

PRODUÇÃO DE AVICELASES PELO TERMOFÍLICO  
*Bacillus* sp. SMIA-2

**LUCIANA RIBEIRO COUTINHO DE OLIVEIRA MANSUR**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2011



PRODUÇÃO DE AVICELASES PELO TERMOFÍLICO  
*Bacillus* sp. SMIA-2

**LUCIANA RIBEIRO COUTINHO DE OLIVEIRA MANSUR**

Tese 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 Doutora em Produção Vegetal.

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 039/2011

Mansur, Luciana Ribeiro Courtinho de Oliveira

Produção de avicelases termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 / Luciana Ribeiro Courtinho de Oliveira Mansur. – 2011.  
98 f. : il.

Orientador: Meire Lelis Leal Martins

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

Bibliografia: f. 85 – 98.

1. *Bacillus* sp. SMIA-2 2. Celulases 3. Avicelases 4. Enzimas termoestáveis 5. Resíduos agroindustriais I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 660.634

PRODUÇÃO DE AVICELASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp.  
SMIA-2

**LUCIANA RIBEIRO COUTINHO DE OLIVEIRA MANSUR**

Tese 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 Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2011

Comissão Examinadora:

*R. Carvalho*

Prof<sup>a</sup>. Raquel Vieira de Carvalho (Doutora, Produção Vegetal) - UFES

*Eder Dutra Resende*

Prof. Eder Dutra Resende (Doutor, Engenharia Química) - UENF

*Silvia Menezes de Faria Pereira*

Silvia Menezes de Faria Pereira (Doutora, Engenharia e Ciências dos Materiais) - UENF

*M. Leles Martins*

Prof<sup>a</sup>. Meire Leles Leal Martins (Ph.D. Microbiologia) - UENF  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização desse curso.

A UENF pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Meire Lelis Leal Martins pela orientação, apoio, confiança e amizade.

Aos professores integrantes da banca examinadora, Eder Dutra Resende, Raquel Vieira de Carvalho e Sílvia Menezes de Faria Pereira por terem aceitado a contribuir com este trabalho.

À Ana Lúcia, técnica do Laboratório de Microbiologia Industrial de Alimentos, que me acolheu com tanto carinho e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao secretário Paulo Sérgio, pela disponibilidade, atenção e presteza em todos os momentos.

Aos colegas da pós-graduação e do Laboratório de Tecnologia de Alimentos pela amizade, troca de experiência, apoio e companheirismo.

Aos meus pais, Antônio e Aida, e a minha irmã, Juliana, pelo carinho, incentivo e por acreditarem no meu sonho.

Ao meu marido, Emil, e aos meus sogros, Elizabeth e José Ricardo, pelo apoio e incentivo.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Enzimas.....	03
2.2. Aplicações industriais das enzimas.....	06
2.3. Celulose e celulasas.....	08
2.4. Exoglicanasas (EC 3.2.1.91) OU Avicelases.....	15
2.5. Microrganismos celulolíticos.....	17
2.6. Celulasas termoestáveis .....	19
2.7. Aplicações industriais das celulasas.....	21
2.8. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas.....	27
3. TRABALHOS .....	34
3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE AVICELASES PELO TERMOFÍLICO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA.....	34
RESUMO .....	34
ABSTRACT .....	35
1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	37

2.1. Microrganismo.....	38
2.2. Manutenção do microrganismo.....	38
2.3. Meio de crescimento.....	38
2.4. Crescimento do microrganismo.....	38
2.5. Medida do crescimento.....	39
2.6. Determinação do pH.....	39
2.7. Ensaio enzimático.....	39
2.7.1. Atividade da avicelase.....	39
2.8. Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase.....	40
2.9. Efeito da concentração de avicel sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase.....	40
2.10. Efeito da concentração de água de maceração de milho sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase.....	40
2.11. Influência do pH inicial do meio e temperatura de incubação sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase.....	41
2.12. Caracterização parcial da enzima.....	41
2.12.1. Efeito do pH na atividade e na estabilidade da avicelase.....	41
2.12.2. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da avicelase.....	42
2.13. Efeito do íon cálcio na estabilidade da avicelase.....	42
2.14. Delineamento experimental.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
3.2. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CELULOSE, DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DA FONTE DE NITROGÊNIO NA SÍNTESE DE AVICELASE PELO TERMOFÍLICO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1. Microrganismo.....	62
2.2. Manutenção do microrganismo.....	63

2.3. Meio de crescimento.....	63
2.4. Crescimento do microrganismo.....	63
2.5. Medida do crescimento.....	64
2.6. Determinação do pH.....	64
2.7. Ensaio enzimático.....	64
2.7.1. Atividade da avicelase.....	64
2.8. Efeito de diferentes fontes de celulose no <i>crescimento de Bacillus sp. SMIA-2 e na atividade de avicelase</i> .....	65
2.9. Efeito da glicose na síntese da avicelase.....	65
2.10. Efeito das diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de <i>Bacillus sp. SMIA-2 e na atividade de avicelase</i> .....	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4. CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação da molécula de celulose: estrutura convencional com destaque para as posições das ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  (Peixoto, 2006).....09

**Figura 2.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (Castro e Pereira, 2010).....11

### 3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE AVICELASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2 E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

**Figura 1.** Crescimento, pH e atividade de avicelase em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp. SMIA-2 em avicel (0,5% p/v) e água de maceração de milho (0,5% p/v) com pH inicial de 7,5 a 50 °C e 150 rpm.....44

**Figura 2.** Crescimento (a) de *Bacillus* sp. e atividade (b) da avicelase usando diferentes fontes de carbono. A densidade ótica da cultura e a atividade da avicelase foram determinadas com 120 h de incubação a 50 °C e em pH inicial 7,5. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade .....45

**Figura 3.** Efeito da concentração de celulose (a) e da concentração da água de maceração de milho (b) sobre o crescimento (●), o pH (■) do meio e da atividade (■) da avicelase de *Bacillus* sp SMIA-2, que foram cultivados em meio líquido em frascos agitados em pH inicial de 7,5 e 50 °C por 120h. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.....47

**Figura 4.** Efeito da concentração de celulose (a) e da concentração da água de maceração de milho (b) sobre o crescimento (●), o pH (■) do meio e da atividade (■) da avicelase de *Bacillus* sp SMIA-2, que foram cultivados em meio líquido em frascos agitados em pH inicial de 7,5 e 50 °C por 120h. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.....48

**Figura 5.** Efeito do pH inicial do meio (a) e da temperatura de incubação (b) sobre o crescimento (●), o pH (■) do meio e da atividade (■) da avicelase de *Bacillus* sp, que foram cultivados por 120 horas em frascos agitados contendo meio de crescimento. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade .....49

**Figura 6.** pH ótimo (■) e estabilidade (●) da avicelase produzida por *Bacillus* sp, cultivado a 50 °C por 120 horas em frascos agitados contendo meio de crescimento. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do valor máximo (100% da atividade da enzima U / mL= 89,95).....50

**Figura 7.** Temperatura ótima (a) e a estabilidade (b), da avicelase produzida por *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado a 50 °C por 120 h (100% da atividade da enzima 95,39 = U / mL).....52

**Figura 8.** Estabilidade da avicelase produzida por *Bacillus* sp SMIA-2 a 70 °C (a) e a 80 °C (b), na presença (■) e ausência (●) de cálcio (10mM), cultivado a 50 °C for 120h (100% da atividade enzimática = 98,97 U/mL).....54

### 3.2. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CELULOSE, DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DA FONTE DE NITROGÊNIO NA SÍNTESE DE AVICELASE PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2

**Figura 1.** Crescimento (■), pH (●) do meio e atividade de avicelase (■) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) de avicel a 50 °C. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ..... 67

**Figura 2.** Crescimento (■), pH (●) do meio e atividade de avicelase (■) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) carboximetilcelulose a 50 °C. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade..... 68

**Figura 3.** Crescimento (■), pH (●) do meio e atividade de avicelase (■) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) de avicel (a), carboximetilcelulose (b) e xilana (c) a 50 °C. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.. 69

**Figura 4.** Crescimento (a) e atividade de avicelase (b) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) de avicel e/ou 0,5% (p/v) de glicose a 50 °C. A glicose foi adicionada após 72h de incubação (■)..... 71

**Figura 5.** Efeito da concentração do bagaço de cana não tratado no crescimento (■) e na atividade da avicelase (■) de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 120 horas de incubação a 50 °C e pH inicial de 7,5. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.. 75

**Figura 6.** Efeito da concentração do bagaço de cana tratado com  $\text{Ca(OH)}_2$  no crescimento (■) e na atividade da avicelase (■) de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 120 horas de incubação a 50 °C e pH inicial de 7,5. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade..76

**Figura 7:** Crescimento (■), pH (▼) e atividade da avicelase (●) secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio mineral contendo 0,5% (p/v) de BCT por 192 horas a 50° C.....77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais utilizações industriais de enzimas .....	07
<b>Tabela 2.</b> Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais .....	21
<b>Tabela 3.</b> Características das celulasas em diferentes indústrias .....	26
<b>Tabela 4.</b> Composição (%) de alguns resíduos agroindustriais .....	30

### 3.2. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CELULOSE, DO BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR E DA FONTE DE NITROGÊNIO NA SÍNTESE DE AVICELASE PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2

<b>Tabela 1.</b> Atividade da avicelase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 cultivado a 50 °C por 120 horas em diferentes fontes de celulose e nitrogênio. Colunas de mesma legenda seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade .....	73
<b>Tabela 2.</b> Densidade ótica e pH da cultura de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 cultivado a 50 °C por 120 horas em diferentes fontes de celulose e nitrogênio. Colunas de mesma legenda seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade .....	74

## RESUMO

MANSUR, Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira; DSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2011; Produção de avicelases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2; Professora orientadora: Meire Lélis Leal Martins.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, com o objetivo de estudar a secreção de avicelase por um microrganismo termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2, em um meio de cultura constituído de celulose e água de maceração de milho.

O primeiro trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a produção de avicelase pelo termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2 quando cultivado num meio de cultura constituído de celulose microcristalina (0,5%, p/v) como principal fonte de carbono e suplementado com água de maceração de milho (0,5% p/v). O estudo do perfil da síntese da avicelase com o tempo de fermentação revelou que a atividade máxima da enzima foi alcançada 120 horas após a inoculação do microrganismo com níveis de 85,64 U/mL.

A concentração da celulose que proporcionou melhor atividade da avicelase foi 0,5% (p/v). Em concentrações maiores que 0,5% a atividade da enzima foi comparativamente mais baixa. Em relação à concentração da água de maceração de milho no meio de cultura foi encontrado que a atividade da enzima aumentou nas concentrações de 0,4% e 0,5% (p/v) e decresceu acima deste ponto.

Estudos sobre a caracterização da avicelase revelaram que a enzima mostrou uma atividade crescente entre 40 °C e 70 °C, onde a atividade atingiu o seu valor máximo. Acima de 70 °C ocorreu uma redução na atividade da enzima e a 80 °C e 90 °C a avicelase perdeu cerca de 28% e 72% de sua atividade, respectivamente. Quanto à estabilidade térmica da avicelase foi observado que esta enzima reduziu sua estabilidade em temperaturas maiores que 70 °C. O cálcio aumentou a estabilidade da enzima em ambas as temperaturas estudadas (70 e 80 °C), sendo este aumento mais pronunciado para a temperatura de 70 °C. A atividade da avicelase após 20 minutos de incubação a 70 °C e a 80 °C na presença do cálcio foi 34% e 13% maior que na ausência deste íon, respectivamente.

O pH ótimo da enzima foi 8,5. Em valores de pH maiores que 8,5 a atividade da enzima decresceu. A atividade da enzima a pH 9,5 foi reduzida em 42%. Após a incubação do extrato enzimático a temperatura ambiente por 2 h a pH 6,0-9,0, foi observado um decréscimo de entorno 13% de sua atividade original a pH 9,0.

A produção de Avicelase (EC 3.2.1.74.) pelo termofílico *Bacillus* sp. cepa SMIA-2 cultivado em meios líquidos contendo avicel como principal fonte de carbono e suplementado com água de maceração de milho atingiu um máximo com 120 h de fermentação, apresentando níveis de 94,67 U / mL. A influência de diferentes fontes de celulose sobre a atividade enzimática foi investigada substituindo o avicel do meio por carboximetilcelulose, xilana e bagaço de cana. Verificou-se que carboximetilcelulose e xilana foram bons indutores para a síntese de avicelase, uma vez que altos níveis de atividade dessa enzima foram obtidos. Foram realizados estudos sobre a produção de enzima avicelase por *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando bagaço de cana em dois estados diferentes (tratado e não tratado com Ca (OH)<sub>2</sub> a 50 °C. De acordo com os resultados obtidos a atividade máxima da enzima foi exibida com bagaço de cana tratado em comparação com os resultados obtidos a partir de bagaço de cana não tratado. Assim, o bagaço de cana tratado, utilizado como fonte de carbono, aumentou a produção da avicelase pelo *Bacillus* sp SMIA-2. Dentre as fontes nitrogenadas utilizadas, a atividade enzimática máxima foi obtida quando foi utilizado Peptona 0,5% (p / v) no meio.

## ABSTRACT

MANSUR, Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February de 2011; Avicelase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2; Professora orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

The present work was carried out at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos of the Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ with the objective of study the secretion of avicelase by thermophilic bacterium, *Bacillus* sp. SMIA-2, when growth in a medium containing cellulose and corn steep liquor.

The objective of optimized the production of avicelase by thermophilic bacterium, *Bacillus* sp. SMIA-2, when growth in a medium containing microcrystalline cellulose (0.5%, w/w) as a main carbon source and supplemented with corn steep liquor (0.5%, w/v). Studies on the profile of synthesis of avicelase with the time revealed that the enzyme reached maximum activity after 120 hours of growth with levels of 85,64 U/mL.

The microcrystalline cellulose concentration which provided better activity of the protease was 0.5% (w/v). At higher cellulose concentrations, enzyme production was comparatively lower. Regarding the corn steep liquor concentration in the medium it was found that the activity of the enzyme increased between 0.1% and 0.5% corn steep liquor concentration and then fell beyond this point.

Studies on the avicelase characterization revealed that the enzyme increased the activity at temperatures between 40 °C and 70 °C, where the activity reached its maximum. Above 70 °C occurred a reduction in the activity of the enzyme and at 80 °C and 90 °C the avicelase lost about 28% and 72% of its activity, respectively. Regarding the thermal stability of protease was observed that this enzyme reduced its stability at temperatures higher than 70 °C.

The optimum pH of protease was found to be 8.5. At values of pH higher than 8.5 the activity of the enzyme decreased and at pH 9.5 the activity was reduced in 42%. After incubation of crude enzyme solution at room temperature for 2 h at pH 6.5-9.0, a decreased of about 20% of its original activity at pH 9.0 was observed.

Avicelase (EC 3.2.1.74) production by thermophilic *Bacillus* sp strain SMIA-2 cultivated in liquid media containing avicel as main carbon source and supplemented with corn steep liquor reached a maximum at 120 h, with levels of 94,67 U/mL. The influence of the different cellulose sources on enzyme activity was investigated replacing the avicel in the medium by carboxymethylcellulose, xylan and sugarcane bagasse. It was found that carboxymethylcellulose and xylan were good inductor of the synthesis of avicelase, since higher levels of activity of this enzyme were obtained. Studies were carried out on the comparative study of the production of avicelase enzyme using sugarcane bagasse in two different statuses (i.e. treated and untreated with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  by thermophilic *Bacillus* sp SMIA-2 at 50°C. According to the results obtained the maximal enzyme activity was exhibited with treated sugarcane bagasse (TSCB) in comparison with the results obtained from untreated sugarcane bagasse (NTSCB). So, the TSCB was enhancing the Avicelase production. Among the various nitrogen sources used, the maximum enzyme activity was obtained when 0,5% (p/v) peptone was used in the medium.

## 1. INTRODUÇÃO

A celulose é um polímero linear formado por subunidades de glicose, unidas por ligações  $\beta$ -1-4 e cada resíduo de glicose é rotacionado  $180^\circ$  em relação ao resíduo vizinho. Durante a biossíntese de celulose, as cadeias individuais de glicose são unidas por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares e força de van der Waals, o que lhes confere uma forma rígida com microfibrilas insolúveis. As cadeias de microfibrilas são orientadas em paralelo com uma extremidade redutora e outra não redutora. Esta estrutura resulta em regiões altamente ordenadas e cristalinas intercaladas por regiões amorfas. A celulose tem função estritamente estrutural e é o principal componente da parede primária das plantas (Béguin e Aubert, 1990; Schwarz, 2001; Mansfield e Meder, 2000).

As celulasas constituem um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis. A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, divide-se em três grandes grupos: as endoglicanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglicanases, que atuam na região externa da celulose; e as  $\beta$ -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (Lynd et al., 2002). As celulasas possuem uma ampla faixa de aplicação. A utilização das celulasas e hemicelulasas teve seu uso mais intenso nos primeiros anos da década de 80, primeiro na indústria de alimentação animal, seguido na aplicação na indústria de alimentos. Subseqüentemente, essas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e de detergentes. O grupo de enzimas formado por celulasas, pectinases e

hemicelulases, é responsável por aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas (Bhat, 2000).

As celulasas termoestáveis são consideradas ideais para aplicações biotecnológicas. Na conversão da celulose do bagaço, por exemplo, geralmente se utiliza temperaturas entre 45 e 70 °C. Para a degradação de celulose cristalina, que é insolúvel em água devido à sua estrutura altamente compacta, é interessante a utilização de celulasas termoestáveis ativas a altas temperaturas (Haki & Rakshit, 2003).

Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzir uma variedade de enzimas extracelulares importantes tais como amilases, proteases, pectinases e celulasas. Estas bactérias são capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Wang et al., 2007). A maior parte das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. apresenta uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas e são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Além disso, 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) (Mahmood et al., 1998).

*Bacillus* sp SMIA-2, uma bactéria termofílica isolada de amostras provenientes do solo do município de Campos dos Goytacazes (Sousa e Martins, 2001), foi capaz de secretar amilases, proteases e pectinases. Este trabalho, investigou a produção de avicelase pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Enzimas

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, isto é, exercem a função de acelerar ou mesmo possibilitar reações entre componentes químicos. Presentes em todos os sistemas biológicos, elas são produzidas por todos os organismos vivos e têm a capacidade de atuar fora do meio celular. Constituem o principal alvo da pesquisa em Biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (Do Canto e Menezes, 1995).

As enzimas, também denominadas de biocatalisadores, possuem características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade, sendo inclusive capazes de catalisar reações estereoespecíficas. Este potencial catalítico é utilizado industrialmente não só nos clássicos processos fermentativos, mas também em processos de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância na indústria farmacêutica (Madigan et al., 1996).

As enzimas têm sido utilizadas pelo homem há vários séculos. O emprego dessas substâncias começou bem antes de se conhecer a sua natureza e propriedades. Em 1783, Spallanzani observou, pela primeira vez, a reação de degradação enzimática da carne pelo suco gástrico. A denominação “enzima” foi utilizada pela primeira vez por Kühne, em 1878. Naquela época acreditava-se que

as enzimas só eram ativas em células vivas, conceito que perdurou até 1878, quando Büchner observou que o extrato obtido por prensagem de células de leveduras ainda possuía a propriedade de fermentar sacarose. Foi a partir das primeiras décadas do século XX que o desenvolvimento da tecnologia de enzimas se intensificou. A descoberta de novas enzimas integrantes das vias metabólicas, o aumento do conhecimento das propriedades das enzimas e a constatação de que quase todas as enzimas de interesse industrial podem ser produzidas por microrganismos, foram alguns dos fatores responsáveis para a evolução da tecnologia enzimática (Coelho et al., 2008).

As enzimas podem ser classificadas quanto à (ao) (Coelho, 2008):

1 – Forma de uso: as preparações enzimáticas podem ser divididas, quanto à sua forma de uso, em três grupos. Os dois primeiros grupos têm como semelhança o fato das preparações participarem do processo produtivo; são insumos. A diferença reside na modificação que será catalisada.

1° Grupo - A enzima catalisa a reação principal, ou seja:

Matéria-prima → enzima → Produtos.

2° Grupo - As enzimas são importantes em reações que complementam as devidas características do produto (reações laterais).

3° Grupo – A enzima é o produto, sendo vendida normalmente, combinada a outros componentes. Não é ativada no processo produtivo.

2 – Origem: as enzimas, quanto à sua origem, podem ser intracelulares, sendo produzidas dentro da célula, necessitando de uma etapa de rompimento celular para serem liberadas; ou extracelulares, quando são produzidas e secretadas para o meio externo à célula.

3 – Modo de ação: quanto ao modo de ação, as enzimas podem ser classificadas como endoenzimas ou exoenzimas. As endoenzimas atuam clivando aleatoriamente as ligações químicas das regiões internas da molécula ou polímero alvo. Já as exoenzimas atuam clivando as ligações químicas das extremidades da molécula ou polímero alvo, gerando dímeros ou trímeros.

4 – Reação química catalisada: a Comissão de Enzimas (E.C.) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) estabeleceu, em 1961, as normas de classificação e nomenclatura de enzimas e coenzimas, com suas

unidades de atividades e métodos padrões de análise, junto com símbolos usados na descrição da cinética enzimática. As enzimas foram, então, classificadas em (Do Canto e Menezes, 1995):

- Oxidoredutases: são enzimas que oxidam ou reduzem substratos pela transferência de hidrogênio ou elétrons, ou pelo uso de grupos aceptores, como oxigênio, NAD<sup>+</sup> e citocromo. No processo biológico estão relacionadas à respiração e fermentação; que usam como agente oxidante o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o oxigênio (O<sub>2</sub>) ou grupos hidroxilas (OH).

- Transferases: são as que fazem reações de transferência de grupamento.

- Hidrolases: que fazem hidrólises (transferências de grupamento por água).

- Liasas: removem o grupamento formando dupla ligação ou adição à dupla ligação.

- Isomerasas: transformações de isômeros entre si, cis e trans.

- Ligases: ligação de dois substratos a custo de hidrólise de ATP ou outro NTP.

As enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase, celulase, pectinase, oxidoredutase), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidoredutase), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidoredutase), de papel (lipase, oxidoredutase, xilanase), e de couro (lipase, protease) (Kirk et al., 2002; Nielsen e Oxenboll, 1998).

As enzimas podem ser secretadas por reações de dentro (intracelulares) ou de fora das células (extracelulares), sendo que as de natureza extracelular existem em maior quantidade (Bourgaize et al., 2000). As enzimas intracelulares que são secretadas dentro das células e permanecem no citoplasma, são utilizadas quando não há outra forma de síntese, principalmente quando se necessita de replicação do DNA. Porém, as mais utilizadas industrialmente são as extracelulares, que são secretadas no ribossomo próximo à membrana celular e transferidas para fora. Assim, são retiradas do meio do cultivo, tendo como principal vantagem a de não haver risco de contaminação por outras moléculas (Kohan, 2009).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas. Apesar disso, enzimas com o mesmo perfil de atuação sobre o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a triagem de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, torna possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (Oliveira et al., 2006).

Depois dos antibióticos, as enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana. Inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos, utilizam a tecnologia das enzimas em várias de suas etapas (Pandey et al., 1999).

O maior empecilho ao uso de enzimas em processos industriais está relacionado ao alto custo deste catalisador (Gandhi, 1997). Apesar do alto custo das enzimas, elas possuem vantagens em diversos campos (Van Beilen e Li, 2002).

## **2.2. Alicações industriais das enzimas**

O desenvolvimento da tecnologia enzimática reveste-se no Brasil de importância singular devido à sua disponibilidade única de recursos renováveis em quantidade e variedade e à necessidade vital da preservação ambiental e da qualidade da água. No entanto, o uso de enzimas industriais no país é ainda pequeno. Estima-se que o mercado mundial de biocatalisadores seja superior a 4 bilhões de dólares, enquanto o mercado brasileiro está em torno de 200 milhões, prevalecendo as importações (Enzitec, 2010).

Diversas aplicações têm sido atribuídas às enzimas, tais como: enzima como fitoterápicos, que agem em seus alvos com grande afinidade e especificidade (Vellard, 2003); na agricultura, a medida específica da atividade de proteases, lipases e esterases (atividade hidrolítica) serve como parâmetro

adequado da qualidade do solo (Barak e Chet, 1986; Ghini et al., 1998); enzimas associadas ou livres podem se comportar como poderosos catalisadores na biodegradação de poluentes prejudiciais (Gianfreda e Rao, 2004).

O mercado se encontra dividido em três segmentos, o de enzimas técnicas (constituído pelas indústrias de detergente, amido, têxtil, álcool combustível, polpa de papel e celulose e couro), alimentação e bebidas e alimentação animal (Kirk, et al., 2002; Mussatto et al., 2007).

