

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

BRUNA FERNANDES RIBEIRO

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
CELULASE PRODUZIDA POR *Streptomyces* sp. S5 E SUA
APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO.**

Goiânia

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

Bruna Fernandes Ribeiro

3. Título do trabalho

Purificação parcial e caracterização de uma celulase produzida por *Streptomyces* sp S5 e sua aplicação em panificação

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **BRUNA FERNANDES RIBEIRO, Discente**, em 30/06/2020, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Artur Mendes Bataus, Professor do Magistério Superior**, em 02/07/2020, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1409523** e o código CRC **8ACD96AA**.

Referência: Processo nº 23070.013541/2020-21

SEI nº 1409523

BRUNA FERNADES RIBEIRO

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
CELULASE PRODUZIDA POR *Streptomyces* sp. S5 E SUA
APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás como exigência para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Luiz Artur Mendes Bataus

Co-orientador: Ivan Torres Nicolau de Campos

Goiânia

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro, Bruna Fernandes
PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
CELULASE PRODUZIDA POR *Streptomyces* sp. S5 E SUA
APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO. [manuscrito] / Bruna Fernandes
Ribeiro. - 2020.
LXXI, 71 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus; co-orientador Dr.
Ivan Torres Nicolau de Campos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. atividade enzimática. 2. actinomicetos. 3. farinha refinada. 4.
farinha integral. I. Bataus, Luiz Artur Mendes, orient. II. Título.

CDU 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 0070/2020 da sessão de Defesa de Dissertação de **Bruna Fernandes Ribeiro**, que confere o título de Mestre(a) em **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, na área de concentração em **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Ao/s 30/03/2020, trinta dias do mês de março do ano de dois mil e vinte, a partir da(s) 14:00 hora, no(a) por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "Purificação parcial e caracterização de uma celulase produzida por *Streptomyces* sp S5 e sua aplicação em panificação. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus / Escola de Agronomia - UFG** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez / ICB/UFG**, membro titular interno, **Prof.ª Dr.ª Carolina Cândida de Queiroz Brito** membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) 30/03/2020, trinta dias do mês de março do ano de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Purificação parcial e caracterização de uma celulase produzida por *Streptomyces* sp S5 e sua aplicação em panificação



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Artur Mendes Bataus, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2020, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cândida de Queiroz Brito Cunha, Usuário Externo**, em 30/03/2020, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando Garcia Rodriguez, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2020, às 21:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1234404** e o código CRC **2C3CE1A7**.

28/04/2020

SEI/UFG • 1234404 • Ata de Defesa de Dissertação

Referência: Processo nº 23070.013541/2020-21

SEI nº 1234404

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido graça e força para que seguisse em frente com meus objetivos.

Ao meu orientador, Luiz Artur, um agradecimento especial pela oportunidade, confiança, carinho, compreensão e ensinamentos. Obrigada por sempre ter me motivado quando algo dava errado. Sempre será lembrado com muito carinho

Ao meu co-orientador Ivan, pela calma e tranquilidade em me ensinar sempre que necessário, pelo auxílio nos experimentos, e por tudo que contribuiu para que pudesse chegar a este objetivo. Bom amigo.

A professora Kátia e sua equipe, por me receberem com carinho, pelos equipamentos cedidos e pelas dicas preciosas.

Ao professor Cirano e sua equipe, pelo auxílio e os equipamentos cedidos para que pudesse obter os resultados.

A querida Aline, por sempre se dispor a ensinar as técnicas, por tirar dúvidas e contribuir de forma tão valiosa para realização deste trabalho.

Ao meu esposo, João Pedro, pela paciência e companheirismo durante toda essa caminhada.

A minha querida mãe, Helenir, por sempre me impulsionar a ser melhor, por sonhar comigo, e por ter me ensinado grandes valores.

A toda equipe e colegas do PPGCTA.

A Capes pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que passaram por minha vida deixando suas marcas, ajuda e ensinamentos.

