, incubando 0,5 mL da enzima bruta com 1,0 mL de solução de pectina cítrica em 1,0% dissolvida em tampão Glicina-NaOH (50 mM, pH 8,0) e incubada a 70°C por 10 minutos (Soares et al., 1999). Após a reação, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e mantido em ebulição em banho-maria durante 5 min para paralisar a reação. As amostras resultantes foram em seguida resfriadas em banho de gelo, e a absorbância foi medida a 540 nm (Miller, 1959). O mesmo procedimento será realizado com o controle, porém com a adição de 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) no lugar do extrato enzimático, e esta mistura foi mantida em ebulição, como descrito anteriormente. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de

onda a 540 nm. Uma unidade (U) de atividade da poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto a partir da pectina cítrica nas condições do ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de ácido galacturônico nas concentrações de 0,10 a 1,0 mg/mL.

4.2.7. Estabilidade das enzimas durante a estocagem sob congelamento à temperatura de 3^o C

O comportamento da atividade das enzimas em condições de congelamento foi investigado. Para tal foi determinado a atividade das celulases presentes no extrato bruto, nos tempos (0, 3, 29, 34, 61, 92, 125 e 154 dias), totalizando um período de 5 meses. O extrato bruto ficou estocado em vários frascos sob congelamento à temperatura de 3^o C e para determinar a atividade o mesmo foi descongelado à temperatura ambiente. A atividade da carboximetilcelulase e da avicelase foi determinada conforme o procedimento descrito no item 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente.

4.2.8. Influência de Aditivo estabilizante na atividade enzimática

A carboximelilcelulase e avicelase secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foram estudadas adicionando ao sobrenadante do extrato bruto os seguintes aditivos: Etilenoglicol 1M, Polietilenoglicol 0,01M, Glicina 0,01M e Glicerol 1%. Em seguida, a atividade das enzimas foi determinada conforme o procedimento descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.3, nos tempos de 1 e 3 horas à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado no extrato bruto sem os estabilizantes.

4.2.9. Compatibilidade e estabilidade das enzimas com detergentes comerciais

Os detergentes comerciais Omo[®], Bem-te-vi[®], Surf[®], Barra[®], Ariel[®], Ultra Biz[®], Invicto[®], Tide[®], Tixan[®] e Cheer[®], foram diluídos em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) a uma concentração final de 7mg/mL para simular condições de lavagem. Em seguida foram tratados termicamente a 100^o C por 30 minutos para inativar as

enzimas que fazem parte da formulação dos detergentes. Após o resfriamento desta solução contendo o detergente foi realizado o ensaio enzimático da seguinte forma: Uma mistura de 1,0 mL do substrato avicel e carboximetilcelulose em 1% (m/V) preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0), 0,5 mL do extrato bruto e 0,5 mL da solução do detergente em tampão. Após agitação do sistema a atividade das enzimas foi determinada conforme o procedimento descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.3 para determinação da atividade residual tanto nos tratamentos quanto no controle (incubado sem nenhum detergente e considerado como sendo 100% da atividade) (Banerjee et al., 1999; Phadatare et al., 1993).

O detergente que possibilitou maior atividade da enzima foi utilizado em estudos de compatibilidade por (15, 30 ,45 ,60 120 e 240 minutos).

4.2.10. Influência de íons na estabilidade e compatibilidade das enzimas

O efeito dos íons metálicos como $\text{Ca}^{+2}(\text{CaCl}_2)$, $\text{K}^{+1}(\text{KCl})$, $\text{Ba}^{+2}(\text{BaCl}_2)$, $\text{Hg}^{+2}(\text{HgCl}_2)$, $\text{Cu}^{+2}(\text{CuSO}_4)$, $\text{Zn}^{+2}(\text{ZnSO}_4)$, $\text{Cs}^{+1}(\text{CsCl})$, $\text{Co}^{+2}(\text{CoCl}_2)$, $\text{Na}^{+1}(\text{NaCl})$, $\text{Ni}^{+2}(\text{NiCl}_2)$, $\text{Fe}^{+2}(\text{FeSO}_4)$, $\text{Mn}^{+2}(\text{MnCl}_2)$ e $\text{Mg}^{+2}(\text{MgCl}_2)$ sobre a atividade das enzimas foi estudado. O extrato bruto foi incubado à temperatura ambiente por (15, 30, 45 ,60 ,120 e 240 minutos) na presença do íon correspondente com a concentração final de 1 mM em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0). Uma mistura de 1,0 mL do substrato em 1% (m/V), 0,5 mL do extrato bruto e 0,5 mL da solução do íon metálico preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0). Após agitação do sistema a atividade das enzimas foi determinada conforme o procedimento descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.3 para determinação da atividade residual tanto nos tratamentos quanto no controle incubado sem nenhum íon metálico e considerado como sendo 100% da atividade.

4.2.11. Influência da protease comercial na estabilidade das enzimas

Para estudar o efeito da Protease Comercial na atividade da carboximetilcelulase e avicelase, o extrato bruto foi incubado à temperatura ambiente por (15, 30, 45, 60, 120 e 240 minutos) na presença de protease comercial diluída em água destilada na concentração de 1:10. A atividade residual (%) será

determinada nas condições padrões anteriormente descritas nos itens 4.2.2 e 4.2.3. Um controle (ausência de Protease Comercial) foi realizado e considerado como sendo 100% de atividade.