Dentre as enzimas mais utilizadas estão as proteases, utilizadas na indústria de detergentes, processamento de carne e soja e tratamento do couro (Cherry e Fidantsef, 2003). As lipases utilizadas como catalisadores na produção de biodiesel e para aumentar o poder de limpeza em detergentes (Hasan et al., 2006). As amilases utilizadas também na formulação de detergentes, no processo de panificação e na fermentação da cerveja (Mitidieri et al., 2006). As pectinases utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas (Jayani et al., 2005). A tabela 1 mostra as principais utilizações industriais de enzimas.

**Tabela 1.** Principais utilizações industriais de enzimas

Indústria	Consumo em %
Detergentes	40-45
Processamento de amido	20-25
Laticínios	12-15
Cervejarias	2-4
Suco de frutas e vinho	3-5
Panificação	1-2
Têxtil e papel	4-6
Couro	1-2
Outras	6-10

Fonte: Lima et al., 2001.

A variedade de enzimas microbianas e seus ramos de aplicação somada com a necessidade de utilização de processos industriais menos agressivos para o meio ambiente, justificam a pesquisa e produção de enzimas (Mussatto et al., 2007).

Nas indústrias de papel e celulose, xilanase é a hemicelulase que tem maior importância. Esta enzima pode atuar no processo de branqueamento do papel auxiliando no desligamento da lignina da fibra. Isso faz com que o material fique mais suscetível ao tratamento químico, diminuindo assim, a utilização de cloro durante o tratamento. Estudos apontam que a utilização de extratos contendo atividade de mananase juntamente com a de xilanase é mais eficiente para o branqueamento do papel (Bhat, 2000). Devido ao pH alcalino e às altas temperaturas (55 - 70 °C) aos quais a polpa é submetida, é necessário que as enzimas utilizadas neste processo sejam resistentes em tais condições (Collins, et al., 2005).

Hemicelulases podem ser utilizadas também no processo de polpação biomecânica, onde as lascas de madeira são tratadas enzimaticamente e a polpação mecânica subsequente resulta na utilização reduzida de energia, resistência melhorada, e tempo de cozimento reduzido (Bhat, 2000).

### **2.3. Celulose e celulasas**

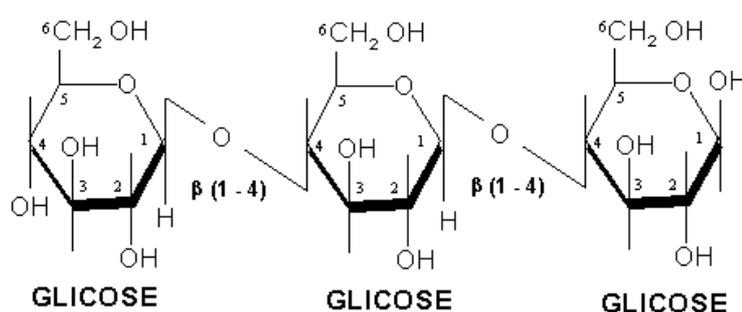
Na natureza a celulose não ocorre na forma pura. Em qualquer fonte natural, mesmo as fibras de algodão que são a forma mais pura de celulose prontamente disponível, contêm cerca de 10% de materiais não celulósicos, proteínas e elementos minerais. Este polímero encontra-se associado com uma variedade de outros polissacarídeos como amido, pectina, lignina e hemicelulose (Bisaria e Ghose, 1981).

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero renovável mais abundante do mundo. Como a amilose e as cadeias principais da amilopectina e do glicogênio, a molécula de celulose é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose. Todavia, há uma diferença significativa na molécula de celulose, que tem a configuração  $\beta$ , enquanto na amilose, na amilopectina e no glicogênio a glicose está disposta na configuração  $\alpha$ . Os polímeros de  $\beta$ -D-glicose, como a celulose, podem ser representados por uma série de anéis piranosídicos rígidos conectados por um átomo de oxigênio que faz ponte entre dois átomos de carbono (ligação glicosídica). Existe rotação livre para a ligação C-O que liga as duas unidades. A conformação mais estável para o polímero é aquela na qual a “cadeia” é rodada 180° em relação às

subunidades vizinhas, formando uma cadeia reta e estendida. Com várias cadeias estendidas lado a lado, uma rede estabilizadora de ligações de hidrogênio inter e intracadeias produz fibras supramoleculares retas, estáveis e de grande resistência à tensão (Abraão, 2006).

Na celulose sólida, regiões cristalinas se alternam com regiões amorfas. A celulose possui polimorfismo, ou seja, dependendo da origem ou das condições de isolamento ou conversão, a molécula pode adquirir uma conformação de cristais reticulados. A estrutura básica elementar das fibras de celulose é denominada fibrila elementar. A reatividade química da celulose é determinada em grande parte pela estrutura molecular em estado sólido. Muitas das reações naturais que ocorrem com a celulose são heterogêneas. Algumas reações se iniciam a partir das fibras menos ordenadas na superfície das fibrilas elementares ou de suas agregações (Peixoto, 2006). A figura 1 ilustra a estrutura convencional da molécula de celulose.

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulase. A maioria dos estudos do complexo celulase refere-se a enzimas microbianas devido ao potencial de converter material celulósico insolúvel em glicose (Peixoto, 2006).



**Figura 1.** Representação da molécula de celulose: estrutura convencional com destaque para as posições das ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  (Peixoto, 2006).

O grau de cristalinidade depende da origem e do pré-tratamento e pode variar de 0% (amorfa) até próximo de 100%. O grau de cristalinidade da maioria

das celuloses comerciais varia de 30 – 70%. A celulose pura é comercialmente disponível em várias formas (algodão, papel-filtro, avicel). Estas celuloses são geralmente empregadas para avaliar os sistemas de celulases, mas não são adequadas para os estudos de componentes celulolíticos individuais, que são fracamente ativos nestes substratos. As formas amorfas e solúveis são freqüentemente empregadas por sua rápida taxa de hidrólise, como a carboximetilcelulose (CMC) e a hidroximetilcelulose (Bisaria e Ghose, 1981; Béguin e Aubert, 1990). A diversidade e a heterogeneidade de substratos de celulose contribuem para fomentar a ampliação de estudos enzimológicos (Rabinovich et al., 2002a).

A celulose é o composto orgânico mais abundante da Terra e a maior parte utilizada na indústria provém da madeira (40% a 50% de celulose) e das fibras de algodão (98% de celulose) (Medve, 1997). É o principal elemento estrutural da parede celular das plantas superiores e ocorre em forte associação com os outros dois principais componentes da parede celular, a hemicelulose e a lignina. Essa forte associação faz com que sejam limitadas as aplicações de materiais lignocelulósicos como fonte renovável para a produção de biomoléculas e produtos químicos (Ramos, 2003).

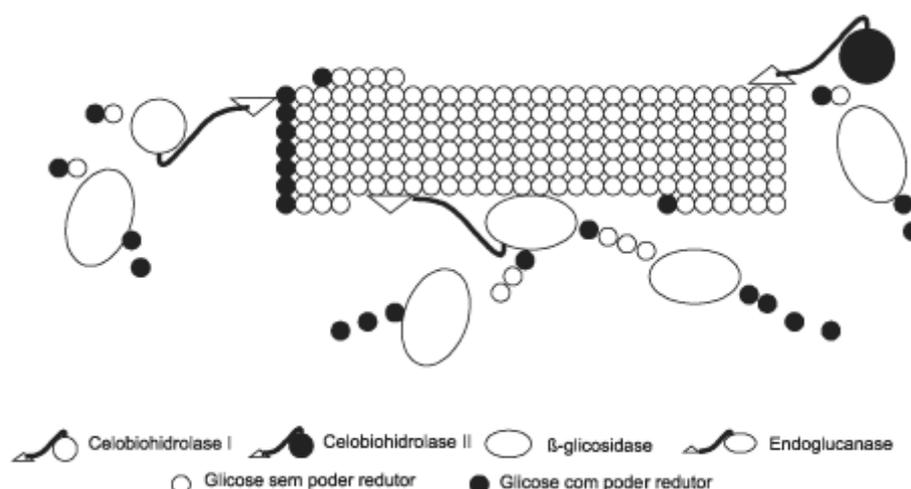
A bioconversão de resíduos de celulose até glicose é catalisada por um grupo de enzimas denominadas celulases. Este processo é de crucial importância para a reciclagem de nutrientes, uma vez que a celulose representa cerca de 40% do material de origem vegetal. Para que ocorra a hidrólise enzimática da celulose é necessário que ocorra a adsorção da enzima ao substrato, com a formação de um complexo - enzima e celulose. A adsorção das celulases sobre o substrato promove, não somente um contato físico entre estes componentes, mas em muitos casos pode desempenhar um importante papel na eficiência da hidrólise de celulose (Klyosov, 1990).

A conversão enzimática da celulose em glicose é uma árdua tarefa, devido à natureza física do substrato. Na sua forma nativa, a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Adicionalmente, as fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz a acessibilidade às enzimas

celulolíticas (Béguin, 1997). As celulasas são algumas vezes descritas como um grupo complexo de enzimas com ação sinérgica.

A classificação das hidrolases *O*-glicosídicas (EC. 3.2.1), conforme a nomenclatura enzimática clássica é feita com base na seqüência de aminoácidos, nas propriedades estruturais e sua especificidade (Gilkes et al., 1991). As celulasas apresentam diferentes especificidades para hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4 na celulose sendo, assim, divididas em três classes (Dillon, 2004): endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidasas.

A figura 2 ilustra a ação sinérgica entre exoglicanases, endoglicanase e  $\beta$ -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.



**Figura 2.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (Castro e Pereira, 2010).

As endoglicanases (EC 3.2.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas da celulose, atuando aleatoriamente sobre regiões amorfas e sobre substratos solúveis de celulose, liberando celoligosacarídeos. A degradação da celulose insolúvel ou microcristalina até celulose solúvel ainda é pouco entendida. Considera-se que a endo- $\beta$ (1-4) glicanase modifica a parte amorfa da celulose e produz celodextrinas de variadas massas moleculares. Ocorre redução rápida da viscosidade e aumento do poder redutor.

As exoglicanases (EC 3.2.1.91), conhecidas também como celobiohidrolases,  $\beta$ -1,4-celobiohidrolases ou avicelases hidrolisam as ligações glicosídicas da celulose a partir das extremidades redutora e não redutora, liberando celobiose. Elas atuam sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização.

A completa hidrólise é realizada pela ação das  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21), conhecidas também como celobiasas, que convertem celobiose em glicose e catalisam a hidrólise de resíduos de  $\beta$ -D-glicose terminais não redutores liberando  $\beta$ -D-glicose (Gilkes et al., 1991; Perez - Pons, 1995; Bhat e Bhat, 1997; Cao e Tan, 2002; Lynd et al., 2002; Howard et al., 2003). Elas não são consideradas celulases legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose pela remoção da celobiose do meio reacional (Medve, 1997).

A ação sinérgica dos componentes individuais do sistema de celulases, especialmente endo e exoglicanases sobre a celulose insolúvel tem sido relatada por diversos trabalhos (Béguin e Aubert, 1990; Bhat e Bhat, 1997; Mansfield e Meder, 2000). Endoglicanases e celobiohidrolases podem causar dispersão da celulose, seja por ação hidrolítica ou mecânica. A ação de dois ou mais componentes celulolíticos individuais é maior do que a soma de cada ação individual. Embora estas ações aumentem a taxa de hidrólise dos substratos, a complexibilidade para estudos de mecanismos de ação torna-se dificultada, pois o efeito sinérgico varia em relação às múltiplas formas dos componentes celulolíticos (diferentes celulases e isoformas), as fontes de celulases e as amostras de celulose (Klyosov, 1990).

O grupo das exoglicanases (ExG) é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucanohidrolase (GH). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- $\beta$ -D-glucana-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (Lynd et al., 2002).

As enzimas endoglicanase e celobiohidrolase mostram diferentes tipos de sinergia na hidrólise da celulose cristalina (Henrissat et al., 1985). A ação sinérgica entre GH e CBH na degradação da celulose cristalina foi demonstrada (Creuzet et al., 1993).

A ação da celulase em determinado substrato depende, preponderantemente, da origem do substrato e da composição ou, ainda, de pré-tratamentos químicos ou físicos em ação sinérgica com outras classes de enzimas como xilanasas, pectinasas, peroxidases, lactases, fenoloxidasas, dentre outros. A celulose nativa é mais facilmente hidrolisada pela ação combinada de endo e exo- $\beta$  (1-4) glicanasas que pela ação individual dessas enzimas. Bactérias são reconhecidamente produtores de endoglicanasas intra e extracelulares, enquanto fungos produzem endoglicanasas predominantemente extracelulares (Peixoto, 2006).

As celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (Kubicek et al., 1993). A produção de celulases por microrganismos é dependente do controle de regulação por mecanismos genéticos e bioquímicos. Os açúcares agiriam como verdadeiros indutores, direta ou indiretamente, influenciando a ligação de proteínas ao DNA, promovendo, assim, a expressão dos genes para celulases. A presença de substratos facilmente assimiláveis, a repressão do catabólito, o acúmulo do produto final ou fontes de carbono restritas podem inibir a síntese destas enzimas (Ilmén et al., 1997).

Segundo Béguin e Aubert (1990), na maioria dos organismos, a produção de celulase é reprimida na presença de altas concentrações de fonte de carbono prontamente metabolizáveis. Adicionalmente, em diversos sistemas, a síntese de celulase é regulada por celobiose, que é gerada a partir da degradação da celulose por pequenas quantidades de celulases constitutivas.

Embora as enzimas celulolíticas possuam especificidades para ligações  $\beta$ -1,4, celulases isoladas de várias fontes, bem como de um mesmo microrganismo, apresentam importantes diferenças funcionais em seu modo de ação, em relação ao substrato (grau de pureza, cristalinidade, tamanho das partículas), quanto às suas características moleculares (massa molecular, composição e seqüência de aminoácidos, ponto isoelétrico) na adsorvidade sobre celulose, em sua atividade catalítica e especificidade ao substrato (Klyosov, 1990; Mansfield e Meder, 2000).

As duas principais estratégias para a produção de celulases por microrganismos são: a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação

submersa (FS). Indubitavelmente, um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional. Na FES há ausência ou quase ausência de água livre (Pandey, 2003; Raghavarao et al., 2003). A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30-85% e a atividade de água típica vai de 40-90%, mimetizando condições encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é pouco provável (Robinson, 2003).

De forma geral, na maior parte dos trabalhos reportados na literatura, os materiais utilizados para a produção de celulases são de origem lignocelulósica ou celulósica pura. Entretanto, o efeito indutor de espécies de menores massas moleculares tem sido rastreado há muito tempo. Mandels e colaboradores compararam o efeito de diversos oligo e polissacarídeos na indução de celulases de *T. viride*, expressas por suas atividades em carboximetilcelulose, obtendo como os de maior potencial: lactose, glucana de cevada, e principalmente sofrose, que apresentou um poder indutor cerca de 2500 vezes maior que o observado anteriormente utilizando-se celobiose (Mandels, 1962).

Segundo Lynd et al. (2002), a natureza insolúvel e recalcitrante da celulose representa um desafio aos sistemas de celulases. Um aspecto geral de várias celulases é a estrutura modular que inclui freqüentemente domínios catalíticos e módulos de ligação a carboidratos (CBM). O CBM se liga à superfície do carboidrato para facilitar a sua hidrólise, colocando o domínio catalítico em íntima associação com o substrato. De acordo com Stahlberg et al. (1991), a presença de CBMs é particularmente importante para dar início e continuidade à atividade de exoglucanases. Além do modelo original de degradação da celulose sugerido por Reese et al. (1950), uma função adicional não catalítica do CBM foi proposta por Cysneiros (2009): o desprendimento de fragmentos das superfícies de celulose, aumentando a hidrólise do carboidrato.

O sistema de enzimas celulolíticas é o somatório de atividades de enzimas individuais, fenômeno conhecido como sinergismo. São relatadas quatro formas de ação sinérgica: endo-exo, que ocorre entre endo e exoglucanases; exoexo, atividades de exoglucanases que atuam na porção redutora e não redutora da

cadeia de celulose; exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases que removem celobiose e celodextrinas e sinergismo intramolecular entre domínios catalíticos e CBMs (Teeri, 1997).

Lynd et al. (2002) relataram que os sistemas de celulases são conjunto de enzimas, representado por endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidase, com ou sem CBMs, que hidrolisam de maneira coordenada e eficiente a celulose. Os fungos filamentosos celulolíticos são hábeis em penetrar substratos celulósicos por meio de extensões das hifas, colocando freqüentemente seus sistemas de celulases em regiões restritas da celulose. As celulases livres, com ou sem CBMs, podem clivar a celulose sob essas condições. Nesses sistemas, as enzimas não formam um complexo estável de alto peso molecular e são designadas de sistemas não complexados. Em oposição, as bactérias anaeróbicas não penetram de forma efetiva o polímero e por isso, na presença de microrganismos competitivos e com baixa disponibilidade de ATP para síntese de celulases, desenvolveram mecanismos alternativos de degradação e de acesso aos produtos da hidrólise, conhecidos como celulosoma. São sistemas complexos que posicionam as células produtoras de celulases no sítio de hidrólise, observado em clostrídio e bactéria ruminal (Lynd et al., 2002). De acordo com White et al. (1993), as diferenças entre os modelos se baseiam na ordem de ação das enzimas e no seu requerimento cinético. Marsden e Gray (1986) descreveram um tipo alternativo, o mecanismo paralelo, que exhibe maneiras diferentes de hidrólise da celulose amorfa e cristalina.

#### **2.4. Exoglicanases (EC 3.2.1.91) ou avicelases**

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. Duas classificações são utilizadas para definir este tipo de enzima. As 1,4-  $\beta$ -D-glicana glicanohidrolases, também podendo ser chamadas de glicana-1,4-  $\beta$  - glicohidrolase ou exo- $\beta$ -glicosidase (E.C. 3.2.1.74), são responsáveis pela remoção sucessiva de unidades de D-glicose. Já as 1-4- $\beta$ -

celobiohidrolase (EC 3.2.1.91), denominadas também por exo-glicanase ou celobiohidrolase, catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-D glicosídicas na celulose, liberando celbiose das extremidades não redutoras e redutoras das cadeias (Bhat & Bhat, 1997, Lynd et al., 2002).

As exoglicanases principais são a CBH I e CBH II, que hidrolisam a cadeia de celulose a partir das extremidades redutora e não-redutora, respectivamente.

O sítio ativo das celbiohidrolases possui uma forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofrem hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando majoritariamente celbiose (Hui; White; Thibault, 2002).

As exoglicanases não atuam sobre celbiose 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 CMC (Sánchez, 2009), tornando possível a diferenciação entre essas enzimas.

A CBH (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4- $\beta$ -D-glucana-celbiohidrolase. Embora a IUBMB defina a CBH como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos, há relatos do ataque de terminais redutores por essa enzima (Lynd et al., 2002). A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato. A amorfogênese promove aumento na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celbiose (Zhang e Lynd, 2004).

Makky (2010) investigou a produção de celbiose (avicelase) pelo termofílico *Geobacillus stearothermophilus* quando cultivado no bagaço de cana-de-açúcar. Esta enzima apresentou pH e temperatura ótimas para atividade a 7,0 e 50 °C, respectivamente. Além disso, mostrou boa estabilidade entre temperaturas variando de 30-80 °C.

## 2.5. Microrganismos celulolíticos

Os microrganismos celulolíticos são encontrados em grupos taxonômicos extremamente variados, sendo a maioria pertencente às eubactérias e aos fungos. Os organismos celulolíticos ocorrem em todas as biotas onde há acúmulo de resíduos de celulose. Usualmente, ocorrem em populações mistas, compreendendo espécies celulolíticas e não celulolíticas que interagem sinergicamente. Estas interações levam à completa hidrólise da celulose que é convertida em glicose, e esta em dióxido de carbono e água, em condições aeróbicas, e em dióxido de carbono, metano e água em condições de anaerobiose (Béguin & Aubert, 1994).

Embora microrganismos capazes de degradar celulose sejam distribuídos em diferentes grupos, os sistemas de celulasas de bactérias e fungos têm sido estudados mais detalhadamente. Bactérias aeróbias e anaeróbias, mesofílicas e termofílicas (*Acetobacter xylinum*, *Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp., *Clostridium* spp.) produzem celulasas individuais ou associadas à parede (celulossomo) (Bisaria & Ghose, 1981; Belaich et al., 1997; Samejima et al., 1998; Schwarz, 2001).

Em bactérias, existe a presença de microrganismos decompositores da celulose tanto aeróbios como anaeróbios. Em bactérias aeróbias, são descritos como produtores de celulasas o gênero *Cellulomonas*, espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* e *B. cereus*. Entre as bactérias anaeróbias estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium*, e *Ruminococcus*. As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem celulasas e carboximetilcelulasas (CMCase) na presença de celulose microcristalina. Alguns genes que codificam celulasas nestes microrganismos já foram donados e seqüenciados (Mawadza et al., 2000).

Alguns microrganismos são hábeis para produzir sistema enzimático. Por exemplo, *C. cellulolyticum* e *C. thermocellum*, que são bactérias termofílicas capazes de produzir um complexo multienzimático (celulossoma), quando cultivadas em celulose como substrato. As espécies do gênero *Bacillus* são industrialmente importantes, pois eles têm uma elevada taxa de crescimento, são capazes de secretar proteínas extracelulares e são considerados relativamente seguros para uso com relação à saúde e aos aspectos ambientais. Uma

característica interessante do gênero é sua capacidade bem caracterizada para degradar substratos amorfos, tais como carboximetilcelulose (Makky, 2000).

Alguns microrganismos são conhecidos por produzirem um completo sistema de celulases, no entanto, outros produzem um sistema incompleto ou carecem de estudos. *Cellulomonas fimi* secreta pelo menos duas distintas celobiohidrolases e quatro endoglicanases com diferentes especificidade e atividade sobre o substrato (Mansfield & Meder, 2000).

A degradação anaeróbia da celulose pode ocorrer em uma variedade de biotas, incluindo esterco, lagoas de tratamento de resíduos, em sedimentos marinhos, entre outros. Microrganismos como *Fibrobacter spp.*, *Butyvirio fibrinosolvens*, *Rumonococcus albus*, *R. flavefaciens*, no rúmen e no trato gastrointestinal desempenham um importante papel na nutrição de animais herbívoros (Bisaria & Ghose, 1981; Weimer et al., 1991).

Em bactérias aeróbias e fungos, as várias enzimas que constituem as celulases, ocorrem como unidades separadas, cada qual tendo uma ação específica diferentemente das bactérias anaeróbias, como *Clostridium thermocellum*, *C. cellulolyticum* e *Fibrobacter succinogenes*, que apresentam complexos celulolíticos extracelulares multienzimáticos, os chamados celulosomos. Estes complexos apresentam-se como protuberâncias na parede bacteriana com uma variedade de enzimas, não somente celulolíticas, mas xilanases, manases e quitinases também estão presentes. Devido à interface célula/substrato, a celobiose não se acumula nem se dissipa no meio, podendo ser mantida em concentrações apropriadas para uma utilização mais eficiente pela célula. Celulosomos são encontrados principalmente em sistemas anaeróbios onde a economia metabólica é crucial (Biosset et al., 1999; Shoham et al., 1999; Schwarz, 2001).

Assim como as bactérias, fungos também hidrolisam polímeros de celulose. *Trichoderma reesei*, um fungo aeróbio altamente celulolítico, é provavelmente o microrganismo cujo sistema de celulases tem sido mais amplamente estudado. Este microrganismo produz pelo menos seis endoglucanases e duas celobiohidrolases ativas em diferentes fontes de celulose, solúveis ou não, amorfas e cristalinas (Lee et al., 1993; Karlsson et al., 2002).

Muitas das enzimas produzidas por este fungo foram clonadas e expressas (Gama e Mota, 1998). Outros fungos celulolíticos incluem as espécies *Arthrographis cellulolyticum*, *Fusarium solani*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium funiculosum*, *Sinortizobium fredii* (simbionte), *Sporotrichium pruinosum* (Bisaria e Ghose, 1981; Okeke, 1995; Jacobus e Wyk, 1997; Rabinovich et al., 2002a; Saha, 2004).

