



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

RAQUEL NASCIMENTO DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 PARA PRODUÇÃO DE CELULASE

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2019

RAQUEL NASCIMENTO DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Bacillus licheniformis* BCLLN-01 PARA PRODUÇÃO DE CELULASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2019

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4-2018

S586o Silva, Raquel Nascimento da.
Otimização das condições de cultivo de *Bacillus licheniformis* bcllnf-01 para produção de celulase./ Raquel Nascimento da Silva. - Vitória de Santo Antão, 2019.

55 folhas; il.: color.

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2019.

Inclui referências apêndice.

1. Enzimas. 2. celulases. 3. Carboximetilcelulose Sódica 4. *Bacillus licheniformis*. I. Finkler, Christine Lamenha Luna (Orientadora). II. Título.

572.756 CDD (23. ed.)

BIBCAV/UFPE-096/2019

RAQUEL NASCIMENTO DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 PARA PRODUÇÃO DE CELULASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Aprovado em: 31/05/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Christine Lamenha Luna Finkler(Orientador)
Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE

Prof.^o Dr. Carlos Daniel Pérez (Examinador Interno)
Núcleo de Ciências Biológicas, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE

Prof.^o Dr. Leandro Finkler (Examinador Externo)
Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE

Prof.^a Dr.^a Idjane Santana de Oliveira (Examinador Externo)
Núcleo de Enfermagem, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE

A Deus, Senhor de tudo e todos
Aos meus amados pais, Senhor João José e Senhora Miriam Oliveira
A minha irmã e melhor amiga, Jéssica Nascimento

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente me ajudando nessa incrível jornada que é viver, me mostrando que cada dia tem algo especial a oferecer para nosso crescimento como ser humano.

Agradeço à minha família por sempre me encorajar a superar os obstáculos que surgem e a lutar por meus objetivos, sempre demonstrando amor e respeito. São vocês quem participam das minhas lágrimas e risos.

Agradeço às minhas amigas e irmãs do coração, Dáfine, Érica e Lidiane por acreditarem em minha capacidade, pelas palavras e gestos de carinho e respeito.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler, por todo apoio e aprendizado adquirido. Obrigada professora por sua atenção, por acreditar em mim, por me fazer enxergar novas possibilidades diante das minhas dificuldades.

Agradeço à Liany Melo pelos bons momentos de aprendizagem no laboratório. Você faz parte dessa conquista. Muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas de classe pelo espírito cooperativo dando-me a oportunidade de construir novos saberes, em especial à Aralí, Roselita e Márcio.

Agradeço aos técnicos do CAV/UFPE, em especial a Gabriel Locatelli pela amizade, paciência e ensinamentos.

Aos membros da banca pelas importantes contribuições para o presente trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante todo o curso de mestrado.

Gratidão à todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu avançasse mais um passo em direção ao meu objetivo profissional.

RESUMO

A aplicabilidade das celulasas é muito relevante em diversos setores industriais, contudo, o seu alto custo de produção tem sido um dos principais desafios enfrentados pelo comércio de enzimas. O presente estudo teve por objetivo otimizar as condições de cultivo de *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01, uma cepa associada ao muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) para produção de celulase. O microrganismo foi preservado por liofilização (células totais) e por secagem em discos de papel (esporos), sendo estes últimos utilizados como inóculo nos experimentos de fermentação. Para definir a melhor condição de cultivo do inóculo, foram realizados experimentos com o meio BLM (*Basic Liquid Media*) suplementado em três condições distintas: 0,5% de carboximetilcelulose (CMC), 1% de glicose e 1% de glicose + 1% de caseína. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 150 mL do meio, sendo cada frasco semeado com um disco de papel contendo a cultura esporulada e incubado a 30 °C, pH 6,5 e agitação de 200 rpm. A melhor condição definida para a obtenção do inóculo foi a suplementação com CMC a 0,5%, que iniciou a fase exponencial de cultivo com 14 h. Com o objetivo de analisar o padrão de distribuição de celulasas sintetizadas por *B. licheniformis* BCLLNf-01, as atividades de celulase total e de carboximetilcelulase (CMCase) foram investigadas em diferentes frações do cultivo (sobrenadante, conteúdo intracelular e conteúdo de parede), sendo este realizado em tubos de 50 mL de capacidade contendo 19 mL de meio BLM suplementado com 1,5% de CMC, 5,5% de inóculo, a 40 °C, pH 6,5, 500 rpm por 72 h. A maior atividade foi registrada no sobrenadante. Para os ensaios de otimização, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ para investigar a influência das variáveis concentração da fonte de carbono (CMC), concentração do inóculo e temperatura sobre a produção de CMCase. Os resultados demonstraram que a concentração de CMC e a temperatura foram significativas para 95% de confiança estatística, atingindo-se uma atividade enzimática máxima de 0,493 UI/mL com 96 h de cultivo, concentração de CMC de 1,5 % e temperatura ótima de 40 °C.

Palavras-Chave: Enzima. Planejamento Experimental. Carboximetilcelulase. Carboximetilcelulose.

ABSTRACT

The applicability of cellulases is relevant in many industrial sectors; however, its high cost of production has been one of the main challenges faced by the enzyme trade. The objective of the present study was to optimize the culture conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01, a strain associated with mucus from the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) for cellulase production. The microorganism was preserved by lyophilization (total cells) and by drying on paper disks (spores), the latter being used as inoculum in the fermentation experiments. In order to define the inoculum culture conditions, a BLM (*Basic Liquid Media*) media supplemented in three different conditions (0.5% carboxymethylcellulose - CMC, 1% glucose and 1% glucose + 1% of casein) were investigated. Cultures were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL of the medium, and each flask was inoculated with a paper disc containing sporulated culture and incubated at 30 °C, pH 6.5 at 200 rpm. The best defined condition for obtaining the inoculum was the supplementation with 0.5% CMC, which initiated the exponential phase after 14 h. In order to analyze the cellulase distribution pattern synthesized by *B. licheniformis* BCLLNf-01, total cellulase and carboxymethylcellulase (CMCase) activities were investigated in different culture fractions (supernatant, intracellular content and wall content). The assays were performed using BLM medium supplemented with 1.5% CMC, 5.5% inoculum, at 40 °C, pH 6.5, 500 rpm for 72 h. The highest activity was recorded in the supernatant. For the optimization tests, a Rotational Central Compound Design (RCCD) 2³ was used to investigate the influence of the variables carbon concentration (CMC), concentration of inoculum and temperature on the production of CMCase. The results showed that the concentration of CMC and temperature were significant at 95% statistical confidence, reaching a maximum enzymatic activity of 0.493 IU/mL with 96 h of culture, CMC concentration of 1.5% and optimum temperature of 40 °C.

Keywords: Enzyme. Experimental Planning. Carboxymethylcellulase. Carboxymethylcellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação esquemática da celulose (Adaptado de RAVEN <i>et al.</i> , 2008)	16
Figura 1.2	Modelo esquemático da atuação das enzimas celulolíticas (CASTRO, 2010)	17
Figura 2.1	Cinética de crescimento celular de <i>Bacillus licheniformis</i> BCLLNf-01 nos meios BLM + 0,5% CMC (■), BLM + 1% de glicose (●) e BLM + 1% de glicose + 1% de caseína (▲)	34
Figura 2.2	Distribuição da atividade de carboximetilcelulase- CMCase (A) e de celulase total (B) de <i>B. licheniformis</i> BCLLNf-01 (inóculo 5,5%; CMC 1,5%; 40 °C; 500 rpm) de acordo com o tempo de cultivo	36
Figura 2.3	Atividade de CMCase para todos os ensaios realizados no planejamento experimental após 24, 48, 72 e 96 h de cultivo	38
Figura 2.4	Diagrama de Pareto para atividade de CMCase. Termo linear (L) e Termo Quadrático (Q) das variáveis independentes (CMC, Temperatura e Inóculo)	38
Figura 2.5	Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a variável resposta concentração de carboximetilcelulase (CMCase) em função das variáveis temperatura e concentração de carboximetilcelulose (CMC) após 96 h de cultivo e inóculo de 5,5 %	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Valores das variáveis concentração da fonte de carbono (Carboximetilcelulase - CMC), temperatura e concentração do inóculo no planejamento composto central rotacional 2^3	32
Tabela 2.2	Matriz do planejamento composto central rotacional 2^3 com três pontos centrais (nível 0) e seis axiais (níveis $\pm \alpha$)	32

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Atividade enzimática
C	Concentração determinada a partir do método DNS
D	Diluição
mT	Militesla
m/v	Massa/volume
μm	Micrômetros
nn	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
T	Tempo da reação
ton	Toneladas
UI/mL	Unidade Internacional por mL
Ve	Volume da enzima
Vt	Volume total da reação
v/v	Volume/volume
x	Concentração de CMC
y	Temperatura
μ	Velocidade máxima de crescimento celular
z	Atividade de CMCase

LISTA DE ABREVIATURAS

BLM	Basic Liquid Media
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
AN	Ágar nutriente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	15
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i>	15
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	15
1.2 Revisão da Literatura	15
1.2.1 <i>Celulose</i>	15
1.2.2 <i>Celulases</i>	16
1.2.3 <i>O Gênero Bacillus</i>	17
1.2.4 <i>Bacillus licheniformis e a produção de enzimas</i>	18
1.2.5 <i>Produção de celulases por B. licheniformis</i>	20
1.2.6 <i>Parâmetros que influenciam a síntese e atividade de celulases</i>	22
2 ARTIGO	24
2.1 Resumo	25
2.2 Abstract	26
2.3 Introdução	27
2.4 Materiais e Métodos	28
2.4.1 <i>Microrganismo e condições de cultivo para preservação</i>	28
2.4.2 <i>Triagem do meio de cultivo para o desenvolvimento do inóculo</i>	29
2.4.3 <i>Determinação da distribuição da atividade de celulases de B. licheniformis BCLLNf-01</i>	30
2.4.4 <i>Otimização dos parâmetros para produção enzimática</i>	31
2.5 Resultados e Discussão	33
2.5.1 <i>Triagem do meio de cultivo para o desenvolvimento do inóculo</i>	33
2.5.2 <i>Determinação da distribuição da atividade de celulases de B. licheniformis BCLLNf-01</i>	35
2.5.3 <i>Otimização da condição de cultivo para produção de CMCase</i>	36
Referências	41
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A – TABELA E GRÁFICOS	54

1 INTRODUÇÃO

As enzimas constituem um grupo de moléculas indispensáveis a vários setores industriais, onde as de origem microbiana destacam-se por se manterem funcionais sob diversas condições físicas e químicas. Como catalisadores, essas moléculas reduzem o tempo necessário para obtenção do produto desejado e conferem características que lhes agregam valor. O emprego de enzimas na indústria é considerado como uma tecnologia limpa, pois reduz o uso de energia, água e resíduos químicos, diminuindo os impactos ambientais causados por processos convencionais (LEHNINGER; NELSON, 2002, COTRINO; ORDONEZ, 2011, SINGH *et al.*, 2016).

As enzimas celulolíticas têm ganhado destaque por sua participação na hidrólise da biomassa lignocelulósica, possibilitando a obtenção do etanol de segunda geração que atualmente é considerado como uma alternativa para a redução dos resíduos agroindustriais e substituição dos combustíveis fósseis. No bagaço de cana de açúcar, uma das principais matérias-primas para o etanol de segunda geração, a celulose representa cerca de 45 % de sua massa total, sendo a hidrólise enzimática uma importante etapa na obtenção de açúcares fermentescíveis (CATOLICO *et al.*, 2015).

Além da aplicabilidade no setor sucroalcooleiro, as celulasas são importantes ferramentas para a indústria de polpa e papel, têxtil, farmacêutica, detergente e alimentícia. Na hidrólise da celulose, biopolímero mais abundante encontrado na natureza, o complexo enzimático formado pelas enzimas celulolíticas (endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase), seja individual ou em associação com outras enzimas como as xilanases, potencializa os processos de extração de sucos de fruta, metabólitos secundários, melhoramento de ração animal e extração de corantes de origem vegetal (SINGH *et al.*, 2016).

Apesar da relevância industrial das celulasas, o custo de produção é um dos principais desafios enfrentados pela indústria. Assim, investigações voltadas à produção dessas enzimas são um processo contínuo, com ênfase tanto em bioprospecção, objetivando a triagem de microrganismos celulolíticos, quanto na análise de fatores que influenciam em sua síntese. Selecionar o microrganismo e a condição ideal para a síntese da enzima de interesse é indispensável, sendo a otimização do processo de cultivo uma das etapas para que parâmetros como temperatura, pH, tamanho de inóculo, aeração, agitação e composição do meio de crescimento possam ser definidos de forma a aumentar a quantidade de enzima produzida e

diminuir o custo de produção (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; KIIO *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2017).

Com o objetivo de superar o desafio de produção das celulasas em escala comercial, pesquisadores têm focado cada vez mais na busca por microrganismos em diferentes *habitat*, considerando que as condições físico-químicas do ambiente conferem às enzimas propriedades como termoestabilidade e haloalcalinidade (AZADIAN *et al.*, 2016). Diferentes substratos são investigados quanto à capacidade de indução da síntese das enzimas celulolíticas, a qual pode ser direcionada tanto para produção do complexo enzimático (endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase) quanto para um grupo específico de celulasas; além disso, também são avaliados os parâmetros físico-químicos e nutricionais (KARIM *et al.*, 2015; NALLUSAMY *et al.*, 2016).

Diversos microrganismos são relatados como produtores de celulasas, dentre estes, representantes dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, com celulasas comercializadas pela Novozymes®, empresa que detém mais de 40% do mercado mundial de enzimas. O gênero *Bacillus* também é amplamente investigado e espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* são notificadas como produtoras de celulasas. Dentre os representantes do gênero, *Bacillus licheniformis* tem despertado o interesse biotecnológico por sintetizar enzimas empregadas em processos de panificação, fabricação de bebidas, detergentes, processamento de couro, hidrólise de resíduos lignocelulósicos (NEMA *et al.*, 2015; KAZEEM *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016 a; SREENA *et al.*, 2018).