4.3. Análises Estatísticas

Para análise dos dados, o programa estatístico utilizado foi SAS – Statistical Analysis System (2003), versão 9.3. Os resultados obtidos em cada experimento foram realizados em triplicata e submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação entre as médias dos diferentes tratamentos em um mesmo tempo, como entre as médias de um mesmo tratamento entre tempos distintos pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada seguindo o protocolo descrito por Karnovsky (Karnovsky, 1965). Com a microscopia eletrônica de varredura (MEV) conseguiu observar as características microestruturais e obter as informações sobre a morfologia e o crescimento do *Bacillus* sp SMIA-2 com grande profundidade de foco no extrato enzimático que foram colhidas a partir da fermentação de 120 horas, meios de cultura com farinha de casca de maracujá 0,5 % e bagaço de cana-de-açúcar 0,5 %. O pellet desse extrato enzimático foi fixado durante a noite a 4°C em uma solução de 2,5 % de glutaraldeído . A suspensão foi lavada em tampão de fosfato de sódio 0,05 M a pH 7,1 , 3 vezes durante 10 minutos cada. Após fixação as amostras foram desidratadas por passos com 15 %, 30 %, 50 % , 70 % , 90 % e concentrações de 100% de etanol durante 15 min cada . Para preservar a estrutura da superfície da espécie e para evitar danos devido à tensão superficial durante a observação microscópica, foi utilizado um procedimento de ponto crítico . As amostras foram colocadas em um suporte de alumínio e coberto com uma camada de paládio e observado sob alto vácuo em uma BALTEC SCD 050 - Sputter Coater, (Lichtenstein , Alemanha) microscópio eletrônico de varredura no

Zeiss DSM 962 (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF , Campos, Brasil) .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estabilidade das celulases durante estocagem

A estabilidade das celulases presentes no extrato bruto das culturas de *Bacillus* sp SMIA-2 em função do tempo de estocagem a 3°C está apresentada na Tabela 2. A avicelase e a carboximetilcelulase mantiveram suas atividades estáveis em até 154 dias de estocagem. Esse resultado indica uma estabilidade considerável das celulases, em relação aos trabalhos citados na literatura, mesmo armazenada no extrato bruto e sem a presença de estabilizadores, como o glicerol, por exemplo, os quais são conhecidos por aumentar a estabilidade enzimática durante a estocagem.

Tabela 2 – Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presentes no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 em função do tempo de estocagem a 3°C por 154 dias. (100% de atividade da avicelase = 1,20 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,50 U/mL).

Tempo (dias)	Avicelase (%)	CMCase (%)
0	100,0 ^a ± 0,0007	100,0 ^a ± 0,0007
3	98,9 ^a ± 0,0028	99,0 ^a ± 0,0029
29	98,9 ^a ± 0,0027	99,0 ^a ± 0,0027
34	98,9 ^a ± 0,0028	99,0 ^a ± 0,0027
61	98,6 ^a ± 0,0026	98,6 ^a ± 0,0012
92	98,6 ^a ± 0,0012	98,6 ^a ± 0,0014
125	98,2 ^a ± 0,0019	98,5 ^a ± 0,0018
154	98,0 ^a ± 0,0021	98,4 ^a ± 0,0017

¹Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, o teste de Tukey.

A estabilidade apresentada pelas celulasas de *Bacillus* sp. SMIA-2 foi superior às celulasas (carboximetilcelulase) produzidas pelo fungo filamentoso *Rhizopus* sp cultivado em fermentação em estado sólido (FES), utilizando como substrato a palma da forrageira (*Nopalea cochenillifera*). O complexo celulásico se manteve estável quando armazenado a -18°C por até 144 horas (Santos et al., 2014).

Segundo Narra et al. (2014), a estabilidade de uma endoglucanase purificada produzida por *Aspergillus terreus* e armazenada a 4°C foi estudada e verificou-se que após 5 meses houve um decréscimo de 3 a 5% de sua atividade inicial. Em outro estudo realizado por Iqbal et al. (2011), uma endoglucanase de *Trichoderma viride* apresentou uma atividade residual em 58% após 30 dias armazenada sob as mesmas condições de temperatura de 4°C .

Segundo Heller et al. (1997), o congelamento a -20°C ou -80°C é o método mais comum de armazenamento de proteínas a frio. No entanto, o congelamento de soluções enzimáticas frequentemente causa desnaturação estrutural e perda da função biológica, devido às variações de pH e “stress” (agregação, desdobramentos e dissociações) causados pela formação de cristais de gelo e ciclos de congelamento-descongelamento, o que reduz a estabilidade enzimática.

Algumas enzimas são pouco estáveis à temperatura ambiente, limitando a sua aplicação e dificultando a sua distribuição e uso. As enzimas podem ser, de um modo geral, armazenadas a -20°C ou $+4^{\circ}\text{C}$ na presença de um estabilizador, de modo a prolongar a sua estabilidade (Carneiro, 2003).

5.2. Influência de aditivos estabilizantes na atividade das celulasas

Alguns polióis como o sorbitol, xilitol ou glicerol são conhecidos por estabilizar a atividade biológica. Desta forma, a influência da adição de alguns aditivos na estabilidade das celulasas incubadas à temperatura ambiente foi estudada e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 3. A atividade da avicelase não diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) do controle quando incubada por 1 hora na presença do polietilenoglicol 0,01M e do glicerol 1%. Já quando incubada por 3 horas na presença de todos os aditivos a atividade da avicelase diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) do controle. Ressalta-se que para o controle também não foi observada

diferença significativa ($p \leq 0,05$) da atividade da enzima quando incubada por 1 e 3 horas.

Tabela 3 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de aditivos estabilizantes. (100% de atividade da avicelase = 1,07 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,48 U/mL).

Tratamento	Avicelase (%)		CMCase (%)	
	1 hora	3 horas	1 hora	3 horas
Controle	100,0 ^{bA} ± 0,0029	100,0 ^{aA} ± 0,0029	100,0 ^{aA} ± 0,0043	100,0 ^{aA} ± 0,0043
Etilenoglicol 1M	101,1 ^{aA} ± 0,0029	50,8 ^{eB} ± 0,0031	99,7 ^{aA} ± 0,0037	88,5 ^{cB} ± 0,0037
Glicerol 1%	100,1 ^{bA} ± 0,0029	57,8 ^{cB} ± 0,0029	98,7 ^{aA} ± 0,0043	87,9 ^{cB} ± 0,0043
PEG 0,01M	100,6 ^{abA} ± 0,0029	60,5 ^{bB} ± 0,0014	99,5 ^{aA} ± 0,0043	92,6 ^{bB} ± 0,0043
Glicina 0,01M	95,3 ^{cA} ± 0,0025	54,0 ^{dB} ± 0,0012	119,9 ^{bA} ± 0,0033	94,0 ^{bB} ± 0,0033

¹Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey; Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

Em relação a CMCase, foi observado na tabela 3 que com 1 hora de incubação à temperatura ambiente a atividade da enzima não apresentou diferença significativa entre o controle, o etilenoglicol 1M, o glicerol 1% e o polietilenoglicol 0,01M. Já, na presença da glicina 0,01M houve um aumento significativo da atividade em relação ao controle. Entretanto, constatou-se que na incubação da CMCase por 3 horas houve diferença significativa em todos os aditivos estabilizantes em relação ao controle.