RESUMO

Celulases são um complexo enzimático constituído por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasases, e possuem diversas aplicações biotecnológicas. Algumas bactérias filamentosas como *Streptomyces* sp. são utilizadas nos processos de degradação enzimática, e possuem potencial para produção de enzimas de interesse biotecnológico. A busca por celulases com propriedades mais adequadas para aplicação industrial tem aumentado nos últimos anos. Na indústria de panificação estas enzimas agem sobre a massa alterando características físico-químicas e sensoriais. Melhorando, assim, a qualidade final do produto e elevando a vida útil. Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar e purificar a enzima celulase produzida durante o crescimento de *Streptomyces* sp. S5, utilizando a técnica de fermentação submersa. E ainda avaliar sua aplicação na produção de pães de farinha de trigo refinada e integral. Para tal, o microrganismo foi cultivado em meio Pridham por 6 dias à 37° C, o extrato bruto foi obtido e determinada sua atividade celulolítica pela atividade de CMCase. O extrato parcialmente purificado foi obtido por Ultrafiltração (Ultracell10Kda) e cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100). A enzima foi caracterizada por determinação do efeito do pH, temperatura e íons metálicos sobre sua atividade, e estabilidade térmica. A enzima do extrato parcialmente purificado foi aplicada na formulação de pão de farinha de trigo refinada e integral, nas concentrações de 2,5; 5; 7,5 e 15 U/100 g de farinha. Foram avaliadas a influência no volume específico, textura e cor produto final. Como resultado, o extrato parcialmente purificado apresentou enzima com massa molecular de 32 kDa, com atividade para CMCase em zimograma. Tendo atividade ótima em pH de 5.5, e temperatura ótima a 55° C. Termoestabilidade com manutenção de mais de 60% de atividade a 50° C em até uma hora. Acima de 60% de atividade a 60°C, exceto na quinta hora. Atividade de mais de 100% na primeira hora a 70°C, mantendo acima de 80% entre 2 e 4 horas de incubação. A atividade enzimática foi inibida na presença de CaCl_2 , HgCl_2 , MgCl_2 e NaCl_2 , KCl_2 e FeSO_4 . A caracterização dos pães demonstra aumento do volume específico, e diminuição da dureza na presença de enzima celulase em todas as concentrações. Houve alterações na luminosidade, indicando aumento das reações de Maillard, e diminuição da intensidade de cor. Assim, conclui-se que o cultivo de *Streptomyces* sp. S5 utilizando a técnica de fermentação submersa é eficaz na produção de enzima celulase. As propriedades da enzima celulase obtida neste estudo a torna útil na aplicação em processos biotecnológicos como na produção de pães. Onde atuou proporcionando melhorias nas qualidades físicas e sensoriais do produto.

Palavras-chaves: atividade enzimática, actinomicetos, farinha refinada, farinha integral.

ABSTRACT

Cellulases are an enzymatic complex made up of endoglucanases, exoglucanases and β -glycosidases, and have several biotechnological applications. Some filamentous bacteria like *Streptomyces* sp are used in enzymatic degradation processes, and have potential to produce enzymes of biotechnological interest. The search for cellulases with more suitable properties for industrial application has increased in recent year. In the bakery industry, these enzymes act on the dough, changing physical-chemical and sensory characteristics. Thus, improving the final quality of the product and increasing the useful life. Given the above, the present study aims to characterize and purify cellulase enzyme produced during the growth of *Streptomyces* sp. S5, using the submerged fermentation technique. Also evaluate its application in the production of refined and whole breads. So, microorganism was grown in Pridham medium for 6 days at 36° C, the crude extract was obtained and its cellulolytic activity was determined by tge CMCase activity. The partially purified extract was obtained by Ultrafiltration (Ultracel 10 kDa) and gel filtration chromatography (Sephacryl S-100). The enzyme was characterized by effect of pH, temperature and metal ions on its activity, and thermal stability. The enzyme of the partially purified extract was applied in the formulation of refined and whole wheat bread, in concentrations of 2.5, 5.0, 7.5. And 15 U/100 g of flour. The influence on the specific volume, texture and color of the final product was evaluated. As a result, the partially purified extract showed an enzyme with a molecular mass of 32 kDa, with activity for CMCase in a determined by zymogran. It showed an optimum activity at pH 5.5, and na optimum temperature at 55°C. Thermostability with maintenance of more than 60% of activity at 50°C in up one hour. Above 60% of activity at 60°C, except in the fifth hour. More than 100% activity in the first hour at 70°C, keeping above 80% between 2 and 4 hours of incubation. The enzymatic activity was inhibited by the presence of CaCl₂, HgCl₂, MgCl₂ e NaCl, KCl and FeSO₄. The characterization of the breads shows an increase in specific volume, and a decrease in hardness in the presence of cellulase enzyme in all concentrations. There were changes in luminosity, indicating a increase in Maillard reactions, and a decrease in color intensity. Thus, it is concluded that the cultivation of *Streptomyces* sp. S5 using the submerged fermentation technique is effective in the production of cellulase enzyme. The properties of the cellulase enzyme obtained in this study makes it useful in application in biotechnological processes such as bread production, providing improvements in the physical and sensory qualities of the product.