Melo (2017) isolou *Bacillus spp.* associados ao muco de diferentes colônias do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) na Praia de Porto de Galinhas-PE, identificando as cepas por meio de análise de caracteres microscópicos e técnicas da biologia molecular. Também investigou a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por esses microrganismos e a cepa identificada como *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 destacou-se como uma boa produtora de celulase. Esta bactéria pertencente à família Bacillaceae, é Gram-positiva, esporulada, e forma colônias que apresentam um aspecto de líquen. Atualmente, encontra-se conservada na forma liofilizada e em discos de papel no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV). Considerando o potencial biotecnológico da espécie *B. licheniformis* e a relevância das celulasas, este trabalho se propôs a otimizar a produção de celulase por *B. licheniformis* BCLLNf-01.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Estabelecer a condição ótima para produção de celulase por *B. licheniformis* BCLLNf-01.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Preservar a cepa por método de secagem em discos de papel e liofilização;
- Determinar o meio de cultivo mais adequado para o desenvolvimento do inóculo;
- Determinar a distribuição da atividade de celulases de *B. licheniformis* BCLLNf-01 em diferentes frações do cultivo;
- Analisar o efeito do tamanho do inóculo, da concentração da fonte de carbono (CMC) e da temperatura sobre a produção de CMCase por *B. licheniformis* BCLLNf-01.

1.2 Revisão da Literatura

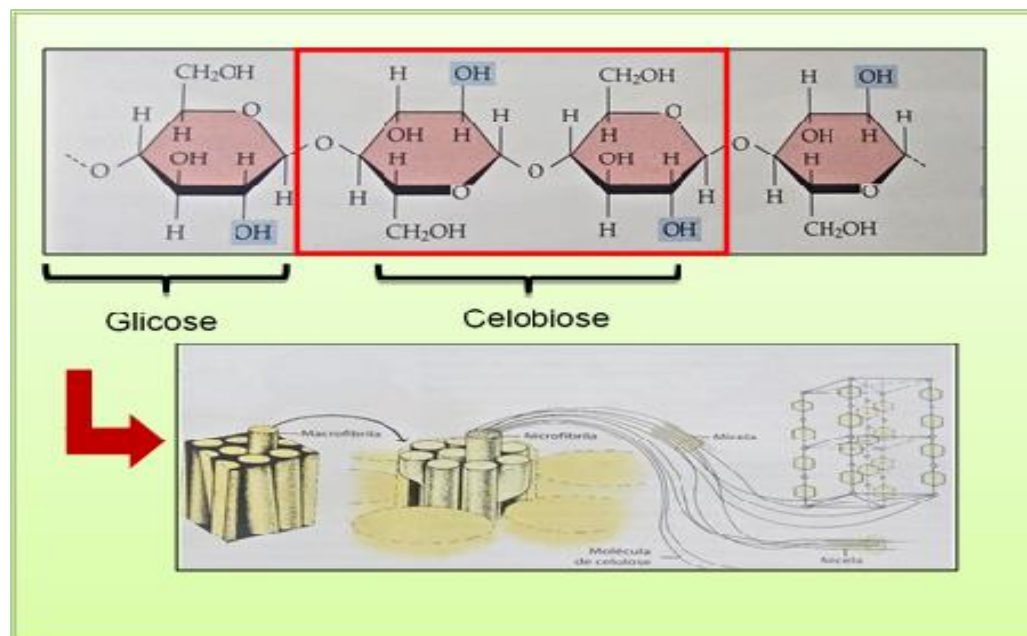
1.2.1 Celulose

A celulose é abundantemente encontrada na natureza como principal componente estrutural da parede celular dos vegetais. Seu percentual é variável, podendo corresponder a cerca de 85 % da biomassa de espécies lenhosas (CORALES *et al.*, 2015). O papel desempenhado por esse polissacarídeo justifica sua importância tanto sobre aspectos ecológicos, uma vez que é a base da alimentação de herbívoros e participa do ciclo do carbono, quanto econômicos. Só em 2015 a indústria de celulose (polpa) teve movimentação mundial de cerca de 572,50 bilhões de dólares por tonelada exportada, onde o Brasil liderou o *ranking* exportando mais de 10,6 milhões de toneladas (MOURA *et al.*, 2018). De acordo com o Ibá (Indústria brasileira de árvores), uma associação responsável pela representação institucional da cadeia produtiva de árvores plantadas, o Brasil é o segundo maior produtor de celulose do mundo, com 19,5 milhões de ton produzidas em 2018, dos quais 13,065 ton foram destinadas à exportação, um indicativo da expansão do mercado brasileiro neste segmento.

A celulose é um polímero formado por uma cadeia linear com numerosas unidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 glicosídicas, onde a unidade repetida é a

celobiose. A fibra de celulose está estruturalmente organizada em microfibrilas, as quais são compostas por microfibrilas que variam de 10 a 25 nm de diâmetro e que são resultantes do empacotamento de moléculas de celulose. As moléculas de celulose apresentam regiões ordenadas (micelas) e desordenadas ou amorfas (sem formação de micelas), sendo que as primeiras conferem à fibra de celulose maior resistência e impermeabilidade, até mesmo para moléculas pequenas como a água, sendo responsável por sua característica cristalina (RAVEN *et al.*, 2008). Na Figura 1.1 é apresentada a organização estrutural da molécula e da fibra de celulose.

Figura 1.1 - Representação esquemática da celulose



Fonte: Adaptado de Raven *et al.* (2008).

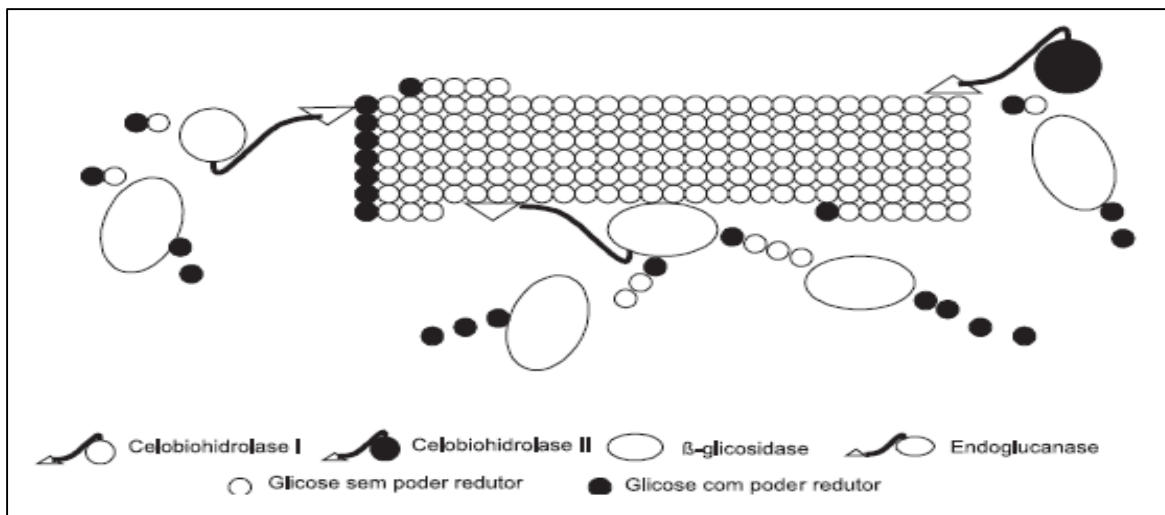
1.2.2. Celulases

As celulases pertencem ao grupo das glicosil-hidrolases, atualmente formado por 162 famílias (CAZy; <http://www.cazy.org>). Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise das ligações β -1,4 glicosídicas da celulose, a qual requer pelo menos a atuação de três grupos enzimáticos, a saber, endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases que agem em sinergismo rompendo estas ligações e liberando açúcares solúveis (VILELA, 2013).

As endoglucanases (endo-1,4- β -glucanase EC 3.2.1.14), também conhecidas como carboximetilcelulases, são as enzimas do complexo celulolítico que iniciam a hidrólise da celulose. Atuam na região interna da estrutura amorfa, e como resultado ocorre a liberação de

oligossacarídeos de tamanhos variados. As exoglucanases incluem as 1,4- β -D-glucanglucanohidrolases GHs (EC 3.2.1.74), responsáveis pela liberação de glicose, e as 1,4- β -D-glucancelobiohidrolases CBHs (EC 3.2.1.91), que ainda podem ser divididas em dois tipos: CBH I (atuam nos terminais redutores) e CBH II (atuam nos terminais não-redutores), sendo responsáveis pela liberação de celobiose. As β -glicosidases (1,4 β -D-glicosidase EC 3.2.1.21) são responsáveis pelo rompimento das ligações da celodextrina e celobiose, tendo como produto final moléculas de glicose (LYND *et al.*, 2002; CASTRO, 2010; DOBREV e ZHEKOVA, 2012; VILELA, 2013). A Figura 1.2 esquematiza o sistema de ação das celulasas na hidrólise da celulose.

Figura 1.2 - Modelo esquemático da atuação das enzimas celulolíticas



Fonte: (CASTRO, 2010).

1.2.3 O Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* compreende microrganismos com características morfológicas e bioquímicas diversas. São bastonetes com extremidades retas ou arredondadas, esporulados, Gram-positivos ou Gram variáveis (coloração de Gram não é positiva nos cultivos jovens), com tamanhos entre 0,5 x 1,2 μ m e 2,5 x 10 μ m. Alguns representantes como *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. subtilis* são formadores de cápsula. Podem ser aeróbios ou anaeróbios, geralmente móveis, com exceções como *B. anthracis* e *B. mycoides* (GOMES, 2013).

A grande diversidade morfológica, bioquímica e a formação de esporos de resistência tem garantido ao gênero *Bacillus* uma ampla distribuição, com representantes encontrados nos

mais variados ambientes. Pindi *et al.* (2014) isolaram sete cepas de *Bacillus* a partir da rizosfera de plantas de algodão; Chantarasiri (2015) isolou *B. cereus* JD0404 a partir de sedimentos de mangue; El-Gayar (2017) isolou *B. subtilis* a partir de amostras de água de torneira, Yd *et al.* (2019) isolaram *Bacillus* a partir de fontes termais na Índia. Dentre os ambientes ocupados pelos *Bacillus* o meio marinho tem despertado interesse, visto que oferece condições físicas e químicas extremas (temperatura, pH, salinidade, densidade de luz, disponibilidade de nutrientes), tornando esses microrganismos fontes de moléculas bioativas com características distintas das suas homólogas terrestres (BAHARUM *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2016).

Espécies marinhas têm sido isoladas e estudadas quanto à síntese de enzimas e outros metabólitos de importância industrial. Annamalai *et al.* (2012) purificaram e caracterizaram uma celulase produzida por *B. licheniformis* AU01 isolado de sedimentos marinhos, e a enzima demonstrou características termostáveis e estabilidade em pH alcalino, restando sua atividade em mais de 80 % a 80 °C e pH 12, propriedades relevantes para o emprego na indústria de detergentes. Bastos *et al.* (2013) isolaram três cepas de *Bacillus* sp. a partir da esponja *Petromica citrina*, as quais demonstraram atividade antiviral, dando possibilidade do emprego desses microrganismos na indústria farmacêutica para a produção de drogas contra o vírus da hepatite C. Veras *et al.* (2018) estudaram a síntese multienzimática de protease, amilase, celulase e xilanase e observaram que dentre 12 cepas isoladas a partir de recifes de coral, a cepa identificada como *B. subtilis* SR60 conseguiu produzir todas as enzimas em condições de alta salinidade. O conjunto de características atribuídas aos metabólitos sintetizados por *Bacillus* marinhos os tornam uma fonte de novas moléculas para aplicação industrial.

1.2.4 *Bacillus licheniformis* e a produção de enzimas

Bacillus licheniformis é um microrganismo Gram-positivo, capsulado e produtor de estruturas de resistência denominadas endósporos. Suas colônias caracterizam-se pelo formato de líquen e por apresentarem um aspecto seco. Graças à disseminação dos seus endósporos, a espécie tem sido encontrada em diversos ambientes, sendo isolada a partir de amostras de solo, lagos, animais e vegetação (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; GOMES, 2013; MELO, 2017). O potencial biotecnológico da espécie baseia-se na capacidade de síntese de metabólitos com aplicações farmacêutica, agrícola, em processos de biorremediação e de

várias enzimas de importância industrial (ALVAREZ- ORDÓÑEZ *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2014; LEÃO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016).

Um dos principais objetivos dos estudos de isolamento e caracterização de cepas de *B. licheniformis* é a prospecção de enzimas que atendam às necessidades industriais. Em experimentos conduzidos com *B. licheniformis* P11(c) por Bajaj e Manhas (2012), observou-se que o isolado conseguiu metabolizar diversos tipos de resíduos agrícolas como fonte de carbono (farelo de trigo, cevada, farelo de arroz, casca de arroz, farinha de milho) e diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, caseína, peptona) produzindo xilanase, enzima com potencial aplicação na indústria de bebidas.

Seo *et al.* (2014) conduziram um experimento no qual *B. licheniformis* foi cultivado em frascos com volume de 100 mL de meio de cultura à base de sais acrescido de 1% de distintos resíduos agrícolas (grãos secos de destilaria com solúveis, farelo de trigo, farelo de palmeira e farelo de coco) durante um período de quatro dias a 37 °C. Sob estas condições, foi observado que o microrganismo foi capaz de produzir concomitantemente xilanase, endoglucanase e β -glucosidase, enzimas envolvidas na hidrólise da celulose e da hemicelulose.

A produção de lacase por *B. licheniformis* também tem sido notificada. Lu *et al.* (2013) realizaram uma triagem, onde cinco microrganismos demonstraram alta capacidade de síntese de lacase. Dentre estes, a cepa identificada como *B. licheniformis* LSO4 foi selecionada para as demais etapas do estudo, com registro de uma lacase com tolerância a NaCl, solventes orgânicos como metanol, etanol e propriedades termostáveis e alcalino tolerantes.

Ghani *et al.* (2013) isolaram e caracterizaram 35 cepas do gênero *Bacillus*, identificando dentre estas cinco isolados como *B. licheniformis*. Os resultados dos ensaios constataram que as cinco cepas foram capazes de produzir, dentre outras enzimas, α -amilase e glucoamilase. Deljou e Arezi (2017) realizaram uma triagem com três cepas bacterianas isoladas de uma fonte termal localizada em Quinarje (Província de Ardebil, Irã) e *B. licheniformis*-AZ2 apresentou a mais alta produção de amilase, sendo assim selecionada para a etapa de otimização da atividade amilolítica. Recentemente, Ali *et al.* (2018) isolaram e identificaram quatro sub-cepas de *B. licheniformis* a partir de amostras de solo. Em seus achados, os microrganismos demonstraram atividade amilolítica ao serem cultivados em placas com Ágar-Amido, sintetizando uma α -amilase com características termostáveis e alcalina.