5.3. Compatibilidade e estabilidade das enzimas com detergentes comerciais

O estudo sobre a compatibilidade das celulases com detergentes comerciais mostrou que a avicelase apresentou um aumento de 11% e 10% de sua atividade quando incubada à temperatura ambiente nos detergentes comerciais Omo[®] e Bem-te-vi[®], respectivamente na Tabela 4. Além disso, a enzima perdeu em torno de 12% a 60% da atividade quando incubada à temperatura ambiente na presença dos outros detergentes comerciais testados.

Em relação a CMCase, a enzima manteve sua atividade ($p \leq 0,05$) quando incubada à temperatura ambiente na presença dos detergentes comerciais Barra® e Ariel®. Nos detergentes Omo® e Bem-te-vi® foi observado um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na atividade da enzima de 10% e 9%, respectivamente. Por outro lado, a CMCase perdeu em torno de 20% a 30% de sua atividade quando os outros detergentes comerciais foram utilizados. Estes resultados sugerem que as formulações dos detergentes contêm alguns compostos que podem estimular ou inibir a atividade da avicelase e da carboximetilcelulase.

Tabela 4 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de detergentes comerciais. (100% de atividade da avicelase = 1,18 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,47 U/mL).

Detergentes Comerciais	Avicelase (%)	CMCase (%)
Controle	100,0 ^a ± 0,0027	100,0 ^a ± 0,0029
Ariel®	86,4 ^d ± 0,0038	100,0 ^a ± 0,0034
Ultra Biz®	74,6 ^e ± 0,0025	80,8 ^c ± 0,0007
Cheer®	28,0 ⁱ ± 0,0033	66,0 ^d ± 0,0012
Tide®	39,0 ^g ± 0,0033	98,0 ^a ± 0,0007
Invicto de Limão®	62,7 ^f ± 0,0007	80,8 ^c ± 0,0014
Tixan Ypê®	36,4 ^h ± 0,0031	85,1 ^b ± 0,0021
Surf®	88,1 ^b ± 0,0037	97,9 ^a ± 0,0033
Barra®	87,3 ^c ± 0,0038	100,0 ^a ± 0,0033
Bem-te-vi®	110,2 ^a ± 0,0036	109,0 ^a ± 0,0031
Omo®	111,0 ^a ± 0,0031	110,0 ^a ± 0,0014

¹Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

Vários estudos sobre a aplicação de celulasas em fórmulas de detergente estão disponíveis na literatura (Ladeira et al., 2015; Nascimento, 2005). O que torna possível a aplicação de enzimas hidrolíticas em formulações de detergente é a sua compatibilidade e estabilidade com os constituintes dos mesmos (Mittidieri et al., 2006).

Uma vez que as celulasas de *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentaram compatibilidade com os detergentes Omo® e Bem-te-vi®, a estabilidade das mesmas

foi estudada na presença destes detergentes Tabela 5. A avicelase foi estável na presença dos detergentes Omo® e Bem-te-vi® até 120 minutos, onde manteve 97% e 100%, respectivamente de sua atividade. Já quando incubada nestes mesmos detergentes por 240 minutos, foi observada uma diminuição da atividade residual em torno de 50%.

Tabela 5 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença dos detergentes Omo® e Bem-te-vi®. (100% de atividade da avicelase = 1,09 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,47 U/mL).

Tempo (min)	Bem-te-vi®		Omo®	
	Avicelase (%)	CMCase (%)	Avicelase (%)	CMCase (%)
0	100,0 ^a ± 0,0012	100,0 ^a ± 0,0014	100,0 ^a ± 0,0012	100,0 ^a ± 0,0014
15	100,0 ^a ± 0,0019	104,0 ^a ± 0,0007	99,0 ^a ± 0,0030	100,0 ^a ± 0,0007
30	100,0 ^a ± 0,0031	98,0 ^a ± 0,0012	99,0 ^a ± 0,0026	108,0 ^a ± 0,0019
45	101,0 ^a ± 0,0031	106,0 ^a ± 0,0019	97,0 ^a ± 0,0031	111,0 ^a ± 0,0019
60	101,0 ^a ± 0,0031	102,0 ^a ± 0,0021	97,0 ^a ± 0,0026	111,0 ^a ± 0,0012
120	100,0 ^a ± 0,0019	98,0 ^a ± 0,0007	97,0 ^a ± 0,0038	98,0 ^a ± 0,0012
240	47,0 ^b ± 0,0018	51,0 ^b ± 0,0007	52,0 ^b ± 0,0014	51,0 ^b ± 0,0012

¹Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

Ainda de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, a CMCase quando incubada na presença dos detergentes Omo® e Bem-te-vi® por até 120 minutos apresentou um aumento de sua atividade, em torno de 11% e 2%. Já quando incubada por 240 minutos apresentou uma diminuição das suas atividades residuais em torno de 50%.

Estudos realizados por Ladeira et al. (2015) sobre a estabilidade de celulases presentes em extratos dialisados de culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo bagaço de cana “in natura” como fonte de celulose e água de maceração de milho, revelaram que as atividades das enzimas variaram para cada detergente testado, sendo observada a maior estabilidade na presença de Ultra Biz® e a menor estabilidade na presença do detergente Ariel®.

Celulases produzidas por *Bacillus cereus* apresentaram excelente estabilidade em detergentes comerciais, mantendo cerca de 80% de sua estabilidade após 1

hora de incubação a 40 e 50°C (Banik e Prakash, 2004). De acordo com alguns autores, em temperaturas maiores que 40°C, a enzima requer a adição de agentes estabilizantes como cálcio, para que a enzima se mantenha estável.

Celulases produzidas por *Bacillus brevis* mostraram compatibilidade com detergentes comerciais como Ariel®, Surf® excels®, Surf® Ultra® e Rin® em presença de cálcio e glicina (Banerjee et al., 1999).