## 2.6. Celulases termoestáveis

As enzimas produzidas por microrganismos termofílicos são conhecidas como termoenzimas ou enzimas termoestáveis e possuem uma temperatura ótima de atividade por volta de 60 °C (Vieille et al., 1996; Andrade et al., 1999). Estas enzimas apresentam como características a estabilidade à temperatura e ao pH, podendo ser por isso, usadas em diversos processos industriais, nos quais, substituem as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos ou produtos químicos. As principais vantagens do uso dessas enzimas em processos conduzidos a altas temperaturas são: redução do risco de contaminação microbiana, menor viscosidade – a maior parte dos reagentes torna-se mais solúvel, difundindo-se mais rapidamente e assim permitindo que concentrações maiores desses compostos possam ser utilizadas, aumento da taxa de transferência de massa e da solubilidade dos substratos (Lee et al., 2001).

Estudos com enzimas purificadas desses microrganismos têm demonstrado que uma variedade de substituições de aminoácidos pode estabilizar a proteína evitando a desnaturação térmica via uma modificação sutil de sua estrutura secundária (Jaenicke e Böhm, 1998). Além disso, proteínas especializadas conhecidas como chaperonas são produzidas por esses organismos, que auxiliam depois da sua desnaturação no re-enovelamento da proteína para sua forma nativa e restaurando assim sua função (Everly e Alberto, 2000).

Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menor exposição do seu sítio de proteólise (Asghari et al., 2004). A maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos também tem sido relatada como uma propriedade das proteínas termoestáveis (Cowan, 1997).

A pesquisa por celulases termoestáveis tem se intensificado nos últimos anos e o domínio Archae tem sido pesquisado com maior ênfase. Genes codificadores de enzimas celulásicas de microrganismos termófilos degradadores de celulose foram clonados e as enzimas correspondentes purificadas e caracterizadas (Haki e Rakshit, 2003).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que degradam biomassa, principalmente celulose, produzindo diferentes complexos de enzimas (Castro et al., 2010; Lynd et al., 2002). Para a degradação da celulose microcristalina, que é insolúvel em água devido à sua estrutura altamente compacta, é interessante a utilização de celulases termoestáveis ativas a altas temperaturas (Haki e Rakshit, 2003). Devido a este fato, as celulases termoestáveis de microrganismos termofílicos passaram a ser mais estudadas e caracterizadas (Maheshwari et al., 2000). Dentre estas, destacam-se as bactérias *Clostridium thermocellum*, *Thermonospora fusca* e *Microbispora bispora* (Wilson, 1992; Bhat & Bhat, 1997) e os fungos *Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Sporotrichum thermophile* e *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Bhat & Bhat, 1997; Maheshwari et al., 2000).

As celulases termoestáveis são consideradas ideais para aplicações biotecnológicas. Na conversão da celulose do bagaço, por exemplo, geralmente se utiliza temperaturas entre 45 e 70 °C (Haki & Rakshit, 2003).

Entre os microrganismos do domínio Archae que produzem endoglicanases e exoglicanases, incluem-se *Pyrococcus furiosus* e *Pyrococcus horikoshi*, espécies do gênero *Sulfolobus* como produtores de  $\beta$ -glicosidases e o gênero *Thermotoga* (Niehaus et al., 1999; Haki & Rakshit, 2003).

Além de serem novas opções para a produção de celulases termoestáveis, os microrganismos termofílicos, sintetizam celulases resistentes a valores de pH alcalino e ácido. Também conseguem desenvolver-se em uma variedade de substratos com menores riscos de contaminação por outros microrganismos.

Celulases produzidas pela bactéria termofílica e celulolítica *Anoxybacillus* sp. 527 demonstraram boa atividade entre temperaturas de 50 a 70 °C com máxima atividade a 70 °C. Embora as atividades tenham sido drasticamente reduzidas a 80 °C, 25% do potencial máximo celulolítico foi ainda retido até mesmo a 100 °C, tornando estas enzimas muito promissoras para a engenharia

genética de proteínas, a fim de melhorar sua tolerância para a degradação de celulose em altas temperaturas (Liang et al., 2010).

## 2.7. Aplicações industriais das celulasas

A variedade de enzimas microbianas e seus ramos de aplicação somada com a necessidade de utilização de processos industriais menos agressivos para o meio ambiente, justificam a pesquisa e produção de enzimas (Mussatto et al., 2007). Na Tabela 2 são mostradas as enzimas mais utilizadas em diferentes segmentos industriais (Kirk et al., 2002). Nas indústrias de papel e celulose, xilanase é a hemicelulase que tem maior importância. A celulase pode atuar no processo de branqueamento do papel auxiliando no desligamento da lignina da fibra. Isso faz com que o material fique mais suscetível ao tratamento químico, diminuindo assim, a utilização de cloro durante o tratamento. Estudos apontam que a utilização de extratos contendo atividade de mananase juntamente com a de xilanase são mais eficientes para o biobranqueamento do papel (Bhat, 2000).

**Tabela 2.** Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais

Segmento Industrial	Enzima	Aplicação
Detergentes	Proteases, amilases, celulasas, lipases	Remoção de manchas, lavagem e clarificação de cores.
Álcool combustível	Amilase, Amidoglucosidase, Glucose isomerase	Liquefação do amido, sacarificação, conversão da glicose a frutose.
Alimentos	Proteases, amilases, lactases, transglutaminase, lipoxigenase	Coagulação do leite (formulação de queijo, remoção da lactose, branqueamento e amolecimento do pão, etc.
Higiene pessoal e beleza	Amiloglicosidase, Glicose oxidase, Peroxidase	Atividade bactericida.

Fonte: Kirk et al., 2002.

As celulasas possuem uma grande área de aplicação, como na indústria de alimentos, cervejas e vinhos, alimentação de animais, têxtil, polpa e papel, assim como na agricultura e em pesquisas (Bhat, 2000).

A produção de celulasas em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, cujo objetivo era de melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulasas também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias: têxtil, nos processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a serem recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o desgaste das peças, notado pela formação de fiapos após sucessivas lavagens (Coelho et al., 2008).

As celulasas foram introduzidas na indústria têxtil e de detergentes, a partir da década de 80, passando a ser um importante componente do mercado mundial de enzimas; vêm sendo usadas também, muito eficientemente em detergentes enzimáticos biodegradáveis (Mitidieri et al., 2002). As celulasas estão sendo produzidas comercialmente em cultivos submersos, contendo, como fonte de carbono e de indução, a celulose. (Bitencourt et al., 2002).

As enzimas mais utilizadas em formulações de detergentes são as amilases, proteases, lipases e celulasas. As enzimas como princípios ativos dos detergentes apresentam a grande vantagem de ser 100% biodegradáveis (Mitidieri et al., 2002).

Na indústria têxtil as celulasas são utilizadas principalmente no descoloramento e amaciamento de tecidos. Na lavagem de roupas em lavanderias, as celulasas degradam o tecido das roupas que contém algodão. O efeito neste caso é a remoção de fibrilas de celulose que com o tempo passam a aparecer

como penugem no exterior da fibra principal. O efeito das celulasas sobre os tecidos é então o de melhorar a aparência quanto ao brilho, à maciez e facilitar a remoção de partículas sólidas do tecido. As celulasas também são utilizadas para a remoção do excesso de corante dos tecidos jeans, processo denominado bioestonagem. Este processo faz com que os jeans adquiram uma aparência “lavada”, danificando menos as fibras dos tecidos do que as pedras-pomes utilizadas nesse processo (Mussatto et al., 2007).

Durante o processo de bioestonagem, as celulasas atuam hidrolisando as pequenas fibras da superfície do tecido, proporcionando a perda do índigo. As vantagens de substituir as pedras pelas enzimas são: redução do desgaste das máquinas; aumento da produtividade das máquinas devido à maior quantidade de tecido tratado em menos tempo; é um processo não poluente e gera efluentes tratáveis; flexibilidade para criar e reproduzir novos produtos (Bhat, 2000; Belghith, et al., 2001). Uma desvantagem da bioestonagem é a redeposição do índigo, que gera um desbotamento ineficiente. Este processo acontece quando as celulasas utilizadas no processo possuem afinidade pelo índigo, logo este não é excluído durante a lavagem. Normalmente as enzimas de caráter ácido possuem maior afinidade pelo índigo e por isso as enzimas neutras e básicas são preferidas para utilização da indústria têxtil. Para diminuir o efeito de redeposição, proteases têm sido utilizadas após a lavagem com as celulasas (Miettinen-Oinonen, 2004).

As celulasas são também empregadas na extração de óleos, pigmentos, essências, alcalóides e amido; preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimulantes de digestão, rações animais, produtos estimuladores de ensilagem, adjuvante para o malte da cerveja e no tratamento de lixo orgânico (Kubicek et al., 1993). Ainda, é importante destacar o uso potencial das celulasas na hidrólise de material lignocelulósico para produção de xarope de glicose.

Na indústria de alimentação animal são utilizadas nas rações dos animais monogástricos e ruminantes. Em animais monogástricos as celulasas atuam em conjunto com as xilanasas, na hidrólise de polissacarídeos não amiláveis (Bhat e Bhat, 1997; Bhat, 2000). Em animais ruminantes, a utilização de celulasas em conjunto com pectinases e hemicelulasas, vêm da necessidade de aumentar a

digestão das plantas forrageiras, base da alimentação dos animais, e assim poder incrementar a qualidade e digestibilidade da ração (Bhat, 2000).

Celulases e hemicelulases têm uma ampla aplicação nas indústrias alimentícias. Essas enzimas melhoram a textura, qualidade e vida útil de produtos de padaria. As celulases e hemicelulases (xilosidases, xilanases, mananases e arabinases), juntamente com as pectinases são denominadas enzimas de maceração, utilizadas para a extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. Durante a produção de sucos, as frutas são totalmente maceradas em polpa, que depois de processos físicos (prensagem, centrifugação e filtração) resulta em uma fase líquida de suco e uma fase sólida que não é aproveitada. O uso das enzimas de maceração permite a utilização desta fase sólida aumentando o rendimento do processo e o valor nutricional do suco (Bhat, 2000; Haros, 2002).

As celulases podem ser adicionadas a amaciantes de roupas para “aparar” microfibrilas de roupas, que após várias lavagens tendem a se desprender. Na indústria têxtil são empregadas para remover o excesso de cor, para estonação de jeans e para o amaciamento das fibras (Bhat & Bhat, 1997; Lynd et al., 2002).

As celulases também são usadas em vários processos, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata-doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Orberg 1981).

Também são empregadas em formulações de detergentes domésticos e industriais. As celulases usadas em detergentes são produzidas ou por espécies de *Bacillus* ou por fungos do gênero *Humicola*. Essas celulases possuem pH ótimo de ação próximo a 7,0, apesar de apresentar certa tolerância a valores de pH mais elevados.

Os produtores de detergentes são hoje os maiores consumidores de enzimas. Por isso, constantemente, estão sendo desenvolvidos novos produtos contendo novas enzimas e novas formulações. As enzimas mais utilizadas em formulações de detergentes são as amilases, proteases, lipases e celulases.

A bioconversão da celulose à glicose abre caminhos para aplicações de processos enzimáticos microbianos para obtenção de etanol ou para produção de proteínas de células únicas para alimentos (Rabinovich et al., 2002b).

Outra importante área é o tratamento de resíduos de celulose, municipais ou agrícolas. A biomassa destes resíduos acumula-se em grandes quantidades a cada ano, resultando na deterioração do ambiente e uma perda de recursos potencialmente valiosos. A bioconversão destes poderia ser uma solução prática para estes problemas. Apesar das inúmeras aplicações, parece que a maior utilização destas enzimas é para conversão à glicose e posterior fermentação na produção de solventes e combustíveis (Bhat & Bhat, 1997; Howard et al., 2003).

Na tabela 3 apresenta-se um resumo do uso das celulasas de acordo com suas funções e aplicações.

**Tabela 3.** Características das celulasas em diferentes indústrias

Indústria	Função	Aplicação
Alimentos	Hidrólise da celulose, diminuição da viscosidade mantendo a textura de sucos de frutas.	Melhoramento na prensagem e extração de suco de frutas e óleos de olivas, realçando o sabor. Melhoramento na eficiência de molhagem, absorção homogênea da água pelo cereal, qualidade nutritiva de alimentos fermentados, produção de oligossacarídeos como
	Hidrólise parcial ou completa de celulose substituída.	alimentos funcionais e conversão de biomassa, re-hidratação de vegetais secos e sopas;
	Liberação de antioxidantes de frutas e cascas de vegetais.	
Têxtil e Lavanderia	Remoção do excesso de corantes do tecido; amaciar a tela de algodão sem danificar a fibra. Remoção do excesso de microfibrilas da superfície do algodão e tecidos.	Bioestonagem do tecido; produção de sabão em pó de alta qualidade e não-poluente. Biopolimento de algodão e tecidos.
Papel e Celulose	Modificação mecânica da polpa grossa e das propriedades da força da folha de mão; hidrólise parcial de carboidratos.	Polpagem biomecânica; modificação das propriedades das fibras; descoloramento de fibras recicladas.

Fonte: Nascimento, 2006.

Segundo Onar et al. (2004), enzimas de bactérias têm a desvantagem de ser irreversíveis, entretanto são melhores na limpeza de microfibrilas das fibras celulósicas e ainda têm mais afinidade ao detergente. O uso de combinações de

diversas celulasas pode ser uma alternativa para além de melhorar as atividades catalíticas resolver a questão da reversibilidade.

No processo de fabricação da polpa de celulose, é realizado o refino da mesma, sendo removidos materiais lenhosos que prejudicam a qualidade da polpa. A utilização de celulasas de *Trichoderma* no processo permitiu uma economia de energia em 20%, mas podendo chegar até 40%, de acordo com o momento e tipo da enzima aplicada. A utilização das celulasas se faz presente na modificação das propriedades das fibras, permitindo o enxague das fibras, o que aumenta a velocidade da fabricação do papel (Bhat, 2000).

Nesta indústria as celulasas estão presentes na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação de folhas de papel (Bhat e Bhat, 1997; Lima *et al.*, 2001).

Existe uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (Zhang *et al.*, 2006). O uso de celulasas para este fim, tem como entraves o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção das enzimas e a necessidade de produzir enzimas mais eficientes (Suns e Cheng, 2002). A expectativa é de que o mercado de celulasas seja superior a 400 milhões de dólares por ano com a possível utilização das enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa (Zhang *et al.*, 2006).

## **2.8. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas**

Nas últimas décadas há uma crescente busca na utilização dos resíduos agroindustriais. O acúmulo destes resíduos gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos foram desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas.

Não há dúvidas de que o Brasil dispõe, em face de suas inúmeras atividades agroindustriais, de uma grande disponibilidade de fitobiomassa nativa e/ou residual que representa um enorme potencial energético. Nela figuram alternativas como o bagaço de laranja, os resíduos de fecularias (bagaço de mandioca), o bagaço de cana, as palhas de aveia, de cana, de trigo e de milho, as cascas de arroz e de aveia, a serragem de madeira e outros resíduos da natureza agro-florestal (Pitarelo,2007).

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional. Segundo Doelle, (1996) uma tecnologia de fermentação desenvolvida a partir de materiais lignocelulósicos resultando em múltiplos produtos, sem efluentes poluentes no solo, na água e no ar, é caracterizada como uma “tecnologia integrada”.

A biodegradação de materiais lignocelulósicos constitui um dos mais importantes ciclos de carbono na natureza e o entendimento desse processo representa contribuição significativa às ciências naturais (Kirk & Cullen, 1998).

O desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção das enzimas a um custo competitivo é de grande importância não só para a área de biocombustíveis, mas para diversas aplicações biotecnológicas e de outros setores, incluindo o de produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, têxteis, papel e celulose e agricultura (Bhat, 2000). De acordo com Demain (2000), 60% do total do abastecimento mundial de enzimas industriais são produzidos na Europa, e os restantes 40% nos Estados Unidos e Japão.

Os resíduos lignocelulósicos são uma grande alternativa para a geração de energia, devido à sua grande disponibilidade na natureza. Os maiores usos da lignocelulose concentram-se nas polpas e indústrias de papéis, proteína para ração, em meios tecnológicos de alimentação, além de poder gerar energia através da produção de etanol (Ballesteros, 2001). A Tabela 4 apresenta a composição de alguns resíduos agroindustriais utilizados para a produção de celulasas (Farinas et al.; 2008). Tal composição é de grande importância na avaliação do desempenho desses materiais como substrato para produção de enzimas.

Estes resíduos agroindustriais são, em sua maioria, de natureza lignocelulósica (Kerem et al., 1992) e de acordo com Semanni & Porri (1989), a utilização de material lignocelulósico para a obtenção de compostos de alto valor econômico, por biotransformação, é um dos mais interessantes campos da pesquisa biotecnológica. Os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina. O teor de nitrogênio é, geralmente, muito baixo. A proporção percentual dos componentes celulose, hemicelulose e lignina, assim como do teor de nitrogênio, depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (Rajarithnam et al., 1992).

Diversos substratos são utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos (Vitti, 1988; Silva & Dillon, 1988). Os resíduos agrícolas podem ser devidamente moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, em fermentação submersa (Da Silva et al., 1994). Na maioria dos casos, o simples enriquecimento destes compostos com fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de elevada atividade enzimática (Bisaria & Ghose, 1981; Elisashvili, 1993).

Dos resíduos agrícolas de maior importância no território nacional, o bagaço de cana-de-açúcar certamente ocupa uma posição de grande destaque, e este contém um elevado teor de celulose. Bagaço de cana é o resíduo obtido após o esmagamento da cana-de-açúcar durante a produção de açúcar e contém principalmente lignocelulose. No ano de 2006, a agroindústria sucroalcooleira brasileira, composta aproximadamente por 300 usinas, processou  $3,84 \times 10^8$  toneladas de cana para produzir  $1,6 \times 10^7$  m<sup>3</sup> de álcool. A quantidade de cana processada gerou cerca de  $10^8$  toneladas de bagaço e  $8,9 \times 10^7$  toneladas de palha (base úmida) (UDOP, 2009).

**Tabela 4.** Composição (%) de alguns resíduos agroindustriais

Componente	Bagaço de cana	Bagaço de laranja	Bagaço de soja	Casca de arroz
Celulose	36	16	03	36
Hemicelulose	28	14	04	20
Lignina	20	01	03	19
Cinzas	05	02	05	20
Proteínas	04	08	43	03

Fonte: Farinas et al.; 2008.

De acordo com Pal et al. (1995), o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial abundante em vários países e pode ser utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de vários processos biotecnológicos de interesse industrial.

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido utilizado como indutor para a produção de celulases. Esse resíduo tem sido utilizado para produção de energia pela queima em caldeiras além de ser exportado. Outra aplicação desse resíduo é a utilização como matéria-prima na fabricação de papel. Apesar do reaproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar, às vezes, o excesso é desperdiçado nos pátios das destilarias (Pandey e Soccol, 1998).

A reciclagem de resíduos agroindustriais vem ganhando espaço cada vez maior, não simplesmente porque os resíduos representam “matérias-primas” de baixo custo, mas, também, porque os efeitos da degradação ambiental decorrente de atividades industriais e urbanas estão atingindo níveis cada vez mais alarmantes (Costa Neto et al., 2000).

Na industrialização do maracujá para extração do suco obtêm-se como principais resíduos as cascas e as sementes. Os frutos utilizados na indústria de sucos devem apresentar um peso superior a 200 g, o que gera um rendimento aproximado de 38% de suco, 12% de semente e 50% de cascas. Soma-se, a esses resíduos, os frutos que são descartados devido à baixa qualidade dos

mesmos, que inviabiliza a sua utilização para o processamento industrial, por já apresentarem sinais de deterioração como a mudança na coloração e firmeza da casca. Esses resíduos na maioria das vezes não são aproveitados e se transformam em um grande problema ambiental. No Brasil, cerca de 90% das cascas e sementes do maracujá viram toneladas de lixo. A casca do maracujá é rica em pectina, vitamina B<sub>3</sub>, ferro, cálcio, fósforo e sódio (Borguini et al., 2008), e portanto pode ser uma fonte de baixo custo para a produção de celulases por microrganismos .

O processo industrial de moagem úmida é o segundo maior setor de consumo de grãos de milho após a alimentação animal, utilizando 12% do total produzido (Abimilho, 2006). Este envolve transformações químicas, bioquímicas e operações mecânicas com o objetivo de separar o grão do milho em suas frações relativamente puras: gema, fibra, amido (Singh et al., 1997).

Os produtos primários de moagem úmida são amidos alimentícios e industriais, os quais podem ser convertidos em xaropes e etanol. Os co-produtos incluem o óleo de milho e os produtos destinados à produção de rações animais, tais como, farelo do glúten de milho, farelo do gema de milho, fibras e licor de maceração, sendo os últimos, sólidos solúveis removidos durante a maceração e concentrados por evaporação. O licor resultante da maceração, usualmente vendido na base de 50% de sólidos, é rico em vitaminas, especialmente do complexo B. Além de ser usado em rações, o licor também é aplicado na produção de antibióticos e produtos farmacêuticos e fermentos. Combinados com outros ingredientes esses itens são usados na formulação de rações específicas de acordo com a destinação dos animais (Abimilho, 2006).

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre essas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração. O bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa predominante, com uma geração em 2007 de 147 milhões de toneladas (Sidra, 2009).

As biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações co-valentes (Jeffries, 1990)

Kona et al. (2001), Burkert et al. (2004) e Lee et al. (2001) sugerem a utilização da água de maceração de milho para a redução do custo do meio de cultura utilizado para o crescimento e produção de enzimas por microrganismos.

Segundo Menezes et al. (1976), a atividade celulolítica de linhagens fúngicas, como *Aspergillus niger*, desenvolvidas em bagaço de cana foi superior às cultivadas em carboximetilcelulose e papel de filtro. Sugeriram que estas linhagens produzem a fração exoglicanase, uma vez que o bagaço é uma celulose *in natura* e não havia recebido qualquer tratamento químico, o que exigiria ação da fração pré-hidrolítica da exoglicanase antes de ser hidrolisada pelas outras frações endoglicanase e  $\beta$ -glicosidase.

Segundo Gupta e Madamwar (1997), resíduos lignocelulósicos disponíveis em abundância podem ser excelentes substratos para a produção enzimática por fermentação em estado sólido. Cultura mista de *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* desenvolvida em bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de cálcio a 2% foi favorável à produção de celulase e  $\beta$ -glicosidase, após oito dias de fermentação.

Abdelnasser et al. (1997) testaram três fungos: *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6361 e *Coriolus versicolor* NRRL 6102, quanto às suas capacidades de produzir xilanase e celulase, em resíduos agrícolas (bagaço de cana tratado e não tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó). Espigas de milho, palha de trigo e bagaço de cana tratado promoveram maior indução enzimática.

Segundo Umikalsen et al. (1997), uma linhagem de *Chaetomium globosum* apresentou bom crescimento e substancial quantidade de celulase em fibras deslignificadas de palma, produzindo extrato.

Para Vlaev et al. (1997) a máxima produção de celulase total foi percebida com 72 horas de fermentação e de xilanase com 96 horas, obtendo-se menor atividade em fibras de sabugo de milho do que em Avicel, possivelmente, devido à presença de inibidores. A atividade de celulase total alcançou somente 30% de

valor medido com Avicel, possivelmente, devido ao maior teor de lignina naquele substrato.

### 3. TRABALHOS

#### 3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE AVICELASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2 E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

##### RESUMO

Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur, Meire Lelis Leal Martins\*  
Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) - Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA). Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil, 28013-602.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a produção de avicelase pelo termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2 quando cultivado em um meio de cultura constituído de avicel (0,5%, p/v) como principal fonte de carbono e suplementado com água de maceração de milho (0,5% p/v). O estudo do perfil da síntese da avicelase com o tempo de fermentação revelou que a atividade máxima da enzima foi alcançada 120 horas após a inoculação do microrganismo com níveis de 85,64 U/mL.

A concentração da celulose que proporcionou melhor atividade da avicelase foi 0,5% (p/v). Em concentrações maiores que 0,5% a atividade da enzima foi mais baixa. Em relação à concentração da água de maceração de

milho no meio de cultura foi encontrado que a atividade da enzima aumentou nas concentrações de 0,4% e 0,5% (p/v) e decresceu a partir destes valores.

Estudos sobre a caracterização da temperatura ótima da avicelase revelaram que a enzima mostrou uma atividade crescente entre 40 °C e 70 °C, onde a atividade atingiu o seu valor máximo. Acima de 70 °C ocorreu uma redução na atividade da enzima e a 80 °C e 90° C a avicelase perdeu cerca de 28% e 72% de sua atividade, respectivamente. Quanto à estabilidade térmica da avicelase foi observado que esta enzima reduziu sua atividade em temperaturas maiores que 70 °C. Ao adicionar o cálcio ao meio reacional, verificou que a estabilidade da enzima aumentou em ambas as temperaturas estudadas (70 e 80 °C), sendo este aumento mais pronunciado para a temperatura de 70 °C. A atividade da avicelase após 20 minutos de incubação a 70 °C e a 80° C na presença do cálcio foi 34% e 13% maior que na ausência deste íon, respectivamente.