As pectinases são outro grupo de enzimas sintetizadas por *B. licheniformis*. Hehman *et al.* (2015) conduziram um ensaio de triagem com 23 cepas isoladas de vegetais estragados, solo e outras fontes a fim de selecionar microrganismos com potencial pectinolítico. Dentre estes, apenas três foram capazes de sintetizar pectinase, sendo a maior atividade de produção desempenhada pela cepa identificada como *B. licheniformis* KIBGE-IB21. Madu (2016) trabalhou com foco na purificação e caracterização de uma pectinase proveniente de uma cepa de *B. licheniformis* isolada de resíduos de mandioca, investigando, dentre outros fatores, a temperatura de estabilidade, pH e inibidores. Bib *et al.* (2018) realizaram o isolamento de microrganismos provenientes de amostras de solo, resíduo têxtil, frutas e vegetais estragados e ao executar o ensaio para atividade de pectinase, apenas uma cepa demonstrou maior produção, sendo esta posteriormente identificada como *B. licheniformis*.

A síntese de proteases por *B. licheniformis* também tem sido relatada. Inca-Torre *et al.* (2018) trabalharam com a cepa *B. licheniformis* 21415 utilizando um meio formulado com lodo de esgoto e registraram, além da atividade de lipases e celulases, a presença de proteases. Hashem *et al.* (2018) realizaram ensaios com a cepa identificada como *B. licheniformis* ALW1, e obtiveram atividade de queratinase, a qual foi melhorada após otimização das variáveis pH, temperatura e concentração do substrato. Sonune e Garobe (2018) isolaram 34 microrganismos provenientes de amostras de águas residuais e lodo, dentre os quais cinco foram selecionados para as etapas de identificação e potencial uso em processos de biorremediação. Em seus achados, *B. licheniformis* NW6, além de produzir protease, destacou-se na síntese de lipase, com formação de um halo de 41 mm após 72 h de incubação.

B. licheniformis também são notificados como produtores de quitinase, enzima envolvida na degradação de quitina. Larib Habich *et al.* (2015) realizaram uma triagem a partir de amostras de águas residuais provenientes de uma indústria de alimentos aquáticos, onde várias cepas demonstraram atividade de quitinase, com destaque para a cepa *B. licheniformis* LHH100. A diversidade de enzimas sintetizadas pela espécie *B. licheniformis* tem justificado as pesquisas voltadas para prospecção e otimização de parâmetros de produção dessas moléculas.

1.2.5 Produção de celulases por *B. licheniformis*

Há uma ampla gama de pesquisas que relatam a produção de celulases por diversos microrganismos. Fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Streptomyces* e *Aspergillus*

tem sido reportados como produtores de enzimas do complexo celulolítico. O gênero *Bacillus* também é bastante relevante, com destaque para *B. licheniformis* (BANSAL *et al.*, 2012; VILELA, 2013; KARIM *et al.*, 2015; NEMA *et al.*, 2015; BISCHOF *et al.*, 2016).

Acharya e Chaudhary (2012) analisaram os efeitos de fatores nutricionais (fonte de nitrogênio) e ambientais (pH, temperatura, período de incubação) sobre a produção de celulase por *Bacillus sp.* MVS3 e *B. licheniformis* MVS1 isolados a partir de amostras de água coletadas em uma fonte termal em Maharashtra, Índia e constataram que *B. licheniformis* MVS1 apresentou melhor desempenho na produção da referida enzima.

Karim *et al.* (2015) analisaram a produção da endo-1,4-β-D-glucanase por *B. licheniformis* KIBEG-IB2 com ênfase em fatores físicos (pH, tempo, temperatura), químicos (macro e micronutrientes) e diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. A produção máxima da referida enzima foi encontrada após um período de 48 h de incubação, sendo a temperatura de 37 °C e o pH 6,0 considerados como ótimos e o meio de cultura composto por (g.L⁻¹) carboximetilcelulose, 5,0; peptona, 15,0; extrato de levedura, 15,0; CaCl₂.2H₂O, 0,001; FeSO₄.7H₂O, 0,001; K₂HPO₄, 5,0; NaH₂PO₄, 5,0 e MgSO₄.7H₂O, 1,0, como o mais indicado para potencializar a produção da endo-1,4-β-glucanase.

Gupta *et al.* (2015) realizaram uma triagem de microrganismos produtores de celulases com 14 isolados. Dentre estes, apenas cinco demonstraram potencial celulolítico, sendo a maior atividade atribuída à cepa identificada como *B. licheniformis* K-3, com produção de 1,1 UI/mL⁻¹ quando o substrato utilizado foi o farelo de trigo. Os autores ressaltam que as celulases sintetizadas pela cepa apresentaram características desejáveis pela indústria, como estabilidade a uma ampla faixa de pH (4-10) e temperatura (50-100 °C).

Shajahan *et al.* (2017), ao investigarem a otimização da produção de celulase pela cepa identificada como *B. licheniformis* NCIM 5556, isolada de uma fonte termal em Maharashtra (Índia), observaram que a condição ótima para a produção da enzima foi alcançada mediante a utilização de um meio de cultura composto por 19,21 g/L de carboximetilcelulose, 25,06 mg/L de CaCl₂.6H₂O, 2,96 mL/L de tween-20, sendo a temperatura ideal de 43,3 °C. Os autores ressaltaram que o meio otimizado proporcionou uma produção três vezes maior quando comparado com o meio basal.

Melo (2017) conduziu um experimento com várias espécies do gênero *Bacillus* isoladas a partir do muco de diferentes colônias do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) e identificou quatro cepas como *B. licheniformis*. Estas foram cultivadas em meio sólido com adição de filtro de papel como substrato específico para celulase, e

demonstraram forte atividade enzimática de acordo com o índice de Pz (cálculo da zona de precipitação), o qual foi utilizado para calcular a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de hidrólise. Diante dos resultados, os isolados foram classificados pelo autor como bons produtores de celulase.

Chen *et al.* (2017) conduziram um estudo com *B. licheniformis* CGMCC 2876 produtora de β -glucosidase, enzima do complexo celulolítico. Os autores focaram na caracterização da enzima e sua relação com a hidrólise de um polissacarídeo biofloculante também sintetizado pela cepa.

Tariq *et al.* (2018) isolaram microrganismos a partir de amostras de solo de jardim, onde restos de grama e outros vegetais eram queimados, com o objetivo de avaliar a capacidade de produção de celulases termostáveis. Sete cepas identificadas como *B. licheniformis* demonstraram atividade celulolítica, dentre as quais, *B. licheniformis* RT-17 se destacou com produção promissora a 50 °C. Diante do exposto, a síntese de celulases por *B. licheniformis* é inquestionável tornando a espécie uma importante fonte de enzimas celulolíticas.

1.2.6 Parâmetros que influenciam a síntese e atividade de celulases

A síntese e a atividade das celulases microbianas são influenciadas por diversos fatores. Uma ampla faixa de temperatura tem sido descrita para a síntese de celulases por bactérias do gênero *Bacillus*. Nirmala e Sindhum (2011) conduziram um estudo com *B. circulans* e registraram 45 °C como a temperatura ótima para a síntese de endoglucanase. Para a cepa identificada como *B. licheniformis* AU01 e estudada por Annamalai *et al.* (2012), a temperatura ótima nos ensaios foi de 50 °C, enquanto Deka *et al.* (2013) observaram que para *B. subtilis* AS3 a temperatura ideal para síntese enzimática foi de 39 °C. Nandimath *et al.* (2016) relataram a condição ótima para a celulase produzida por *Bacillus sp.* na temperatura de 30 °C. Recentemente, Sreena *et al.* (2018) realizaram um experimento de otimização conduzido com *B. subtilis* UM S1 e concluíram que o cultivo realizado a 40 °C foi a condição ótima para síntese de CMCase.

O pH ótimo para produção de celulases também varia, sendo observados valores entre 5 e 9. Para *B. licheniformis*, os valores ótimos de pH inicial registrados são 5, 6, 6,5 e 9 (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; ALI MOHAMED *et al.*, 2015; DAVE *et al.*, 2015; KIIO *et al.*, 2016), enquanto que para *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* a maior produção de celulases tem sido registrada a pH 7.0 (YE *et al.*, 2017; SREENA *et al.*, 2018).

A atividade de celulases pode ser induzida ou inibida na presença de certos íons, como relatado por Nema *et al.* (2015), que conduziram um estudo com *B. cereus* e observaram que íons metálicos como Co^{2+} e Mn^{2+} são agentes ativadores da atividade enzimática, enquanto o íon Fe^{3+} (independente da concentração utilizada) mostrou-se como agente inibidor. Padilha *et al.* (2015) analisaram a atividade de celulase produzida por *Bacillus sp.* C1AC5507 na presença dos íons Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} , e observaram que todos os íons induziram a atividade enzimática, exceto Cu^{2+} . Chantarasiri (2015) também relataram melhora na atividade de celulases sintetizadas por *B. cereus* JDO404 na presença de Mn^{2+} .

O tamanho do inóculo também é um dos fatores que influencia a produção de celulases. Diversos tamanhos de inóculo têm sido empregados, contudo os relatos são de que as melhores concentrações estão na faixa de 1 a 5% (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; ALI MOHAMED *et al.* 2015; KAZEEM *et al.* 2016; SHAJAHAN *et al.* 2017).

A influência das fontes de carbono e nitrogênio sobre a síntese de celulases é um importante fator a ser analisado, uma vez que essas enzimas são induzíveis e que na maioria dos casos a produção enzimática está atrelada ao crescimento microbiano (HO; KU, 2017). Substratos como glicose, sacarose, frutose, lactose e resíduos agrícolas (bagaço de cana de açúcar, casca de batata, farelo de trigo) são utilizados como fonte de carbono na síntese de celulases (PADILHA *et al.*, 2015; LUGANI *et al.*, 2015; IRFAN *et al.*, 2017). As fontes de carbono com melhores resultados sobre a síntese de enzimas do complexo celulolítico são CMC, frutose e lactose (SREEJA *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2014; MARRA *et al.*, 2015; MARCO *et al.*, 2017; THOMAS *et al.*, 2018). Em relação às fontes de nitrogênio, extrato de levedura e peptona são as que têm demonstrado maior influência (KUMAR *et al.*, 2012; SINGH, 2014; LUGANI *et al.*, 2015; ABU-GARBIA *et al.*, 2018).

2 ARTIGO

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 PARA PRODUÇÃO DE CELULASE

Raquel Nascimento da Silva

Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, R. Alto do Reservatório,
s/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, 55608-680, Brasil

Autor para correspondência: raquelnascimento@gmail.com

Revista para submissão: World Journal of Microbiology and Biotechnology

Autor para correspondência:

Raquel Nascimento da Silva, E-mail: raquelnascimento@gmail.com

2.1 Resumo

Carboximetilcelulases (CMCases) são enzimas do complexo celulolítico que atuam na hidrólise interna das ligações 1,4- β -D-glicosídicas da celulose. O objetivo deste estudo foi otimizar a produção de CMCase por *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01, uma cepa associada ao muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidária, Anthozoa). Para definir a melhor condição de cultivo do inóculo, foram realizados experimentos com o meio BLM-*Basic Liquid Media* (composição, em g/L: KH_2PO_4 , 1.36; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; FeSO_4 , 0.01; NaCl , 2.0; extrato de levedura 1,0) suplementado em três condições distintas: 0,5% de carboximetilcelulose (CMC), 1% de glicose e 1% de glicose + 1% de caseína. A melhor condição encontrada foi com suplementação de CMC a 0,5%. Para analisar o padrão de distribuição das celulases de *B. licheniformis* BCLLNf-01, as atividades de celulase total e CMCase foram investigadas no sobrenadante, conteúdo intracelular e conteúdo de parede. O cultivo foi realizado em meio BLM suplementado com 1,5% de CMC, 5,5% de inóculo, 40 °C, pH 6,5, 500 rpm por 72 h. A maior atividade foi registrada no sobrenadante. Para otimizar a produção de CMCase, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) ²³ para investigar a influência das variáveis concentração da fonte de carbono (CMC-0.5 a 1.5%), concentração do inóculo (1 a 10%) e temperatura (35 a 45 °C) sobre a produção de CMCase. Os resultados demonstraram que a concentração de CMC e a temperatura foram significativas a 95% de confiança, com atividade enzimática máxima de 0,493 UI/mL com 96 h de cultivo, concentração de CMC de 1,5 % e temperatura ótima de 40 °C.

Palavras-chave: Enzima, Planejamento experimental, Carboximetilcelulase, Carboximetilcelulose.

2.2 Abstract

Carboxymethylcellulases (CMCases) are enzymes of the cellulolytic complex that act on the internal hydrolysis of 1,4- β -D-glycosidic bonds of cellulose. The objective of this study was to optimize the production of CMCase by *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01, a strain associated with mucus from the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidária, Anthozoa). In order to define the best inoculum cultivation condition, experiments were performed with BLM-Basic Liquid Media (composition in g/L: KH_2PO_4 , 1.36, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2, FeSO_4 , 0.01, NaCl, 2.0, yeast extract 1.0) supplemented under three different conditions: 0.5% carboxymethylcellulose (CMC), 1% glucose and 1% glucose + 1% casein. The best condition found was with 0.5% CMC supplementation. To analyze the distribution pattern of *B. licheniformis* BCLLNf-01 cellulases, the activities of total cellulase and CMCase were investigated in the supernatant, intracellular content and wall content. Cultivation was performed in BLM medium supplemented with 1.5% CMC, 5.5% inoculum, 40 °C, pH 6.5, 500 rpm for 72 h. The highest activity was recorded in the supernatant. To optimize the production of CMCase, a Rotational Compound Design (DCCR) 2^3 was used to investigate the influence of the variables carbon concentration (CMC-0.5 to 1.5%), inoculum concentration (1 to 10%) and temperature (35 to 45 °C) on the production of CMCase. The results demonstrated that the CMC concentration and temperature were significant at 95% confidence, with maximal enzymatic activity of 0.493 IU/mL with 96 h of culture, concentration of CMC of 1.5% and optimum temperature of 40 °C.

Keywords: Enzyme, Experimental Planning, Carboxymethylcellulase, Carboxymethylcellulose.

2.3 Introdução

As celulasas desempenham um importante papel na degradação da biomassa lignocelulósica, clivando as ligações 1,4- β -D-glicosídicas da celulose, biopolímero abundantemente encontrado na natureza. O termo celulase é comumente utilizado para descrever o complexo enzimático formado pelas seguintes enzimas: endoglucanases (endo-1,4- β -glucanase EC 3.2.1.14), também conhecidas como carboximetilcelulasas (CMCase), que atuam na região interna da fibra de celulose liberando oligossacarídeos de tamanhos variados; exoglucanases (exo-1,4- β -D-glucanase EC 3.2.1.91), enzimas que agem nas extremidades da fibra de celulose resultando na liberação de celobiose, e as β -glicosidases (1,4 β -D-glicosidase EC 3.2.1.21), responsáveis pelo rompimento das ligações da celobiose, o que resulta em moléculas de glicose livre (Lynd *et al.* 2002).