5.4. Influência de íons metálicos na compatibilidade e estabilidade das enzimas

Um estudo sobre a compatibilidade das celulases com íons metálicos foi realizado e os resultados estão apresentados na Tabela 6. A atividade da avicelase aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) em torno de 40% e 25% quando incubada na presença dos íons Cobalto e Bário, respectivamente.

Em relação a CMCase, a atividade da enzima aumentou em torno de 13% e 22%, quando incubada na presença dos íons Cobalto e Bário. No entanto, o Manganês foi o íon que apresentou o efeito mais relevante sobre a atividade dessa enzima com um aumento de 31% na atividade da enzima.

Estes resultados confirmam os relatados por Ladeira et al. (2015) em que o Cobalto na concentração de 1mM aumentou a atividade enzimática da avicelase presente tanto no extrato bruto, precipitado e dialisado da cultura. O Manganês e Cobalto estimularam a atividade enzimática da CMCase, sendo que o Cobalto foi o íon que apresentou o efeito mais relevante sobre a atividade desta enzima.

Enzimas microbianas extracelulares são geralmente conhecidas por exigir cations divalentes para a atividade e estabilização (Lin, 2012).

Tabela 6 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de íons metálicos. (100% de atividade da avicelase = 1,08 U/mL e 100% de atividade da CMCCase = 0,49 U/mL).

Metais	Avicelase (%)	CMCase (%)
Controle	100,0 ^e ± 0,0007	100,0 ^d ± 0,0007
Cobalto (Co ⁺²)	140,0 ^a ± 0,0026	113,0 ^c ± 0,0007
Bário (Ba ⁺²)	125,0 ^b ± 0,0033	122,0 ^b ± 0,0007
Potássio (K ⁺¹)	117,0 ^c ± 0,0031	116,0 ^c ± 0,0033
Manganês (Mn ⁺²)	116,0 ^c ± 0,0033	131,0 ^a ± 0,0007
Cálcio (Ca ⁺²)	116,0 ^c ± 0,0026	102,0 ^d ± 0,0007
Sódio (Na ⁺¹)	104,0 ^d ± 0,0031	78,0 ^f ± 0,0012
Magnésio (Mg ⁺²)	102,0 ^d ± 0,0031	90,0 ^e ± 0,0014
Zinco (Zn ⁺²)	99,0 ^e ± 0,0031	92,0 ^e ± 0,0007
Níquel (Ni ⁺²)	94,0 ^e ± 0,0031	59,0 ^h ± 0,0007
Césio (Cs ⁺²)	84,0 ^f ± 0,0034	57,0 ^h ± 0,0007
Cobre (Cu ⁺²)	82,0 ^f ± 0,0039	78,0 ^f ± 0,0007
Mercúrio (Hg ⁺²)	72,0 ^g ± 0,0033	69,0 ^g ± 0,0007
Ferro (Fe ⁺²)	55,0 ^h ± 0,0026	61,0 ^g ± 0,0007

¹Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

Lin (2012) descobriu que, em estirpes de *Bacillus thuringiensis* a atividade de celulase foi aumentada por Mn⁺². Jonvesly e Naik (2001) observaram que a protease produzida por *Bacillus* sp. JB-99 foi estimulada na presença de Ca⁺², Mn⁺² e Mg⁺². Proteases de *Bacillus brevis* também foram estimuladas por acetato de cálcio, CaCl₂ e MnSO₄. Além disso, estes autores verificaram que estes íons foram essenciais para o crescimento do microrganismo.

Considerando que as celulasas de *Bacillus* sp. SMIA-2 não só apresentaram boa compatibilidade com os íons metálicos Bário e Cobalto, mas também aumentaram suas atividades na presença destes íons, a estabilidade da avicelase e da CMCCase foi estudada, incubando as mesmas na presença destes íons por até 240 minutos na Tabela 7.

A avicelase aumentou sua atividade em 21,4% e 33,9%, quando incubada por 120 minutos na presença dos íons Bário e Cobalto, respectivamente. Além disso, a CMCase também apresentou um aumento na sua atividade de 29,8% e 12,8% quando incubada por 120 minutos na presença dos íons Bário e Cobalto, respectivamente.

De acordo com Tomazic (1991), a estabilização de algumas enzimas pode ser induzida por aditivos não proteicos, principalmente íons bivalentes como Ba^{+2} , Co^{+2} . Esses íons, usados em baixas concentrações, podem estabilizar a estrutura terciária da proteína promovendo a formação de ligações cruzadas, que conferem a ela uma maior estabilidade.

Tabela 7 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presentes no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de Bário (Ba^{+2}) e Cobalto (Co^{+2}) (100% de atividade da avicelase = 1,12 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,47 U/mL).

Tempo (min)	Bário (Ba^{+2})		Cobalto (Co^{+2})	
	Avicelase (%)	CMCase (%)	Avicelase (%)	CMCase (%)
Controle	100,0 ^b ± 0,0008			
15	121,4 ^a ± 0,0031	129,8 ^a ± 0,0007	133,9 ^a ± 0,0026	112,8 ^a ± 0,0007
30	121,4 ^a ± 0,0033	129,8 ^a ± 0,0021	133,9 ^a ± 0,0037	112,8 ^a ± 0,0021
45	121,4 ^a ± 0,0037	129,8 ^a ± 0,0007	133,9 ^a ± 0,0026	112,8 ^a ± 0,0007
60	121,4 ^a ± 0,0037	129,8 ^a ± 0,0007	133,9 ^a ± 0,0026	112,8 ^a ± 0,0007
120	121,4 ^a ± 0,0021	129,8 ^a ± 0,0007	133,9 ^a ± 0,0026	112,8 ^a ± 0,0007
240	69,6 ^c ± 0,0038	83,0 ^c ± 0,0007	68,8 ^c ± 0,0026	76,6 ^c ± 0,0007

¹Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

5.5. Influência da protease comercial na estabilidade das celulases

A atividade da avicelase e da CMCase na presença de proteases comerciais está apresentada na Tabela 8. De acordo com os resultados encontrados, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) da atividade das enzimas quando incubadas na presença da protease por até 120 minutos, indicando que esta enzima não foi capaz de degradar as celulases produzidas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2. Portanto, as

celulases mostraram boa estabilidade quando submetidas à ação da protease comercial por até 120 minutos.