Keywords: enzymatic activity, actinomycetes, refined flour, wholemeal flour

LISTA DE ABREVIATURAS

EGs	endoglucanases
CBs	exo-celobiohidrolases
CMCase	carboximetilcelulase
CBH	celobiohidrolase
GH	glicobiohidrolase
FSm	fermentação submersa
FES	fermentação em estado sólido
CMC	carboximetilcelulose
AX	arabinoxilano
WE-AX	arabinoxilano solúvel em água
WU-AX	arabinoxilano insolúvel em água
MLG	glucanos de ligação mista
EB	extrato bruto
ADNS	ácido dinitrosalicílico
SDS	dodecil sulfato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da lignocelulose	15
Figura 2. Representação esquemática da estrutura molecular da celulose	17
Figura 3. Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico	18
Figura 4. Colônias de <i>Streptomyces</i> sp. S5	20
Figura 5. Estrutura e composição do grão de trigo	22
Figura 6. Organização estrutural da parede celular do endosperma do trigo	23
Figura 7. Gráfico cromatografia gel filtração Sephacryl S-100	36
Figura 8. SDS-page 12% poliacrilamida, e Zimograma com extrato bruto e parcialmente purificado obtido do cultivo de <i>Streptomyces</i> sp. S5 em FSm	38
Figura 9. pH ótimo para atividade de CMCase (55°C) no extrato parcialmente purificado, produzido por <i>Streptomyces</i> sp. S5 cultivado em FSm	40
Figura 10. Temperatura ótima para atividade de CMCase (pH 5.5) no extrato parcialmente purificado, produzida por <i>Streptomyces</i> sp. S5 cultivado em FSm	41
Figura 11. Termoestabilidade em 50, 60 e 70°C para atividade de CMCase, no extrato parcialmente purificado, produzida por <i>Streptomyces</i> sp. S5 cultivado em FSm	42
Figura 12. Efeito das diferentes concentrações da celulase na formulação de pães	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação dos pães	32
Tabela 2. Enzimas presentes no EB de cultivo de <i>Streptomyces</i> sp. S5 cultivado em FSm ...	35
Tabela 3. Purificação parcial de celulase produzida por <i>Streptomyces</i> sp. S5 cultivado em FSm	36
Tabela 4. Efeito de íons metálicos, β - mercaptoetanol e SDS na atividade de CMCase do extrato parcialmente purificado produzida por <i>Streptomyces</i> sp. S5 cultivado em FSm	43
Tabela 5. Valores médios das análises de volume específico e textura do pão de farinha de trigo refinada e integral	46
Tabela 6. Valores médios das análises de cor da casca do pão de farinha de trigo refinada e integral	50
Tabela 7. Valores médios das análises de cor do miolo do pão de farinha de trigo refinada e integral	52

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1.	Biomassa lignocelulósica	15
2.2.	Celulases	16
2.2.1.	Endoglucanases	18
2.2.2.	Exoglucanases	19
2.2.3.	β -glicosidade	19
2.3.	Actinomicetos	19
2.4.	Fermentação Submersa	21
2.5.	Enzimas na panificação	22
3.	OBJETIVOS	26
3.1.	Objetivo geral	26
3.2.	Objetivos específicos	26
4.	METODOLOGIA	27
4.1.	Linhagem da bactéria	27
4.2.	Fermentação Submersa	27
4.3.	Determinação da atividade enzimática e concentração de proteína	28
4.3.1.	Determinação da atividade de celulase (CMCase)	28
4.3.2.	Determinação da atividade de xilanase	28
4.3.3.	Determinação da concentração de proteínas	29
4.4.	Purificação da enzima celulase	29
4.5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	29
4.6.	Zimografia	30