Na indústria, as celulasas são aplicadas em processos de extração de sucos, metabólitos secundários, melhoramento de ração animal, extração de corantes de origem vegetal e na obtenção de açúcares fermentescíveis empregados na produção de biocombustíveis, o que as tornam cada vez mais requeridas no mercado de enzimas (Catolico *et al.* 2015; Singh *et al.* 2016). Celulasas microbianas têm ganho destaque do ponto de vista industrial por se manterem estáveis em diversas condições físicas e químicas (Singh *et al.* 2016). Representantes dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Bacillus* já são utilizados na produção comercial dessas enzimas por empresas como a Novozymes® e DuPont®, no entanto, em virtude do alto custo de produção, há uma busca constante por novos produtores de celulasas e melhoramento das condições de cultivo para maximizar a síntese enzimática (Abdul-hadi *et al.* 2016; J. Abdullah *et al.* 2016; Sreena e Sebastian 2018).

O gênero *Bacillus* demonstra bastante eficiência em relação à produção de celulasas, tendo como alguns de seus representantes as cepas *Bacillus licheniformis* KIBEG-IB2 (Karim *et al.* 2015), *B. licheniformis* K-3 (Gupta *et al.* 2015), *B. licheniformis* NCIM 5556 (Shajahan *et al.* 2017) e *B. licheniformis* CGMCC 2876, que tem sido avaliadas quanto à síntese de enzimas do complexo celulolítico e com resultados que confirmam o potencial biotecnológico dessa espécie. A busca por celulasas com características desejáveis do ponto de vista industrial é contínua, requerendo microrganismos cuja tendência seja sintetizar enzimas termotolerantes, salinotolerantes, ativas em ampla faixa de pH. Nesse contexto, microrganismos provenientes dos ecossistemas marinhos são bons candidatos, dadas suas

condições ambientais extremas (temperatura, pH, salinidade, densidade) (Wang 2016; de Veras *et al.* 2018).

O presente estudo objetivou otimizar a produção de CMCase pela cepa marinha *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01, analisando a influência das variáveis fonte de carbono (Carboximetilcelulose-CMC), inóculo e temperatura sobre a produção da enzima.

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Microrganismo e condições de cultivo para preservação

A cepa *B. licheniformis* BCLLNf-01 foi isolada a partir do muco de diferentes colônias sadias (sem sinais aparentes de necrose, infecções, ressecamento ou branqueamento) do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) na praia de Porto de Galinhas, município de Ipojuca, litoral sul de Pernambuco, em trabalho prévio realizado por Melo (2017). O microrganismo foi cultivado em meio de esporulação MBS (composição, em g/L: peptona de carne 10,0; extrato de levedura 1,0; KH_2PO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01), a pH 7,2, em *shaker* (MARCONI®) a 200 rpm, 30 °C e período de incubação de 5 dias.

2.4.1.1 Preservação dos esporos em disco de papel

A preservação dos esporos em discos de papel foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Chitte (2015) Um volume de 30 mL do cultivo descrito na etapa anterior foi centrifugado a 6000 rpm (VISION®) por 20 min e o sobrenadante foi desprezado. Na sequência, a amostra foi ressuspensa em 3 mL de solução salina 0,85 % (m/v) (suspensão 10x concentrada) e incubada em banho-maria a 80 °C durante 12 min, sendo posteriormente submetida a um banho de gelo por 5 min para eliminação das células vegetativas. A suspensão celular foi submetida à contagem de esporos viáveis por meio de plaqueamento em meio AN após diluições decimais seriadas e incubação a 30 °C por 24-48h.

Para o preparo dos discos, foi utilizado papel mata borrão com gramatura de 250 g/m² e um furador de 7,0 mm. Foram distribuídos 20 discos por placa de Petri (90 × 15 mm), sendo estas embaladas individualmente, levadas à autoclave a 121 °C em três ciclos de 1 h com intervalos de 24 h e posteriormente secas em estufa a 60 °C. Após o processo de esterilização e secagem, os discos foram impregnados com alíquotas de 20 µL da suspensão celular ($5,8 \times 10^9$ esporos/mL), secos em estufa a 35 °C por 24 h e armazenados em geladeira a 4 °C.

2.4.1.2 Preservação de células totais por liofilização

Na preservação das células totais por liofilização foi utilizado o meio crioprotetor composto por 10 % de sacarose e 1 % de gelatina (Kupletskaya e Netrusov 2011), o qual foi preparado e autoclavado a 121 °C por 15 min. Um volume de 120 mL de suspensão celular de *B. licheniformis* BCLLNf- 01, obtida a partir das condições de cultivo descritas no item 2.4.1.1, foi centrifugado a 6000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso em 12 mL do meio crioprotetor. Frascos de vidro estéreis com capacidade de 10 mL foram utilizados para o procedimento de liofilização, sendo estes devidamente identificados com o código da cepa.

A suspensão foi homogeneizada e uma alíquota de 1 mL foi transferida para cada frasco, que recebeu uma tampa de liofilização deixando-se um espaço para evaporação do líquido. As amostras foram congeladas a -80 °C e após 16 h, o sistema foi transferido para o liofilizador (Sentry 2.0, VirTis, SP Scientific), no qual se realizou a secagem por 48 h a -50 °C, com vácuo a 300 mT. Os frascos foram fechados a vácuo, lacrados e armazenados à temperatura ambiente.

2.4.2 Triagem do meio de cultivo para o desenvolvimento do inóculo

Com o objetivo de redução do tempo necessário para que o microrganismo atingisse a fase de crescimento exponencial no inóculo, foi testado o meio *Basic Liquid Media* (BLM), que apresenta a seguinte composição (g/L): KH₂PO₄, 1,36; (NH₄)₂SO₄, 1,0; MgSO₄·7H₂O, 0,2; FeSO₄, 0,01; NaCl, 2,0; extrato de levedura, 1,0, conforme Shajahan *et al.* (2017). O meio foi suplementado em três condições distintas: 0.5% de carboximetilcelulose-CMC de alta viscosidade (Sigma-Aldrich®), 1% de glicose e 1% glicose + 1% caseína. Foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 150 mL do meio em cada condição testada, a pH 6,5. Cada frasco foi semeado com um disco de papel contendo a cultura esporulada ($1,16 \times 10^9$ esporos/disco) e incubado em *shaker* (MARCONI®) a 200 rpm e 30 °C. Durante o período de 24 h alíquotas de cada cultivo foram retiradas a cada 30 minutos e a densidade óptica foi determinada por espectrofotometria a 600 nm. A curva de crescimento celular foi plotada como absorbância *versus* tempo, empregando-se como branco para as análises o meio de cultura livre de células.

2.4.3 Determinação da distribuição da atividade de celulases de *B. licheniformis* BCLLNf-01

As atividades de celulases totais e CMCase foram analisadas a partir de três frações distintas do cultivo (sobrenadante conteúdo intracelular e conteúdo de parede celular). O meio utilizado foi o BLM com suplementação de 1,5% de CMC, pH 6.5, temperatura de 40 °C e inóculo de 5,5 %. Tubos de 50 mL receberam um volume de 18,9 mL do meio de cultivo e foram semeados com 1,1 mL de inóculo, sendo incubados por 72 h a 500 rpm. A cada 24 h, alíquotas foram coletadas e centrifugadas a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C.

Para a análise da atividade das enzimas extracelulares foi utilizado o sobrenadante obtido da etapa de centrifugação. Para a obtenção do conteúdo intracelular foi utilizada a metodologia descrita por Medeiros *et al.* (2008), com algumas modificações. O *pellet* foi ressuspenso em tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8). Em seguida, as amostras foram submetidas à abrasão com pérolas de vidro, sendo agitadas em ciclos de cinco minutos em agitador tipo vórtex (BIOMIXER QL - 901) com intervalos de dois minutos em banho de gelo, a fim de evitar a desnaturação enzimática. Ao término de 30 minutos, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores, sendo o novo sobrenadante utilizado na análise da porção intracelular e o *pellet* ressuspenso em tampão citrato de sódio e utilizado na análise do conteúdo de parede celular. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.4.3.1 Ensaio de celulase total

A atividade celulolítica total foi avaliada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). Um volume de 0,5 mL do extrato enzimático bruto foi incubado com 20 mg de papel de filtro Whatman N°. 1 (Whatman Inc., Florham Park, NJ, USA) e 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) a 50 °C por 60 min. Como controle, preparou-se uma amostra nas mesmas condições descritas exceto pela substituição do extrato enzimático por água destilada. Para o branco de calibração do espectrofotômetro foi utilizado apenas tampão citrato de sódio. Após incubação, um volume de 0,5 mL de cada amostra foi transferido para tubos com a mesma proporção de DNS e a mistura levada à ebulição por 5 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e tiveram seu volume ajustado para 5 mL pela adição de água destilada.

Os açúcares redutores liberados foram quantificados por espectrofotometria UV-Vis a 540 nm utilizando-se como padrão glicose (2 g/L). Uma Unidade Internacional (UI) de atividade celulolítica foi expressa como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol

de glicose por minuto sob as condições padronizadas da reação (Ghose, 1987). Curvas padrão com glicose foram realizadas para cada análise.

2.4.3.2 Ensaio de CMCase

Para a determinação da atividade de CMCase foi utilizado como substrato CMC solubilizado a 2 % m/v em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). O ensaio consistiu na incubação de 0,5 mL do extrato enzimático bruto diluído em 0,5 mL de tampão citrato de sódio e 0,5 mL do substrato (m/v). Para a amostra controle, a enzima foi substituída por água destilada e para o branco de calibração foi utilizado o tampão citrato de sódio. Todas as amostras foram incubadas a temperatura de 50 °C por 30 min, como descrito por Ghose (1987). A atividade da enzima foi mensurada pelo método de Miller (1959), que utiliza o DNS como reagente para quantificação dos açúcares redutores, conforme descrito anteriormente. Curvas padrão com glicose foram realizadas para cada análise.

A atividade enzimática (A) nos ensaios de celulase total e CMCase foi determinada de acordo com a Equação 1: (Inforsato e Porto 2016).

$$A = \frac{D \times C (\mu\text{mol. mL}^{-1}) \times V_t (\text{mL})}{T (\text{min}) \times V_e (\text{mL})} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

D – fator de diluição

C – concentração de glicose liberada na reação enzimática

V_t – Volume total da reação

T – Tempo de reação

V_e – Volume da solução enzimática

2.4.4 Otimização dos parâmetros para produção enzimática

Para análise dos parâmetros que influenciam na produção de CMCase foi empregado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ com três pontos centrais (nível 0) e seis axiais (níveis ± α), totalizando 17 experimentos. As variáveis investigadas neste estudo foram a concentração da fonte de carbono (CMC), concentração do inóculo e temperatura. Na Tabela 2.1 são apresentados os valores das variáveis e seus respectivos níveis do planejamento experimental. Os intervalos testados foram definidos com base em dados obtidos na literatura (Ali Mohamed *et al.* 2015; Karim *et al.* 2015; Shajahan *et al.* 2017). A

Tabela 2.2 mostra a matriz completa do planejamento experimental. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Statistica® (versão 7.0).

Tabela 2.1 – Valores das variáveis concentração da fonte de carbono (Carboximetilcelulose-CMC), temperatura e concentração do inóculo no planejamento composto central rotacional 2^3

Variável	-α	-1	0	+1	+α
Concentração de CMC (%)	0,5	0,7	1,0	1,3	1,5
Temperatura (°C)	35	37	40	43	45
Concentração do Inóculo (%)	1,0	2,8	5,5	8,2	10,0

O meio utilizado no inóculo e nos ensaios de otimização foi o meio BLM a pH 6,5. Para o inóculo foram utilizados Erlenmeyers com capacidade de 500 mL, os quais receberam 100 mL do meio de cultivo suplementado com 0,5% de CMC (m/v), sendo cada frasco inoculado com um disco de papel contendo a cultura esporulada e incubado a 150 rpm, 30 °C por 16 h. Nos ensaios de otimização as concentrações de CMC variaram conforme o planejamento experimental. Frascos tipo tubo Falcon com capacidade de 50 mL foram utilizados nos cultivos realizados em *shaker* de bancada com agitação a 500 rpm por um período de incubação de 96 h. Amostras foram coletadas com 24, 48, 72 e 96 h e centrifugadas a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante livre de células (enzima bruta) foi utilizado nos ensaios da atividade enzimática. Todos os testes de atividade enzimática foram realizados em duplicata e as análises efetuadas no dia da coleta, sendo realizadas curvas-padrão de glicose a cada análise.

Tabela 2.2 – Matriz do planejamento composto central rotacional 2^3 com três pontos centrais (nível 0) e seis axiais (níveis $\pm \alpha$)

Ensaio	Concentração de CMC (%)	Temperatura (°C)	Concentração de inóculo (%)
1	-1 (0,7)	-1(37)	-1 (2,8)
2	+1 (1,3)	-1 (37)	-1 (2,8)
3	-1 (0,7)	+1 (43)	-1 (2,8)
4	+1 (1,3)	+1 (43)	-1 (2,8)

Ensaio	Concentração de CMC (%)	Temperatura (°C)	Concentração de inóculo (%)
5	-1 (0,7)	-1 (37)	+1 (8,2)
6	+1 (1,3)	-1 (37)	+1 (8,2)
7	-1 (0,7)	+1 (43)	+1 (8,2)
8	+1 (1,3)	+1 (43)	+1 (8,2)
9	0 (1,0)	0 (40)	0 (5,5)
10	0 (1,0)	0 (40)	0 (5,5)
11	0 (1,0)	0 (40)	0 (5,5)
12	- α (0,5)	0 (40)	0 (5,5)
13	+ α (1,5)	0 (40)	0 (5,5)
14	0 (1,0)	- α (35)	0 (5,5)
15	0 (1,0)	+ α (45)	0 (5,5)
16	0 (1,0)	0 (40)	- α (1,0)
17	0 (1,0)	0 (40)	+ α (10,0)

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Triagem do meio de cultivo para o desenvolvimento do inóculo

As cinéticas de crescimento de *B. licheniformis* BCLLNf-01 nos três meios de cultivo testados para o desenvolvimento do inóculo é apresentada na Figura 2.1. Os resultados mostram que quando *B. licheniformis* BCLLNf-01 foi cultivado no meio suplementado com 0,5 % de CMC, a fase de crescimento exponencial foi iniciada após 14 h de cultivo, diferindo das demais condições (glicose e glicose+caseína), onde a fase log foi iniciada após aproximadamente 17 h. Por outro lado, nos meios suplementados com glicose e glicose +caseína o microrganismo apresentou maior velocidade específica de crescimento celular.