Tabela 8 - Atividade relativa da avicelase e da carboximetilcelulase presentes no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de Protease Comercial. (100% de atividade da avicelase = 1,11 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,46 U/mL).

Tempo (minutos)	Avicelase (%)	CMCase (%)
0	100,0 ^a ± 0,0009	100,0 ^a ± 0,0009
15	100,0 ^a ± 0,0019	100,0 ^a ± 0,0029
30	100,0 ^a ± 0,0019	98,7 ^a ± 0,0007
45	100,0 ^a ± 0,0019	98,7 ^a ± 0,0007
60	100,0 ^a ± 0,0019	98,7 ^a ± 0,0007
120	100,0 ^a ± 0,0019	98,7 ^a ± 0,0007
240	66,6 ^b ± 0,0019	58,7 ^b ± 0,0007

¹Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

As proteases são as principais classes de enzimas utilizadas na formulação de detergentes enzimáticos, seguidas das amilases. Ocorre que as proteases têm a capacidade de degradar a azocaseína e outras proteínas, podendo potencialmente causar uma diminuição na atividade de outras enzimas, que podem estar presentes na mesma formulação. Assim, para que as celulases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 possam ser empregadas como aditivos de detergentes, as mesmas devem ser resistentes à digestão por proteases.

De acordo com Caparrós et al. (2012), celulases de espécies de *Bacillus* geralmente mostram boa estabilidade com proteases, o que é interessante para aplicações em formulações de detergentes.

Bacillus sp. SMIA-2 produz proteases (Barbosa et al., 2014) e α -amilases (Cordeiro et al., 2002; Carvalho et al., 2008b) extracelulares quando cultivado em diferentes condições de cultivo utilizando resíduos industriais. De fato, dosagens de proteases e amilases nos extratos brutos utilizados neste trabalho mostraram a presença de proteases (3,04 U/mL) e amilases (0,2928 U/mL), embora suas atividades tenham sido inferiores às já relatadas para esse microrganismo. Esses

resultados eram esperados, uma vez que o meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo foi otimizado para a produção de celulases e não de proteases e amilases.

Os extratos brutos utilizados neste trabalho também apresentaram atividades enzimáticas para outros substratos como mostrado na Tabela 9. Além da avicelase e da CMCase, os extratos brutos mostraram atividade de xilanase (0,2734 U/mL) e poligalacturonase (0,2376 U/mL). Segundo Van et al., (2009), diferentes enzimas são necessárias para a degradação de substratos complexos presentes na parede celular de plantas. Alguns organismos expressam enzimas livres, enquanto outros produzem um grande complexo extracelular multienzimático.

Tabela 9 - Atividade enzimática do extrato bruto obtido após 92 dias de fermentação presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2.

Enzima	U/mL
Avicelase	1,0903 ^a ± 0,0026
Carboximetilcelulase	0,4702 ^b ± 0,0009
Amilase	0,2928 ^c ± 0,0014
Xilanase	0,2734 ^d ± 0,0026
Poligalactorunase	0,2376 ^e ± 0,0019

¹Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

Conforme já descrito anteriormente, um meio de cultura complexo foi utilizado para a obtenção dos extratos brutos. O meio continha bagaço de cana-de-açúcar como fonte de celulose, farinha da casca de maracujá como cosubstrato e a água de maceração de milho como fonte de nitrogênio. A farinha da casca de maracujá, além de conter na sua composição celulose, é rica em pectina (21,5%), triptofano, ácidos graxos e aminoácidos (Guertzenstein e Srur, 2002). A água de maceração de milho por sua vez é rica em aminoácidos, peptídeos, vitaminas, fosfato e íons metálicos (Rivas et al., 2004). O bagaço de cana contém de 32 a 44% de celulose, 27 a 32% de hemicelulose, 20 a 24% de lignina e 4,5 a 9,0% de cinzas (Socol et al., 2010). Desta forma, considerando a composição do meio de cultura utilizado para o crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 para a produção de celulases

percebe-se a importância da secreção do complexo multienzimático para a degradação de todos os nutrientes presentes no meio.

5.6. Microscopia eletrônica de varredura em culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo bagaço de cana, farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho estão mostradas nas Figuras 3 e 4. *Bacillus* sp. SMIA-2 aderiu firmemente a ambos, bagaço de cana e farinha da casca de maracujá, que é uma característica importante no processo de degradação desses substratos. Além disso, as imagens forneceram observações qualitativas da população de células. Apesar da dificuldade em diferenciar as células microbianas do bagaço de cana (Figura 3A e 3B), um substrato insolúvel, o número de células observadas neste substrato foi mais baixo comparado com a farinha da casca do maracujá (Figura 4A e 4B).

Também pode ser observado que a presença da água de maceração de milho não alterou visualmente a população de células, tanto quando adicionada ao meio contendo o bagaço de cana, como ao meio contendo a farinha da casca de maracujá. Considerando a composição similar da farinha da casca de maracujá e da água de maceração de milho em relação a proteínas e minerais, pode-se sugerir que a adição da farinha de maracujá ao meio de cultura, por si só, foi suficiente para fornecer além da fonte de carbono (pectina), quantidades suficientes de fontes de nitrogênio, capazes de promover o crescimento da bactéria. Mas, estudos devem ser aprofundados no sentido da retirada da água de maceração de milho do meio de cultura, como fonte de nitrogênio, para a produção de celulasas. 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.