4.7. Caracterização bioquímica da celulase	30
4.8. Formulação dos pães	31
4.9. Caracterização dos pães	33
4.9.1. Volume específico	33
4.9.2. Análise de Textura	33
4.9.3. Análise de Cor	33
4.10. Análise estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Produção de celulases por <i>Streptomyces</i> sp. S5 em FSm	35
5.2. Purificação parcial	36
5.3. Perfil eletroforético e zimografia	37
5.4. Caracterização do extrato parcialmente purificado produzido por <i>Streptomyces</i> sp. S5 em FSm	40
5.4.1. pH e temperatura ótimos para atividade de CMCase	50
5.4.2. Termoestabilidade enzimática de CMCase	42
5.4.3. Efeito de íons metálicos, SDS e β - mercaptoetanol sobre atividade de CMCase	43
5.5. Aplicação da celulase na formulação de pão de farinha de trigo refinada e pão de farinha de trigo integral	44
5.5.1. Volume específico dos pães	46
5.5.2. Análise de textura dos pães	48
5.5.3. Coloração dos pães	49
6. CONCLUSÕES	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	56

1- INTRODUÇÃO

As enzimas têm sido cada vez mais utilizadas nas indústrias para variadas aplicações. Em diferentes segmentos como na produção de detergentes, alimentos e rações, produção de papel e celulose, produtos farmacêuticos e têxteis, entre outros (CARVALHO et al., 2017). A celulase é a terceira enzima mais utilizada em escala industrial, com potencial para aplicação no processamento de algodão, nas indústrias de papel, de alimentação animal e alimentação de modo geral, na produção de detergentes e indústria têxtil, além de serem utilizadas na produção de etanol a partir da biomassa (GUEIROS et al., 2020).

No entanto, a produção dessas enzimas envolve um custo elevado, diminuindo sua utilização em diferentes processos. Devido a isso, há uma crescente demanda por microrganismos capazes de produzi-las utilizando técnicas economicamente mais viáveis. Além da busca pela produção de enzimas estáveis, que possam ser aplicadas em processos sob ampla faixa de pH e temperatura, tornando assim os processos industriais mais eficientes e econômicos (BAJAJ, 2019).

A celulose é um homopolissacarídeo linear, não ramificado, composto por subunidades de glicose unidas por meio de ligações β -1,4-glicosídicas. As celulasas atuam na despolimerização da celulose por meio de ação sinérgica: das endoglucanases (endo 1,4- β glucanases), que agem aleatoriamente na celulose, gerando como produtos finais a glicose e celobiose; as exoglucanases (exo 1,4- β glucanases), que hidrolisam as extremidades da cadeia liberando celobiose; e por fim, a β - glicosidase, ou celobiase, que cliva a celobiose e oligossacarídeos liberando glicose (BEDADE et al, 2017)

As celulasas são produzidas principalmente por fungos e bactérias, e um dos grupos bacterianos com potencial para produção dessas enzimas são os Actinomicetos. Especialmente o *Streptomyces* sp., organismo saprófito que degrada uma vasta gama de substratos insolúveis utilizando enzimas hidrolíticas extracelulares de interesse biotecnológico como as celulasas (SAHMOUNE, 2018).

Na indústria de panificação as celulasas agem alterando as propriedades da massa, melhorando a qualidade físico-química e sensorial do produto, e elevando sua vida útil. Estes atributos têm sido cada vez mais desejáveis para suprir as exigências do consumidor. As influências da aplicação da celulase na massa do pão ainda não são bem conhecidas, mas há

evidências de que a atuação deste complexo pode resultar na diminuição da dureza, proporcionando migalha macia e melhor qualidade sensorial (LIU et al., 2017; WANG et al., 2018a).

Diante da necessidade da produção de celulasas utilizando processos de baixo custo, tornando-as viáveis para utilização em diferentes processos biotecnológicos, este trabalho teve como proposta produzir celulase com características físico-químicas estáveis e adequadas para aplicações industriais, por meio do cultivo de *Streptomyces* sp. S5 em fermentação submersa. A enzima produzida foi purificada e caracterizada bioquimicamente, e aplicada na produção do pão de farinha de trigo refinada e integral, visando obter efeitos positivos na qualidade do produto final.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é uma matéria prima renovável e abundante que devido a sua alta disponibilidade têm sido utilizada como fonte de carbono sustentável. Por meio de fermentações microbianas possui potencial para o desenvolvimento de combustíveis e produtos químicos de base biológica (BALA; SINGH, 2017; CHYLENSKI et al., 2017; ROCHA-MARTÍN et al., 2017).

