

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARBOXIMETILCELULASE POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *STACHYLIDIUM BICOLOR***

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.037-096>

Alda Catarina Miranda Alves

Mestre em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.
E-mail: aldacatarinam@gmail.com

Geise Camila de Araujo Ribeiro

Doutor em Biotecnologia, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.
E-mail: ribeirocamila0207@gmail.com

Floriatan Santos Costa

Doutor em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. ORCID: 0000-0001-7766-2860
E-mail: floriatanscosta@gmail.com

Sandra Aparecida de Assis

Doutor em Biotecnologia, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil. ORCID: 0000-0001-8258-7623
E-mail: sandraassis@uefs.br

RESUMO

Microrganismos capazes de degradar materiais lignocelulolíticos podem produzir complexos de celulase extracelular. Os fungos são bons produtores de complexo celulolítico, uma vez que essas fontes de microrganismos possuem alta capacidade de multiplicação e produção de diversas enzimas, possibilitando a produção industrial. Neste trabalho, pesquisamos a produção da enzima carboximetilcelulase (CMCase) pelo fungo *Stachylidium bicolor*. O pH e a temperatura ótima foram estudados pela metodologia de superfície de resposta com diferentes temperaturas (30, 50, 70°C) em diferentes pHs, variando de 2 a 6. O efeito das substâncias (cloreto de sódio, benzoato de sódio e fosfato monossódico) foi estudado como estabilizador CMCase usando um delineamento de mistura de centroide simples. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos a 4,0 e 50 °C, respectivamente. O fosfato monossódico apresentou maior e positivo PE, sugerindo que a mistura com maior proporção desse componente proporciona maior atividade enzimática.

Palavras-chave: Fermentação. Fúngico. Produção. Metodologia de superfície de resposta. Caracterização.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são uma excelente alternativa para produção de complexo celulolítico, uma vez que essas fontes possuem alta velocidade de multiplicação, são adaptáveis a diversos meios nutritivos pouco expansivos, produzem enzimas comerciais (Loureiro et al., 2018, Santana et al., 2023). Microrganismos capazes de degradar materiais lignocelulolíticos normalmente produzem complexo de celulase extracelular. Microrganismos, incluindo fungos, produzem celulases, um biocatalisador induzível, em diferentes fases de seu desenvolvimento em substratos de celulose (Sutaoney et al., 2024).

A utilização de enzimas microbianas tem sido amplamente relatada há séculos, mas o uso comercial de enzimas foi adotado recentemente (Ejaz et al., 2021). Cellulases tem aplicações em vários setores comerciais, incluindo agricultura, cervejaria, lavanderia, papel e celulose e indústria têxtil. As celulases podem ser usadas para amaciar frutas, clarificar os sucos de frutas, reduzir a volumosidade na massa, hidrolisar o café torrado, extrair polifenóis de chá e óleos essenciais de azeitonas e podem aumentar o aroma e o sabor dos alimentos (Ejaz et al., 2021).

A conversão microbiana da celulose em produtos solúveis requer a ação de vários tipos de enzimas hidrolíticas glicosídicas, como endoglucanases ou carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91 e β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (Henrissat 1991, Lynd et al., 2002; Hua-Li et al., 2007, Santana et al., 2023). O uso de microrganismos produtores de celulase e o desenvolvimento de novas rotas tecnológicas para a produção de celulase continuam sendo uma questão estratégica a ser considerada durante o desenvolvimento de um processo sustentável para a produção de etanol a partir de biomassa (dos Reis et al., 2015; Juturu e Wu, 2014, Pirota et al., 2016; Loureiro et al. 2018). O bagaço de cana-de-açúcar tem potencial para uso industrial na produção de etanol devido à sua grande abundância em países como o Brasil, gerando uma grande quantidade de resíduos agroindustriais que podem ser utilizados e transformados em um produto de valor agregado empregando enzimas celulases (Santana et al., 2023).

A diversidade de fungos na Caatinga também é alta, sendo os conídios componentes importantes da microbiota (Cruz; Gusmão, 2009). *Stachylidium bicolor* é um fungo que faz parte da classe Chaetosphaeriales, filo Ascomycota (Almeida et al., 2017).

Este estudo descreve a otimização do pH e da temperatura utilizando a metodologia de superfície de resposta e estabilização da carboximetilcelulase (CMCase) de *Stachylidium bicolor*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMOS

O microrganismo *Stachylidium bicolor* foi obtido da Coleção Bahia de Microcultura (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e reativado em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) por 10 dias em incubadora B.O.D. a 28°C.