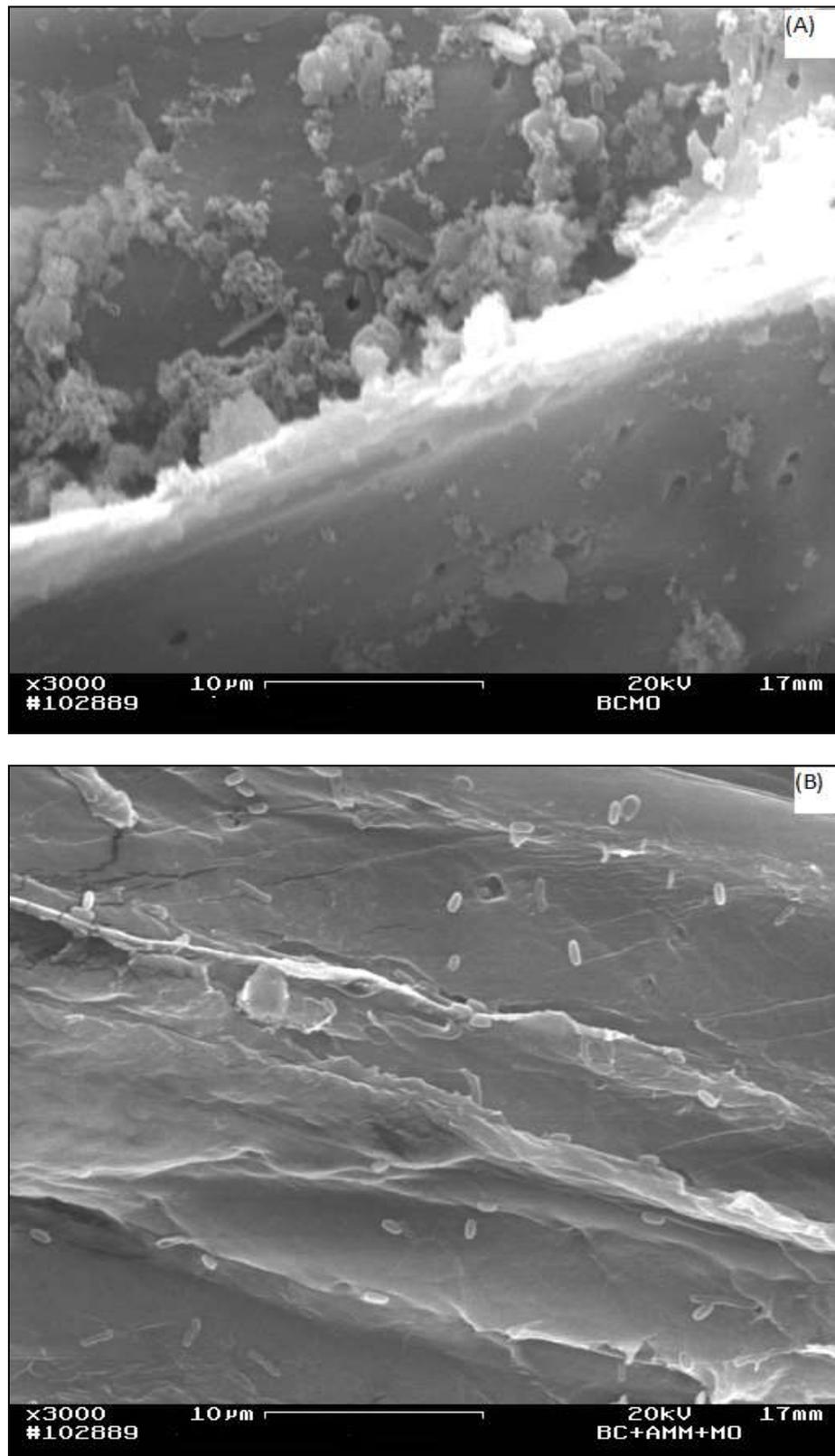


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células de *Bacillus* sp. SMIA-2. (A) Culturas contendo 0,65% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar; (B) Culturas contendo 0,65% m/m de bagaço de cana-de-açúcar e 0,65% (m/v) de água de maceração de milho a 50°C por 72 horas.