A estrutura da lignocelulose e sua composição é apresentada na Figura 1. Contém, com base em seu peso seco, aproximadamente 40 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 10 a 25% de lignina. É também constituído em quantidades menores por pectina, proteína e extrativos (materiais não estruturais solúveis, como açúcares não estruturados, material nitrogenado e clorofila). Essas proporções variam em uma mesma planta de acordo com a idade, época de colheita e condições de cultivo. (HAN et al., 2019; SHARMA, A., PAREEK, V., ZHANG, 2015)

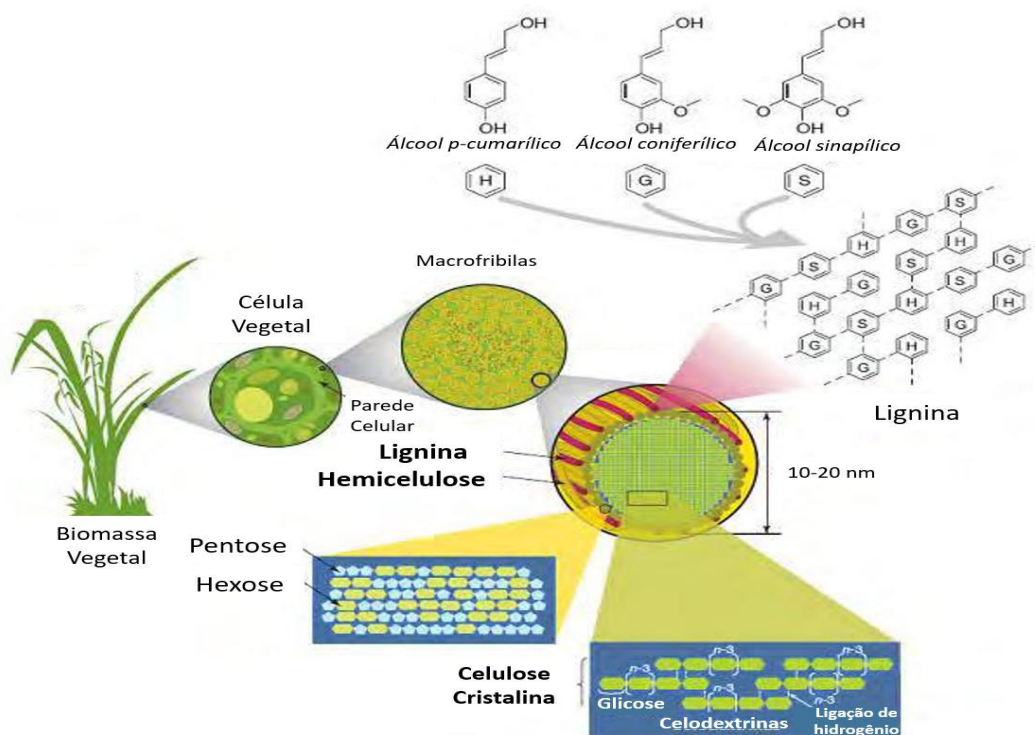


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da lignocelulose.

Fonte: Adaptado de (MARQUES, 2013)

A celulose é o componente principal da parede celular dos vegetais. Seguido de hemicelulose é um polímero amorfo complexo, composto por unidades de monômeros de pentose (principalmente D-xilose, L-arabinose) e hexose (D-manose, D-glicose ou D-galactose), unidas por ligações β -1,4- glicosídicas, e possui cadeias ramificadas e se encontram associadas a lignina; A lignina, é um heteropolímero aromático, constituído por unidades de fenilpropano sintetizados a partir de três álcoois: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, (HAN et al., 2019; MA et al., 2017).

A complexidade da estrutura hierárquica e a natureza recalcitrante da lignocelulose faz com que sejam necessárias etapas de pré-tratamento, as quais viabilizam sua utilização. Essas etapas permitem a conversão da biomassa em açúcares fermentáveis, e possibilita que a hidrólise enzimática quebre a lignina e a hemicelulose, disponibilizando a molécula de celulose. O pré-tratamento deve ser simples, economicamente viável e ecológico. Além de não originar compostos inibitórios ou perda das frações de interesse, que são os polissacarídeos ou lignina (RAVINDRAN et al., 2018; SUN et al., 2016).