Os fatores nutricionais exercem grande influência sobre o crescimento microbiano, especialmente as preferências relativas ao consumo das fontes de carbono e nitrogênio, as quais variam de acordo com o microrganismo e a complexidade do substrato (Anderson e Jayaraman 2003; Mazmira *et al.* 2012; Khani *et al.* 2016).

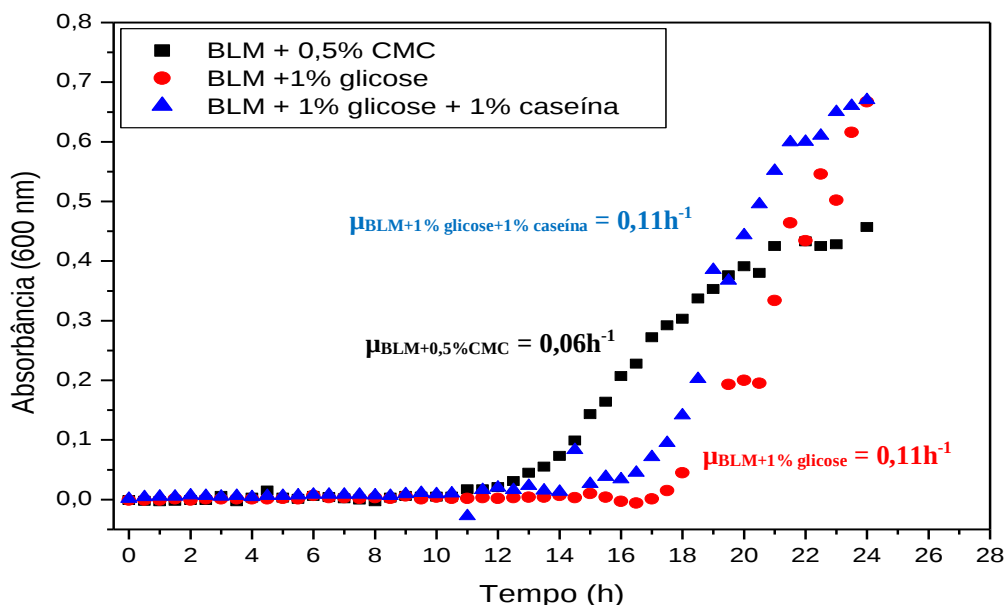


Figura 2.1 - Cinética de crescimento celular de *B. licheniformis* BCLLNf-01 nos meios BLM + 0,5% CMC (■), BLM + 1% de glicose (●) e BLM + 1% de glicose + 1% de caseína (▲) (μ = máxima velocidade específica de crescimento).

O meio utilizado no inóculo e nos ensaios de otimização foi o meio BLM a pH 6,5. Para o inóculo foram utilizados Erlenmeyers com capacidade de 500 mL, os quais receberam 100 mL do meio de cultivo suplementado com 0,5% de CMC (m/v), sendo cada frasco inoculado com um disco de papel contendo a cultura esporulada e incubado a 200 rpm, 30 °C por 16 h. Nos ensaios de otimização as concentrações de CMC variaram conforme o planejamento experimental. Frascos tipo tubo Falcon com capacidade de 50 mL foram utilizados nos cultivos realizados em *shaker* de bancada com agitação a 500 rpm por um período de incubação de 96 h. Amostras foram coletadas com 24, 48, 72 e 96 h e centrifugadas a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante livre de células (enzima bruta) foi utilizado nos ensaios da atividade enzimática. Todos os testes de atividade enzimática foram realizados em duplicata e as análises efetuadas no dia da coleta, sendo realizadas curvas-padrão de glicose a cada análise.

Embora nos meios suplementados com glicose e glicose+caseína *B. licheniformis* BCLLNf-01 tenha apresentado uma maior velocidade específica de crescimento, o meio BLM + 0,5% CMC foi selecionado para o desenvolvimento do inóculo, baseando-se no fato de que nesta condição o tempo necessário para o início da fase log foi reduzido, fator de grande relevância quando se considera a relação custo-benefício para produção enzimática. Além disso, CMC tem sido amplamente relatada como um bom indutor na síntese de enzimas

do complexo celulolítico (Shajahan *et al.* 2017; Listyaningrum *et al.* 2018), podendo sua utilização ser vantajosa desde o preparo do inóculo, uma vez que esta funcionaria tanto como fonte de carbono, para o crescimento microbiano, quanto como indutor na produção de celulases nos ensaios de otimização.

2.5.2 Determinação da distribuição da atividade de celulases de *B. licheniformis* BCLLNf-01

Com o objetivo de analisar o padrão de distribuição de celulases sintetizadas por *B. licheniformis* BCLLNf-01, a atividade de celulase total e CMCase foram investigadas no sobrenadante, conteúdo intracelular e conteúdo de parede ao longo de 72 h de cultivo (Figura 2.2). As maiores atividades enzimáticas foram observadas com 72 h de cultivo nas amostras do sobrenadante, revelando que as celulases sintetizadas por *B. licheniformis* BCLLNf-01 são principalmente excretadas no meio extracelular.

A atividade de celulases tem sido comumente registrada a partir do conteúdo extracelular, cujas amostras são provenientes do processo de centrifugação do meio de cultivo onde se obtêm um sobrenadante livre de células e debris celulares (Bai 2012; Ali Mohamed *et al.* 2015; Dave 2015; Bedade *et al.* 2017). Poucos são os relatos de celulases intracelulares e associadas à parede (Wood *et al.* 1982; Begum e Absan 2009). Embora CMC seja utilizada como indutor de celulases totais e CMCase (Sadhu *et al.* 2013; Jimenez-Leyva *et al.* 2016; Shajahan *et al.* 2017), os resultados sugerem que CMC favoreceu principalmente a síntese de CMCase. Esses resultados estão de acordo com aqueles observados por Abu-Gharbia *et al.* (2018), que avaliaram, dentre outros fatores, o efeito da suplementação do meio de cultivo com várias fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, lactose e CMC). Os autores observaram que a atividade de CMCase foi superior a de celulase total, celobiase e hemicelulases quando CMC foi incorporada ao cultivo.

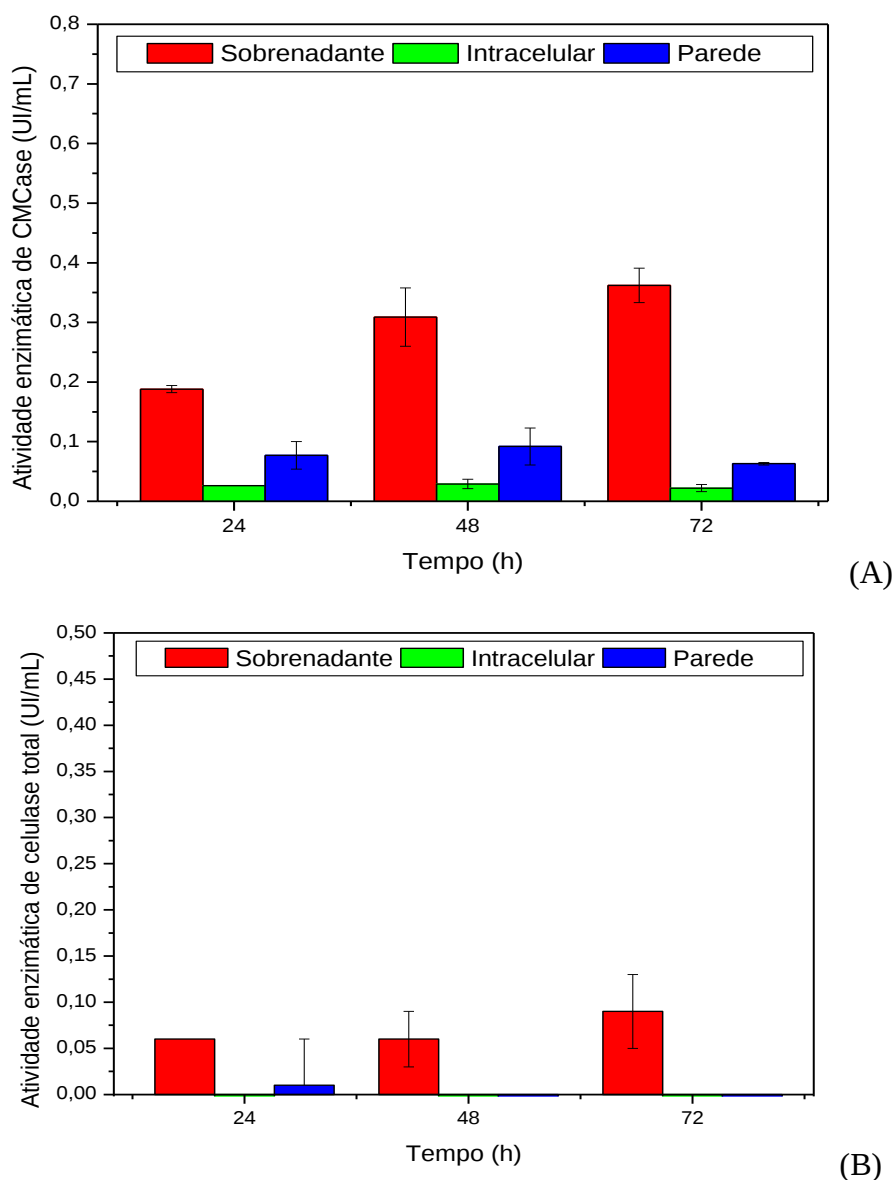


Figura 2.2 - Distribuição da atividade de carboximetilcelulase- CMCase (A) e de celulase total (B) de *B. licheniformis* BCLLNf-01 (inóculo 5,5%; CMC 1,5%; 40 °C; 500 rpm) de acordo com o tempo de cultivo

2.5.3 Otimização da condição de cultivo para produção de CMCase

A Figura 2.3 apresenta a atividade de CMCase para todos os ensaios realizados no planejamento experimental após 24, 48, 72 e 96 h de cultivo. O maior valor de atividade foi registrado no ensaio 13 (inóculo de 5,5%, temperatura de 40 °C e CMC a 1,5%), atingindo 0,493 UI/mL. As mais altas atividades da enzima foram observadas às 96 h, contudo, não podemos afirmar que CMCase tenha atingido seu pico de produção, visto que trata-se de uma cepa nova e este foi o maior período de cultivo analisado no presente estudo. Além disso, o

tempo ótimo para a síntese enzimática pode variar em função da espécie e das condições de cultivo (Kim *et al.* 2012; Seo *et al.* 2014; Lugani *et al.* 2015). Os resultados de atividade de CMCase para todos os ensaios do planejamento são apresentados no Apêndice.

A influência das variáveis concentração de CMC, concentração de inóculo e temperatura sobre a síntese de CMCase é apresentada no Diagrama de Pareto (Figura 2.4). A concentração do inóculo tem sido relatada como um dos fatores que influenciam na síntese de celulase. Diferentes tamanhos de inóculo são avaliados em estudos de otimização e os relatos são de que as concentrações ótimas estão na faixa de 1 a 5%, o que sugere que altas concentrações acabam por reduzir a síntese enzimática (Acharya e Chaudhary 2012; Ali Mohamed *et al.* 2015; Kazeem *et al.* 2016; Shajahan *et al.* 2017). Entretanto, para *B. licheniformis* BCLLNf-01 os resultados mostram que esta variável não influenciou de maneira significativa a síntese de CMCase.

A partir da análise estatística dos dados experimentais obteve-se o modelo para atividade da enzima, o qual apresenta a atividade de CMCase em função dos efeitos de interação das variáveis significativas (CMC e temperatura). Os coeficientes em negrito são os estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (Equação 2).

$$z = -10,496 - \mathbf{0,171*x} - 0,040*x^2 + 0,528*y - \mathbf{0,007*y^2} + 0,011*x*y + \mathbf{0,021*5,5*x} - 0,002*5,5*y + 0,471 \text{ (Equação 2)}$$

Onde: z = Atividade de CMCase

x = CMC

y = temperatura

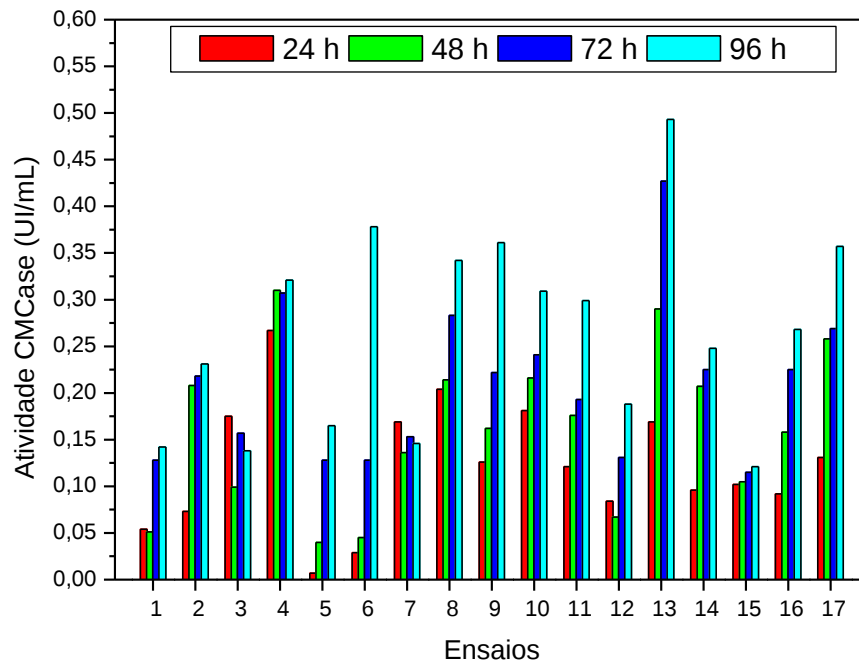


Figura 2.3 - Atividade de CMCase para todos os ensaios realizados no planejamento experimental após 24,48 72 e 96 h de cultivo

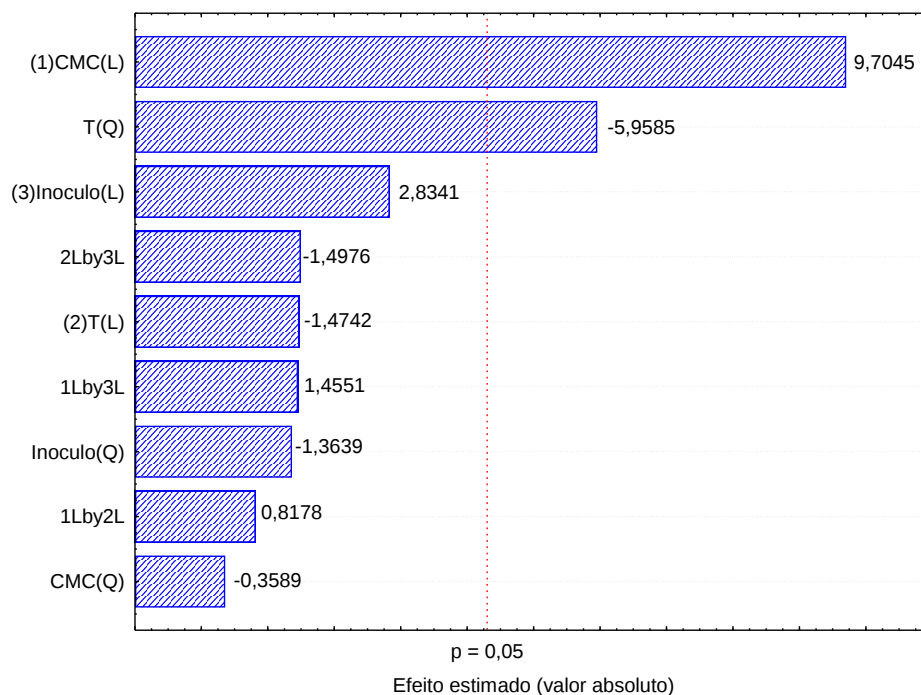


Figura 2.4 - Diagrama de Pareto para atividade de CMCase. Termo linear (L) e Termo quadrático (Q) das variáveis independentes (CMC, Temperatura e Inóculo)

Neste estudo, a temperatura e a concentração de CMC foram as variáveis que influenciaram a produção da enzima, sendo esta última responsável pelo efeito de maior

importância no processo, exercendo um efeito positivo (valor absoluto de 9,7045), ou seja, quanto maior a concentração de CMC, maior a produção da enzima. Por outro lado, a temperatura exerceu um efeito negativo (-5,9585) sobre a produção da enzima, o que indica que temperaturas maiores tendem a influenciar de forma negativa a produção de CMCase.