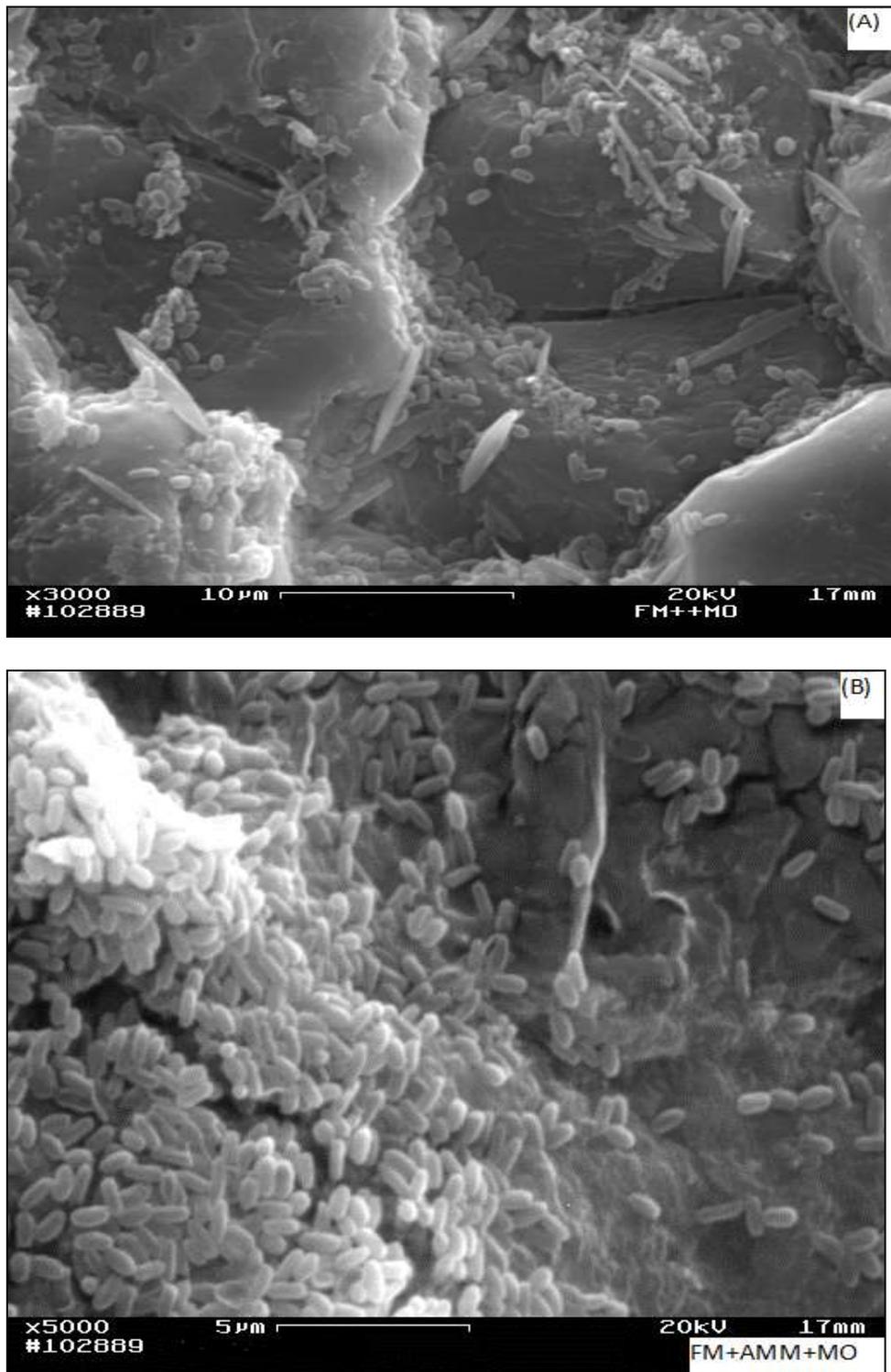


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando células de *Bacillus* sp. SMIA-2. (A) Culturas contendo 0,65% (m/v) de Farinha da casca de maracujá; (B) Culturas contendo 0,65% (m/m) de farinha da casca de maracujá e 0,65% (m/v) de água de maceração de milho a 50°C por 72 horas.

6. CONCLUSÕES

A estabilidade da avicelase e CMCase secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo o bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá, em função do tempo de estocagem a 3°C não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$), o que sugere que até 154 dias estas enzimas se mantiveram estáveis.

A atividade da avicelase e da CMCase se manteve quando extratos brutos contendo as enzimas foram incubados na presença de etilenoglicol (1M), glicerol (1%) e polietilenoglicol (0,01M) por 1 hora à temperatura ambiente. Porém, após 3 horas de incubação as enzimas apresentaram uma diminuição na sua atividade inicial para todos os aditivos utilizados.

O estudo da compatibilidade e estabilidade das celulases com detergentes comerciais mostrou que tanto a avicelase quanto a CMCase foram compatíveis e estáveis na presença dos detergentes Bem-te-vi® e Omo®.

Os íons Cobalto e Bário (1 mM) aumentaram a atividade da avicelase em 40% e 25%, respectivamente. A atividade da CMCase também aumentou em 13% e 22% quando a enzima foi incubada na presença dos íons Cobalto e Bário, respectivamente. Na presença do íon Mn^{+2} (1 mM) a CMCase aumentou em torno de 31% sua atividade inicial.

A estabilidade das celulases na presença de proteases comerciais foi estudada e foi observado que a avicelase foi estável na presença desta enzima. Todavia, a CMCase apresentou uma pequena diminuição na sua atividade quando submetida à ação da protease comercial.

Além das celulases, o extrato bruto da cultura apresentou atividades de amilases, xilanases e poligalacturonases, mostrando que estas enzimas são também importantes no processo de degradação dos subprodutos utilizados como substratos para a produção de celulases. As características apresentadas pelas celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 mostram o potencial de aplicação das enzimas em processos industriais, tais como aditivos em formulações de detergentes.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou o processo de degradação do bagaço de cana e farinha da casca de maracujá, uma característica importante de degradação desses substratos de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M.G., Ghule, J.E., Singh, R., Shaikh, H., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V., Varma, A.J. (2004) Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydr. Polym.*, 57:67-72p.
- Aguilar, A. (1996) Extremophile research in the European Union: From fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, 18: 89-92p.
- Archana, A., Satyanarayana, T. (1997) Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 12-17p.
- Assis, S.A., Oliveira, R.Q., Soaes, W.R.A., Oliveira, O.M.M.F. (2010) Estabilização de Enzimas: Uma abordagem. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 10:195-200p.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999) Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 35:213-219p.
- Banik, R. M.; Prakash, M. (2004) Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 159:135-140p.
- Bano, S., Qader, S.A.U. Aman, A., Syed, M.N., Durrani, K. (2013) High production of cellulose degrading endo-1, 4- β -d-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Carbohydrate Polymers*, 91: 300–304p.
- 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: 1–7p.
- Bourgaizeb, D., Jewell, T.R., Buiser, R.G. (2000) *Biotechnology: Demystifying the Concepts*. Benjamin/Cummings, San Francisco.

- Bummer, P.M. (2008) Chemical considerations in protein and peptide stability. 2^a ed. Norty Carolina: Pharmaceutech, 7- 42p.
- Bhat, M.K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18:355-383p.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E., Boom, R.M. (2001) Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90: 155-186p.
- Campbell, M.K., Farrell, S.O. (2007) *Bioquímica*, 5^a ed, São Paulo: Cengage Learnig, 263p.
- Caparrós, C., López, C., Torrell, M., Lant, N., Smets, J., Cavaco, P. (2012) Treatment of cotton with an alkaline *Bacillus* spp cellulose: Activity towards crystalline cellulose *Biotechnol*, 7:275-283p.
- Carneiro, A. B. (2003) Estabilização de Enzimas para Modificação de Fibras Sintéticas. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Fabricação) - Portugal, Escola de Engenharia Departamento de Engenharia Têxtil, 85p.
- Castro, A.M., Pereira, J.N. (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*. 33:181-188p.
- Castro, A. M. (2006) Produção e propriedades de celulases de fungos filamentos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Carvalho, M. L. A. (2007) Otimização da produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., 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*, 39:102-107p.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. (2002). Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*: 33:57-61p.

- Da Silva, R., Yim, D. K., Park, Y. K. (1994) Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. *Journal Fermentation and Bioengineering*, 77: 109-111p.
- Delatorre, A. B. (2010) Produção de celulases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp SMIA2. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 55p.
- Ereno, D. (2005) *Revista Pesquisa Fapesp*. Disponível em: www.revistapesquisa.fapesp.br. acessado em 26/01/2017.
- Fernandes, M. L. M., Krieger, N., Baron, A.N., Zamora, P.P., Ramos, L.P., Mitchell, D.A. (2004) Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isocooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30:43-49p.
- Ganesh, K., Joshi, J.B., Sawant, S.B. (2000) Cellulase deactivation in a stirred reactor. *Bochem.Eng.J.*, 4:137-141p.
- Gomes, M.J.P.(2013) Tópicos em Bacteriologia Veterinária. Faculdade de veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martins, N., Da Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial *Quimica. Nova*, 30:136-145p.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59:257-268p.
- 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 São Camilo*,10:213-218p.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89:17-34p.
- Hartmeier, W. (1988) Immobilized biocatalysts: an introduction. Berlin: Springer Verlag.
- Heller, M. C.; Carpenter, J. F.; Randolph, T. W. (1997) Manipulation of lyophilization-induced phase separation: implications for pharmaceutical proteins. *Biotechnology Progress*, 13:590-596p.
- Illanes, A. (2008) *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*, Chile: Springer, 398p.