O pH ótimo da enzima foi 8,5. Em valores de pHs maiores que 8,5 a atividade da enzima decresceu. A atividade da enzima em pH 9,5 foi reduzida em 42%. Após a incubação do extrato enzimático à temperatura ambiente por 2 horas a uma faixa de pH 6,0-9,0, foi observado um decréscimo de aproximadamente 13% de sua atividade original em pH 9,0.

Palavras-chave: Avicelases; *Bacillus*; água de maceração de milho; avicel, xilana, carboximetilcelulose.

## ABSTRACT

### OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCTION OF AVICELASE BY THERMOPHILIC *Bacillus* sp. SMIA-2 CHARACTERIZATION OF THE ENZYME

Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur, Meire Lelis Leal Martins  
Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) - Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias (CCTA) - Laboratório de Tecnologia de Alimentos

(LTA). Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Calif6mia, Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil, 28013-602.

This work was carried out with the objective of optimize the production of avicelase by thermophilic bacterium, *Bacillus* sp. SMIA-2, when growth in a medium containing microcrystalline cellulose (0.5%, w/v) as a main carbon source and supplemented with corn steep liquor (0.5%, w/v). Studies on the profile of synthesis of avicelase with the time revealed that the enzyme reached maximum activity after 120 hours of growth with levels of 85,64 U/mL.

The microcrystalline cellulose concentration which provided better activity of the avicelase was 0.5% (w/v). At higher cellulose concentrations, enzyme production was comparatively lower. Regarding the corn steep liquor concentration in the medium it was found that the activity of the enzyme increased between 0.4% and 0.5% corn steep liquor concentration and then fell beyond this point.

Studies on the avicelase characterization revealed that the enzyme increased the activity at temperatures between 40 °C and 70 °C, where the activity reached its maximum. Above 70 °C occurred a reduction in the activity of the enzyme and at 80° C and 90 °C the avicelase lost about 28% and 72% of its activity, respectively. Regarding the thermal stability of protease was observed that this enzyme reduced its stability at temperatures higher than 70 °C.

The optimum pH of protease was found to be 8.5. At values of pH higher than 8.5 the activity of the enzyme decreased and at pH 9.5 the activity was reduced in 42%. After incubation of crude enzyme solution at room temperature for 2 h at pH 6.0 -9.0, a decreased of about 13% of its original activity at pH 9.0 was observed.

Author Key-words: *Bacillus*; corn steep liquor; avicel, xylan, carboxymethylcellulose.

## 1. INTRODUÇÃO

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero renovável mais abundante do mundo. Como a amilose e as cadeias principais da amilopectina e do glicogênio, a molécula de celulose é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose (Abraão, 2006). A degradação microbiana da celulose envolve a ação sinérgica de três enzimas principais: endo- $\beta$ -1,4-glicanase (avicelase, EC 3.2.1.4), exo- $\beta$ -1,4-glicanase (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21). Este complexo enzimático pode hidrolisar a celulose até atingir oligossacarídeos e pequenas moléculas de glicose (Lynd et al., 2002).

Dentre as aplicações relatadas na literatura para a avicelase citam-se sua utilização na bioconversão de resíduos agrícolas em combustíveis e produtos químicos. Uma diversidade de microrganismos são relatados por possuírem sistemas enzimáticos capazes de degradar materiais celulósicos (Costa Neto et al., 2000; Howard et al., 2003).

As espécies do gênero *Bacillus* são bactérias que produzem diversas enzimas extracelulares incluindo celulasas (Wang et al., 2007). Espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* como *B. sphaericus* e *B. subtilis* expressam atividades altas de degradação da celulose (Takami e Horokoshi, 2000; Sing et al., 2004). As bactérias deste gênero são industrialmente importantes, pois têm uma alta taxa de crescimento e são capazes de secretar proteínas extracelulares. Em alguns casos utilizam matéria orgânica constituída por misturas complexas típicas da maioria dos resíduos. Além disso, com exceção do grupo de *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos e que não produzem toxinas, sendo incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood et al., 1998).

O objetivo do presente trabalho foi identificar as melhores condições para a produção de uma avicelase termoestável extracelular por *Bacillus* sp cepa SMIA-2, utilizando materiais de baixo custo. Algumas propriedades da enzima produzida também foram determinadas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1. Microrganismo:** O microrganismo usado nesse estudo foi uma bactéria termofílica, *Bacillus* sp cepa SMIA-2 (Souza e Martins, 2001), previamente isolada de amostras de solo coletadas na cidade de Campos dos Goytacazes, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) Rio de Janeiro, Brasil.

**2.2. Manutenção do microrganismo:** O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio TSY (triptona 20 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; ágar 20 g/L e água 1 L), sob temperatura de refrigeração (7 °C).

**2.3. Meio de crescimento:** O meio de cultura usado para o crescimento e produção de avicelase continha (g/L): Avicel (Celulose microcristalina - Sigma) 5,0; água de maceração de milho 5,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO<sub>4</sub> 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,87; CaCl<sub>2</sub> 0,29; ZnO- $2,03 \times 10^{-3}$ ; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O- $2,7 \times 10^{-2}$ ; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O- $1,0 \times 10^{-2}$ ; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O- $8,5 \times 10^{-5}$ ; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O- $2,4 \times 10^{-3}$ ; NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O- $2,5 \times 10^{-4}$  e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>- $3,0 \times 10^{-4}$ .

O meio acima foi preparado utilizando água destilada e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O pH final foi ajustado para 7,5 com NaOH 1,0 M, antes da esterilização.

**2.4. Crescimento do microrganismo:** Para o preparo do inóculo o microrganismo foi semeado em placas de petri contendo o meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50 °C por 18 horas. Após este período, 10 mL do meio de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 25mL do meio de cultura descrito anteriormente no item 2.3, incubadas por mais 18 horas a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm, e posteriormente utilizadas para inocular o meio de crescimento. Esta cultura foi considerada o inóculo.

O meio de cultura foi inoculado com 2mL de uma cultura de véspera (inóculo) e incubado a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. A intervalos de tempos pre-determinados foram retiradas amostras para determinação do crescimento, pH e da atividade enzimática. Todos os experimentos foram realizados com três repetições.

**2.5. Medida do crescimento:** A concentração celular foi medida pela turbidez do meio de crescimento. A turbidez foi medida em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 600 nm. Foi subtraído do valor obtido o valor de densidade ótica do meio puro (branco) e o resultado foi considerado o valor de densidade ótica relativo ao crescimento.

**2.6. Determinação do pH:** As variações dos valores de pH durante o crescimento celular foram determinadas utilizando-se o pHmetro da marca WTW pH 330.

## **2.7. Ensaio enzimático**

**2.7.1. Atividade da avicelase:** Amostras em triplicata (8 mL) foram centrifugadas em centrífuga CENTRIFUGE 5415 C a 4.500 rpm a 5 °C por 15 minutos para obtenção do extrato livre de células (sobrenadante). A atividade da avicelase foi determinada segundo técnica descrita por Ghose (1987), que consiste em conduzir a hidrólise de 1% (p/v) de celulose microcristalina (Avicel - Sigma) preparada em tampão Tris-HCl, pH 8,5. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL do extrato enzimático a 0,5 mL do substrato 1% (p/v) de celulose microcristalina (Avicel - Sigma) preparada em tampão Tris-HCl, pH 8,5 e procedendo a reação a 70 °C em banho-maria por 10 minutos. Após a incubação foi adicionado à mistura de reação 1 mL de DNS, e posteriormente colodado em água em ebulição por 10 minutos. A reação foi paralisada pela imersão das amostras em banho de gelo pela imersão dos tubos em banho de gelo. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de glicose, por minuto, por mL a 50 °C. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método descrito por Miller (1959). A coloração desenvolvida foi medida por espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini

1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão foi feita utilizando uma solução de glicose (Merck), nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L.)

O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o reagente de Miller (DNS) foi adicionado juntamente com o sobrenadante e a solução de Avicel e esta mistura foi colocada em água em ebulição como descrito anteriormente.

**2.8. Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase:** Para este estudo o microrganismo foi cultivado no meio de cultura descrito anteriormente substituindo a avicel pelas seguintes fontes de carbono a 0,5% (p/v): amido, pectina, lactose, sacarose, glicose e frutose. As soluções de açúcares foram esterilizadas separadamente em autoclave a 121 °C por 15 minutos e adicionadas posteriormente ao meio de crescimento de forma asséptica em capela de fluxo laminar. As culturas foram incubadas por 192 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Após este período, a densidade ótica da cultura, o pH e a atividade da avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

**2.9. Efeito da concentração de avicel sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase:** Após a verificação da eficiência de utilização de avicel pelo microrganismo para a secreção da avicelase, foi avaliada qual a melhor concentração desta fonte para a atividade da enzima. As seguintes concentrações de avicel foram utilizadas: 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0% (p/v). As culturas foram incubadas por 120 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Após este período, a densidade ótica da cultura, o pH e a atividade da avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

**2.10. Efeito da concentração de água de maceração de milho sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase:** O efeito da concentração da água de maceração de milho sobre a atividade da enzima foi avaliado variando sua concentração no meio de 0,1 a 0,7% (p/v). As culturas

foram incubadas por 120 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Após este período, a densidade ótica da cultura, o pH e a atividade da avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

**2.11. Influência do pH inicial do meio e temperatura de incubação sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da avicelase:** o efeito da temperatura de incubação do meio de cultura sobre a atividade da avicelase foi investigado cultivando-se o microrganismo em 25 mL do meio definido anteriormente, nas seguintes temperaturas: 42 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C. Os frascos contendo os meios de cultura foram inoculados com 2 mL do pré-inóculo e incubados por um período de 120 horas. Após este período, a densidade ótica da cultura, o pH e a atividade da avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

Para avaliar a influência do pH inicial do meio de cultivo sobre a atividade da avicelase, o meio de crescimento foi preparado ajustando-se o pH para que, após a esterilização os valores fossem 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 e 9,5. Posteriormente, 25 mL dos meios ajustados com diferentes valores de pH foram inoculados com 2,0 mL do pré-inóculo e incubados a 50 °C e 180 rpm, por um período de 120 horas. Após este período, a densidade ótica da cultura, o pH e a atividade da avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

## **2.12. Caracterização parcial da enzima**

**2.12.1. Efeito do pH na atividade e na estabilidade da avicelase:** A influência do pH sobre a atividade da avicelase foi avaliada na faixa de valores de 6,0 a 10,0 com intervalo de 0,5 unidades. Para o preparo do substrato foi utilizada uma mistura tamponante, os tampões preparados consistiam de acetato de sódio (pH 5,0-5,5), fosfato (pH 6,0-8,0), tris/HCl (pH 8,5-9,5) e tampão glicina-NaOH (pH 10,0) na concentração final de 50 mM. Os valores de pH da mistura de reação foram ajustados com NaOH ou HCl 1N.

O pH ótimo foi determinado dissolvendo o substrato (avicel 0,5%) nas soluções tampão com diferentes valores de pH e incubando 0,5mL do mesmo com 0,5 mL do extrato enzimático em banho-maria a 50 °C por 10 minutos. Após este período, a densidade ótica da cultura, o pH e a atividade da avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

A estabilidade da avicelase a diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o extrato enzimático sem substrato, nos tampões anteriormente descritos, por 2 horas à temperatura ambiente. Após este período, a densidade ótica da cultura, o pH e a atividade da avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

**2.12.2. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da avicelase:** A determinação da temperatura ótima foi realizada incubando-se a mistura de reação (pH 8,5) em temperaturas que variaram de 40 a 100 °C, com intervalos de 10 °C. Depois de 10 minutos de incubação em cada temperatura a atividade enzimática foi analisada, conforme item 2.7.

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se a enzima em temperaturas que variaram de 70 a 90 °C, com intervalos de 10 °C por duas horas. Após a incubação, a atividade residual foi analisada na temperatura ótima da enzima determinada, conforme descrito no item 2.7.

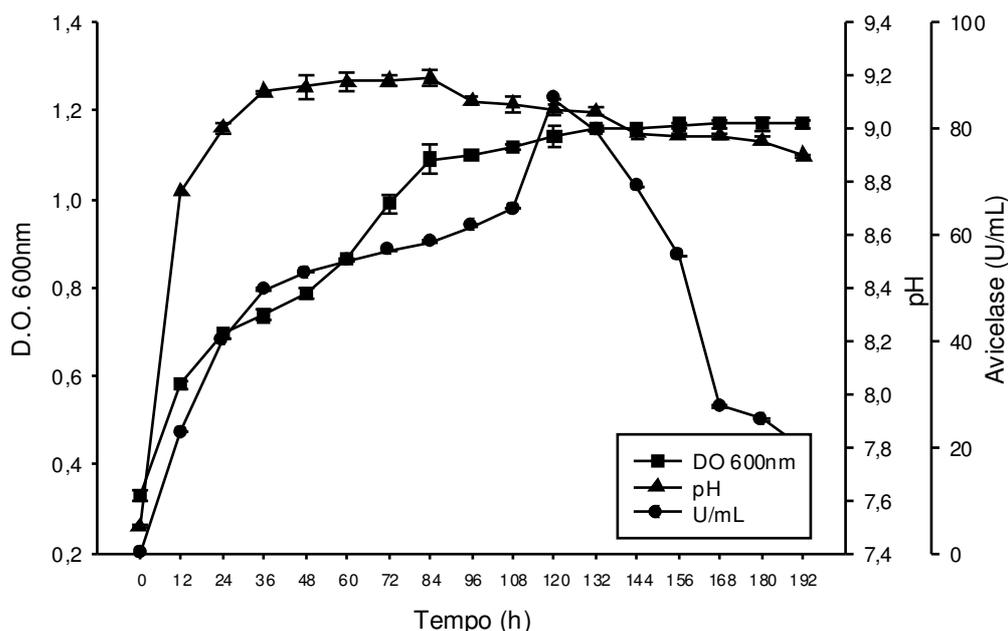
**2.13. Efeito do íon cálcio na estabilidade da avicelase:** O efeito do íon  $\text{Ca}^{+2}$  sobre a estabilidade térmica da avicelase foi verificado incubando o extrato enzimático na presença de  $\text{CaCl}_2$  (10mM) nas temperaturas de 70 °C e 80 °C por 2 horas. Após intervalos de 15 minutos por um período de duas horas a atividade enzimática residual foi determinada nas condições preestabelecidas. Amostras controle também foram medidas para ambas as temperaturas estudadas, incubando-se o extrato na ausência do metal. Após a incubação, a atividade residual foi analisada na temperatura ótima da enzima determinada, conforme descrito no item 2.7.

**2.14. Delineamento experimental:** Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Em cada repetição,

foram feitas triplicatas de cada frasco cultivado. Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SAS 8.0 para Windows pacote estatístico. O teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) foi utilizado para a comparação entre as médias do experimento.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

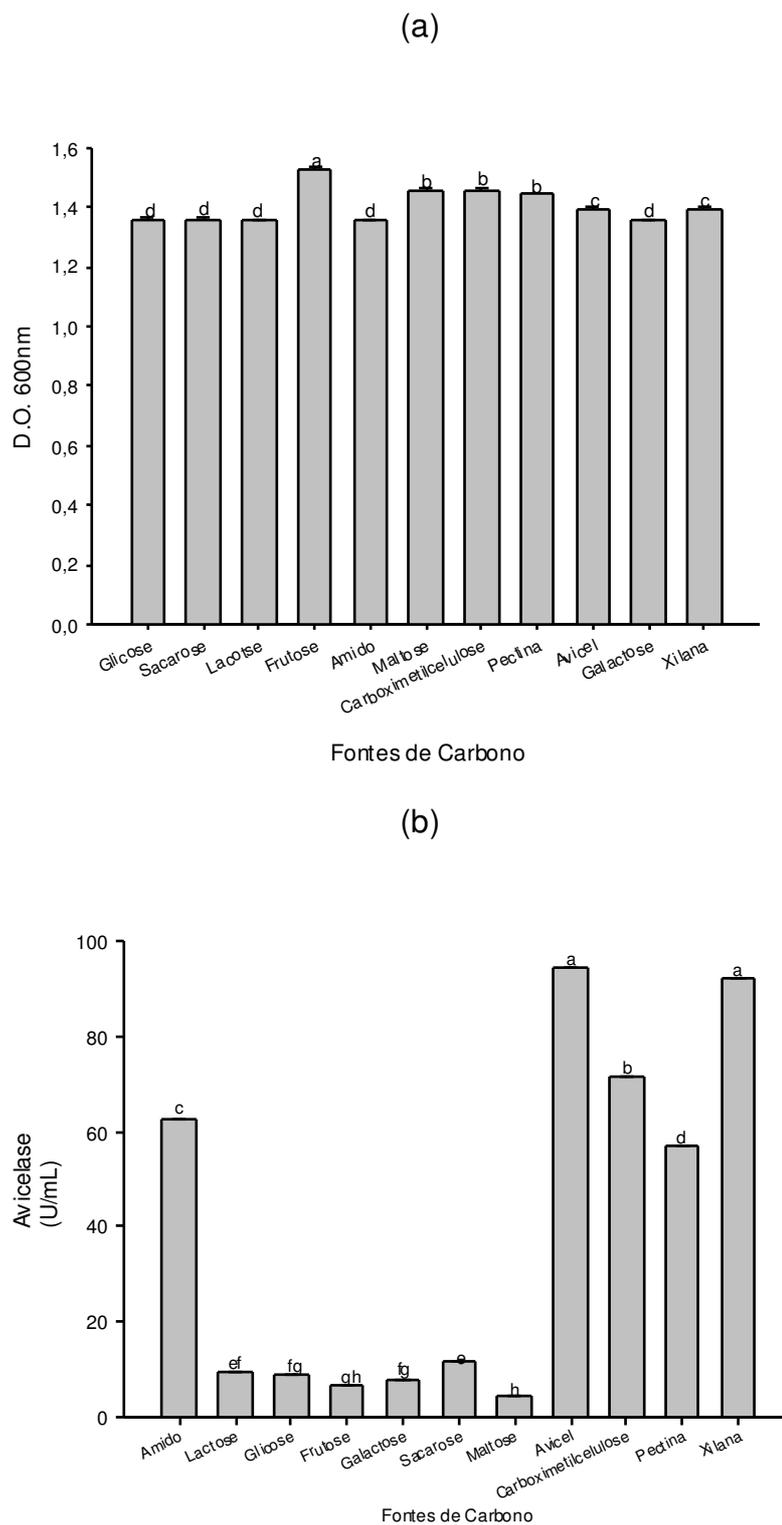
A Figura 1 mostra o crescimento, pH do meio e a atividade de avicelase em culturas líquidas de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo avicel (0,5% p/v) como principal fonte de carbono e suplementada com água de maceração de milho (0,5% p/v). A máxima atividade da avicelase foi atingida no tempo de 120 horas de incubação da cultura, com níveis de 85,64 U/mL e em seguida começou a cair. Isto sugere que a produção da avicelase está diretamente ligada à cultura metabolicamente ativa. O crescimento exponencial do microrganismo foi iniciado logo após a incubação da cultura, finalizando após aproximadamente 36h de incubação. A partir deste tempo a velocidade de crescimento foi reduzida e a cultura entrou na fase estacionária.



**Figura 1.** Crescimento, pH e atividade de avicelase em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp. SMIA-2 em avicel (0,5% p/v) e água de maceração de milho (0,5% p/v) com pH inicial de 7,5 a 50 °C e 150 rpm.

O pH do meio aumentou com o início do crescimento microbiano e atingiu cerca de 8,9 no final da fermentação. Devido à relação entre a síntese de avicelase e a utilização de compostos nitrogenados a variação do pH é útil para a monitorização da secreção da avicelase durante a fermentação.

*Bacillus* sp SMIA-2 foi capaz de usar uma variedade de fontes de carbono, mas a atividade da avicelase variou de acordo com cada fonte (Figura 2). A avicel, carboximetilcelulose e xilana foram as melhores fontes de carbono no presente estudo para a secreção da avicelase, enquanto que em hidratos de carbono facilmente metabolizáveis como a glicose, frutose, lactose e sacarose foram produzidos apenas níveis constitutivos de avicelase. Uma boa quantidade de avicelase foi produzida na presença de amido e pectina.



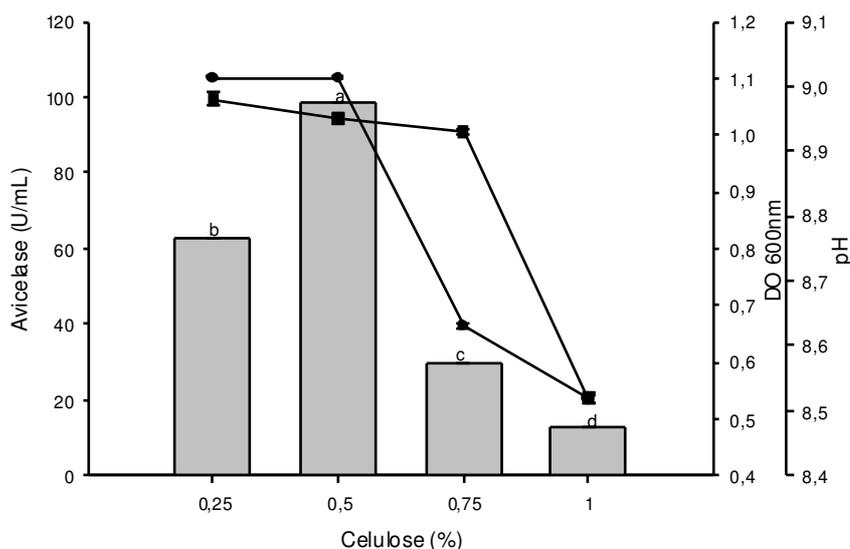
**Figura 2.** Crescimento (a) de *Bacillus* sp. e atividade (b) da avicelase usando diferentes fontes de carbono. A densidade ótica da cultura e a atividade da avicelase foram determinadas com 120 h de incubação a 50 °C e em pH inicial 7,5. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem celulasas e carboximetilcelulasas (CMCase) na presença de avicel, variando a atividade de 7,3 a 9,1 UI/mL. Alguns genes que codificam celulasas nestes microrganismos já foram clonados e seqüenciados (Mawadza et al., 2000).

Walter e Schrempf (1996) mostraram que entre as fontes de carbono testadas, só a celulose cristalina induziu a síntese de avicelase. Glicose e outras fontes de carbono, facilmente metabolizáveis, reprimiram a síntese avicelase. Além disso, foi encontrado que a Carboximetilcelulose foi uma boa fonte de carbono para estimular a produção de celulasas por *Streptomyces transformans* T3-1, enquanto que a glicose não teve efeito significativo estimulante.

Por outro lado, de acordo com Susumu (1997), espécies do gênero *Bacillus* normalmente requerem carboximetilcelulose para a produção de celulasas, mas a celulase de *Bacillus* sp. KSM-635 foi produzida quase constitutivamente, em termos de quantidade, em hidratos de carbono diferentes, e aparentemente nenhum padrão foi observado em relação à estrutura ou composição da fonte de carbono utilizada. Segundo Arijit-Das (2010), a melhor fonte de carbono para induzir a produção de celulasas por uma cepa de *Bacillus* sp. termofílico foi a carboximetilcelulase.

O aumento da concentração de avicel no meio de cultura até 0,5% (p/v) estimulou o crescimento do microrganismo e a atividade da enzima. Em concentrações mais altas de avicel, a atividade da enzima foi comparativamente menor (Figura 3).



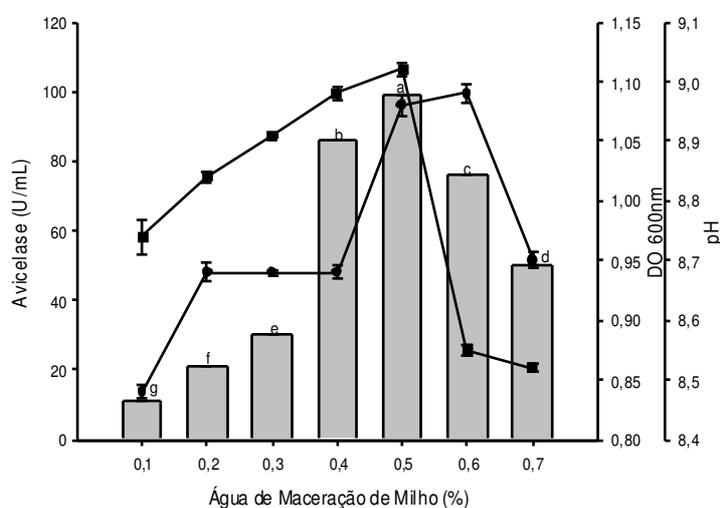
**Figura 3.** Efeito da concentração de celulose (a) e da concentração da água de maceração de milho (b) sobre o crescimento (●), o pH (■) do meio e da atividade (■) da avicelase de *Bacillus* sp SMIA-2, que foram cultivados em meio líquido em frascos agitados em pH inicial de 7,5 e 50 °C por 120h. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A fim de encontrar o nível ideal da concentração da água de maceração de milho, para a secreção da avicelase, suas concentrações foram variadas no meio de cultura. A atividade da enzima, o pH do meio e o crescimento do microrganismo aumentou à medida que a concentração da água de maceração de milho foi também aumentada até 0,5% (p/v). A partir desta concentração a atividade da avicelase foi reprimida e o pH do meio decresceu (Figura 4).