2.2 FERMENTAÇÃO E OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

O extrato enzimático foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Delabona et al. (2012; 2019). A composição do meio de pré-cultura foi adaptada de Mandels e Weber (1969) usando 10 g/L de glicose como fonte de carbono. A composição do meio pré-inóculo foi: 1 mL de Tween 80; 0,3 g/L de Ureia; 2,0 g/L de KH₂PO₄; 1,4 g/L de (NH₄)₂SO₄; 0,4 g/L de CaCl₂.2H₂O; 0,3 g/L de MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/L de peptona; 5,0 mg/L de FeSO₄.7H₂O; 1,6 mg/L de MnSO₄.4H₂O; 1,4 mg/L de ZnSO₄.7H₂O; 2,0 mg/L de CoCl₂.6H₂O. O meio de cultura foi preparado com o mesmo meio de pré-cultura.

Para preparar o inóculo, uma suspensão de conídios do fungo foi preparada adicionando 20 mL de água destilada e Tween 80 (0,1%) às placas de BDA cultivadas até aproximadamente 10^{-7} células. Esta suspensão foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 50 mL do meio de pré-cultura, incubando 72 h a 29°C em agitador rotativo a 200 rpm.

Para a fermentação para produzir a enzima CMCase, um volume de 20 mL do inóculo foi então transferido para frascos Erlenmeyer contendo 180 mL do meio de produção contendo bagaço de cana-de-açúcar in natura como indutor. Os ensaios foram incubados por 10 dias a 29°C e 200 rpm em uma incubadora agitadora refrigerada. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 10°C por 15 min e analisadas quanto à atividade enzimática obtida.

2.3 ATIVIDADE DA ENZIMA CARBOXIMETILCELULASE (CMCASE)

Os tubos de reação foram preparados com 0,25 mL do substrato carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% (p/v) preparado em solução tampão citrato fosfato 50mM e 0,25 mL de extrato enzimático (extrato bruto). Para controlar a reação, foram adicionados 0,25 mL de solução tampão e 0,25 mL de extrato enzimático. A reação branca foi composta por 0,25 mL de solução tampão e 0,25 mL do substrato carboximetilcelulase (CMC). As amostras foram incubadas a 50°C por 30 minutos. Após a incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo e, em seguida, 0,5 mL do reagente DNS foi adicionado. Posteriormente, os tubos foram submersos em água fervente (95°C) por 15 minutos e, após o resfriamento, 2,5 mL de água destilada foram adicionados aos tubos. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm (Santos et al., 2011). O ensaio foi realizado em réplica. Este foi escolhido para conduzir os próximos experimentos essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

2.4 PH E TEMPERATURA ÓTIMOS

O efeito da temperatura sobre a atividade da carboximetilcelulase foi determinado por ensaios de atividade enzimática em reações com diferentes temperaturas (30, 50, 70°C) em diferentes pHs, variando de 2 a 6. Conforme mostrado na Tabela 3. Utilizou-se o delineamento experimental de Doehlert, com duas variáveis, equivalentes a 9 experimentos, tendo seu ponto central nos experimentos 4, 5 e 6 (Tabela 1), com testes realizados em replicação.

A atividade enzimática da carboximetilcelulase obtida em cada ponto foi determinada conforme descrito anteriormente e utilizada para plotar o gráfico de superfície de resposta usando o programa Statistic 7.0.

2.5 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA PARA ESTABILIZAÇÃO DE ATIVIDADE

As condições experimentais foram otimizadas usando um planejamento de mistura simplex-centróide. Um total de nove experimentos foram realizados aleatoriamente, conforme apresentado na Tabela 2, incluindo repetições do ponto central para estimar o erro experimental. A mistura foi composta por cloreto de sódio, benzoato de sódio e fosfato monossódico, modelados na proporção de 0 a 100% (concentração de 1 mol L⁻¹). A atividade enzimática (U mL⁻¹) foi utilizada como resposta experimental para a obtenção dos modelos matemáticos que foram avaliados a partir da análise de variância (ANOVA). Foram considerados a significância estatística da regressão, os coeficientes de determinação (R²) e a ausência de falta de ajuste (Azcarato; Pinto; Goicoechea, 2020; Bezerra et al., 2020). Os dados foram processados no software Statistic 12 (StatSoft, Tulsa, Estados Unidos) com nível de confiança de 95% (p = 0,05).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) obtida com o auxílio do programa Statistica, bem como gráfico de superfície de resposta, análise de variância, índice de regressão, R², entre outros parâmetros estatísticos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Os resultados mostraram que o uso do bagaço de cana-de-açúcar in natura apresentou atividade de $0,12 \mu\text{mol min}^{-1}$. Esses resultados evidenciam a utilização do bagaço de cana-de-açúcar na produção de carboximetilcelulase (CMCase) pelo fungo *Stachylidium bicolor*.