Para melhor representar os resultados do planejamento DCCR, foram plotadas as curvas de superfície de resposta (Figura 2.5A) e curvas de contorno (Figura 2.5B) para a variável resposta concentração de CMCase em função das variáveis temperatura e concentração de CMC após 96 h de cultivo, para uma concentração de inóculo de 5,5 % (ponto central do planejamento). Na faixa experimental estudada (0,5% -1,5%) observou-se que a produção de CMCase aumentou proporcionalmente com a concentração de CMC. Dentre fontes de carbono como glicose, lactose, farelo de arroz, bagaço de cana de açúcar e papel de filtro, a CMC tem se destacado como substrato eficiente na síntese de enzimas do complexo celulolítico (Sadhu *et al.* 2013; Lugani *et al.* 2015). Entretanto, é utilizada principalmente como substrato específico para CMCase (Emmyrafedziawati e Stella 2015). Uma explicação plausível para que esta seja considerada como um bom indutor na síntese desse grupo enzimático pode estar relacionada ao fato de que as CMCase atuam especificamente nas regiões amorfas da molécula da celulose e a CMC é um substrato cuja complexidade é inferior à celulose, sendo referido como celulose amorfa (Dobrev e Zhekova 2012, Jimenez-Leyva *et al.* 2016).

Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Karim *et al.* (2015), ao analisarem a influência da concentração de CMC na síntese de endo-1,4- β -D-glucanase por *B. licheniformis* KIBGE-IB2, observaram que o valor ótimo foi de 5,0 g/L (0,5%) em um cultivo a 37 °C, e que maiores concentrações de CMC resultaram na diminuição da produção da enzima. De acordo com os autores, este fato pode ser atribuído ao aumento da viscosidade do meio de cultivo provocada por altas concentrações de CMC, tendo como efeito a má distribuição de nutrientes e oxigênio. Embora altas concentrações de CMC possam ser um fator limitante, Shajahan *et al.* (2017) otimizaram as condições de cultivo de *B. licheniformis* NCIM 5556 para produção de celulase e não relataram redução na produção da enzima, encontrando como valor ótimo de CMC 19,21 g/L em um cultivo a 43,35 °C. Desta forma, a concentração ideal de CMC pode variar em função do microrganismo estudado, temperatura e sua própria natureza, considerando que o mercado oferece este substrato em diferentes graus de viscosidade, ressaltando-se ainda que esta informação nem sempre é relatada na literatura.

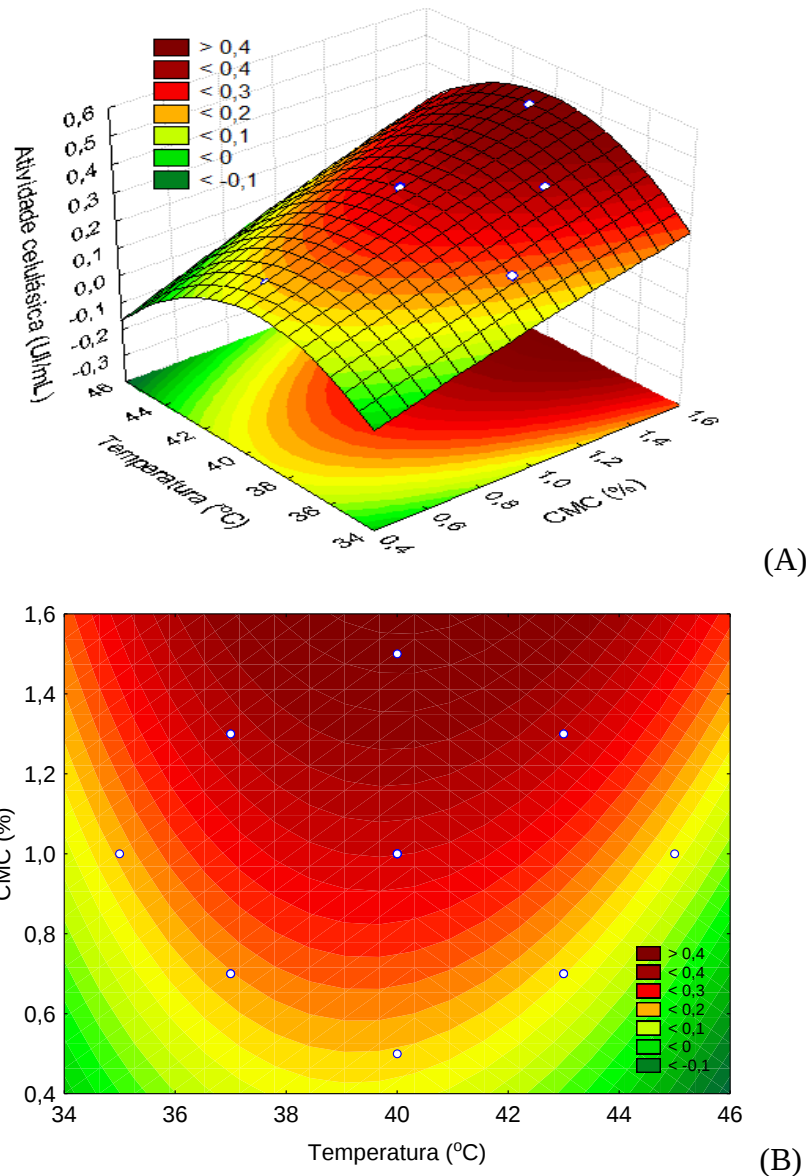


Figura 2.5 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para a variável resposta concentração de carboximetilcelulase (CMCase) em função das variáveis temperatura e concentração de carboximetilcelulose (CMC) após 96 h de cultivo e inóculo de 5,5 %

A temperatura é um fator que exerce grande influência sobre a produção enzimática. Microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* geralmente são relatados produzindo celulasas em uma ampla faixa de temperatura, a qual varia de 30 a 60 °C (Karim *et al.* 2015; Nandimath *et al.* 2016; Kazeem *et al.* 2016). No presente estudo a temperatura ótima para produção de CMCase por *B. licheniformis* BCLLNf-01 foi de 40 °C, não sendo observado efeito de interação significativo entre esta variável e a concentração de CMC; sendo assim, temperaturas inferiores ou superiores a esta, independente da concentração de CMC, tendem a reduzir a produção de CMCase por *B. licheniformis* BCLLNf-01 (Figura 2.5B). Essa mesma

temperatura tem sido relatada como ótima na síntese de CMCase para *Bacillus* sp. JS14 (Singh e Kaur 2012), *B. thuringiensis* ABS 125A (Lokahande e Pethe 2017) e *B. subtilis* UM S1 (Sreena *et al.* 2018).

O delineamento composto central e a metodologia de superfície de resposta são ferramentas estatísticas amplamente utilizadas em diversas áreas do conhecimento, possibilitando o planejamento e análise da interação entre variáveis que influenciam diversos tipos de processos, tais como produção de enzimas, surfactantes, bicombustíveis (Dave *et al.* 2015; Corrêa *et al.* 2015; Shajahan *et al.* 2017; Hashen *et al.* 2018, Yesilyurt *et al.* 2018). No presente estudo, a condição de cultivo de *B. licheniformis* BCLLNf-01 foi melhorada, sendo possível estabelecer a temperatura ótima para produção de CMCase. Embora a maior atividade registrada seja inferior aos valores disponíveis na literatura (Tariq *et al.* 2018, Afzal *et al.* 2019), vale considerar que este é o primeiro estudo de otimização da produção de CMCase por *B. licheniformis* BCLLNf-01 isolado a partir do muco do cnidário *Palythoa caribaeorum*, sendo assim, outros parâmetros (pH, fontes de nitrogênio, taxa de aeração.) devem ser investigados a fim de se alcançar a condição ótima em termos de produtividade.

Referências

- Abdul-Hadi SY, Al-Saffar FA, Al-Bayyar AH (2016) Purification and characterization of cellulase from *Trichoderma reesei*. Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation 4(3): 230-236.
- Abu-Gharbia MA, El-Sawy NM, Nasr AM, Zedan LA (2018) Isolation, optimization and characterization of cellulases and hemicellulases from *Bacillus cereus* LAZ 518 isolated from cow dung using corn cobs as lignocellulosic waste. Journal of Pharmaceutical and Applied Chemistry 4(2):67–79.doi:[10.18576/jpac/040201](https://doi.org/10.18576/jpac/040201)
- Acharya S, Chaudhary A (2012) Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. Brazilian Archives of Biology and Technology 55:497–503. doi: [10.1590/S1516-89132012000400003](https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400003)
- Afzal M, Qureshi MZ, Khan S, et al (2019) Production, purification and optimization of cellulase by *Bacillus licheniformis* HI-08 isolated from the hindgut of wood-feeding termite. Intl. J. Agric. Biol., 21: 125–134.
- Ali M, El-Din E (2015) A novel promising thermotolerant cellulase-producing *Bacillus licheniformis* 1-1v strain suitable for composting of rice straw. International Journal of Advanced Research 3:12.
- Anderson RKI, Jayaraman K (2003) Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. Chem Biochem Eng Q. 17(3):225-231.
- Bai S (2012) Cellulase production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung. Archives of Applied Science Research. 4(1):269-279.

- Bedade DK, Singhal RS, Turunen O, et al (2017) Biochemical characterization of extracellular cellulase from *Tuber maculatum* mycelium produced under submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181:772–783. doi: [10.1007/s12010-016-2248-8](https://doi.org/10.1007/s12010-016-2248-8).
- Begum MF, Absar N (2009) Purification and characterization of intracellular cellulase from *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01. *Mycobiology* 37:121. doi: [10.4489/MYCO.2009.37.2.121](https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.2.121)
- Catolico AC, Oliveira R, Crivelare L, Oliveira AD (2015) Análise de sustentabilidade do etanol 2g e bioenergia da cana. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista* 11(9): 97-112. doi: [10.17271/1980082711920151174](https://doi.org/10.17271/1980082711920151174)
- Chitte RR KG (2015) Preservation of thermophilic bacterial spores using filter paper disc techniques. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 05:223. doi: [10.4172/2155-9821.1000223](https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000223)
- Corrêa PF, Brito JGM, Amorim HS, et al (2015) Utilização de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Editora Edgard Blücher, Florianópolis, Brasil, 2847–2854.
- Dave BR (2015) Optimization of process parameters for cellulase production by *Bacillus licheniformis* MTCC 429 using RSM and molecular characterization of cellulase gene. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 05: 212. doi: [10.4172/2155-9821.1000212](https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000212)
- de Veras BO, dos Santos YQ, Diniz KM, et al (2018) Screening of protease, cellulase, amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain SR60. *F1000Research* 7:1704. doi: [10.12688/f1000research.16542.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.16542.1)
- Dobrev GT, Zhekova (2012) Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from a xylanase producing strain *Aspergillus niger* B03. *Brazilian Journal of Microbiology* . 70-77
- Emmyrafedziawati AKR, Stella M (2015) Hydrolysis of carboxymethyl cellulose (CMC) by *Bacillus* isolated from compost. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 43(2),129 – 135
- Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59(2): 257-268
- Gomaa EZ (2013) Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumilus* grown on *Ficus nitida* wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* 44:529–537. doi: [10.1590/S1517-83822013005000048](https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000048)
- Gupta MN, Roy I (2002). *Applied biocatalysis: an overview*. *Indian Journal of Biochemistry Biophysics*. 220-228.
- Hashem A, Abdel-Fattah A, Ismail S, et al (2018) Optimization, characterization and thermodynamic studies on *B. licheniformis* ALW1 keratinase. *Egyptian Journal of Chemistry* 0:0–0. doi: [10.21608/ejchem.2018.3379.1287](https://doi.org/10.21608/ejchem.2018.3379.1287)
- Inforsato FJ, Porto ALM (2016) Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*. 5(4):444-465.
- J. Abdullah J. et al (2016) Optimizing cellulase production from municipal solid waste (msw) using solid state fermentation (SSF). *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications* 06:206 doi: [10.4172/2090-4541.1000206](https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000206)
- Jimenez-Leyva MF, Beltrán-Arredondo LI, Cervantes-Gómez R, et al (2016) Effect of CMC and MCC as sole carbon sources on cellulase activity and *eglS* gene expression in three *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Corn Stover. *BioResources* 12(1): 1179-1189. doi: [10.15376/biores.12.1.1179-1189](https://doi.org/10.15376/biores.12.1.1179-1189)