A hidrólise da lignocelulose pode ser realizada por enzimas lignocelulolíticas, que possuem diversas aplicações biotecnológicas. Como as celulasas, que são úteis na produção de etanol, no processamento da madeira, na indústria têxtil, na maltagem na indústria de bebidas, nutrição animal, produção de detergentes, de polpa, na obtenção de protoplastos a partir de tecidos vegetais, processo de reciclagem de papel impresso e na indústria de alimentos. As hemicelulasas são usadas no biobranqueamento na indústria de papel, clarificação de sucos, melhoria de alimentos, produção de açúcares de xilose. E as enzimas que degradam a lignina são úteis na produção de biocombustível, indústria de papel, têxtil, alimentos, tratamento de águas residuais, biorremediação, indústria cosmética e farmacêutica (COELHO et al., 2018; ORJI et al., 2016).

2.2 Celulasas

Enzima é uma molécula de proteína que age como catalisador biológico e influencia na taxa de reação. A capacidade dos microrganismos em assimilar matéria orgânica está relacionada com a sua habilidade em produzir enzimas capazes de degradar estes substratos,

assim, microrganismos capazes de degradar a celulose produzem enzimas com atuações diferentes (BEHERA; RAY, 2015; ISLAM et al., 2019; LIMA et al., 2019).

As celulasas são enzimas hidrolíticas que degradam a celulose. A celulose é um polímero linear composto por subunidades de celobiose (dissacarídeos D-glicose) associados por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 2). As fortes ligações de hidrogênio intramoleculares entre as unidades de glicose, por meio dos grupos hidroxilas, determinam a estabilidade e a complexidade da estrutura macromolecular da celulose. As cadeias de celulose se agrupam para formar fibrilas elementares, que se acumulam em microfibrilas. Possuem regiões desordenadas e ordenadas, denominadas de regiões amorfas e cristalinas, respectivamente (SHARMA et al., 2019)

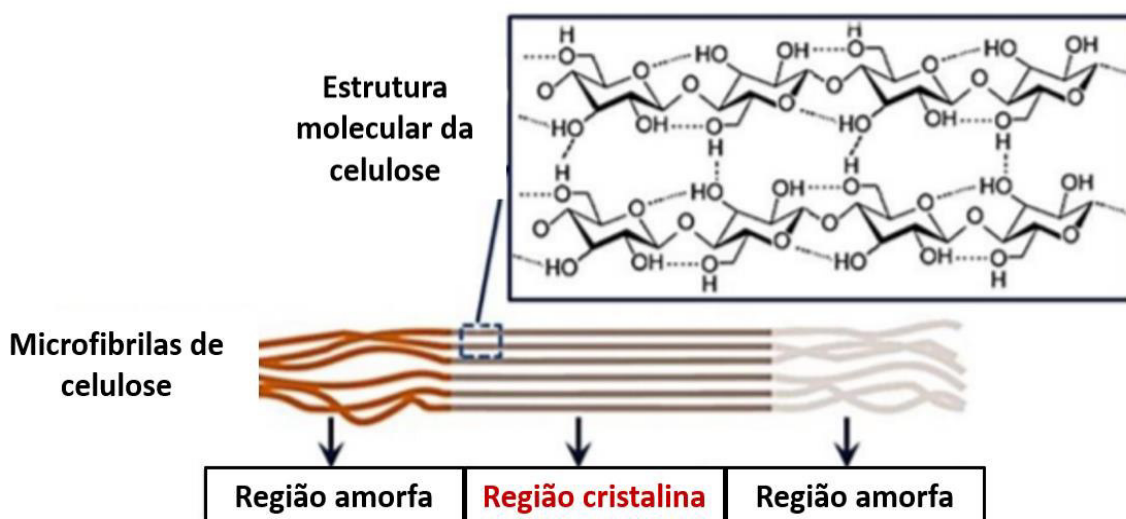


Figura 2. Representação esquemática da estrutura molecular da celulose.