3.2 PH E TEMPERATURA ÓTIMOS

O pH e a temperatura estão entre os parâmetros mais importantes, que afetam diretamente a produção de enzimas (Behera et al., 2017). Em seguida, para analisar essas variáveis, o planejamento experimental de Doehlert foi aplicado para avaliar o efeito desses parâmetros sobre a enzima CMC obtida de *Stachylidium bicolor* (Tabela 1).

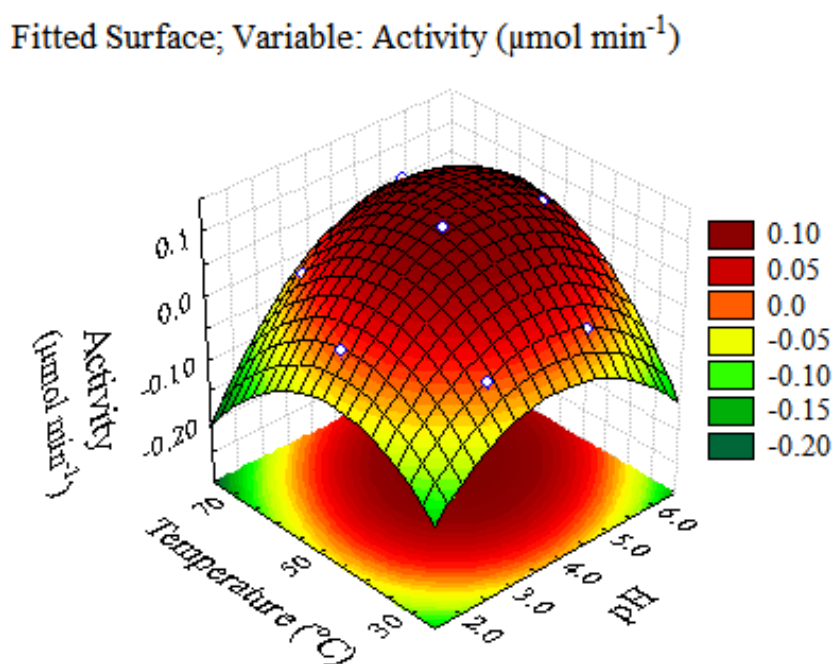
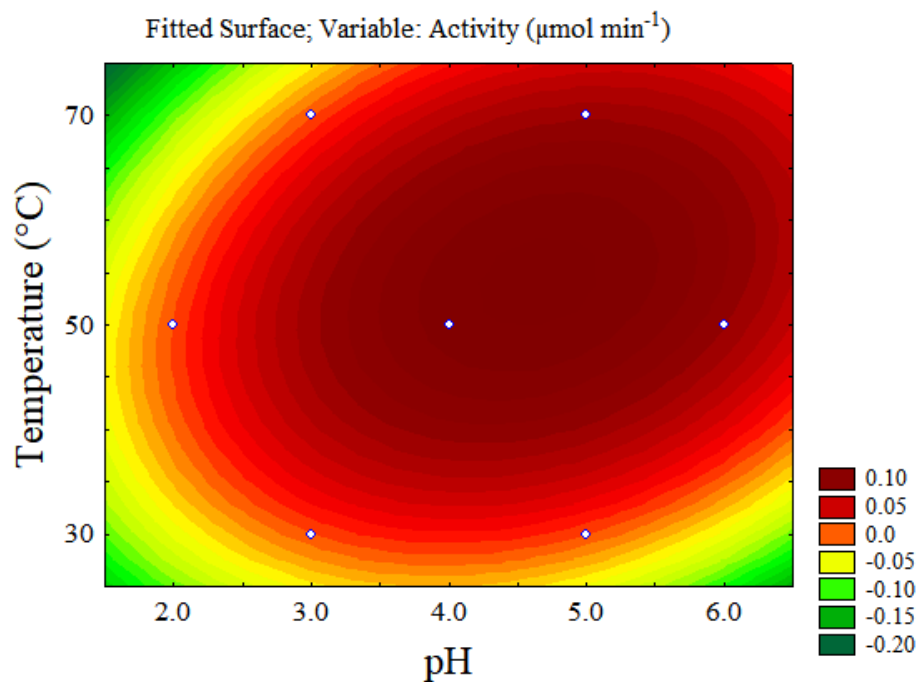
Tabela 1. Caracterização de pH e Temperatura: Desenho Experimental de Doehlert e Atividade Específica