- Karim A, Nawaz MA, Aman A, Ul Qader SA (2015) Hyper production of cellulose degrading endo (1,4) β -d-glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2. Journal of Radiation Research and Applied Sciences 8:160–165. doi: [10.1016/j.jrras.2014.06.004](https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.06.004).
- Kazeem MO, Shah UKM, Baharuddin AS, Abdul Rahman NA (2016) Enhanced cellulase production by a novel thermophilic *Bacillus licheniformis* 2D55: Characterization and application in lignocellulosic saccharification. BioResources11(2):5404-5423. doi: [10.15376/biores.11.2.5404-5423](https://doi.org/10.15376/biores.11.2.5404-5423)
- Khani M, Bahrami A, Chegeni A, et al. (2016) Optimization of carbon and nitrogen sources for extracellular polymeric substances production by *Chryseobacterium indologenes* MUT.2. Iran J Biotech. 2016 March;14(2): e1266. doi: [10.15171/ijb.1266](https://doi.org/10.15171/ijb.1266)
- Kim Y-K, Lee S-C, Cho Y-Y, et al (2012) Isolation of Cellulolytic *Bacillus subtilis* Strains from Agricultural Environments. ISRN Microbiology 2012:1–9. doi: [10.5402/2012/650563](https://doi.org/10.5402/2012/650563)
- Kupletskaya MB, Netrusov AI (2011) Viability of lyophilized microorganisms after 50 year Storage. Microbiology. 80(6):850–853. doi: [10.1134/S0026261711060129](https://doi.org/10.1134/S0026261711060129)
- Listyaningrum NP, Sutrisno A, Wardani AK (2018) Characterization of thermostable cellulase produced by *Bacillus* strains isolated from solid waste of carrageenan. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 131:012043. doi: [10.1088/1755-1315/131/1/012043](https://doi.org/10.1088/1755-1315/131/1/012043)
- Lokhande S, As P (2017) Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. 5(2):277-282.
- Lugani Y, Singla R, Sooch BS (2015) Optimization of cellulase production from newly isolated *Bacillus* sp. Y3. J Bioprocess Biotech 5: 264. doi: [10.4172/2155-9821.1000264](https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000264)
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66:506–577. doi: [10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002](https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002)
- Mageshwaran V, Inmann FLLL, Holmes LD (2014) Growth kinetics of *Bacillus subtilis* in lignocellulosic carbon sources. International Journal of Microbiology Research, 6(2):570-574.
- Mazmira, M. M (2012) Effect of saccharides on growth, sporulation rate and δ -endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. African Journal of Biotechnology 11(40): 9654-9663. doi: [10.5897/AJB11.1391](https://doi.org/10.5897/AJB11.1391)
- Medeiros De OF, Alves GF, Lisboa CR et al. (2008) Ondas ultrassônicas e perlas de vidro: um novo método de extração de β - Galactosidase para uso em laboratório. Quim. Nova 31(2):336-339.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3):426-428.
- Nandimath AP, Kharat KR, Gupta SG, et al. (2016) Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. African Journal of Microbiology Research 10:13, 410-419.
- Sadhu S, Ghosh PK, De TK, Maiti TK (2013) Optimization of cultural condition and synergistic effect of lactose with carboxymethyl cellulose on cellulase production by *Bacillus* sp. isolated from fecal matter of elephant (*Elephas maximus*). Advances in Microbiology 03:280–288. doi: [10.4236/aim.2013.33040](https://doi.org/10.4236/aim.2013.33040)
- Seo J, Park TS, Kim JN, et al (2014) Production of Endoglucanase, Beta-glucosidase and Xylanase by *Bacillus licheniformis*; Grown on Minimal Nutrient Medium Containing Agriculture Residues. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 27:946–950. doi: [10.5713/ajas.2014.14082](https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14082)

- Shajahan S, Moorthy IG, Sivakumar N, Selvakumar G (2017) Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. *Journal of King Saud University - Science* 29:302–310. doi: [10.1016/j.jksus.2016.08.001](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.001)
- Singh J, Kaur P (2012) Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus* sp. JS14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55:505–512. doi: [10.1590/S1516-89132012000400004](https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400004)
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6:174. doi: [10.1007/s13205-016-0485-8](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8)
- Sreena CP, Sebastian D (2018) Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16:9–16. doi: [10.1016/j.jgeb.2017.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.12.005)
- Tariq R, Ansari I, Qadir F, et al (2018) Optimization of endoglucanase production from thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* rt-17 and its application for saccharification of sugarcane bagasse. *pak. j. bot.* 50(2): 807-816.
- Wang Y, Song Q, Zhang X-H (2016) Marine microbiological enzymes: studies with multiple strategies and prospects. *Marine Drugs* 14:171. doi: [10.3390/md14100171](https://doi.org/10.3390/md14100171)
- Wood TM, Wilson CA, Stewart CS (1982) Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. *Biochemical Journal* 205:129–137. doi: [10.1042/bj2050129](https://doi.org/10.1042/bj2050129)
- Yesilyurt MK, Arslan M, Eryilmaz T (2019) Application of response surface methodology for the optimization of biodiesel production from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed oil. *International Journal of Green Energy* 16:60–71. doi: [10.1080/15435075.2018.1532431](https://doi.org/10.1080/15435075.2018.1532431)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preservação de *B. licheniformis* BCLLNf-01 foi realizada através de dois métodos (esporos em discos de papel e liofilização) garantindo material para o desenvolvimento do presente estudo, bem como de outros a serem realizados.

A triagem do meio de cultivo (BLM) em três suplementações distintas possibilitou a escolha da condição ideal tanto para o desenvolvimento do inóculo quanto para os ensaios de otimização, sendo considerada a redução do tempo necessário para início da fase log e o fato da CMC ser utilizada tanto como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo quanto para a indução da síntese de celulase.

A distribuição de celulasas de *B. licheniformis* BCLLNf-01 foi analisada em três frações do cultivo (sobrenadante, conteúdo intracelular e conteúdo de parede) com CMC como indutor, possibilitando a escolha da fração adequada e do grupo de enzimas celulolíticas a ser investigado nos ensaios de otimização.

O planejamento experimental DCCR e a metodologia de superfície de resposta possibilitaram a análise da influência das variáveis investigadas (concentração de CMC, concentração do inóculo e temperatura) e seus efeitos de interação sobre a produção de CMCase por *B. licheniformis* BCLLNf-01. Das três variáveis investigadas, apenas a temperatura e a concentração de CMC demonstraram efeito significativo sobre a síntese enzimática, sendo esta última a de maior importância. Nesse estudo, não foi possível alcançar a condição ótima para validação do modelo experimental, mas foi estabelecida a temperatura ótima para síntese de CMCase por *B. licheniformis* BCLLNf-01. Sendo assim, nossos achados contribuem para análises futuras empregando-se maiores concentrações de CMC e investigando-se outros parâmetros (pH, fontes de nitrogênio, taxa de aeração, proporção C/N, inibidores) para a produção de CMCase.

REFERÊNCIAS

- ABU-GHARBIA, M. A. *et al.* Isolation, Optimization and Characterization of Cellulases and Hemicellulases from *Bacillus Cereus* LAZ 518 Isolated from Cow Dung Using Corn Cobs as Lignocellulosic Waste. **Journal of Pharmaceutical and Applied Chemistry**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 67–79, 2018. Disponível em: <http://www.naturalspublishing.com/download.asp?ArtcID=14323>. Acesso em: 03 mar. 2019.
- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Optimization of Fermentation Conditions for Cellulases Production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus sp.* MVS3 Isolated from Indian Hot Spring. **Brasilian Archives of Biology and Tecnology**, Curitiba, v. 55, n. 4, p. 497-503, jul-Aug., 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v55n4/a03v55n4.pdf> . Acesso em: 20 jun. 2017.
- ALI MOHAMED, A. R. *et al.* A Novel Promising Thermotolerant Cellulase Producing *Bacillus Licheniformis* 1-1v Strain Suitable for Composting of rice Straw. **International Journal of Advanced Research**, Indore-India, v. 3, n.12, p. 413-423, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/289528567/download>. Acesso em: 27 ago. 2018.
- ALI, Y. R.-A. *et al.* α -Amylase Production by Thermophilic Isolates of *Bacillus licheniformis*. **EC Microbiology**, Glasgow, v. 14, n. 5, p. 225-233, 2018. Disponível em: <https://www.econicon.com/ecmi/pdf/ECMI-14-00473.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2018.
- ALVAREZ- ORDÓÑEZ, A. *et al.* Investigation of the Antimicrobial Activity of *Bacillus licheniformis* Strains Isolated from Retail Powdered Infant Milk Formulae. **Probiotics & Antimicro. Prot.**, New York, v. 6, p. 32- 40, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676765>. Acesso em: 06 maio 2017.
- ANNAMALAI, N. *et al.* Purification and Characterization of Thermostable Alkaline Cellulase from Marine Bacterium *Bacillus licheniformis* AU01 by Utilization Cellulosic Wastes. **Waste Biomass Valor**, Netherlands, v. 3, p. 305-310, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/257792406_Purification_and_Characterization_of_Thermostable_Alkaline_Cellulase_from_Marine_Bacterium_Bacillus_licheniformis_AU01_by_Utilizing_Cellulosic_Wastes. Acesso em: 03 mar. 2019.
- AZADIAN, F. *et al.* Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. **Molecular Biology Research Communications**, [Shiraz, Iran], v. 5, n. 3, p. 143-155. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5219909/>. Acesso em: 23 set. 2017.
- BAHARUM, S. N.; BENG, E. K.; MOKHTAR, M. A. A. Marine Microorganisms: Potential Application and Challenges. **Journal of Biological Sciences**, [S.l.], v. 10, n. 6, p. 555–564, 1 jun. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/49965604_Marine_Microorganisms_Potential_Application_and_Challenges. Acesso em: 13 maio 2019.

- BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and Characterization of Xylanase from *Bacillus licheniformis* P11 with Potential for Fruit Juice and Bakery Industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Atlanta, v. 1, p. 330-337, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/257730682_Production_and_characterization_of_xylanase_from_Bacillus_licheniformis_P11C_with_potential_for_fruit_juice_and_bakery_industry. Acesso em: 12 maio 2017.
- BANSAL, N. *et al.* Production of Cellulases from *Aspergillus niger* NS- 2 in Solid State Fermentation on Agricultural and Kitchen Waste Residues. **Waste Management**, New York, v. 32, p. 1341- 1346, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503148>. Acesso em: 15 jul. 2017.
- BASTOS, J. C. S. *et al.* Antiviral Activity of *Bacillus sp.* Isolated from the Marine Sponge *Petromica citrina* Against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. **Viruses**, Basel, v. 5, p. 1219-1239, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628828>. Acesso: 03 mar. 2019.
- BIBI, N.; ALI, S.; TABASSUM, R. Isolation and Identification of Novel Indigenous Bacterial Strain as a Low Cost Pectinase Source. **Biological and Applied Sciences**, Curitiba, v. 61, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132018000100424. Acesso em: 03 mar. 2019.
- BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and Beyond: The First 70 Years of the Enzyme Producer *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], v. 15, n. 106, p. 1-13, 2016. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0507-6>. Acesso em: 17 jul. 2017.
- CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100031. Acesso em: 15 maio 2019.
- CATOLICO, A. C. *et al.* Análise de Sustentabilidade do Etanol 2G e Bioenergia da Cana. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, [S.l.], v. 11, n. 9, p. 97-112, 2015. Disponível em: https://www.amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/download/1174/1197. Acesso em: 03 mar. 2019.
- CHANTARASIRI, A. Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 Isolated from the Muddy Sediments of Mangrove Swamps in Thailand and Characterization of its Cellulolytic Activity. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, Alexandria, v. 41, p. 257-264, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S168742851500062X>. Acesso em: 03 mar. 2019.
- CHEN, Z. *et al.* Characterization of a beta- glucosidase from *Bacillus licheniformis* and its effect on biofloculant degradation. **AMB Express**, Heidelberg, v. 7, p. 197, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5673865/>. Acesso em: 03 mar. 2019.

COLARES, C. J. G. *et al.* Exploratory Analysis of the Distribution of Lignin and Cellulose in Woods by Raman Imaging and Chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 1297-1305, 2015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532015000601297](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532015000601297&script=sci_abstract) &script=sci_abstract . Acesso em: 15 maio 2019.

COTRINO, J. C.; ORDONEZ, V. Green Technology: Last Developments in Enzymes for Paper Recycling. **Paper Conference and Trade Show 2011**, Covington- USA, v. 2, p.1631-1639, 2011. Disponível em: https://kipdf.com/green-technology-last-developments-in-enzymes-for-paper-recycling_5ac2f9b01723dd414163db32.html. Acesso em: 03 mar. 2019.

DAVE, B. R. *et al.* Optimization of Process Parameters for Cellulase Production by *Bacillus licheniformis* MTCC 429 using RSM and Molecular Characterization of Cellulase Gene. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, Curitiba, v. 05, n. 03, 2015. Não paginado. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/optimization-of-process-parameters-for-cellulase-production-by-bacillus-licheniformis-mtcc-using-rsm-and-molecular-characterization-of-cellulase-gene-2155-9821.1000212.php?aid=40843>. Acesso em: 19 fev. 2019.

DEKA, D. *et al.* Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimization Physical Parameters for Bioethanol Production. **Hindawi Publishing Corporation ISRN Biotechnology**, Cairo, v. 2013, p. 1-11, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/965310/>. Acesso em: 19 fev. 2019.

DELJOU, A.; AREZI, I. Production of Thermostable Extracellular α - amylase by a Moderate Thermophylic *Bacillus licheniformis*- AZ2 Isolated from Quinarje Hot Spring (Ardebil prov. Of Iran). **Periodicum Biologorum**, Zagreb, v. 118, n. 4, p. 405-416, 2016. Disponível em: <https://hrcak.srce.hr/file/261722/>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MOURA, J. M. *et al.* **Análise da Eficiência Energética em Segmentos Industriais Selecionados**: segmento celulose e papel.[Brasília]: MME , 2018. Disponível em: http://www.mme.gov.br/documents/10584/105176754/PRODUTO+4_Vpublicacao.pdf/f48424df-30ef-464e-ac90-e30d97f41936 Acesso em: 15 maio 2019.

DIAS, P. V. S. *et al.* Avaliação de fontes de carbono indutoras da síntese de celulasas por um *Bacillus sp.* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2014, Florianópolis. **Anais [...]** Florianópolis: Blucher Proceedings, 2014. Disponível em: <http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/avaliacao-de-fontes-de-carbono-indutoras-da-sntese-de-celulasas-por-um-bacillus-sp-16734>. Acesso em: 19 fev. 2019.

DOBREV, G. T.; ZHEKOVA, B. Y. Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from xylanase producing strain *Aspergillus niger* B03. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 70-77, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000100008 > Acesso em: 16 maio 2019.

EL-GAYAR, K.E. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* from tap water. **Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.**, Aligarh, v. 19, n. 4, p. 817-830, 2017. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/323560540_ISO

LATION_IDENTIFICATION_AND_CHARACTERIZATION_OF_BACILLUS_SUBTILIS_FROM_TAP_WATER > Acesso em: 13 maio 2019.