O aumento da disponibilidade de nitrogênio no meio, geralmente por meio da adição de extrato de levedura, aumentou a produção de celulases por outras estirpes, incluindo espécies de *Bacillus* (Yasser et al., 2007). No presente experimento, a suplementação do meio de cultura com água de maceração de milho, estimulou a formação de compostos prontamente metabolizáveis, que podem ser utilizados para o crescimento do microrganismo e formação de avicelase.

A água de maceração do milho, resultante do processamento dos grãos de milho, é um subproduto rico em aminoácidos, peptídeos, em vitaminas, especialmente do complexo B e minerais, além de ser de baixo custo. Kona et al. (2001); Burkert et al. (2004) e Lee et al. (2001); sugerem a utilização da água de maceração de milho para a redução do custo do meio de cultura utilizado para o crescimento e produção de enzimas por microrganismos.

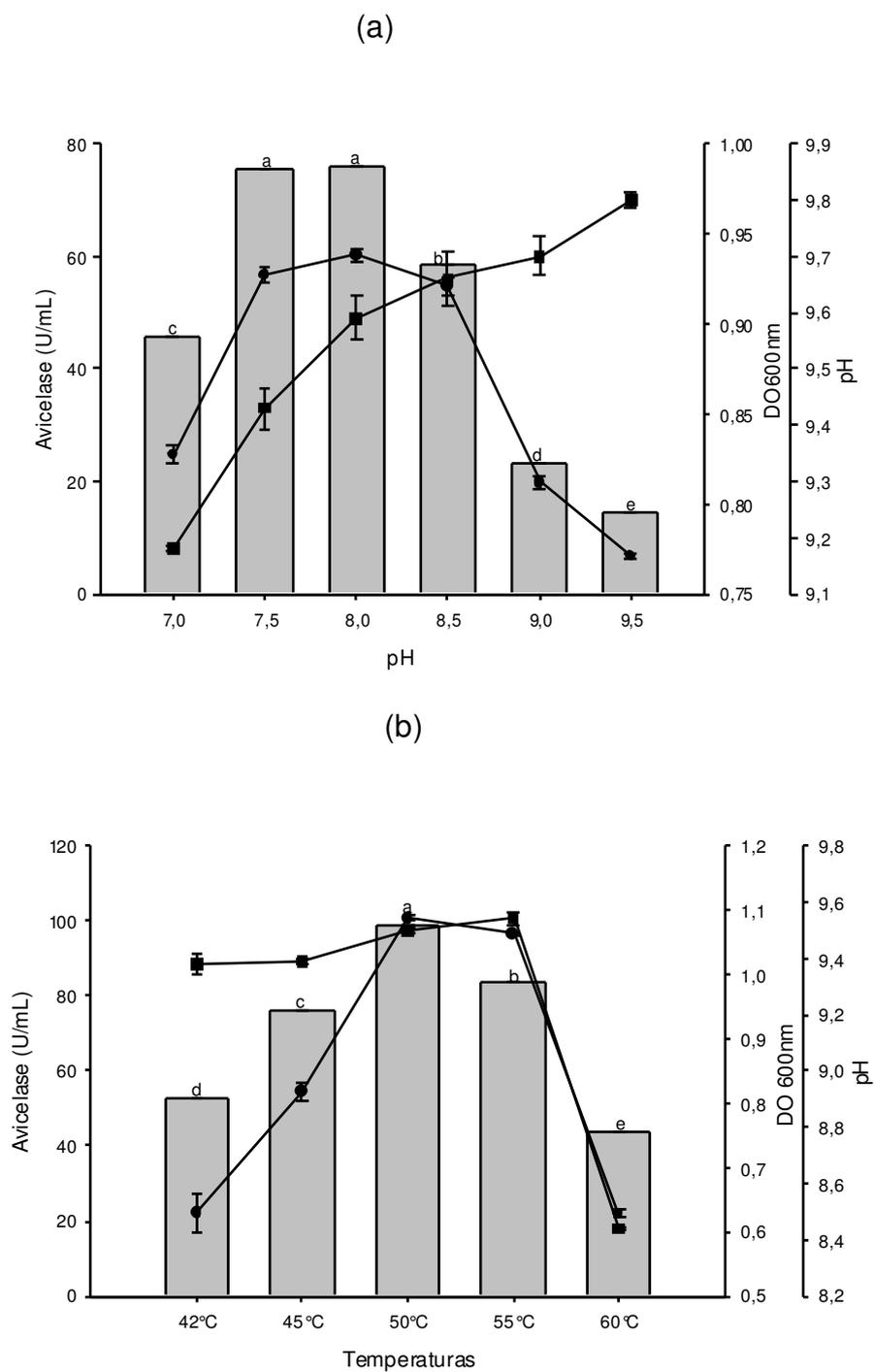
Portanto, a utilização de avicel e a suplementação com água de maceração de milho, é uma alternativa interessante para a produção de avicelase por *Bacillus* sp.SMIA-2.



**Figura 4.** Efeito da concentração de celulose (a) e da concentração da água de maceração de milho (b) sobre o crescimento (●), o pH (■) do meio e da atividade (■) da avicelase de *Bacillus* sp SMIA-2, que foram cultivados em meio líquido em frascos agitados em pH inicial de 7,5 e 50 °C por 120h. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

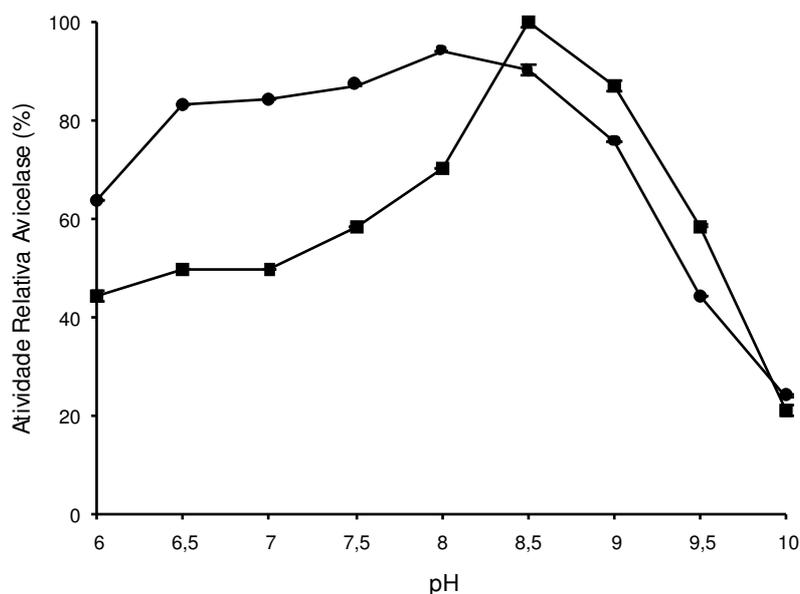
A atividade da avicelase variou de acordo com pH inicial do meio de cultura (Figura 5a). Os maiores níveis de crescimento e atividade enzimática foram encontrados em culturas cultivadas em pH 7,5-8,0. A secreção desta enzima foi máxima a 50 °C (Figura 5b) e foi menor nas temperaturas de 60 °C e 42 °C, que foram as temperaturas extremas estudadas. Zhang (2004) e colaboradores

encontraram valores de pH 10,5 para a produção de celulases para linhagem de *Bacillus* sp.



**Figura 5.** Efeito do pH inicial do meio (a) e da temperatura de incubação (b) sobre o crescimento (●), o pH (■) do meio e da atividade (■) da avicelase de *Bacillus* sp, que foram cultivados por 120 horas em frascos agitados contendo meio de crescimento. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

O efeito do pH inicial na atividade e na estabilidade da avicelase foi avaliado na faixa de pH entre 6,0 e 10,0 (Figura 6). O pH ótimo encontrado foi 8,5. A partir deste valor a atividade reduziu. A atividade da enzima em pH 6,0 e pH 9,5 foi de 43% e 58% do valor observado em pH 8,5, respectivamente.



**Figura 6.** pH ótimo (■) e estabilidade (●) da avicelase produzida por *Bacillus* sp, cultivado a 50 °C por 120 horas em frascos agitados contendo meio de crescimento. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do valor máximo (100% da atividade da enzima U / mL= 89,95).

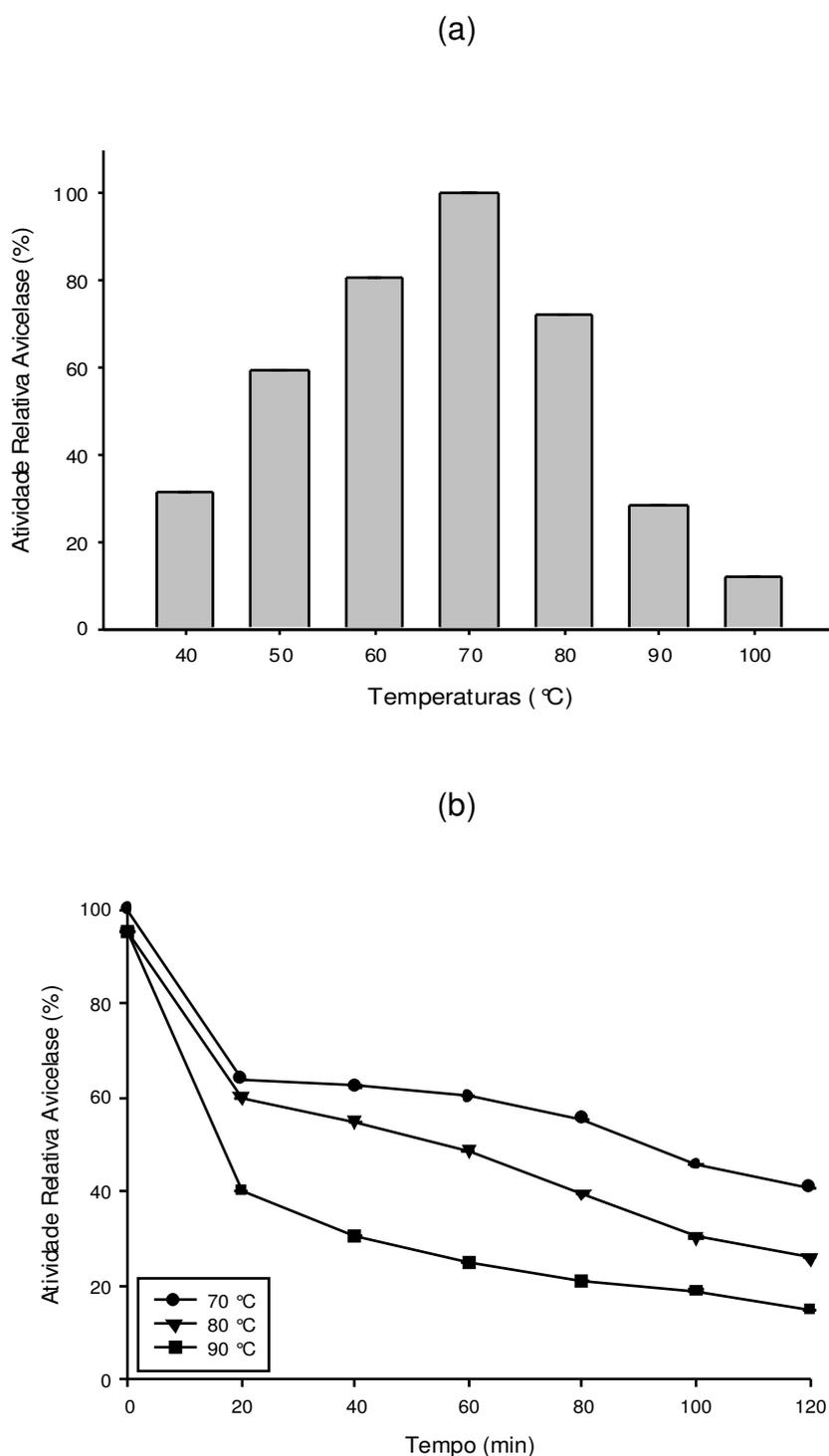
A estabilidade da avicelase aumentou à medida que os valores do pH também aumentaram, sendo que em pH 8,0 a enzima manteve 92% de sua atividade após 2 horas de incubação. Já em pH 10 cerca de 84% da atividade enzimática foi perdida. Assim, a avicelase de *Bacillus* sp. cepa SMIA-2 parece ser ativa em uma ampla faixa de pH.

A avicelase produzida por um *Bacillus* sp. CH43 apresentou atividade ótima na faixa de pH de 5-7, enquanto que a enzima da cepa HR68 foi em pH 5-6,5, com a maior atividade em pH 6,5 para ambas as enzimas em tampão fosfato (Mawadza et al., 2000). A avicelase de *Geobacillus stearothermophilus* mostrou um pH ótimo de 7,0 e exibiu boa estabilidade na faixa de pH entre 5-8 (Makky, 2010). As celulases usadas em detergentes são produzidas ou por espécies de

*Bacillus* ou por fungos do gênero *Humicola*. Essas celulases possuem pH ótimo de ação próximo a 7,0, apesar de apresentar certa tolerância a valores de pH mais elevados. Segundo trabalho realizado por Silva (2009) com o microrganismo *Scytalidium thermophilum* maior o pH ótimo para a atividade da avicelase foi 6,0.

A temperatura ótima da avicelase foi determinada medindo-se a atividade desta enzima em temperaturas variando de 40 -100 °C e a pH 8,5 (Figura 7a). A atividade enzimática aumentou até temperaturas entre 50 °C e 70 °C. A redução da atividade da enzima foi observada em valores acima de 70 °C. A temperatura ótima desta enzima foi 70 °C, que foi maior ou semelhante ao descrito para outras avicelases de *Bacillus* (Mawadza, 2000). Segundo trabalho realizado por Silva (2009) com o microrganismo *Scytalidium thermophilum* maior a temperatura ótima foi de 60 °C.

A termoestabilidade da avicelase foi determinada incubando-se a enzima na ausência de substrato, nas temperaturas de 70 °C, 80 °C e 90 °C por 2 horas e medindo-se a atividade residual a 70 °C. A enzima manteve 59% e 40% da atividade original após 20 minutos de incubação a 80 °C e 90 °C, respectivamente (Figura 7b).



**Figura 7.** Temperatura ótima (a) e a estabilidade (b), da avicelase produzida por *Bacillus* sp SMLA-2 cultivado a 50 °C por 120 h (100% da atividade da enzima 95,39 = U / mL).

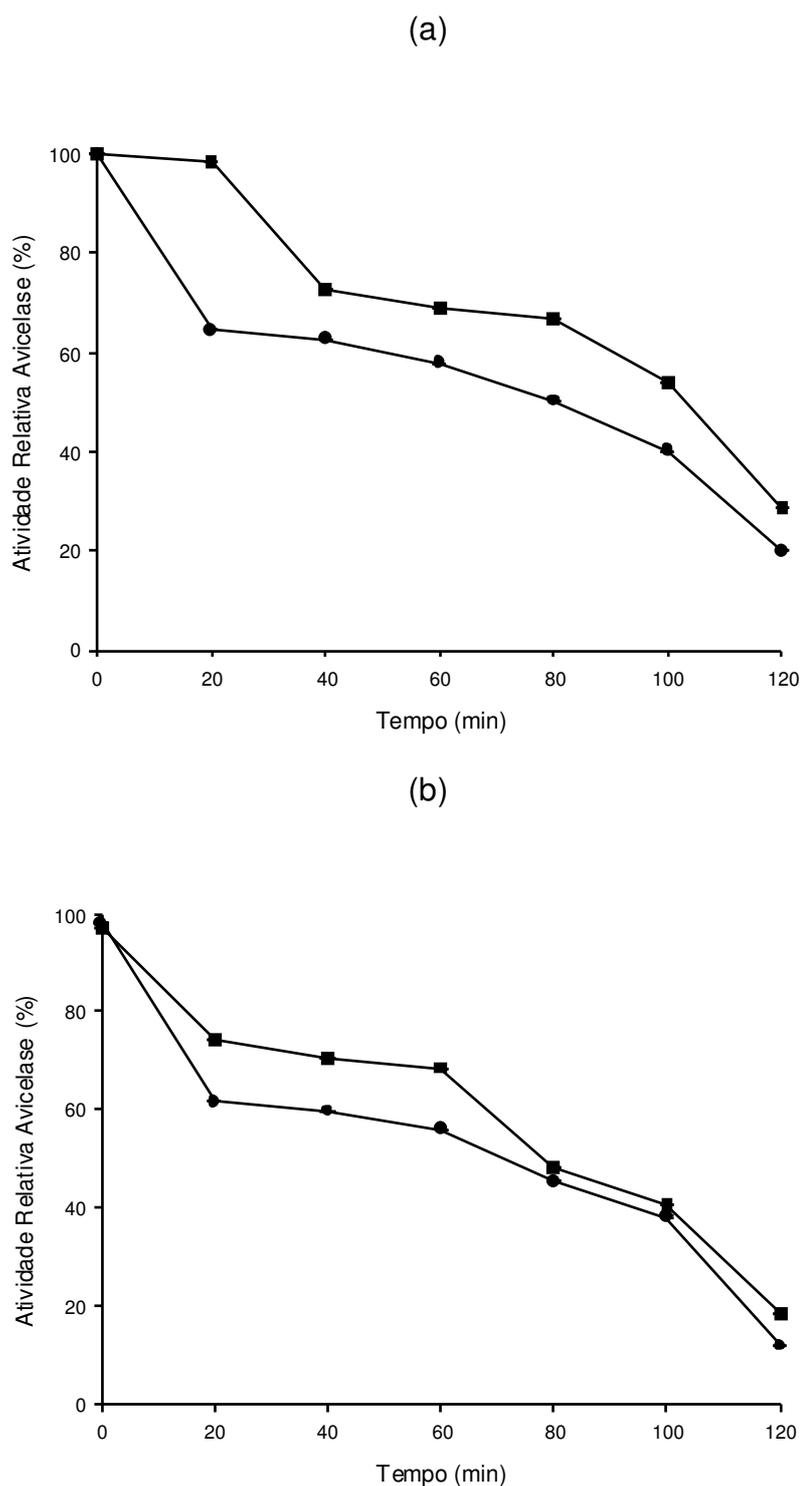
A avicelase produzida pelo *Geobacillus stearotherophilus* teve atividade máxima a 50 °C, quando este microrganismo foi cultivado em bagaço de cana.

Além disso, a enzima apresentou boa estabilidade na faixa de temperatura de 30 a 80 °C, quando foi utilizado o bagaço de cana. Um *Bacillus* sp. isolado de fontes de água quente tem sido utilizado para produzir celulasas termoestáveis, no entanto, a celulase secretada por essa bactéria perdeu 30% de atividade dentro de 30 minutos de incubação a 70 °C (Li et al. 2008). Outro estudo mostrou que *Bacillus* sp. reteve apenas 30% da atividade da celulase quando incubada a 100 °C por 10 min (Makky, 2009).

Celulasas produzidas pela bactéria termofílica e celulolítica *Anoxybacillus* sp. 527 demonstraram boa atividade entre temperaturas de 50 a 70 °C com máxima atividade a 70 °C. Embora as atividades tenham sido drasticamente reduzidas a 80 °C, 25% do potencial máximo celulolítico foi ainda retido até mesmo a 100 °C, tornando estas enzimas muito promissoras para a engenharia genética de proteínas, a fim de melhorar sua tolerância para a degradação de celulose a altas temperaturas (Liang et al., 2010).

O efeito do cálcio na atividade da avicelase foi determinado incubando-se a enzima a 70 °C e a 80 °C por 2 horas na presença deste íon na concentração de 10mM, seguido da determinação da atividade enzimática residual (%) na temperatura ótima (70 °C). Um controle, conduzido na ausência do cálcio, foi também feito e considerado como sendo 100% da atividade da enzima. De acordo com os resultados mostrados na Figura 8, o cálcio aumentou a estabilidade da enzima em ambas as temperaturas estudadas, sendo este aumento mais pronunciado para a temperatura de 70 °C. A atividade da avicelase após 20 minutos de incubação a 70 °C e a 80 °C na presença do cálcio foi 34% e 13% maior que na ausência deste íon, respectivamente.

Trabalhos realizados sobre o efeito de metais na atividade de celulasas são encontrados com muita frequência na literatura. Jonvesly e Naik (2001) observaram que a avicelase produzida por *Bacillus* JB-99 foi estimulada na presença de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . Avicelases de *Bacillus brevis* também foram estimuladas por acetato de cálcio,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MnSO}_4$  (Virupakshi et al., 2005).



**Figura 8.** Estabilidade da avicelase produzida por *Bacillus* sp SMIA-2 a 70 °C (a) e a 80 °C (b), na presença (■) e ausência (●) de cálcio (10mM), cultivado a 50 °C por 120h (100% da atividade enzimática = 98,97 U/mL).

De acordo com Gupta et al. (2003), os íons cálcio têm sido reconhecidos como estabilizadores de enzimas em elevadas temperaturas, além de

contribuírem para o aumento da estabilidade térmica de algumas enzimas. De acordo com os autores, o papel do cálcio na estabilização enzimática está ligado à manutenção da conformação do sítio ativo da enzima em elevadas temperaturas. Vários pesquisadores (Ghorbel et al., 2003; Gupta, 2003; Singh et al., 2001) têm demonstrado que a adição de metais ao extrato bruto de algumas enzimas, promove o aumento da termoestabilidade das mesmas. Geralmente ligantes de  $\text{Ca}^{+2}$  se ligam aos grupos carboxílicos de asparagina e glutamina e essas ligações aumentam a termoestabilidade das cadeias polipeptídicas por redução de sua flexibilidade (Ward e Young, 1998).

#### 4. CONCLUSÕES

*Bacillus* sp. SMIA-2 secretou avicelase quando cultivado em um meio contendo avicel como principal fonte de carbono e suplementado com a água de maceração de milho. A maior atividade da enzima foi observada com 120 h de incubação da cultura.

A concentração da celulose microcristalina e da água de maceração de milho que proporcionaram a obtenção de maiores níveis de atividade da avicelase foi 0,5 e 0,5% (p/v), respectivamente.

As maiores atividades da avicelase foram obtidas quando o pH inicial do meio e da temperatura de incubação foi 7,5 – 8,0 e 50° C, respectivamente.

Os estudos de caracterização da avicelase revelaram que a enzima possui temperatura e pH para atividade ótima de 70° C e 8,5, respectivamente. A enzima manteve 98% e 74% de atividade quando incubada a 70 e 80 °C por 20 min, respectivamente. A incubação da enzima na presença do íon cálcio aumentou a atividade da enzima.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, Y.R.; El-Helow, E. R.; Ghanem, K.M.; Lotfy, W.A. (2007) Application of factorial designs for optimization of avicelase production by thermophilic *Geobacillus* isolate. *Research Journal of Microbiology*, 2(1): 13-23.
- Arijit-Das, S. (2010) Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from cow dung. *Agric. e Environ. Sci.* 8(6) 685-691.
- Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. *Bioresource Technology*. p. 77-84.
- Costa Neto, P.R. ; Rossi, L.F.S. ; Zagonel, G.F. ; Ramos, L.P. (2000) Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v.23, n.4, p. 531-537.
- Ghorbel, B., Kamoun, A. S.; Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 32, p. 513-518.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. Chauhan, B. (2003) Microbial  $\alpha$ -amylases: abiotecnological perspective. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 1599-1616.
- Howard R. L. et al. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, Toronto, v. 2, p. 602 - 19.
- Huang. X.P. e Monk, C. (2004) Purification and characterization of cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. Nov. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 85-92.
- Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M.L.; Penttillä, M.E. (1997) Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 63:1298–1306.
- Ito, S. (1997) Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles*, vol. 1, 61-66.
- Jang, H. D.; Chen, K.S. (2003) Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 263–268.
- Klyosov, A. A.(1990) Trends in Biochemistry and Enzymology of Cellulose Degradation. *Biochemistry*, Vol. 29, No. 47,p.10577-10585.