Amostra	pH	Temperatura (°C)	Atividade ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
1	3 (-0.5)	70 (+0.866)	0
2	5 (+0.5)	70 (+0.866)	0.077
3	2 (-1.0)	50 (0.0)	0
4 (CP*)	4 (0.0)	50 (0.0)	0.1152
4 (CP*)	4 (0.0)	50 (0.0)	0.1150
4 (CP*)	4 (0.0)	50 (0.0)	0.1151
5	6 (+1.0)	50 (0.0)	0.0821
6	3 (0.0)	30 (-0.866)	0
7	5 (+0.5)	30 (-0.866)	0

*CP = Ponto Central

O programa Statistica foi utilizado para gerar o gráfico de superfície de resposta, que mostra a influência do pH e da temperatura na produção de celulase a partir do microrganismo *Stachylidium bicolor* (Figura 1, A e B).

Figura 1. Caracterização de A-pH e Temperatura: Gráfico de Área. Gráfico de superfície de resposta B.



De acordo com a análise dos dados obtidos, a atividade foi maior em pH 4,0 a 50°C, com atividade de aproximadamente $0,115 \mu\text{mol min}^{-1}$.

O resultado experimental obtido com o delineamento de Doehlert teve sua equação ajustada aos dados obtidos na caracterização enzimática que descreve a superfície de resposta, a saber:

$$(UA) = -0,6004 + 0,1200 \times (\text{pH}) - 0,0185 \times (\text{pH})^2 + 0,0164 \times (\text{Temperatura}) - 0,00019 \times (\text{Temperatura})^2 + 0,0009625 \times (\text{pH}) \times (\text{Temperatura}).$$

A Tabela 2 mostra a validade dos modelos obtidos por meio de planejamento experimental pode ser observada por análise de variância (ANOVA), obtendo-se um valor de R^2 igual a 0,99. O modelo obtido para a atividade sobre celulase foi validado com um F calculado de 3284,2, superior ao F tabulado (9,01), mostrando que a função está bem ajustada às respostas obtidas.

Os valores de pH e temperatura influenciaram a atividade, apresentando maior atividade em pH 4,0 e 50°C, sendo os valores críticos apresentados pelo modelo no estudo de 4,65 e 54,11°C. O valor previsto foi de $0,1236 \mu\text{mol min}^{-1}$.

Tabela 2. Caracterização de pH e Temperatura: análise de variância (Anova)

Fonte de variação	QSa	DFb	QM _c	F calculado	F tabulado (CId 95 %)
Regressão	0.0241	5	0.0048	3284.2517	9.01
Residual	0.0000	3	0.0000		
Falta de ajuste	0.000004	1	0.000004	0.0000	0.00
Erro puro	0.000000	2	0.000000		
Total de SQ	0.024146	8			

a = QS, Soma Quadrática; b = DF, Graus de Liberdade; c = QM, Média Quadrática; d = IC, Intervalo de Confiança.

Também foi gerado o gráfico de Pareto, que tem como objetivo descrever uma ordem sob a qual os fatores apresentarão melhores resultados na redução de perdas.

Figura 2. Caracterização de pH e Temperatura: Gráfico de Pareto.

Pareto Chart of Standardized Effects; Variable: Activity ($\mu\text{mol min}^{-1}$)