GHANI, M. *et al.* Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. **Pack. J. Pharm. Sci.**, Karachi, v. 26, n. 4, p. 691-697, July 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23811444>. Acesso em: 02 maio 2017.

GOMES, M. J. P. Gênero *Bacillus* spp. In: LABACVET: Laboratório De Bacteriologia Veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2013. Disponível em: http://www.ufrgs.br/la_bacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf. Acesso em: 29 set. 2017.

GUPTA, M. *et al.* Enhanced Production of Cellulase from *Bacillus licheniformis* K-3 with Potential for Saccharification of Rice Straw. **Energy Technology**, [S.l.], v. 3, p. 216-224, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ente.201402137>. Acesso em: 03 mar. 2019.

HASHEM, A. M. *et al.* Optimization, Characterization and Thermodynamic Studies on *B. licheniformis* ALW1 Keratinase. **Egypt. J. Chem.**, Cairo, v. 61, n. 4, p. 595-607, 2018. Disponível em: https://ejchem.journals.ekb.eg/article_7329.html. Acesso em: 19 fev. 2019.

HO, H.L.; KU, X.N. Kinetic Study of Cell Growth and `Production of Amylase, Cellulase and Xylanase by *Bacillus subtilis* Using Barley Husk as the Prime Carbon Source. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, Hooghly- India, v. 14, n. 2, p. 1-18, 2017. Disponível em: <http://www.journaljabb.com/index.php/JABB/article/view/5149/9119>. Acesso em: 19 fev. 2019.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Sumário executivo 2018**. Brasília: IBA, 2017. Disponível em: <https://iba.org/publicacoes/relatorios> Acesso em: 15 maio 2019.

IRFAN, M. *et al.* Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for saccharification using response surface methodology. **AMB Express**, Heidelberg, v. 7, n. 29, p. 1-9, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5302012/>. Acesso em: 19 fev. 2019.

INCA-TORRES, A. R. *et al.* Hydrolytic Enzymes Production by *Bacillus licheniformis* Growth on Fermentation Media Formulated with Sewage Sludge. **Journal of Biotech Research**, Edmond, v. 9, p. 14-26, 2018. Disponível em: <http://www.btsjournals.com/assets/2018v9p14-26.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2019.

KARIM, A. *et al.* Hyper Production of Cellulose Degrading Endo-(1,4) β - D- glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE- IB2. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Cairo, v. 8, p. 60- 65, 2015. Disponível em: <http://www.science-direct.com/science/article/pii/S1687850714000570>. Acesso em: 15 jul. 2017.

KAZEEM, M. O. *et al.* Enhanced Cellulase Production by a Novel Thermophilic *Bacillus licheniformis* 2D55: Characterization and Application in lignocellulosic Saccharification. **BioResources**, Raleigh, v. 11, n. 2, p. 5404-5423, 2016. Disponível em: https://bioresources.cnr.ncsu.edu/BioRes_11/BioRes_11_2_5404_Kazeem_

SBR_Enhanced_Cellulase_Novel_Thermophilic_Agrowaste_8640.pdf. Acesso em: 20 ago. 2018.

KIIO, I. K. *et al.* Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* Strain Vic Isolated from Geothermal Wells in Keyan Rift Valley. **The Open Biotechnology journal**, Hilversum, v. 10, p. 198-207, 2016. <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOBIOTJ-10-198>> Acesso em: 03 fev. 2019.

KUMAR, D. J. M. *et al.* Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its Biostoning activity. **Der Pharmacia Lettre**, Uadipur-India, v. 4, n.3, p. 881-888, 2012. Disponível em: <https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/optimization-of-bacillus-cereus-mrk1-cellulase-production-and-its-biostoning-activity.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2019.

LARIBI-HABCHI, H. *et al.* Purification, Characterization, and Molecular Cloning of na Extracellular Chitinase from *Bacillus licheniformis* Stain LHH 100 Isolated from Wastewater Samples in Algeria. **International Journal of Biological Macromolecules**, Netherlands, v. 72, p. 1117-1128, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25450539>. Acesso em: 19 fev. 2019.

LEÃO, E. U. *et al.* Potencial in vitro de *Bacillus spp.* no Controle de *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* em Feijoeiro- Comum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n.4, p. 360-362, 2016. Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-54052016000400360&lng=pt&nrm=isso. Acesso em: 06 maio 2017.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, K.Y. Enzimas. In: _____. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier. 2002. Disponível em: <http://cienciasbiologicasfha.blogspot.com.br/2013/04/download-livro-lehninger-principios-de.html>. Acesso em: 06 jun. 2017.

LIU, B. *et al.* Purification and Characterization of Biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its Application in remediation of Petroleum Contaminated Soil. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 107, p. 46-51, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114088>. Acesso em: 06 maio 2017.

LU, L. *et al.* Cloning and Expression of Thermo- Alkali- Stable Laccase oh *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its Characterization. **Bioresource Tecnology**, Barking, v. 134, p. 81-86, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500563>. Acesso em: 19 fev. 2019.

LUGANI, Y.; SINGLA, R.; SOOCH, S. Optimization of Cellulase Production from Newly Isolated *Bacillus sp.* Y3. **Bioprocessing & Biotechniques**, Sunnyvale-CA, v. 5, n. 264, p. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285544161_Optimization_of_Cellulase_ProducProd_from_Newly_Isolated_Bacillus_Sp_Y3. Acesso em: 19 fev. 2019.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; *et al.* Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/11179962_Microbial_Cellulose_Utilization_Fundamentals_and_Biotechnology. Acesso em: 19 fev. 2019.

MADU, J. O. Purification and Characterization of Pectinase of *Bacillus licheniformis* Obtained from a Cassava Waste Dump. **Journal of Advances in Biology**, Amritsar, v. 8, n. 3, p. 1685, 2016. Disponível em: <https://cirworld.com/index.php/jab/article/view/4552>. Acesso em: 03 mar. 2019.

MARCO, É. G. de *et al.* Purification and characterization of a thermostable alkaline cellulase produced by *Bacillus licheniformis* 380 isolated from compost. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3 suppl, p. 2359–2370, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29044330>. Acesso em: 03 mar. 2019.

MARRA, I. F. *et al.* Efeito do pH, Umidade e Indutores Sobre a Produção de Celulases por *Trichoderma sp.* em Fermentação em Estado Sólido de Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 17, n. 2, p. 125–131, 2015. Disponível em: <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev172/Art1722.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2019.

MELO, L. F. A. **Screening farmacológico e diversidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil.** 2017. 96 f. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/27694>. Acesso em: 03 mar. 2019.

NANDIMATH, A. P. *et al.* Optimization of Cellulase Production for *Bacillus sp.* And *Pseudomonas sp.* Soil Isolates. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 10, n. 13, p. 410- 419, abr. 2016. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/13142B457910>. Acesso em: 21 jul. 2017.

NEMA, N.; ALAMIR, L.; MOHAMMAD, M. Production of Cellulase from *Bacillus cereus* by Submerged Fermentation Using Corn Husks as Substrates. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 22, n. 5, p. 1831-1836, 2015. Disponível em: [http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20\(05\)%202015/\(14\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20(05)%202015/(14).pdf). Acesso em: 17 jul. 2017.

NIRMALA, P.; SINDHU, A. Production of Endoglucanase by Optimization the Environmental Conditions of *Bacillus circulans* on Submerged Fermentation. **International Journal of Applied Engineering Research**, Dindigul, v. 2, n. 2, p. 472-481, 2011. Disponível em: <http://www.ipublishing.co.in/jarvol1no12010/voltwo/EIJAER2250.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2019.

PADILHA, I.Q.M.; *et al.* Production and Characterization of Thermophilic Carboxymethylcellulase Synthesized by *Bacillus sp.* Growing on Sugarcane Bagasse in Submerged Fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 32, n. 01, p. 35-42, 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322015000100035. Acesso em: 03 mar. 2019.

PINDI, P.K.; SULTANA, T.; VOOTLA, P. K. Plant Growth Regulation of Bt-Cotton through *Bacillus* species. **3 Biotech**, Berlin, v. 4, p. 305-315, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28324434>. Acesso em: 19 mar. 2019.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. Biologia da Célula Vegetal. In: _____. **Biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 18-70.

REHMAN, H. U. *et al.* Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 139–144, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/280612503_Morphological_and_molecular_based_identification_of_pectinase_producing_Bacillus_licheniformis_from_rotten_vegetable. Acesso em: 29 set. 2017.

ROSA, T. M. F.; MARINHO, B. M.; BENASSE, V. M. Production of Cellulase and Sugar Fermentable Formation by Deterioration of Sugar Cane Bagasse. **Ciência & Tecnology: FATEC-JB**, Jaboticabal- SP, v. 9, n. 1, p. 38-43, 2017. Disponível em: <http://citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/download/1082/970>. Acesso em: 03 mar. 2019.

SEO, J. *et al.* Production of Endoglucanase, Beta- glucosidase and Xylanase by *Bacillus licheniformis* Grown on Minimal Nutrient Medium Containing Agriculture Residues. **Asian Australas J. Anim. Sci.**, Seoul, v. 27, n. 7, p. 946- 950, July 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093570/pdf/ajas-27-7-946-5.pdf>. Acesso em: 12 maio 2017.

SHAJAHAN, S. *et al.* Statistical modeling and optimization of cellulose production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharastra, India. **Journal of King Saud University-Science**, Riyadh-Saudi Arabia, v. 29, p. 302-310, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364716300611>. Acesso em: 29 set. 2017.

SINGH, R. *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, Berlin, v. 6, n. 2, 19 Ago. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28330246>. Acesso em: 06 jun. 2017.

SINGH, K. *et al.* Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus VITRKHB*. **3 Biotech**, Berlin, v. 4, n. 6, p. 591–598, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-013-0173-x>. Acesso em: 06 jun. 2017

SIVAKUMAR, N. *et al.* Isolation and Characterization of Cellulolytic *Bacillus licheniformis* from Compost. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, n. 43, p. 2434-2446, 2016. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/147500>. Acesso em: 20 jan. 2019.

SREEJA, S.J. *et al.* Optimization of cellulase production by *Bacillus altitudinis* APSMSU and *Bacillus licheniformis* APS2 MSU, gut isolates of fish *Etroplus suratensis*. **International Journal of Advancements in Research & Technology**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 401-406, 2013. Disponível em: <http://www.ijoart.org/docs/Optimization-of-cellulase-production-by-Bacillus-altitudinis-APS-MSU-and-Bacillus-licheniformis-APS2-MSU-gut-isolates-of-fish-E.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2019.

SREENA, C.P.; SEBASTIAN, D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Dordrecht, v. 16, p. 9- 16, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X17301142>. Acesso em: 20 agost. 2018.

SONUNE, N.; GAROBE, A. Isolation, Characterization and identification of Extracellular Enzyme Producer *Bacillus licheniformis* from Municipal Wastewater and evaluation of their Biodegradability. **Biotechnology Research and Innovation**, [S.l.], v. 2, p. 37-44, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452072117300400>. Acesso em: 03 mar. 2019.

TARIQ, R. *et al.* Optimization of Endoglucanase Production from Thermophilic Strain of *Bacillus licheniformis* RT-17 and its Application for Saccharification of Sugarcane Bagasse. **Pak. J. Bot.**, Karachi, v. 50, p. 807- 816, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/323336314_Optimization_of_endoglucanase_production_from_thermophilic_strain_of_Bacillus_licheniformis_RT-17_and_its_application_for_saccharification_of_sugarcane_bagasse. Acesso em: 19 mar.

THOMAS, L.; RAM, H.; SINGH, V. P. Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus sp.* SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p. 429–442, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29157901>. Acesso em: 03 mar. 2019.

VERAS, B. O. *et al.* Screening of protease, cellulase, amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain SR60. **F1000Research**, London, v. 7, p. 1704, 26 out. 2018. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/7-1704/v1>. Acesso em: 15 maio 2019.

VILELA, E. D. S. **Análise da Produção de Celulases e Beta glycosidase produzidas por Streptomyces sp.** 2013. 89f. Dissertação. (Mestrado em Biologia)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. Disponível em: <https://pos.icb.ufg.br/up/101/o/Elvia.pdf>. Acesso em: 06 maio 2017.

WANG, Y.; SONG, Q.; ZHANG, X.-H. Marine Microbiological Enzymes: Studies with Multiple Strategies and Prospects. **Marine Drugs**, Basel-Switzerland, v. 14, n. 10, p. e171, set. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669268>. Acesso em: 16 maio 2019.

YD, J. *et al.* Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Maharashtra hot springs: *Bacillus sp.* and *Staphylococcus sp.* **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Delhi, v. 7, n. 1, p. 691-695, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/330666875_Isolation_and_characterization_of_thermophilic_bacteria_from_Maharashtra_hot_springs_Bacillus_sp_and_Staphylococcus_sp. Acesso em: 16 maio 2019.

YE, M. *et al.* The Optimization of Fermentation Conditions for producing Cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its Application to Goose Feed. **R. Soc. Open Sci**, London, v. 4, n. 10, p. 171012, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29134097>. Acesso em: 03 mar. 2019.

APÊNDICE A – TABELA E GRÁFICOS

Resultados do planejamento experimental com os valores reais das variáveis e atividade de CMCase ao longo de 96 h de cultivo

Ensaio	Concentração de CMC (%)	Temperatura (°C)	Concentração do inóculo (%)	Atividade de CMCase (UI/mL)			
				24 h	48 h	72 h	96 h
01	0,7	37	2,8	0,054	0,051	0,128	0,142
02	1,3	37	2,8	0,073	0,208	0,218	0,231
03	0,7	43	2,8	0,175	0,099	0,157	0,138
04	1,3	43	2,8	0,267	0,310	0,307	0,321
05	0,7	37	8,2	0,007	0,040	0,128	0,165
06	1,3	37	8,2	0,029	0,045	0,128	0,195
07	0,7	43	8,2	0,169	0,136	0,153	0,146
08	1,3	43	8,2	0,204	0,214	0,283	0,342
09	1,0	40	5,5	0,126	0,162	0,222	0,361
10	1,0	40	5,5	0,181	0,216	0,241	0,309
11	1,0	40	5,5	0,121	0,176	0,193	0,299
12	0,5	40	5,5	0,084	0,067	0,131	0,188
13	1,5	40	5,5	0,169	0,290	0,427	0,493
14	1,0	35	5,5	0,096	0,207	0,225	0,248
15	1,0	45	5,5	0,102	0,105	0,115	0,121
16	1,0	40	1,0	0,092	0,158	0,225	0,268
17	1,0	40	10,0	0,131	0,258	0,269	0,357

Exemplos de curvas-padrão de glicose utilizadas nos ensaios de distribuição da atividade de celulas de *B. licheniformis* BCLLNf-01