- Iqbal, H. M. N.; Ahmed, I.; Zia, M. A.; Irfan, M. (2011) Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viridae* under SSF and its detergent compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2:149-156p.
- Johnvesly, B.; Naik, G.R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Proc. Biochem.*, 37:139-144p.
- 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: 66-71p.
- Kaya, F.; Heitmann, J.A.; Joyce, T.W. (1996) Deactivation of cellulase and hemicellulase in high shear fields. *Cellulose Chem Technol*, 30: 49–56p.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, Boston, 27:137-138p.
- Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Holtzapple, M.T., Falls, M., Ramirez, R.S., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E., Wyman, C.E. (2011) Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments. *Bioresource Technology*, 102:80–88p.
- Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, (2002) C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, London, 13:345- 351p.
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O. V.(2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35:377–391p.
- Kumar, C.G.; Parrack, P. (2003) Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 19:757–762p.
- 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*, 18:110–115p.

- Lee, B.H.; Kim, B.K.; Lee, Y.J.; Chung, C.H.; Lee, J.W. (2010) Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology* 46:38–42p.
- Lee, B.H., Kim, B.K., Lee, Y.J., Chung, C.H. and Lee, J.W. (2010) Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme Microbiol. Technology*, 48: 38-42p.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2011) *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 5ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 1274p.
- Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. (2001) *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Edgard Blucher Ltda. São Paulo.
- Liming, X.; Xueliang, S. (2004) High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 corn cob residue. *Bioresource Technology*, 91:259-262p.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H., Wang, D. (2012) Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15:1-7p.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van, Z.Y.L, W.H., Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews. American Society for Microbiology*, 66:506-577p.
- MacGoff, P., Scher, D. S., McNally, E.J., Hastedt, J.E. (2008) Protein Formulation and Delivery. *North Carolina*,6:133-152p.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (Eds.). (2010). *Microbiologia de Brock*. 12ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Marco, G.E. (2012) *Produção e caracterização de celulasas produzidas por um isolado de Bacillus sp.* Dissertação-Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS, 87p.
- Market Research Assistance. Disponível em: <http://www.rnrmktresearch.com/world-enzymes-to-2017-market-report.html> acesso em 08/03/17

- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. (2008) Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, 99:1417-1424p.
- Martins, L. F. (2005) Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. 2005. *Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 121p.
- 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* 82:972–978p.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem*, 3:426-428p.
- Mittidieri, S., Martinelli, A.H.S., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, 97:1217-1224p.
- Nascimento, W. C. A. (2005) Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus* sp SMIA2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais. Tese (Doutorado em produção vegetal) - Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 79p.
- Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Kumar, K., Madamwar, D., Shah, A. R. (2014) Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88:150-161p.
- Ogeda, T.L.; Petri, D.F.S. (2010) Hidrólise enzimática de biomassa. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP. *Quim. Nova*, 33:1549-1558p.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S., Chagas Júnior, A.F. (2006) Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:853-860p.
- Ohlson, I., Tragrdh, G., Hahn-Hgerdal, B. (1984) Enzymatic hydrolysis of sodium hydroxide-pretreated sawlog in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:647-653p.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R. (2000) Technological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresouce Technology*. 74:81-87p.

- Peixoto, A.B. (2006) *Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 84p.
- Phadataré, S.U., Deshpande, V.V., Srinivasan, M.C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). (1993) Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 72-76p.
- Reese, E.T., Ryu, D.Y. (1980) Shear inactivation of cellulase of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microbial Technol*, 2:239-240p.
- 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*, 97:93-98p.
- Statistical Analysis System. (2003) SAS® Institute Inc.. SAS User's Guide. Cary. USA: SAS Inst.
- Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27:185-194p.
- Santana Junior, G. L. (2001) Produção de enzimas microbianas. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 351-362p.
- Santos, T. C. S., Diniz, G. A., Santos, D. C., Santos, I. P.C., Franco, M. (2014) Produção de celulasas estáveis a temperatura e pH a partir da fermentação em estado sólido da palma In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 10., 2014. Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, 1-8p.
- Sayali, K.; Sadichha, P.; Surekha, S. (2013) Microbial Esterases: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2:135-146p.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol*, 50:1-17p.
- Shabeb, M.S.A., Younis, M.A.M., Hezayen, F.F., Nour-Eldein, M.A. (2010) Production of cellulase in low cost medium by *Bacillus Subtilis* KO strain. *World Applied Science Journal*, 8:35-42p.

- Silva, J. V. F. (2013) Produção e avaliação da estabilidade de enzimas fúngicas. Dissertação (Graduação em Farmácia Bioquímica) - Araraquara-SP, Universidade Estadual Paulista, 62p.
- Socol, 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.*, 101:4820–4825p.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271-275p.
- Tomazic, S. J. (1991). Protein Stabilization. In: *Biocatalysts for industry. Topic in Applied Chemistry*. Ed. Plenum Press, New York and London. 330p.
- Van Beilen, J. B., Li, Z. (2002) Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, London, 14:338-344p.
- Van Den Burg, B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol.* ;6:213-218p.
- Van Dyk JS, Sakka M, Sakka K, Pletschke BI. (2009) The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multienzyme complex. *Enzym Microb Technol*, 45:372–378p.
- Vitolo, M. (2001) Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. 1ª Ed. Ed. Edgard Blucher Ltda, 4:387-420p.
- Wang, F.; Podell, E.R.; Zaug, A.J.; Yang, Y.; Baciú, P.; Cech, T.R.; Lei, M. (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor, *Nature*, 445:506-510.
- Wiseman, A. (1985) *Manual de Biotecnologia de las enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.