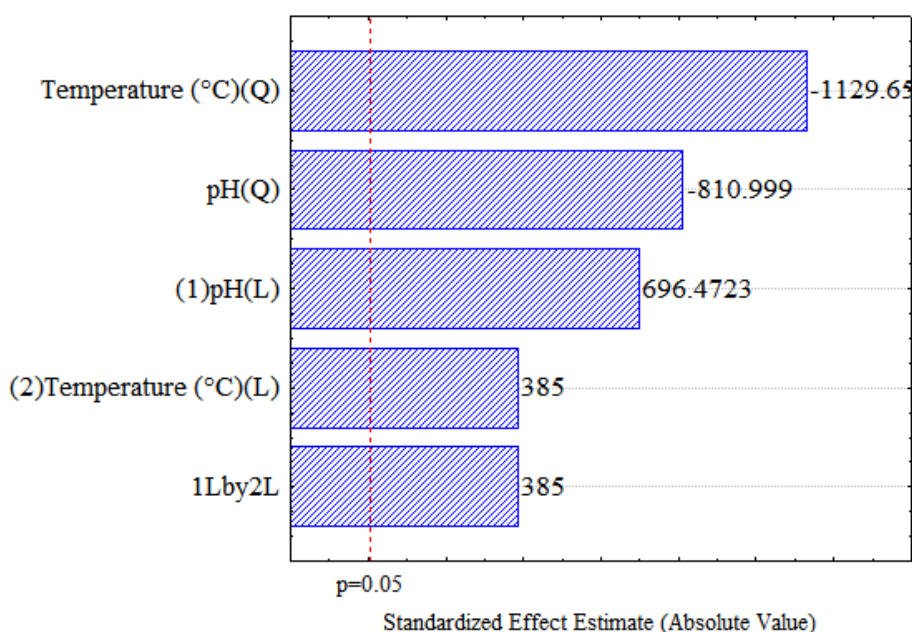


Figura 2 - Gráfico de área da enzima celulase – influência da temperatura sob pH. Fonte: O próprio autor.

Em geral, as celulasas produzidas por fungos filamentosos têm valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0) (Castro; Pereira JR, 2010). Para Sales et al., (2010) o pH com melhor resultado foi de 5,0, segundo Sohail et al., (2009). Os melhores resultados para a obtenção de celulase fúngica

ocorreram em pH 4,0. Buntić et al. (2016) descreveram melhores resultados obtidos em um pH variando entre 5,0 e 7,0, atingindo seus valores máximos mais próximos do pH 7,0 para os fungos utilizados.

Para determinar a melhor temperatura de atividade de fungos filamentosos para obtenção de enzimas celulósicas, Castro; Pereira Jr. (2010) descreveu que os melhores resultados foram obtidos na faixa de temperatura de 50°C, enquanto Santos (2014) relata melhores resultados na produção de celulase fúngica a uma temperatura de 35°C. De acordo com Sales et al., (2010) os melhores resultados foram encontrados a uma temperatura de 33°C e para Buntić et al. (2016) o melhor resultado foi alcançado a uma temperatura de 45°C. Assim, conforme descrito na Tabela 1, para o presente estudo o melhor resultado obtido para a obtenção de enzimas celulósicas fúngicas foi a uma temperatura de 50°C a um pH de 4,0.

Os resultados mostraram semelhança com vários estudos com endoglucanases de diferentes organismos, que apresentam pH 7,0 e ótima atividade à temperatura de 50°C (Romaniec, 1992; Saha 2004; Wen et al., 2005; Dutta et al, 2008; Heidorne et al, 2006). Os resultados mostraram que em *Bacillus amyloliquefaciens* a temperatura e a atividade ótima da celulase do pH foram de 50 ° C e pH 7,0, respectivamente (Lynd et al., 2002). Padilha *et al* (2015) estudaram a produção de celulase a partir da cepa termofílica *Bacillus* sp. C1AC5507 e verificaram que a temperatura e o pH ótimos para a produção de CMCase foram de 70 ° C e 7,0, respectivamente.

Estudou-se a produção de celulases por *Ceriporiopsis subvermispora* em cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis* e *Pinus taeda* . As características bioquímicas das celulases produzidas em ambas as espécies de madeira foram quase as mesmas. O pH ótimo para essas enzimas estava entre 4,0 e 5,0 e a temperatura ótima era de 60 ° C (Romaniec et al., 1992).

Aspergillus niger A atividade da endoglucanase mostrou um aumento na atividade quando incubada em temperaturas de 30 e 35 ° Cat pH 4 com uma redução no pH 5 (Sohail et al, 2009). Estudos de caracterização da celulase de *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 apresentou valores de pH 4,6 e 60°C tão grandes quanto à atividade máxima da celulose (Khalil 2002). Estudos mostram que o pH e a temperatura da endoglucanase purificada têm semelhança com a endoglucanase do extrato bruto. As celulases de *Bacilo* foram otimamente ativos na faixa de pH de 5-6,5. A temperatura ótima foi de 65 e 70°C para a endoglucanase de CH43 e HR68, respectivamente Mawadza et al (2000).

Então, é possível concluir que a celulase CMC apresenta pH e temperatura ótimos que estão na faixa observada na literatura.