- Kona, R.P., Qureshi, N., Pai, J.S. (2001). Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*. p. 123-126.
- Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. (1993) The *Trichodema reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb Technol* 15:90–99.
- Lee, D. W.; Kim, H. W.; Lee, K.W.; Kim, B. C.; Choe, E. A; Lee, H.S.; Kim, D. S.; Pyun, Y. R. (2001) Purification and characterization of two thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 29, p. 363-371.
- Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J., Blackburn, J.W. (2010) Optimization of Growth Medium and Enzyme Assay Conditions for Crude Cellulases Produced by a Novel Thermophilic and Cellulolytic Bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Applied Biochemistry Biotechnology*. V. 60, p. 1841–1852.
- Lynd, L. R.; Weimwr, 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. v. 66, n.3, p. 506-577.
- Mach, R.L.; Zeilinger, S. (2003) Regulation of gene expression in industrial fungi: trichodema. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:515–522.
- Mahmood, A.U; Greenman, J; Scragg, A.H. (1998). Orange and potato pell extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial and Technology*, New York, vol. 22, n.1, p. 130-137.
- Makky, E. A. (2009) Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse World Academy of Science, *Engineering and Technology* 57.
- Mawadza, C. (2000) Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, Netherlands, v. 83, p. 177 - 87.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Biochem* 31:426–428.
- Nunes, A. S., Martins, M. L. L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazillian Journal of Microbiology*, 32:271-275.

- Silva, D. M., Dillon, A. J. P. (1988) Produção de celulases em fermentação semi-sólida por uma linhagem de *Trichoderma* SP In: *Reunião anual de genética de microrganismos*, 15., 1988. Anais. Piracicaba : FEALQ. p. 54.
- Singh, J.; Batra, N. e Sobti, R.C. (2004) Purification and characterization of alkaline cellulose produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JSI. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 31: 51-56.
- Singh, J.; Batra, N.; Sobti, R.C. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. V. 17, p. 761–765, 2001.
- Takami, H. e Horokoshi, K. (2000). Analysis of the genome of an alkaliphilic *Bacillus* strain from an industrial point of view. *Extremophiles*, 4:99-108.
- Virupakshi, S.; Babu, K.G.; Gaikwad, S.R. and Naik, G.R. (2005) Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochemistry* Volume 40, Issue 1, pg. 431-435.
- Walter, S. e Schrempf, H. (1996) Estudos fisiológicos de celulase (avicelase) Síntese de *Streptomyces retícula*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, n.3, p. 1065-1069.
- Wang, Feng Qin, Wang, En Tao, Liu, Jie, Chen, Qiang, Sui, Xin Hua, Chen, Wen Feng, Chen, Wen Xin. (2007) *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1192-1199.
- Ward, O. P.; Young, M. M. Thermostable Enzymes. *Biotechnology Adv.* V. 6, p. 39-69, 1988.

### **3.2. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CELULOSE, DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DA FONTE DE NITROGÊNIO NA SÍNTESE DE AVICELASE PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2**

#### **RESUMO**

Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur, Meire Leis Leal Martins  
Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)/ Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias (CCTA)/ Laboratório de Tecnologia de Alimentos  
(LTA). Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califómia, Campos dos Goytacazes, RJ-  
Brasil, 28013-602.

A atividade Avicelase pelo termofílico *Bacillus* sp. cepa SMIA-2 cultivado em meios líquidos contendo avicel como principal fonte de carbono e suplementado com água de maceração de milho atingiu um máximo com 120 h de fermentação, apresentando níveis de 94,67 U / mL. A influência de diferentes fontes de celulose sobre a atividade enzimática foi investigada substituindo o avicel do meio por carboximetilcelulose, xilana e bagaço de cana. Verificou-se que carboximetilcelulose e xilana foram bons indutores para a síntese de avicelase. Foram realizados estudos sobre a secreção da avicelase por *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando bagaço de cana tratado e não tratado com Ca (OH)<sub>2</sub> a 50 ° C. De acordo com os resultados obtidos a atividade máxima da enzima foi exibida com

bagaço de cana tratado. Dentre as fontes nitrogenadas utilizadas, a atividade enzimática máxima foi obtida com peptona 0,5% (p / v) no meio.

Palavras-chave: Avicelase, bactéria termofílica, *Bacillus* sp, bagaço de cana-de-açúcar.

## ABSTRACT

### **INFLUENCE OF CELLULOSE SOURCE, SUGAR-CANE BAGASSE, AND NITROGEN SUPPLY IN SYNTHESIS AVICELASE BY THERMOPHILIC *Bacillus* sp. SMIA-2**

Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur, Meire Lelis Leal Martins

Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)/ Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA)/ Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA). Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil, 28013-602.

Avicelase production by thermophilic *Bacillus* sp strain SMIA-2 cultivated in containing avicel as main carbon source and supplemented with corn steep liquor reached a maximum at 120 h, with levels of 94,67 U/mL. The influence of the different cellulose sources on enzyme activity was investigated replacing the avicel in the medium by carboxymethylcellulose, xylan and sugar-cane bagasse. It was found that carboxymethylcellulose and xylan were good inductor of the synthesis of avicelase, since higher levels of activity of this enzyme were obtained. Studies were carried out on the comparative study of the production of avicelase enzyme using sugar-cane bagasse in two different statuses (i.e. treated and untreated with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  by thermophilic *Bacillus* sp SMIA-2 at 50°C. According to the results obtained the maximal enzyme activity was exhibited with treated sugar-cane bagasse (TSCB) in comparison with the results obtained from untreated sugar-cane bagasse (NTSCB). So, the TSCB was enhancing the Avicelase production. Among the various nitrogen sources used, the maximum enzyme activity was obtained when 0.5% (p/v) peptone was used in the medium.

Key-words: Avicelase, thermophilic bacterium, *Bacillus* sp, sugar-cane bagasse.

## 1. INTRODUÇÃO

Celulases constituem um grupo de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar celulose microcristalina. Essas enzimas são produzidas por microrganismos, plantas e animais e são usualmente referidas como complexo celulase constituído de várias enzimas distintas:  $\beta$ -1,4-endoglicanase (EC 3.2.1.4),  $\beta$ -1,4-exoglicanase, que são representadas pelas celobioidrolases (EC 3.2.1.91) e glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) e o grupo representado pelas  $\beta$ -1,4-glicosidases (EC 3.2.1.21) (Lynd et al., 2002). As carboximetilcelulases ( $\beta$ -1,4-endoglicanase) clivam as ligações das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres. Já as avicelases (exoglicanases) agem de maneira progressiva em extremidades reductoras ou não-reductoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos. Por outro lado, as  $\beta$ -glicosidases atuam nos resíduos de celobiose liberados e os hidrolisam a glicose (Phillipidis e Smith, 1995; Teeri, 1997; Bisaria e Ghose, 1981; Zeilinger et al., 2000; Lee et al., 2002; Lynd et al. 2002; Howard et al., 2003).

A produção de celulases por microrganismos é dependente da regulação por mecanismos genéticos e bioquímicos. Os baixos níveis de celulases são produzidos constitutivamente, mas sua síntese pode ser induzida por celulose e seus derivados (Sreenath et al., 2001). Tem sido verificado que os verdadeiros indutores de celulases são os produtos da hidrólise inicial. Estes açúcares resultantes agiriam como verdadeiros indutores, direta ou indiretamente, influenciando a ligação de proteínas ao DNA promovendo assim, a expressão dos genes para celulases. A presença de substratos facilmente assimiláveis, a repressão catabólica, o acúmulo do produto final ou fontes de carbono restritas podem inibir a síntese dessas enzimas (Huang e Forsberg, 1987).

As celulasas possuem uma grande área de aplicação, como na indústria de alimentos, cervejas e vinhos, alimentação de animais, têxtil, polpa e papel, assim como na agricultura e em pesquisas (Bhat, 1997).

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem celulasas e carboximetilcelulasas na presença de celulose microcristalina. Alguns genes que codificam celulasas nestes microrganismos já foram clonados e seqüenciados (Mawadza et al., 2000). Essas bactérias são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS). (Mahmood et al., 1998).

A escolha de um substrato apropriado, geralmente, constitui o primeiro passo na otimização de um processo fermentativo, além de ser, de grande importância para obtenção de elevada produção enzimática. O substrato, além de ser fonte de carbono, fornece para o microrganismo diversos compostos indutores de crescimento e enzimático que agem por um prolongado período, propiciando uma extensão da fase de formação de produtos, que pode resultar em um aumento da produtividade do processo fermentativo (Haltrich et al., 1996; Kulkarni et al., 1999).

O custo das enzimas é o principal fator que determina a viabilidade econômica de um processo biocatalítico. Assim, o conhecimento dos mecanismos regulatórios de produção enzimática e das condições ótimas para obtenção do produto é necessário para que se possa dar um enfoque racional na produção, com redução de custos (Bajpai, 1997).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer a melhor fonte de celulose para a indução da avicelase pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2. Foram avaliadas fontes de celulose puras e também resíduos agrícolas ou agroindustriais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1. Microrganismo:** O microrganismo usado nesse estudo foi uma bactéria termofílica, *Bacillus* sp cepa SMIA-2 (Souza e Martins, 2001), previamente isolada

de amostras de solo coletadas na cidade de Campos dos Goytacazes, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) Rio de Janeiro, Brasil.

**2.2. Manutenção do microrganismo:** O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio TSY (triptona 20 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; ágar 20 g/L e água 1 L), sob temperatura de refrigeração (7 °C).

**2.3. Meio de crescimento:** O meio de cultura usado para o crescimento e produção de avicelase continha (g/L): Avicel (Celulose microcristalina - Sigma) 5,0; água de maceração de milho 5,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO<sub>4</sub> 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,87; CaCl<sub>2</sub> 0,29; ZnO- $2,03 \times 10^{-3}$ ; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O- $2,7 \times 10^{-2}$ ; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O- $1,0 \times 10^{-2}$ ; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O- $8,5 \times 10^{-5}$ ; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O- $2,4 \times 10^{-3}$ ; NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O- $2,5 \times 10^{-4}$  e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>- $3,0 \times 10^{-4}$ .

O meio acima foi preparado utilizando água destilada e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O pH final foi ajustado para 7,5 com NaOH 1,0 M, antes da esterilização.

**2.4. Crescimento do microrganismo:** Para o preparo do inóculo o microrganismo foi semeado em placas de petri contendo o meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50 °C por 18 horas. Após este período, 10 mL do meio de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 25mL do meio de cultura descrito anteriormente no item 2.3, incubadas por mais 18 horas a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm, e posteriormente utilizadas para inocular o meio de crescimento. Esta cultura foi considerada o inóculo.

O meio de cultura foi inoculado com 2mL de uma cultura de véspera (inóculo) e incubado a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. A intervalos de tempos pre-determinados foram retiradas amostras para determinação do crescimento, pH e

da atividade enzimática. Todos os experimentos foram realizados com três repetições.

**2.5. Medida do crescimento:** A concentração celular foi medida pela turbidez do meio de crescimento. A turbidez foi medida em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 600 nm. Foi subtraído do valor obtido o valor de densidade ótica do meio puro (branco) e o resultado foi considerado o valor de densidade ótica relativo ao crescimento.

**2.6. Determinação do pH:** As variações dos valores de pH durante o crescimento celular foram determinadas utilizando-se o pHmetro da marca WTW pH 330.

## **2.7. Ensaio enzimático**

**2.7.1. Atividade da avicelase:** Amostras em triplicata (8 mL) foram centrifugadas em centrífuga CENTRIFUGE 5415 C à 4.500 rpm a 5 °C por 15 minutos para obtenção do extrato livre de células (sobrenadante). A atividade da avicelase foi determinada segundo técnica descrita por Ghose (1987), que consiste em conduzir a hidrólise de 1% (p/v) de celulose microcristalina (Avicel - Sigma) preparada em tampão Tris-HCl, pH 8,5. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL do extrato enzimático a 0,5 mL do substrato 1% (p/v) de celulose microcristalina (Avicel - Sigma) preparada em tampão Tris-HCl, pH 8,5 e procedendo a reação a 70 °C em banho-maria por 10 minutos. Após a incubação foi adicionado à mistura de reação 1 mL de DNS, e posteriormente colodado em água em ebulição por 10 minutos. A reação foi paralisada pela imersão das amostras em banho de gelo pela imersão dos tubos em banho de gelo. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de glicose, por minuto, por mL a 50 °C. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método descrito por Miller (1959). A coloração desenvolvida foi medida por espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão foi feita utilizando uma solução de glicose (Merck), nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L.

O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o reagente de Miller (DNS) foi adicionado juntamente com o sobrenadante e a solução de Avicel e esta mistura foi colocada em água em ebulição como descrito

anteriormente.

**2.8. Efeito de diferentes fontes de celulose no crescimento de *Bacillus sp. SMIA-2* e na atividade de avicelase:** A influência de diferentes fontes de celulose sobre o crescimento do microrganismo e sobre a atividade da avicelase foi estudada. O experimento foi desenvolvido, substituindo a avicel no meio de cultura pelas seguintes fontes 0,5%: carboximetilcelulose (Sigma), xilana (Sigma), bagaço de cana-de-açúcar e glicose.

O bagaço de cana utilizado neste trabalho foi fornecido pelos ambulantes da cidade de Campos dos Goytacazes, e em seguida foi levado ao laboratório onde foi primeiramente lavado com água destilada. Após a retirada da última água de lavagem, foi seco em desidratador marca Pardal em bandejas de tela à aproximadamente 70 °C por 48 horas. Em seguida foi triturado em moinho de facas tipo Wily, peneira 30 mesh, e peneirado em peneira de 60 mesh e estocado em saco plástico, sob refrigeração até o uso. Para facilitar o acesso das enzimas celulolíticas nas frações da celulose e hemicelulose, a farinha do bagaço foi submetida a um pré-tratamento com solução de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) 4%. Após o tratamento, o bagaço foi autoclavado a 121 °C por 30 minutos e após 12 horas de incubação do bagaço em presença do hidróxido de cálcio na temperatura ambiente, este foi filtrado e lavado com água destilada previamente à sua esterilização até pH neutro e seco em estufa (Fasanella. 2008).

As soluções contendo as fontes de carbono foram esterilizadas separadamente em autoclave a 121 °C por 15 minutos e adicionadas asepticamente ao meio de cultura. As culturas foram incubadas por um período de 168 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. Em intervalos de tempo determinados a densidade ótica, o pH e a atividade de avicelase foram determinados conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7. Foram feitas triplicatas para cada experimento.

**2.9. Efeito da glicose na síntese da avicelase:** O microrganismo foi cultivado por um período de 168 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm no meio de cultura contendo 0,5% (p/v) de avicel e suplementado com 0,5% (p/v) de água de maceração de

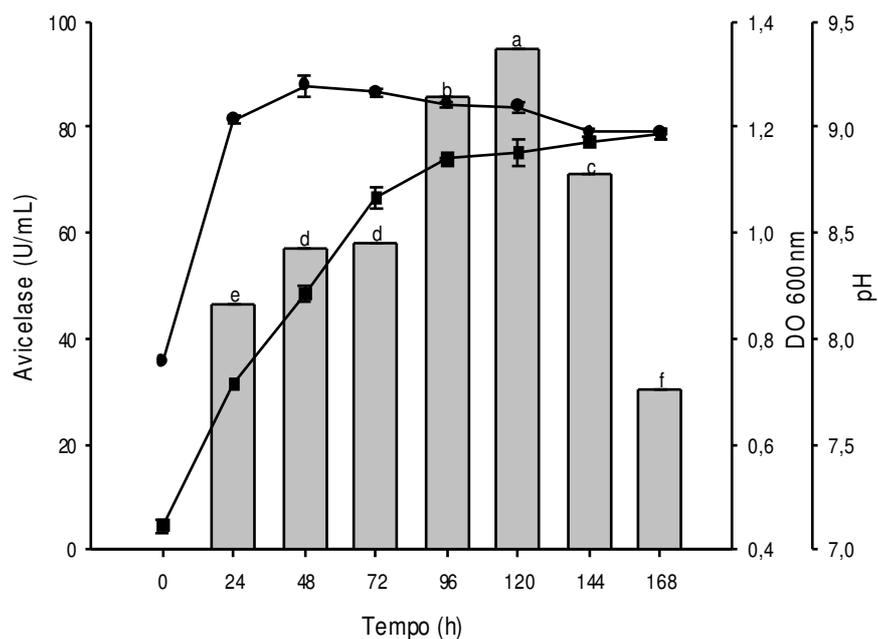
milho. Após 72 horas de incubação da cultura 0,5% (p/v) de glicose foi adicionada. A densidade ótica e o pH da cultura foram determinados em intervalos de tempo definidos, bem como determinada a atividade da avicelase nos filtrados da cultura, conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

#### **2.10. Efeito das diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 e na atividade de avicelase:**

A influência das fontes de nitrogênio sobre o crescimento e a atividade da enzima também foi avaliada. O experimento foi conduzido cultivando o microrganismo no melhor meio de cultivo contendo como principal fonte de carbono a avicel, acrescido individualmente as seguintes fontes de nitrogênio: peptona (0; 0,1 e 0,5%), extrato de levedura (0,5%), extrato de carne (0,5%), citrato de amônio (1%),  $\text{KNO}_3$  (1%),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1%),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1%) e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1%) . Os meios foram esterilizados em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos, então foram inoculados com 2 mL do pré-inóculo e incubados a  $50^\circ\text{C}$  por um período de 120 horas. Após este tempo a densidade ótica, pH e a atividade de avicelase foram dosados nos filtrados da cultura, conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7.

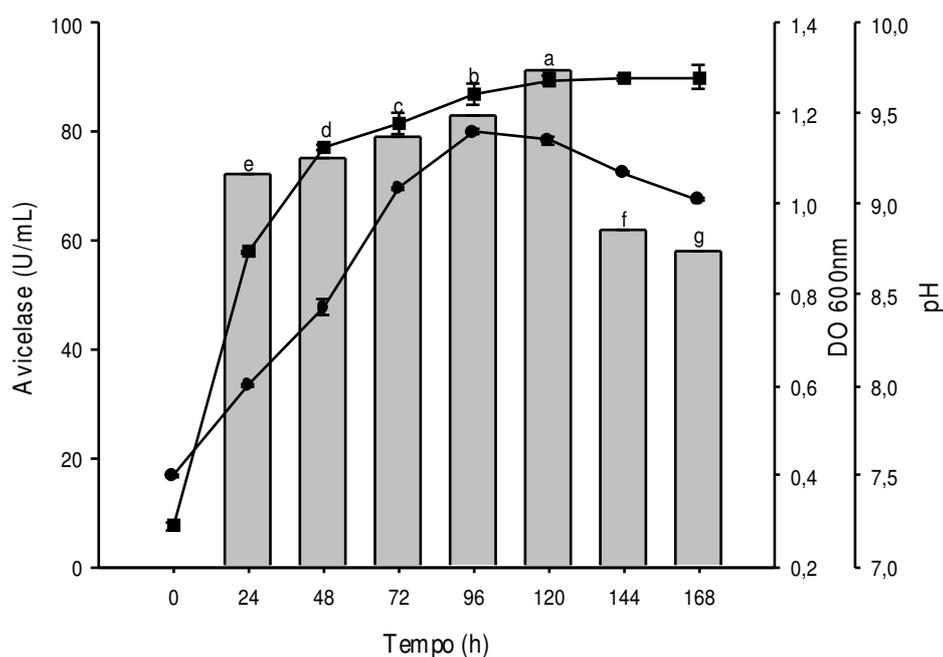
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O crescimento e a produção de avicelases por *Bacillus* sp SMIA-2 foram realizados utilizando-se inicialmente três diferentes fontes de celulose: Avicel, carboximetilcelulose e xilana. A atividade da avicelase, assim como a turbidez da cultura e o pH do meio foram avaliados em intervalos de tempo de 24 horas. A máxima atividade da avicelase foi observada após 120 horas de incubação da cultura, para todas as três fontes de celulose utilizadas. Quando foi utilizada avicel como fonte de celulose a máxima atividade da avicelase foi 94,67 U/mL (Figura 1). *Bacillus* sp foi inoculado no meio de cultura contendo as diferentes fontes de celulose com pH inicial de 7,5. Após 72h de incubação da cultura, os meios tornaram-se alcalinos, atingindo valores de pH de 9,0-9,5, no final do período de fermentação (Figura 1).



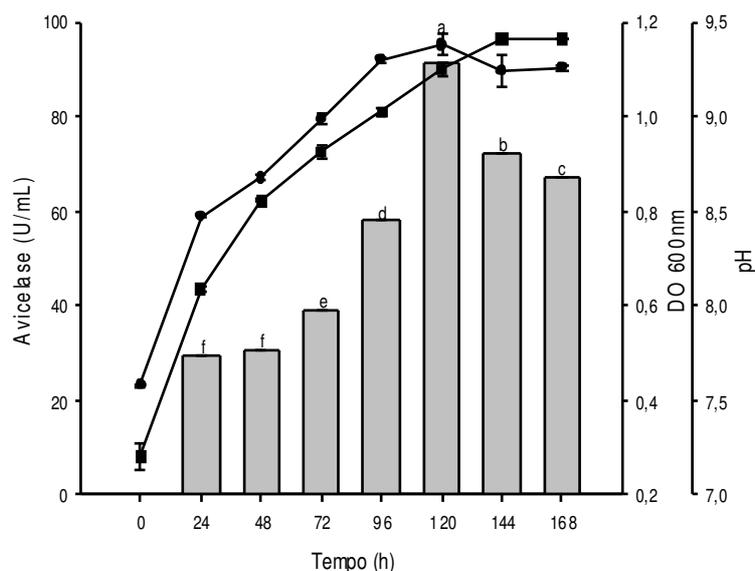
**Figura 1.** Crescimento (■), pH (●) do meio e atividade de avicelase (■) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) de avicel a 50 °C. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Quando foi utilizada carboximetilcelulose como a principal fonte de celulose a máxima atividade da avicelase foi 91,39 U/mL (Figura 2), podendo ser considerada também um bom indutor da síntese de avicelase por *Bacillus* sp SMIA-2.



**Figura 2.** Crescimento (■), pH (●) do meio e atividade de avicelase (■) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) carboximetilcelulose a 50 °C. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Quando foi utilizada xilana como a principal fonte de celulose a máxima atividade da avicelase foi 91,32 U /mL (Figura 3), podendo ser considerada também um bom indutor da síntese de avicelase por *Bacillus* sp SMIA-2.