3.3 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA MISTURA ESTABILIZADORA

Para analisar o efeito das substâncias na atividade enzimática, a mistura estabilizadora composta por cloreto de sódio (A), benzoato de sódio (B) e fosfato monossódico (C) foi investigada

de forma multivariada usando um delineamento de mistura de centróide simples. A matriz experimental resultante da combinação dos componentes em proporções que variam de 0 a 1,00 mL e a resposta experimental (atividade enzimática) são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 3 - Matriz experimental com experimentos com a combinação de componentes e resposta experimental avaliada (Atividade enzimática).

Experimental	Cloreto de sódio (mL)	Benzoato de sódio (mL)	Fosfato monossódico (mL)	Atividade (U mL ⁻¹)
1	1.00	0.00	0.00	0.025
2	0.00	1.00	0.00	0.019
3	0.00	0.00	1.00	0.030
4	0.50	0.50	0.00	0.025
5	0.50	0.00	0.50	0.034
6	0.00	0.50	0.50	0.032
7 CP *	0.33	0.33	0.33	0.035
8 CP *	0.33	0.33	0.33	0.033
9 CP *	0.33	0.33	0.33	0.034

*CP = Ponto Central. Fonte: O próprio autor.

Os modelos matemáticos foram obtidos por meio de dados experimentais e avaliados por meio de ANOVA (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de variância para o modelo quadrático

Fonte de variação	β	Df	MS	Fcalculado	Valor de p
Regressão	2.35E-4	5	4.69E-5	26.7	0.011
Falta de ajuste	3.28E-6	1	3.28E-6	3.3	0.212
Erro puro	2.00E-6	2	1.00E-6		
Total	2.40E-4	8	3.00E-5		

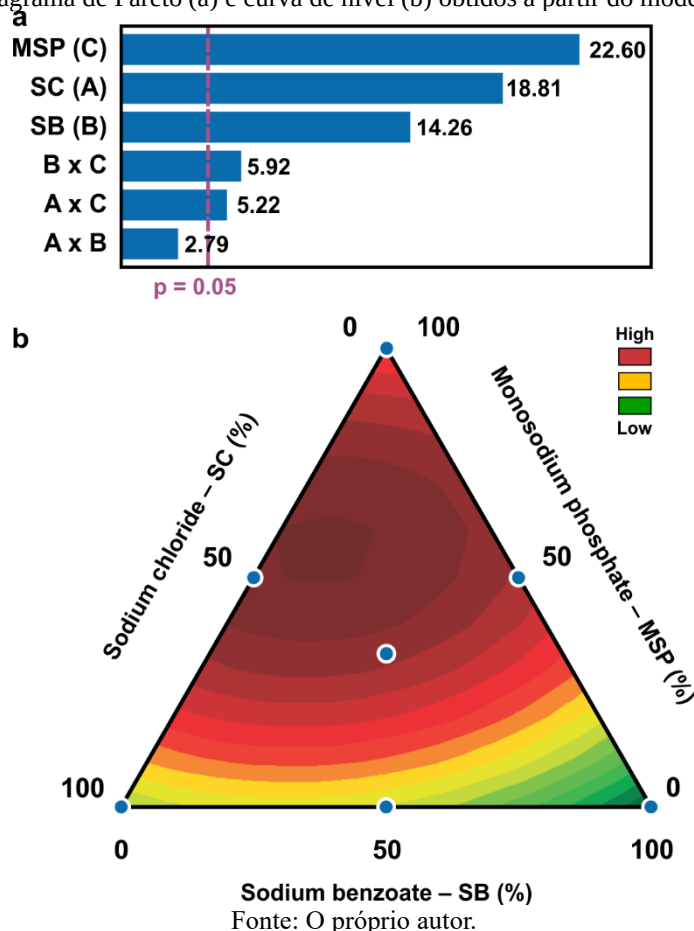
Soma quadrática (SS); grau de liberdade (Df); quadrático médio (MS); coeficiente de determinação (R^2). Fonte: O próprio autor.

Considerando os modelos matemáticos possíveis, a quadrática apresentou melhor potencial descritivo. A regressão foi significativa ($p < 0,05$), ou seja, pode ser utilizada de forma consistente para descrever o comportamento da resposta experimental em função da variação na proporção dos componentes da mistura. Além disso, o modelo quadrático não forneceu evidências de desajuste, indicado pela falta de significância estatística para a falta de ajuste ($p = 0,212$). Assim, obteve-se um modelo cuja regressão foi significativa e a falta de ajuste não foi significativa, sendo considerado adequado para avaliar a condição ótima (Novaes et al. 2017). Além disso, a alta capacidade descritiva do modelo é evidenciada pelo valor de $R^2 = 0,978$.