**Figura 3.** Crescimento (■), pH (●) do meio e atividade de avicelase (■) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMIA-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) de avicel (a), carboximetilcelulose (b) e xilana (c) a 50 °C. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

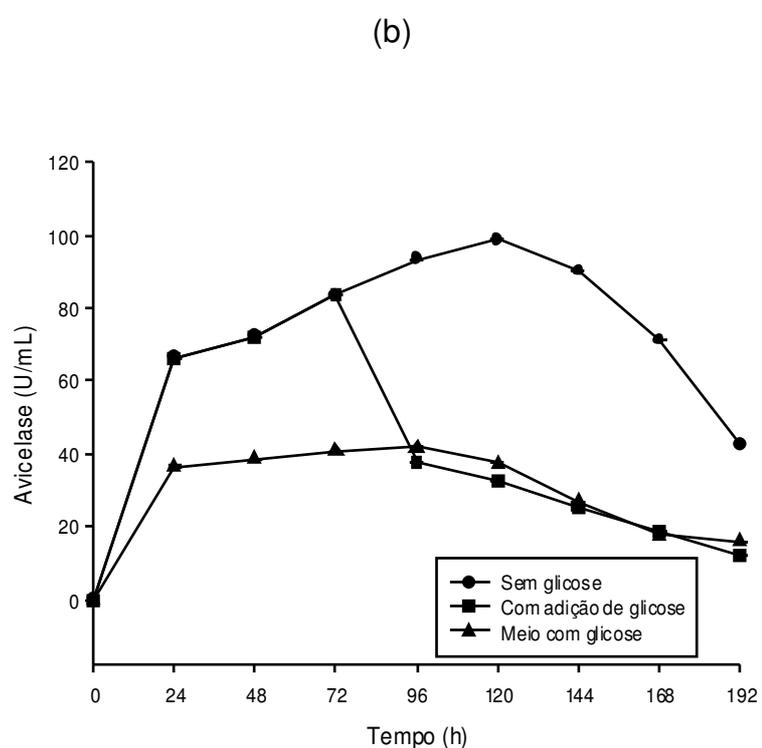
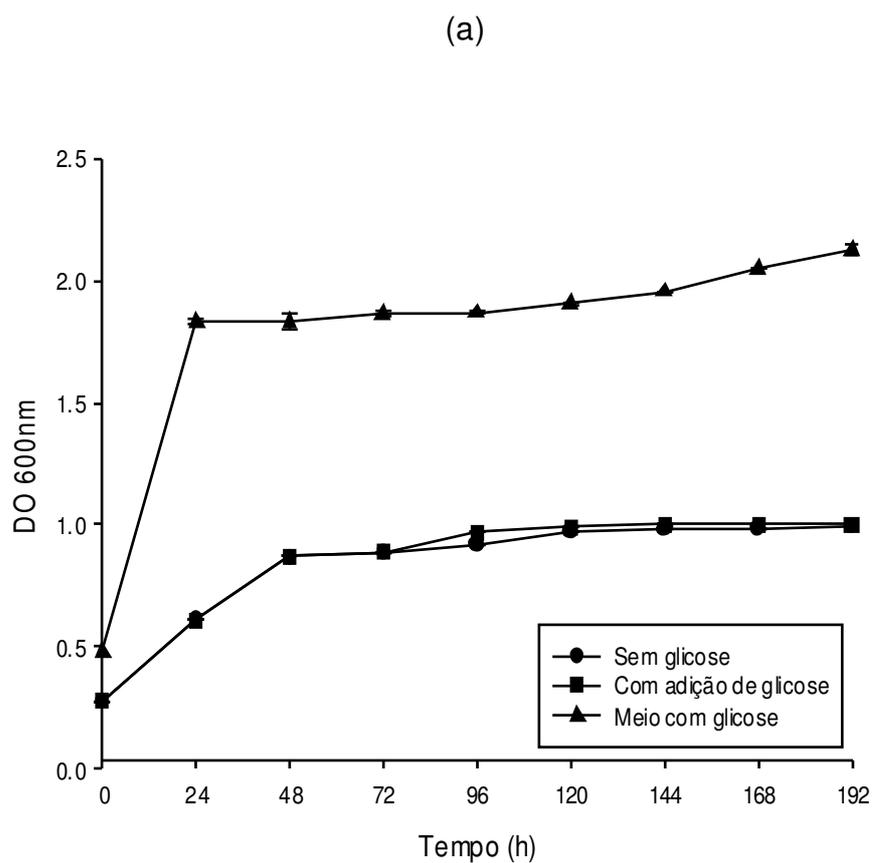
O aumento do pH pode ser atribuído à presença de altos níveis de compostos orgânicos (aminoácidos e peptídeos) desaminados (Ogel et al., 2001). Um aumento nos valores do pH do meio de 7,0 para 9,0, foi também observado em culturas de *Bacillus licheniformis* SVD1 contendo xilana. Este microrganismo secretou além de xilanase, avicelase, carboximetilcelulase, pectinase e manase no meio de cultura (Dyk et al., 2009). Mudanças no pH do meio também foram observadas durante o crescimento de *Scytalidium thermophilum* em materiais lignocelulósicos. O pH aumentou de 6,5 para cerca de 8,5-9,0 no final da fermentação. Entretanto, este aumento não foi observado quando a avicel foi utilizada como fonte de celulose, onde o pH sofreu uma ligeira flutuação, mas permaneceu em torno da neutralidade (Ogel et al., 2001). Estudos realizados com meios de cultura com diferentes valores de pH, revelaram que a síntese de avicelase é fortemente reprimida a valores baixos de pH (Walter e Schrempf, 1996).

O crescimento celular aumentou logo após a incubação do meio de cultura. A atividade máxima da avicelase foi alcançada no final da fase exponencial (cultura contendo xilana) e na fase estacionária de crescimento (cultura contendo avicel e carboximetilcelulose), sugerindo que a produção desta enzima está associada ao crescimento do microrganismo e que a mesma foi produzida, quando a cultura estava metabolicamente ativa.

A fim de avaliar os efeitos de repressão e indução de outras fontes não celulósicas sobre a atividade da avicelase, *Bacillus* sp SMIA-2 foi cultivado em glicose na mesma concentração inicial de 0,5% (p/v). Como mostrado na Figura 2, embora o microrganismo tenha crescido satisfatoriamente em glicose, baixos níveis de atividade da avicelase foram encontrados. Resultados similares foram encontrados para *Bacillus* sp. VG1 em que glicose inibiu fortemente a síntese de celulasas (Singh et al., 2001). Por outro lado para a bactéria termofílica e celulolítica *Anoxybacillus* sp. 527, além da celulose, glicose também induziu a síntese de celulasas (Liang et al., 2010). Segundo Pavle (2010), as celulasas são fortemente inibidas pelos produtos intermediários e finais da sua hidrólise, como a celobiose e glicose. De acordo com estudos realizados por Sukumaran et al. (2005), a síntese de celulase pode ser suspensa pela influência da glicose, quando a geração de glicose é mais rápida que seu consumo.

Para estudar a repressão da síntese de avicelase por glicose em *Bacillus* sp SMIA-2, este foi cultivado em avicel e a glicose foi adicionada após 72 h de incubação da cultura. Como mostrado na Figura 4, 24 h após a adição da glicose foi observado um decréscimo de aproximadamente 45% na atividade da avicelase. A produção de celulasas é controlada por mecanismos envolvendo indução e repressão catabólica como reportado para *Bacillus* sp. 1139, *Bacillus* sp. KSM-19, KAM-64 e KSM-520 (Fukumori et al., 1985; Shikata et al., 1990).

Segundo Aguiar e Menezes (2000), açúcares como glicose, sacarose, maltose e arabinose não induzem a formação de celulase total por *Aspergillus fumigatus*. Altos níveis da enzima celulolítica foram observados quando celulose insolúvel foi utilizada como fonte de carbono. A regulação por glicose da produção de enzimas extracelulares tem sido muito estudada, e existe um efeito repressor deste açúcar na produção de várias enzimas como celulasas, amilases e invertase.



**Figura 4.** Crescimento (a) e atividade de avicelase (b) em função do tempo de cultivo de *Bacillus* sp SMI-A-2 em frascos erlenmeyers contendo 0,5% (p/v) de água de maceração de milho e 0,5% (p/v) de avicel e/ou 0,5% (p/v) de glicose a 50 °C. A glicose foi adicionada após 72h de incubação (■).

A produção de enzimas pelos microrganismos depende da disponibilidade da fonte de carbono e também da de nitrogênio no meio de cultura. O tipo da fonte de nitrogênio também afeta a produção de enzimas e para estudar este efeito sobre a atividade da avicelase, a fonte de nitrogênio, tanto orgânica quanto inorgânica, do meio de cultura foi variada.

Silva (1998) realizou um estudo com *Aspergillus phoenicis* para a produção de avicelase, quando a concentração de peptona, variando entre 2,5 a 7,5 g/L fez com que a atividade enzimática aumentasse. Entretanto, quando a concentração de peptona diminuiu para 1,5 g/L e aumentou para 8,5 g/L, ocorreu uma baixa na atividade enzimática. No mesmo estudo o efeito combinado do resíduo de uva com a peptona promoveu o aumento da atividade enzimática.

Segundo Ikeda et al. (2007), outras fontes de nitrogênio podem ser utilizadas na busca de meios de cultivo para a produção de celulasas. Em *Acremonium cellulolyticus*, a utilização de uréia e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fontes de nitrogênio foram mais efetivas para o aumento da atividade de celulasas totais no sobrenadante do cultivo do que a utilização de milhocina.

De acordo com trabalho realizado por Silva (2009) com o microrganismo *Scytalidium thermophilum* maior, a adição de fontes de nitrogênio inorgânicas favoreceu a síntese da avicelase.

Arijit-Das (2010) a melhor fonte de nitrogênio para a produção de celulasas por uma cepa de *Bacillus* sp. termofílica foi a peptona, quando comparado com extrato de levedura e triptona.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 1, a maior atividade da avicelase foi alcançada quando 0,5% de peptona foi utilizada dentre as várias fontes de nitrogênio estudadas, no meio de cultura.

**Tabela 1.** Atividade da avicelase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado a 50 °C por 120 horas em diferentes fontes de celulose e nitrogênio. Colunas de mesma legenda seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Fonte de Nitrogênio	Avicelase (U/mL)		
	Avicel	Carboximetilcelulose	Xilana
0% Peptona	31,8647 <sup>f</sup>	32,8538 <sup>f</sup>	36,5210 <sup>g</sup>
0,1% Peptona	55,6412 <sup>c</sup>	53,9310 <sup>b</sup>	50,1360 <sup>d</sup>
0,5% Peptona	90,5636 <sup>a</sup>	78,4180 <sup>a</sup>	87,6230 <sup>a</sup>
0,5% E. levedura	59,8721 <sup>b</sup>	51,3410 <sup>c</sup>	62,7510 <sup>b</sup>
0,5% E. carne	61,2358 <sup>b</sup>	47,7510 <sup>d</sup>	57,4692 <sup>c</sup>
1% Citrato de amônio	38,5712 <sup>e</sup>	37,5460 <sup>e</sup>	33,5210 <sup>h</sup>
1% KNO <sub>3</sub>	32,5478 <sup>f</sup>	27,9310 <sup>g</sup>	38,7260 <sup>f</sup>
1% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	15,6742 <sup>g</sup>	12,7260 <sup>h</sup>	19,4080 <sup>i</sup>
1% NH <sub>4</sub> Cl	13,4510 <sup>g</sup>	13,5360 <sup>h</sup>	14,5970 <sup>j</sup>
1% (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	8,7512 <sup>h</sup>	5,4180 <sup>i</sup>	9,4310 <sup>k</sup>

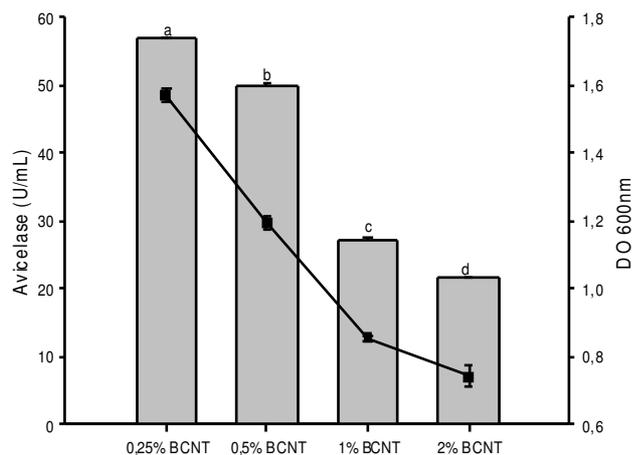
Resultados satisfatórios foram também encontrados quando outras fontes orgânicas de nitrogênio como extrato de levedura e extrato de carne foram utilizadas. Além disso, de uma forma geral, as fontes orgânicas de nitrogênio estimularam mais o crescimento do microrganismo e promoveram a obtenção de maiores atividades da avicelase que as fontes inorgânicas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Densidade ótica e pH da cultura de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado a 50 °C por 120 horas em diferentes fontes de celulose e nitrogênio. Colunas de mesma legenda seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Fonte de Nitrogênio	Avicel		Carboximetilcelulose		Xilana	
	D.O (600nm)	pH	D.O (600nm)	pH	D.O (600nm)	pH
0% Peptona	1,30 <sup>c</sup>	8,98	1,41 <sup>d</sup>	8,86	1,05 <sup>d</sup>	9,07
0,1% Peptona	1,47 <sup>b</sup>	9,13	1,47 <sup>d</sup>	8,79	1,15 <sup>c</sup>	9,57
0,5% Peptona	1,64 <sup>a</sup>	9,34	1,66 <sup>c</sup>	8,33	1,23 <sup>b</sup>	9,49
0,5% E. levedura	1,48 <sup>b</sup>	9,30	1,74 <sup>b</sup>	9,02	1,12 <sup>c</sup>	9,56
0,5% E. carne	1,48 <sup>b</sup>	9,32	1,83 <sup>a</sup>	8,87	1,43 <sup>a</sup>	9,27
1% Citrato de amônio	1,15 <sup>d</sup>	8,26	0,70 <sup>g</sup>	8,37	0,76 <sup>f</sup>	7,1
1% KNO <sub>3</sub>	1,02 <sup>e</sup>	7,64	1,18 <sup>e</sup>	7,75	0,86 <sup>e</sup>	7,32
1% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,19 <sup>d</sup>	7,51	1,24 <sup>e</sup>	7,64	0,86 <sup>e</sup>	7,19
1% NH <sub>4</sub> Cl	0,92 <sup>f</sup>	7,42	1,05 <sup>f</sup>	7,46	0,83 <sup>e</sup>	7,04
1% (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	0,95 <sup>f</sup>	7,79	0,72 <sup>g</sup>	7,73	1,14 <sup>c</sup>	6,99

Singh et al. (2001) também encontraram maiores atividades de celulasas secretadas por *Bacillus* sp. VG1, quando peptona e triptona foram utilizadas como fontes de nitrogênio no meio de cultura.

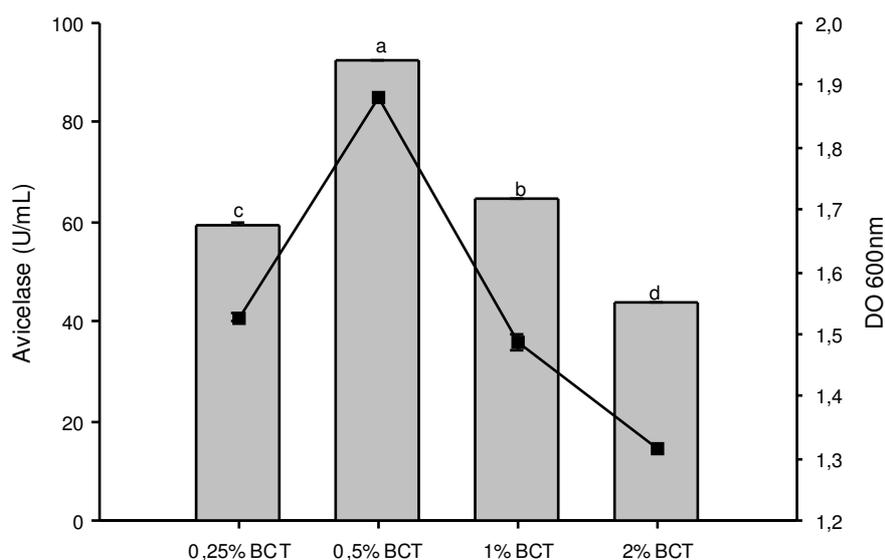
*Bacillus* sp SMIA-2 cresceu e sintetizou avicelase quando cultivado no bagaço de cana-de-açúcar como mostrado na Figura 5. A maior atividade da enzima (56,7 U/mL) e da densidade ótica da cultura (D.O. 600nm 1,7) foi encontrada quando o microrganismo foi cultivado no meio contendo 0,25% (p/v) de bagaço não tratado.



**Figura 5.** Efeito da concentração do bagaço de cana não tratado no crescimento (■) e na atividade da avicelase (■) de *Bacillus* sp. SMA-2 após 120 horas de incubação a 50 °C e pH inicial de 7,5. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Diversas fontes naturais complexas, como resíduos agrícolas e agroindustriais, têm sido utilizadas na indução de celulasas, mesmo quando produzem níveis menores de atividade, pois possuem a vantagem de serem encontradas abundantemente e em baixo custo (Lee et al., 2010). De acordo com trabalho realizado por Aguiar e Menezes (2000), a atividade celulolítica de linhagens fúngicas, como *A. niger*, desenvolvidas em bagaço de cana-de-açúcar foi superior às cultivadas em carboximetilcelulose e papel de filtro. Eles também testaram *Phanerochaete chrysosporium* e *Coriolus versicolor* quanto à sua capacidade de produzir xilanase e celulase em resíduos agrícolas: bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó. Observaram que bagaço de cana-de-açúcar tratado, palha de trigo e espigas de milho promoveram maior indução enzimática.

O tratamento do bagaço de cana (BCT) com uma solução de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  promoveu um aumento na atividade da avicelase, em relação ao bagaço de cana não tratado (BCNT) (Figura 6). Este aumento foi mais pronunciado quando 0,5% (p/v) de bagaço de cana tratado foi utilizado. Ressalta-se, ainda que os níveis de atividade da enzima obtidos (92,73 U/mL) foram similares àqueles encontrados quando a avicel, carboximetilcelulose e xilana foram utilizadas como substrato (em torno de 94 U/mL).



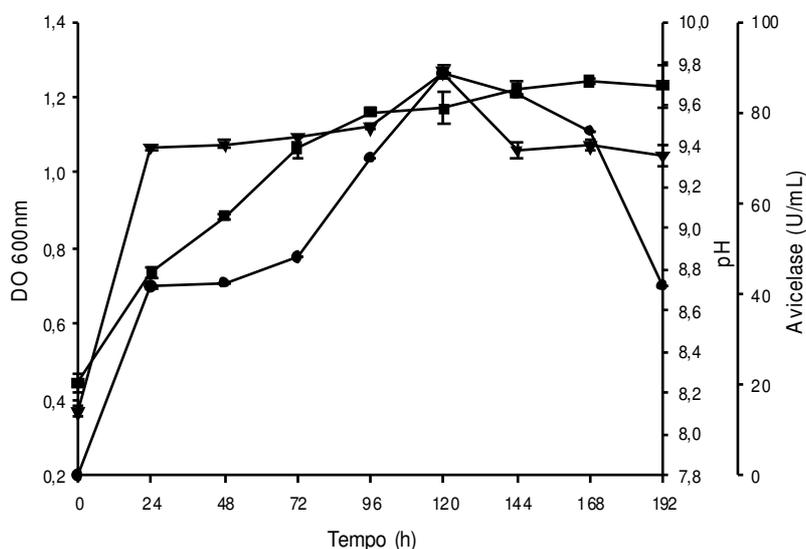
**Figura 6.** Efeito da concentração do bagaço de cana tratado com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  no crescimento (■) e na atividade da avicelase (■) de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 120 horas de incubação a 50 °C e pH inicial de 7,5. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

O efeito do pré-tratamento alcalino sobre a produção de celulases por *Penicillium reesei* QM9414 foi estudada por Aiello et al. (1996) usando bagaço de cana-de-açúcar. A atividade das enzimas foi maior no bagaço de cana tratado. Entretanto, quando a avicel foi utilizada como fonte de carbono, as atividades das enzimas foram comparativamente maiores. A produção de avicelase pelo termofílico *Geobacillus stearothermophilus* usando bagaço de cana-de-açúcar tratado com uma solução de NaOH foi maior que no bagaço de cana não tratado. A atividade da enzima no bagaço de cana tratado alcançou níveis de até 5 vezes mais que no bagaço não tratado (Makky, 2009).

Castro (2006) comparou a produção de celulases por *Trichoderma reesei* e *Humicola grisea*, quando cultivadas em substratos insolúveis (bagaço de cana-de-açúcar e avicel) e solúveis (CMC e celobiose). Foi observada síntese mais lenta das enzimas quando fontes insolúveis foram utilizadas, especialmente a de origem lignocelulósica, devido a um período inicial de adaptação das células a

essa matéria-prima. Já quando CMC e celobiose foram consideradas, os tempos correspondentes à produção enzimática máxima foram antecipados em cerca de 50 h. Ainda, nesse estudo pode-se concluir que na síntese das enzimas do complexo celulolítico pelos fungos *T. reesei* Rut C30 e *Humicola grisea* var. *thermoidea*, não há correlação direta com a fonte de carbono utilizada para a indução, visto que mesmo quando as linhagens foram cultivadas na presença apenas de celobiose como substrato, Endo e Exoglicanase também foram excretadas pelas células, e que essa síntese não se enquadrava em caráter constitutivo.

O crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 e a atividade da avicelase foram observados por 192 horas em meio líquido contendo 0,5% de BCT como fonte de carbono (Figura 7). O crescimento exponencial do microrganismo foi observado por um período longo de tempo, iniciando logo após a incubação da cultura e finalizando após 96 horas. A partir deste tempo, a cultura entrou na fase estacionária.



**Figura 7:** Crescimento (■), pH (▼) e atividade da avicelase (●) secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio mineral contendo 0,5% (p/v) de BCT por 192 horas a 50° C.

A atividade da avicelase aumentou concomitantemente com a densidade óptica da cultura, alcançando a atividade máxima após 120 horas de incubação do

microrganismo, com níveis de 88,34 U/mL, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Durante esta fase, quando a cultura já havia alcançado a máxima produtividade enzimática, a atividade da avicelase foi reduzida, o que sugere que a produção desta enzima está associada ao crescimento e que a mesma foi produzida, quando a cultura estava metabolicamente ativa.

#### 4. CONCLUSÕES

*Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado em meio líquido contendo diferentes fontes de celulose. A máxima atividade da avicelase foi observada após 120 horas de incubação da cultura, para todas as fontes de celulose utilizadas. As máximas atividades das avicelases foram 94,67 U/mL (avicel), 91,39 U/mL (carboximetilcelulose) e 91,32 U /mL (xilana). Portanto, as três fontes de celulose podem ser consideradas como bons indutores da síntese de avicelase por esse microrganismo.

A fim de avaliar os efeitos de repressão e indução de outras fontes não celulósicas sobre a atividade da avicelase, o *Bacillus* sp SMIA-2 foi cultivado em glicose na concentração inicial de 0,5% (p/v). Embora o microrganismo tenha crescido satisfatoriamente em glicose, baixa atividade da avicelase foi encontrada. Quando o microrganismo foi cultivado em meios contendo bagaço de cana tratado e não tratado, a avicelase alcançou atividade máxima após 120 horas de incubação do microrganismo em meio contendo 0,5% de bagaço tratado, com níveis de 88,34 U/mL.

De acordo com os resultados foi observado que dentre as várias fontes de nitrogênio estudadas, a maior atividade da avicelase foi alcançada com 0,5% de peptona no meio de cultura.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, C.L.; Menezes, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- Aiello, C.; Ferrer, A.; Ledesma, A. (1996) *Bioresour Technol.* 57, 13.
- Bajpai, S. & Domning, D. P. (1997). A new dugongine sirenian from the early Miocene of India. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 17(1): 219-228.
- Bisaria, V. S. & Ghose, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 3, p. 90-104, 1981.
- Bhat, M. K.; Bhat, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, New York, v. 15, p. 583 - 620.
- Castro, A.M. (2010) Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 1, 181-188.
- Castro, A. M. (2006) *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- Dyk, J.S.; Sakka, M.; Sakka, K.; Pletschke, B.I. (2009) The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 372–378.
- Fasanella, C.C. A ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus Níger* e *Penicillium* SP. Em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 2008. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- Fukumori, F., Kudo, T. & Horikoshi, K. 1985 Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139. *Journal of General Microbiology* 131, 3339–3345.
- Ghose, T.K. 1987. "Measurement of Cellulase Activities." *Pure & Appl. Chem.* 59: 257-268.

- Howard, R. L.; Masoko, P.; Abotsi, E. Enzyme activity of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (CBHI.1) expressed as a heterologous protein from *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* . V. 2, n. 9, p. 296-300, 2003.
- Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K. D., Steiner W., Zupancic S. (1996) Production of fungal xylanases. *Bioresource Technol*; 58:137–161.
- Huang, L.; Forsberg, C. W.; (1987) Isolation of a Cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes* Appl. Environ. Microbiol., 53, 1034.
- Ikeda, Y.; Hayashil, H.; Okuda, N.; Park, E. Y. (2007) Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Biotechnology Progress*, New York, v. 23 (2), p. 333-338.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 411-56.
- Jang, H. D.; Chen, K.S. (2003) Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 263–268.
- Lynd, L. R.; Weimwr, 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*. v. 66, n.3, p. 506-577.
- 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, 38–42.
- Lee, D. W.; Kim, H. W.; Lee, K.W.; Kim, B. C.; Choe, E. A.; Lee, H.S.; Kim, D. S.; Pyun, Y. R. (2001) Purification and characterization of two thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 29, p. 363-371.
- Liang, Y.; Feng, Z.; Yesuf, J. & Blackburn, J.W. (2010) Optimization of Growth Medium and Enzyme Assay Conditions for Crude Cellulases Produced by a Novel Thermophilic and Cellulolytic Bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Appl Biochem Biotechnol* 160:1841–1852.