O modelo obtido foi adequado e a partir disso, foi possível estimar e avaliar o impacto do efeito padronizado (SE) dos componentes da mistura e suas interações na variação da resposta experimental. O SE dos componentes e interações são mostrados no gráfico de Pareto (Figura 3a). O fosfato monossódico apresentou um PE maior e positivo, sugerindo que a mistura com maior proporção desse componente proporciona maior atividade enzimática. Além disso, os demais componentes têm efeitos

da mesma magnitude e positivos. Apenas o efeito de interação entre cloreto de sódio e benzoato de sódio não foi significativo.

Figura 3. Diagrama de Pareto (a) e curva de nível (b) obtidos a partir do modelo quadrático



Por fim, considerando a alta capacidade preditiva, obteve-se a equação matemática (Equação 1), que descreve o comportamento da resposta experimental em função da proporção de componentes na mistura mostrada pelo gráfico de contorno (Figura 3b).

$$\text{Enzymatic activity (U mL}^{-1}\text{)} = 0.025A + 0.019B + 0.030C + 0.016AB + 0.030AC + 0.034BC \quad (1)$$

O modelo apresentou uma condição máxima, possibilitando o cálculo das coordenadas dos pontos críticos, ou seja, a região no gráfico de contorno que proporcionou a maior resposta experimental. A atividade enzimática máxima foi obtida usando uma mistura estabilizadora composta por 34% de cloreto de sódio (A), 10% de benzoato de sódio (B) e 56% de fosfato monossódico (C). Nessas condições, a atividade enzimática predita pelo modelo foi de 0,036 U mL⁻¹.

Junqueira et al. (2023) estudaram o efeito dos conservantes na atividade do fungo produzido pela enzima CMCase *Aspergillus niger* ATCC 1004. Esses autores testaram cloreto de sódio, fosfato

monossódico e benzoato de sódio em várias concentrações durante 72 horas sobre a atividade da enzima CMCase, incubando a enzima com esses sais, em tampão citrato-fosfato pH 5,0 a 50 mM, a uma temperatura de 50 °C. Eles descobriram que as substâncias estudadas mostram que são boas opções para preservar a enzima CMCase.

O cloreto de sódio é usado na indústria alimentícia, nas indústrias agrícola e química como conservante químico (Ravishankar e Juneja, 2014).

O benzoato de sódio é amplamente utilizado nas indústrias como conservante, especialmente na indústria alimentícia (Junqueira et al. 2023). O efeito das aplicações pós-colheita de benzoato de sódio nas propriedades físico-químicas e atividades enzimáticas do fruto de pera cv foi estudado por Kaur et al. (2019) que encontraram maior eficácia na manutenção de menor atividade enzimática da celulase, pectina metil esterase e poliohenol oxidase.

O fosfato de sódio monobásico ou fosfato monossódico é aplicado nas indústrias alimentícias como regulador de acidez. Além disso, pode contribuir para a estabilização de algumas proteínas (Junqueira et al. 2023). O fosfato monossódico é utilizado como tampão em diversas etapas da produção enzimática por processos fermentativos, como preparo de substrato, extração enzimática, determinação da atividade enzimática, etc., sendo assim utilizado em diversos estudos com essa abordagem (Junqueira et al. 2023).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostraram que é possível produzir a enzima celulase a partir do fungo *Stachylidium bicolor*, demonstrando a viabilidade do fungo para uso, uma vez que é possível ser adquirido em algumas regiões comuns do semiárido baiano.

A enzima celulase produzida por *S. bicolor* apresentou melhor atividade em pH 4,0 a uma temperatura de 50°C.

Foram realizados testes, com adição de misturas estabilizantes que devem aumentar ou diminuir a atividade enzimática. Os resultados obtidos mostraram que uma mistura estabilizadora composta por diferentes proporções de cloreto de sódio, benzoato de sódio e fosfato monossódico possibilitou uma atividade enzimática eficiente no processo, podendo ser utilizada em conjunto ou mesmo em misturas em pares: fosfato monossódico + benzoato de sódio ou fosfato monossódico + cloreto de sódio.

Portanto, nota-se a viabilidade do uso de *Stachylidium bicolor* na obtenção e caracterização da celulase, sendo possível seu uso como microrganismo produtor dessa enzima.