- Mahmood, A.U.; Greenman, J; Scragg, A.H. (1998). Orange and potato pell extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial and Technology*, New York, vol. 22, n.1, p. 130-137.
- Makky, E. A. (2009) Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse World Academy of Science, *Engineering and Technology*, 57, 487.
- Mawadza, C. (2000) Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, Netherlands, v. 83, p. 177 - 87.
- Ogel, Z.B.; Yarangumeli, K.; Dundar, H.; Ifrij, I. (2001) Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 689–695.
- Phillipidis, G.P.; Smith, T.K. (1995) Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry Biotechnology*. V. 51/52, p. 117–124.
- Silva, V. L. M. M.; Gomes, W. C.; Alsina, O. L. S. Utilizacao do bagaco de cana-de-acucar como biomassa adsorvente na adsorcao de poluentes organicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande, v. 2, p. 27-32, 2007.
- Singh, J.; Batra, N. e Solt, R.C. (2001) A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp.VG1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 761–765.
- Shikata, S., Saeki, K., Okoshi, H., Yoshimatsu, T., Ozaki, K., Kawai, S. & Ito, S. (1990) Alkaline cellulase laundry detergents: production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 91–96.
- Sreenath, H. K.; Koegel, R. G.; Moldes, A. B.; Jeffries, T. W.; Straub, R. J. (2001) *Proc. Biochem.*, 36, 1199.
- Sucumaran, R.K.; Rani, R.S; Pandey, A. (2005) Produção de celulases microbianas: aplicações e desafios. *Revista de Pesquisa Científica e Industrial*. Vol. 64, November 2005, pp. 832-844 64.
- Teeri, T. T. (1997) Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends Biotechnol.* V. 15, p. 160-167.

Walter S, Schrempf H. (1996) Physiological Studies of Cellulase (Avicelase) Synthesis in *Streptomyces reticuli*. *Environ Microbiol.* Mar;62(3):1065–1069.

Zeilinger, S.; Haller, M.; Mach, R.; Kubicek, C. P. (2000). Molecular characterization of a cellulose negative mutant of *Hypocrea jeconina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v. 277, p. 581-588.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A influência das condições de cultivo sobre produção da avicelase pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, e algumas propriedades da enzima foram estudadas.

*Bacillus* sp. SMIA-2 produziu avicelase quando cultivado em um meio contendo celulose microcristalina e água de maceração de milho. A maior atividade da enzima foi observada com 120 h de incubação da cultura.

A concentração da celulose microcristalina e da água de maceração de milho que proporcionaram a obtenção de maiores níveis de atividade da avicelase foi 0,5 e 0,5% (p/v), respectivamente.

As maiores atividades da avicelase foram obtidas quando o pH inicial do meio e da temperatura de incubação foram 7,5 – 8,0 e 50° C, respectivamente.

Os estudos de caracterização da avicelase revelaram que a enzima possui temperatura e pH para atividade ótima de 70° C e 8,5, respectivamente. A enzima manteve 98% e 74% de atividade quando incubada a 70 e 80 °C por 20 min, respectivamente. A incubação da enzima na presença do íon cálcio aumentou a atividade da enzima.

No segundo trabalho *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado em meio líquido contendo diferentes fontes de celulose, a máxima atividade da avicelase foi observada após 120 horas de incubação da cultura, para todas as três fontes de celulose utilizadas. As máximas atividades das avicelases foram 94,67 U/mL (avicel), 91,39 U/mL (carboximetilcelulose) e 91,32 U /mL (xilana). Portanto, as

três fontes de celulose podem ser consideradas como bons indutores da síntese de avicelase por esse microrganismo.

A fim de avaliar os efeitos de repressão e indução de outras fontes não celulósicas sobre a atividade da avicelase, *Bacillus* sp SMIA-2 foi cultivado em glicose na mesma concentração inicial de 0,5% (p/v). Embora o microrganismo tenha crescido satisfatoriamente em glicose, baixos níveis de atividade da avicelase foram encontrados.

Quando o microrganismo foi cultivado em meios contendo bagaço de cana tratado e não tratado, a avicelase alcançou atividade máxima após 120 horas de incubação do microrganismo em meio contendo 0,5% de bagaço tratado, com níveis de 88,34 U/mL.

De acordo com os resultados foi observado que dentre as várias fontes de nitrogênio estudadas, a maior atividade da avicelase foi alcançada quando 0,5% de peptona foi utilizada no meio de cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnasser, N. H., Helmy, S. M., El Gammal, A. A. (1997) Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. *Polymer Degradation and Stability*, v. 55, n. 7, p. 249255.
- Adams, M.W.W. e Kelly, R.M. (1998). Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnology*, 16:329-332.
- Aguiar C. L., Menezes T. J. B. (2000) Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *B. CEPPA*, Curitiba. V.18, n.1, p.57-70.
- Aquino, A.C.M.H. (2000) Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades da glucoamilase e  $\alpha$ -amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* 15.1. *Tese de Mestrado em Biologia comparada-Ribeirão Preto-SP, FFCLRP/USP*, 121P.
- Asghari, S. M.; Khajch, K.; Ranjbar, B.; Saedi, R. J. J.; Naderi-Manesh, H. (2004). *Int. J. Biol. Macromol.* 34, 173.
- Awafo, V. A. (1997). *Tese de Doutorado*, McGill University, Canadá.
- Barak, R.; Chet, I. (1986), Determination, by fluorescein diacetate staining, of fungal viability during mycoparasitism. *Soil Biol Biochem.*, 18, 315-319.
- Béguin, P.; Aubert, J. P. (1990) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, Netherlands, v. 13, p. 25 - 58, 1994.

- Béguin, P. (1997) Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Review of Microbiology*, v.44, p.219-248.
- Bélaich, J. P. et al. (1997). The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *Journal of Biotechnology, Japan*, v. 57, p. 3 -14.
- Belghith H, Ellouz-Chaabouni S, Gargouri A (2001) Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Po16) cellulases. *Journal of Biotechnology* 89:257–262
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. *Biotechnology Advances*, 18:355-383.
- Bhat, M. K.; Bhat, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, New York, v. 15, p. 583 - 620.
- Biosset, C. et al. (1999) Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulossomo: structural and morphological aspects. *Biochemical of Journal*, Hoboken, v. 340, p. 829 - 35.
- Bisaria, V.S. e Ghose, T.K. (1981), Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microrganisms, enzyme and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, p. 90-104.
- Bittencourt, L. R. Silveira, M. M. Dillon, J. P. (2002) Produção de celulasas de *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos contendo sorbitol ou glicerol. In: *Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*, 5., 2002, Brasília (DF).Anais.. Brasília (DF).
- Bocchese, C. A. C.; Martinelli, J. A.; Matsumura, A. T. S.; Ferezizzi, L. C.; Prestes, A. M. (2003) Virulência, atividade enzimática e padrões de isosterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides* agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, n.1, p.11-16.
- Brock, T.D. (1985). Life at High Temperatures. *Science*. 230:132-138.
- Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. *Bioresource Technology*. p. 77-84.
- Castro, A. M.; Carvalho, M. L. A.; Leite, S. G. F.; Pereira JR, N. (2010) Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiology Biotechnology*. v. 37, p. 151-158.

- Cattelan, A.J. & Vidor, C. (1990) Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo em função de variações ambientais. *Brazilian Journal of Soil Science*, 14: 133-142 a.
- Cattelan, A.J. & Vidor, C. (1990) Sistemas de culturas e população microbiana do solo. *Brazilian Journal of Soil Science*, 14: 125-132, b.
- Cherry, J.R.; Fidantsef, A.L. (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, v.14, p. 438-443.
- Coelho, M. A. Z.; Salgado, A. M.; Ribeiro, B. D. (2008) Tecnologia Enzimática, 1ª ed., EPUB: Rio de Janeiro.
- Collins T, Gerday C, Feller G (2005) Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 3-23.
- Costa, C. J., Medeiros, N., Silva, N. L., Lima Filho, J. L., Da Silva, M. P. C. (1997) Utilização de meios nutritivos regionais no cultivo de *Aspergillus oryzae*, para a produção de amilase, celulase, lipase e protease. In: *Congresso nacional de iniciação científica*, 5., 1997. Anais. Recife : UFPE. 210 p.
- Costa Neto, P.R. ; Rossi, L.F.S. ; Zagonel, G.F. ; Ramos, L.P. (2000) Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v.23, n.4, p. 531-537.
- Coughlan, M. P. Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*, Amsterdam, Netherlands, v. 39, p. 107 - 15.
- Cowan, D. A. (1997) Comp. Biochem. Physiol., *Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 118A, 429.
- Creuzet, N.; Berenger, J.F.; Frixon, C. (1993) Characterization of exoglucanase and synergistic hydrolysis of cellulose in *Clostridium stercorarium*. *FEMS Microbiology Letters* , v.20, n.3, p.347-350.
- Da Silva, R., Yim, D. K., Park, Y. K. (1994) Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. *Journal Fermentation and Bioengineering*, v. 77, p. 109111.
- De Rosa, M.; Morana, A.; Riccio, A. Gambacorta, A.; Trincone, A.; Incani, O. (1994). Lipids of the archaea: a new tool for bioelectronics. *Biosens. Bioelectr.* 9:669-675.

- Demain AL, M Newcomb & JHD WU. (2005). Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69: 124-54.
- Dillon, A.; Celulases. *In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L.* (2004) Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: *Legis Summa*, p. 243-270.
- Doelle, H. W. (1996) Joint venture capital investment for clean technologies and their problems in developing countries. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* n.12: p. 445 – 450.
- Elisashvilil, V. L. (1993) Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. *Applied Biotechnology and Microbiology*, v. 29, p. 257266.
- Enzitec site: <http://www.enzitec2010.com.br/>, visitado em 22 de março de 2011.
- Esposito E & JL Azevedo. (2004). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Editora EDUCS.
- Everly, C. e Alberto, J. (2000). Stressors, stress and survival: overview. *Front. Biosci.* 5:780-786.
- Gama, F. M.; MOTA, M. (1998) Cellulases for oligosaccharide synthesis a preliminary study. *Carbohydrate Research*, Oxford, v. 37, p. 279 - 81.
- Gianfreda, L. & Rao, M. A. (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: *Rev Enz Microbial Technol.*, 35, 339–354.
- Ghini, R.; Mendes, M. D. L. & Bettiol, W. (1998), Utilização do modo de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathol.*, 24, 239-242.
- Godfrey, T.; West, S. (1996) Industrial Enzimology, 2d. Ed. *Stockton Press Ed.* US e Canadá, p. 609.
- Gomes, E.; Gues, M. A.; Martin, N.; Silva, R. (2007) Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química nova*, São Paulo, v.30, n.1, p. 136-145, janeiro/fevereiro.

- Ghosh, K.; Sen, S. K.; Ray, A. K. (2002). Characterization of bacilli isolated from gut of rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. *Journal of Applied Aquaculture*, v.12, n.3, p.33-42.
- Ghose, T.K. (1987), Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268.
- Gilkes, N.R.; Henrissat, B.; Kilburn, D.G.; Miller, R.C. Jr.; Warren, R.A.J. (1991) Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiological Reviews* , v.55, n.2, p.303-315.
- Gorguini, M.G.; Sampaio, A.C.; Leonel, S. (2008) Uso de subprodutos da maracujazeiro na alimentação animal e nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos.
- Grogan, D.W. (2000). The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. *Trends in Microbiology*. 8(4):180-185.
- Gupta, A., Madamwar, D. (1997) Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and betaglucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology Process*, v. 13, n. 4, p. 166169.
- Haki, G. D.; Rakshit, S. K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. V. 89, p. 17-34.
- Haros M, Rosell CM, Benedito C (2002) Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Resource Technology* 215:425 – 430.
- Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enz Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p. 235-251.
- Headom, D. R. & Walsh, G. (1994), The Industrial production of enzymes. *Biotech Adv.*, 12, 635- 646.
- Henrissat, B.; Driguez, H.; Viet, C.; Schulein, M. (1985) Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technology*, v.3, p.722- 726.
- Hough, D.W. e Danson, M.J. (1999). Extremozymes. *Curr. Opinion. Chem. Biol.* 3: 39-46.

- Howard R. L. et al. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, Toronto, v. 2, p. 602 - 19.
- Hui, J. P. M.; White, T. C.; Thibaut, P. (2002) Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. *Glycobiology*, v. 12, p. 837–849.
- Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M. e Penttilä, M.E. (1997), Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 4, p. 1298-1306.
- Jacobus, P. H.; Wyk, Y. (1997) Cellulase adsorption-desorption and cellulose saccharification during enzymatic hydrolysis of cellulose materials. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, Netherlands, v. 19, n. 8, p. 775 - 8.
- Jayani, R.S.; Shivalika, S.; Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: Review. *Processo Biochemistry, Oxford*, v.40, p.2931-2944, 2005.
- Jaenicke, R. e Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:738-748.
- Jeffries, T. W.; (1990) *Biodegradation*, 1, 163.
- Karlsson, J. et al. (2002) Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, Netherlands, v. 99, p. 63 - 78.
- Kerem, Z., Friesen, D., Hadar, Y. (1992) Lignocelullose Degradation During Solid-State Fermentation: *Pleorotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrisporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 58,n.4, p.1121-1127.
- Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 13 n. 4, p. 345-351.
- Kirk Tk & D Cullen. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi, p. 273-308. *In: Enviromentally friendly technologies for the pulp and paper industry. New York: John Wiley & Sons.*
- Klyosov, A. A. (1990) Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Journal of Biochemistry*, Tokio, Japan, v. 29, n. 47, p. 10577 - 85.

- Kona, R.P.; Qureshi, N.; Pai, J.S.. (2001) Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*. p. 123-126.
- Kumar, C.G.; Takagi, H. (1999). Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17:561-594.
- Lee, I. et al. (1993) Substrate-enzyme interactions in cellulase systems. *Bioresource Technology*, Amsterdam, Netherlands, v. 58, p. 163 – 9.
- Lee, D-W, Kim, H-W, Lee, K-W, Kim, B-C, Choe, E-A, Lee, H-S, Kim, D-S, Pyun, Y-R. (2001) Purification and characterization of two thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:363-371.
- Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J., Blackburn, J.W. (2010) Optimization of Growth Medium and Enzyme Assay Conditions for Crude Cellulases Produced by a Novel Thermophilic and Cellulolytic Bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Applied Biochemistry Biotechnology*. V. 60, p. 1841–1852.
- Lynch, J.M., Slater, J.H., Bennett, J.A. & Harper, S.H.T. (1981). Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. *Journal of General Microbiology* 127:231-236.
- Lynd, L. R.; Weimwr, 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*. v. 66, n.3, p. 506-577.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. & Parker, J. (1996) *Brock: biology of microorganisms*. Prentice – Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Maheshwar, R.; Bharadwaj, G.; Bhat, M. K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. p. 461–488, Sept.
- Mahmood, A.U; Greenman, J; Scragg, A.H. (1998). Orange and potato pell extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial and Technology*, New York, vol. 22, n.1, p. 130-137.

- Mansfield, S. D.; Meder, R. (2000) Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. *Cellulose, Dordrecht*, Netherlands, v. 10, p. 159 – 69.
- Makky, E. A. (2009) Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse World Academy of Science, *Engineering and Technology* 57.
- Malek, M. A. (1988) Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials. *Enzyme of Microbial Technology*, New York, v. 10, p. 750 - 3.
- Marques, W.F. (1997) Caracterização fenotípica de bactérias de solos do Cariri paraibano. (Monografia) João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba – UFPB.
- Marsden, W. L.; Gray, P. P. (1986) Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *Critical Review Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 235-276.
- Martins, E. S.; Silva, D.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2002) Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 949–954.
- Mawadza, C. (2000) Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, Netherlands, v. 83, p. 177 - 87.
- Mendels, M.; Sternberg, D. (1976) Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* 54, 267-286.
- Menezes, T. J. B., De Lamo, P. R., Arakaki, T. (1976) Produção do complexo celulolítico C1, Cx por microrganismos. *Coletânea do ITAL*, v. 7, p. 9196.
- Menezes, T. J. B., Hennies, P. T. (1991) Influência do prétratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. *Coletânea do ITAL*, v. 21, n. 2, p. 213219.
- Miettinen-Oinonen A, Londesborough J, Joutsjoki V, Lantto R, Vehmaanperä J, Primalco Ltd. Biotecd (2004) Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology* 34:332–341.

- Milagres, A. M. F., Borges, L., Aguiar, C. L. (1994) Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. *Anais do SHEB*, n. 4, p. 261-269.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem* 3: 426-428.
- Mitidieri, S.; Martinelli, A. H. S.; Camassola, S.; Menguer, P. K.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. (2002). Detergentes biológicos biodegradáveis avaliação das formulações do mercado. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* – no 26-maio/junho.
- Mitidieri, S.; Martinelli, A. H. S.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. (2006) Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergents formulation. *Bioresource Technology*, Oxford, v.97, p.1217-1224.
- Mussatto, S. I.; Fernandes, M.; Milagres, A. M. M. (2007) Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, v.41, p.28-33.
- Nascimento, R. P. Otimização da produção de endoxilanas por *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 utilizando resíduos agroindustriais. Tese para obtenção do título de Doutorado, UFRJ – RJ.
- Niehaus, F.; Bertoldo, C.; Kahler, M.; Antranikian, G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 51, p. 711-29.
- Nielsen, R. I.; Oxenboll, K. (1998) Enzymes from fungi: their technology and uses. *Mycologist*, v. 12, n.3, p. 69-71.
- Nunes, A. S.; Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. *Braz. J. Microbiology*, v.32, p.271-275.
- Okeke, B. C. (1995) Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. *Bioresource Technology*, Amsterdam, Netherlands, v. 51, p. 23 - 7.
- Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Júnior, A.F.C. (2006) Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* vol.26, n.4.

- Onar, Nurhan; Sariis, Merih. (2004) Application of Enzymes and Chitosan Biopolymer to the Antifeltting Finishing Process. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 93, 2903– 2908.
- Orberg, P.K. (1981). Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei*. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon.
- Pal, M., Calvo, A. M., Terrón, M. C., González, A. E. (1995). Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, pp.541-545.
- Pandey, A.; Soccol, C. R. (1998) Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 41, p. 379–390.
- Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C. R.; Nigam, P. (1999) Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, v. 77, n. 1, p. 149-162.
- Pandey, A.; Soccol, C. R. (1998) Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 41, p. 379–390.
- Pandey, A. (2003) *Biochem. Eng. J.*, 13, 81.
- Pavle, A. (2010) Produto cinética de inibição e limitações de transporte de massa no projeto do reator para hidrólise enzimática melhorada do Lignocelluloses. Centro de convenções Salt Palace.
- Pitarelo, A. P. (2007) Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha da cana de açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Tese de Mestrado – UFPR.
- Priest, F.G.; Goodfellow, M. & Todd, C. (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 134: 1847-1882.
- Rabinovich, M. L.; Melnick, M. S.; Bolobova, A. V. (2002) The structure and mechanisms of action of cellulolytics enzymes. *Biochemistry, Moscow*, v. 65, n. 8, p. 850 - 71, a.

- Rabinovich, M. L.; Melnick, M. S.; Bolobova, A. V. (2002) Microbial cellulases (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, Moscow, v. 38, n. 4, p. 304 - 21, b.
- Raghavarao, K. S. M. S.; Ranganathan, T. V.; Karanth, N. G.; (2003) *Biochem. Eng. J.*, 13, 127.
- Rajarithnam, S.; Shashireka, M. N., Bano, Z. Biopotentialites of the basidiomacromycetes. *Advances in Applied Microbiology*, v.37, p.223-361 (1992).
- Ramos, L.P. (2003) The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, p.863-871.
- Reese, E. T.; Siu, R.G. H.; Levinson, H. S. (1950) The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis *J. Bacteriol.* 59, 485.
- Rivas, B.; Moldes, A.B.; Domínguez, J.M.; Parajó, J.C. (2004). Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Inter J of Food Microbiol.* 97:93-98.
- Robson, L.M. & Chambliss, G.H. (1989). Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology* 11:626-644.
- Robinson, T.; Nigam, P. (2003) *Biochem. Eng. J.* 13, 197.
- Ruegger M. J. S., Tauk-Tornisielo S. M. (2004). Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, vol. 7, p. 34-67.
- Saha, B. C. (2004) Production, purification and properties of endoglucanase from newly isolated strains of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, Oxford, v. 39, p. 1871 - 6.
- Said, S.; Pietro, R.. (2004). Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. *In Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: *Legis Summa*, 2004, p. 1-7.

- Sakai, K.; Yokota, A.; Kurokawa, H.; Wakayama, M. & Moriguchi, M. (1998) Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH – 1, isolated from chitin – containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3397-3402.
- Samejima, M. (1998) Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulase. *Carbohydrate Research, Oxford, United Kingdom*, v. 305, p. 281 – 8.
- Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185–194.
- Santos, H., Lamosa, P., Costa, M. (2001) Extremófilos: Microrganismos à prova de Agressões Ambientais Extremas. *Biociência Microbiana: Boletim de Biociência*. N.2.
- Schwarz, W. H. (2001) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, Germany, v. 56, p. 634 - 49.
- Sermanni, G. G.; Porri, A. (1989) The potentiality of solid state biotransformation of lignocellulosic materials. *Chimica oggi*. Março: 15 – 19.
- Shigalevith, P.A. & Hattori, T. (1995) Effect of UV – irradiation on plate counts of bacteria from Paddy Field Soil. *Soil Microorganisms*, 45: 51-4.
- Shoham, Y; Lamed, R.; Bayer, E. A. (1999) The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends in Microbiology*, Cambridge, United Kingdom, v. 7, n. 7, p. 275 - 80.
- Silva, D. M., Dillon, A. J. P. (1988) Produção de celulasas em fermentação semi-sólida por uma linhagem de *Trichoderma* SP In: *Reunião anual de genética de microrganismos*, 15., 1988. Anais. Piracicaba : FEALQ. p. 54.
- Singer, G. A. & Hickey, D. A. (2003) Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene*. V. 317, p. 39-47.
- Sneath, P.H.A. (1986) Endospore – forming Gram positive rods and cocci. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. (Eds.). *Bergeys manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1105-1139.

- Sonnleitner, B. (1983) Biotechnology of thermophilic bacteria – growth, products and application, 70-137.
- Stahlberg, J.; Johansson, G.; Petterson, G. (1991) A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase-1. *Bio Tecchnology*. v. 9, p. 286-290.
- Stetter, K. (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett*. V. 452, p. 22–25.
- Straatsma, G.; Gerrits, J.P.G.; Augustijn, M.P.A.M.; Den Camp, H.J.M. OP; Vogels, G.D. & Van Griensven, L.J.L.D. (1989) Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yeld of *Agaricus bisporus*. *Journal of General. Microbiology*, 135: 751-759.
- Takao, M.; Akyiama, K.; Sakai, T. (2002) Purification and characterization of thermostable endo – 1,5-alpha – L – arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1639-1646.
- Teeri, T.T. (1997) Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends biotechnology*. v 15, p. 160-167.
- Torres, M.; Dolcet, M. M.; Sala, N. and Canela, R. (2003), Endophytic fungi associated with mediterranean plants as a source of myceliumbound lipases. *J Agric Food Chem.*, 51, 3328-3333.
- UDOP – Usinas e destilarias do oeste paulista. Disponível em: <http://www.udop.com.br>, consultado em junho de 2009.
- Umikalsn, M. S., Ariff, A. B., Shamsuddin, Z. H., Tong, C. C., Hassan, M. A., Karin, M. I. A. (1997) Production of cellulase by a wsild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm emptyfruitbunch fibre as substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, n. 5, p. 590595.
- Uzawa, T.; Yamagishi, A.; Oshima, T. (2000) Polypeptide synthesis directed by DNA as a messenger in ceel – free polypeptide synthesis by extreme thermophiles, *Thermus thermophilus* HB27 and *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 121(6): 840-852.
- Vellard, Michel (2003), The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol*, 14, 444–450.

- Veille, C.; Burdette, D.L.; Zeikus, J.G. (1996). Thermozymses. *Biotech. Ann. Rev.* 2:1-83.
- Vitti, L. S. S. (1988) Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana. Piracicaba. 108 p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Vlaev, S. D., Djejeva, G., Raykovska, V., Schugerl, L. (1997) Cellulase production by *Trichoderma* sp grown on corn fibre substrate. *Process Biochemistry*, v. 32, n. 7, p. 561-565.
- Zandoná Filho, A. (2001) Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas. Tese (Doutorado). Universidade do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba – PR.
- Zhang, Y. H. P. (2004) Lynd, L. R.; *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797.
- Zhang P., Himmel M. E., Mielenz J. R. (2006). Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances.* 24, p. 452-481.
- Wang, X.-D. e Rakshit, S.K. (1999). Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of isooligosaccharides. *Bioprocess Engineering.* 20:429-434.
- Wang, Feng Qin, Wang, En Tao, Liu, Jie, Chen, Qiang, Sui, Xin Hua, Chen, Wen Feng, Chen, Wen Xin. (2007) *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1192-1199.
- Weimer, P. J.; French, A. D.; Calamari, A. JR. (1991) Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, p. 3101 - 6.
- White, B. A.; Mackie, R.I.; Doerner, K. C. (1993) Enzymatic Hydrolysis of Forages Cell Walls. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Madison: WI. p. 455-484.
- Wilson, D.B., (1992). Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12(1-2):45-63.