CONFIRMAÇÕES

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) por bolsa de doutorado [88882.447813/2019-01], ao CNPq e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UEFS - pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. et al. Time-dependent production of the bioactive peptides endolides A and B and the polyketide mariline A from the sponge-derived fungus *Stachylidium bicolor* 293K04. *Fermentation*, v. 3, n. 45, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation3030045>.
- AZCARATE, S. M.; PINTO, L.; GOICOECHEA, H. C. Applications of mixture experiments for response surface methodology implementation in analytical methods development. *Journal of Chemometrics*, v. 34, n. 12, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cem.3246>.
- BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 197–210, 2017.
- BEZERRA, M. A. et al. Application of mixture design in analytical chemistry. *Microchemical Journal*, v. 152, p. 104336, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104336>.
- BUNTIĆ, A. V. et al. Utilization of spent coffee grounds for isolation and stabilization of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 cellulase by immobilization. *Heliyon*, v. 2, n. 8, e00146, 2016.
- CASTRO, A. M. de; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.
- CRUZ, A. C. R. da; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais na Caatinga: espécies lignícolas. *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n. 4, p. 1133–1144, 2009.
- DELABONA, P. da S. et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology*, v. 107, p. 517–521, 2012.
- DELABONA, P. S. et al. A novel *Scytalidium* species: Understanding the cellulolytic system for biomass saccharification. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 36, n. 1, p. 85–97, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170495>.
- DUTTA, T. et al. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: Production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 275–282, 2008.
- EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics (Basel)*, v. 6, n. 3, p. 44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>.
- GHIO, S. et al. Synergic activity of Cel8Pa β -1,4 endoglucanase and Bgl1Pa β -glucosidase from *Paenibacillus xylanivorans* A59 in beta-glucan conversion. *Biotechnology Reports (Amsterdam)*, v. 28, e00526, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00526>.
- HEIDORNE, F. O. et al. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. *Enzyme Microbial Technology*, v. 38, p. 436–442, 2006.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, v. 280, p. 309, 1991.

HUA-LI, E. et al. Microbiological Biotechnology, v. 23, p. 1297, 2007.

JUNQUEIRA, L. L. et al. Stabilization by chemical preservatives of carboxymethyl cellulase from fungus *Aspergillus niger* produced by state solid fermentation in fruit residues using chemical preservatives. Editora, 2023. Disponível em: <https://sevenpublicacoes.com.br/editora/article/view/2569>.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production, and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 33, p. 188–203, 2014.

KHALIL, I. A. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 18, p. 753, 2002.

KAUR, A.; PPS, G.; JAWANDHA, D. R. Effect of sodium benzoate application on quality and enzymatic changes of pear fruits during low temperature. Journal of Food Science and Technology, v. 56, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03823-5>.

LOUREIRO, C. B. et al. Production of cellulolytic enzymes by *Gelatoporia subvermispora* using different substrates. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 35, p. 459–466, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160575>.

LYND, R. L. et al. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, p. 506, 2002.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. Advances in Chemistry Series, v. 95, p. 391–414, 1969.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology, v. 83, n. 3, p. 177–187, 2000.

NOVAES, C. G. et al. Optimization of analytical methods using response surface methodology – Part I: Process variables. Revista Virtual de Química, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170070>.

PADILHA, I. et al. Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulase synthesized by *Bacillus* sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 32, p. 35–42, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003298>.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 33, n. 1, p. 21–31, 2016.

RAVISHANKAR, S.; JUNEJA, V. K. Preservatives: Traditional Preservatives - Sodium Chloride. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00259-7>.

REIS, L. et al. Statistical optimization of mineral salt and urea concentration for cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 32, n. 1, p. 13–22, 2015.

ROMANIEC, M. P. M. et al. Biochemical Journal, v. 283, p. 69, 1992.

SAHA, B. C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. Process Biochemistry, v. 39, p. 187, 2004.

SALES, M. R. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, n. 11, p. 1290–1296, nov. 2010.

SANTANA, M. L. et al. Production and characterization of carboxymethyl cellulase by submerged fermentation of *Moniliophthora perniciosa*. *Catalysis Research*, v. 3, n. 2, p. 019, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.21926/cr.2302019>.

SANTOS, R. O. et al. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 99, n. 3, p. 635–642, 2011.

SINGH, A. et al. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, v. 14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>.

SOHAIL, M. et al. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, v. 25, n. 6, p. 437–441, set. 2009.

SUTAONEY, P. et al. Current perspective in research and industrial applications of microbial cellulases. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 264, p. 130639, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac>.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 491–499, 2005.