Fonte: Adaptado de (NASCIMENTO, 2017)

As celulasas são classificadas pelo seu local de atuação na molécula de celulose, atuam sobre diversos materiais celulósicos gerando como produtos a glicose, celobiose e celooligossacarídeos. Para a hidrólise completa da celulose é necessária uma ação sinérgica das enzimas: endoglucanases (EGs; EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) conforme apresentado na Figura 3 (LEE et al., 2018; SHARMA, S.; SHARMA, V.; KUILA, 2016; WANG et al., 2018b)

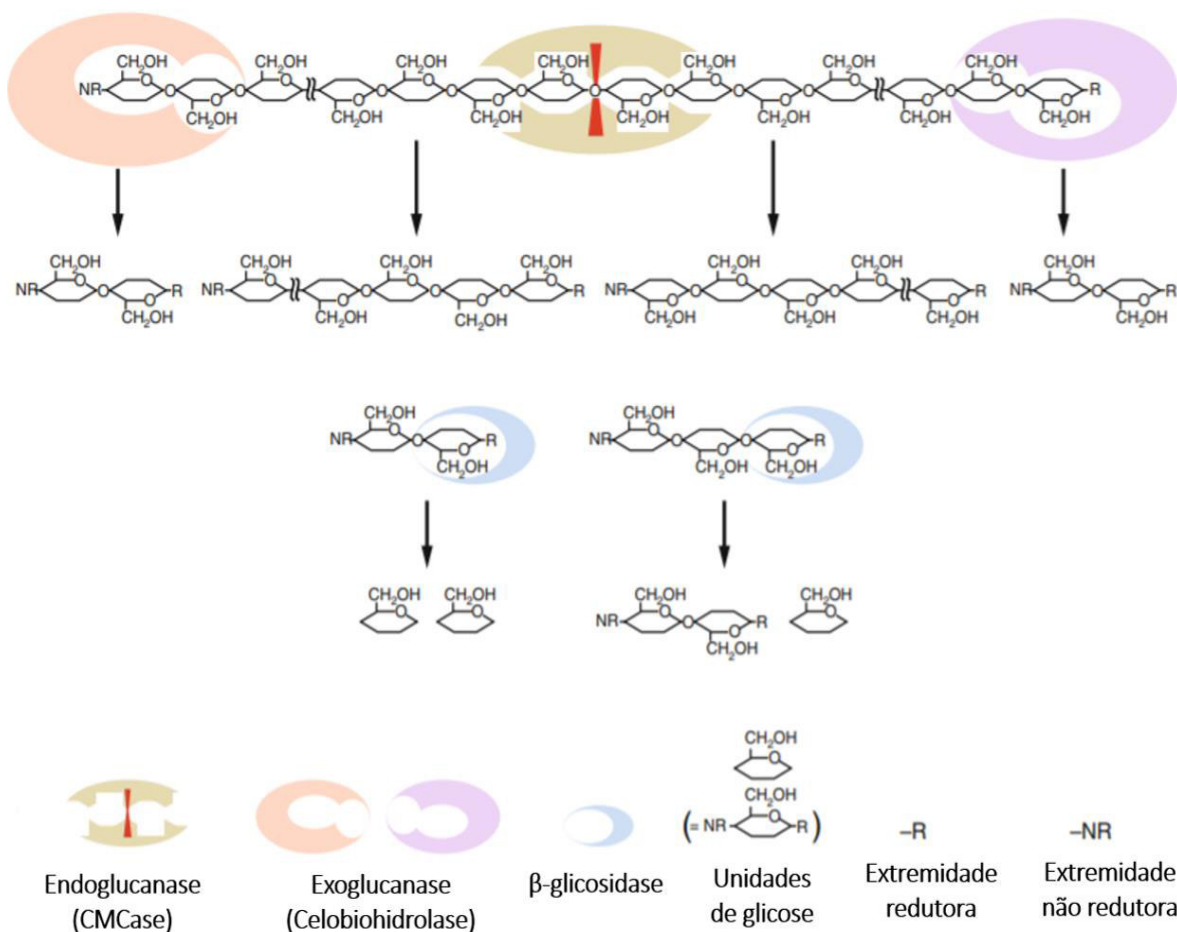


Figura 3. Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico.
Fonte: Adaptado de (BARBOSA, 2019)

O efeito sinérgico dessas enzimas possibilita a hidrólise completa da celulose. As celulasas possuem aplicações como na indústria têxtil; indústria de sucos, alimentos e cervejaria; indústria de papel e celulose; indústria de detergentes e bioetanol. Assim, elas representam 20% da demanda mundial anual por enzimas. Porém, as aplicações das celulasas são limitadas devido a perda de atividade enzimática a elevadas temperaturas nas práticas industriais, já elevação de alguns graus acima da temperatura ideal leva a mudanças conformacionais afetando sua funcionalidade. Portanto, as características de estabilidade térmica da enzima são dados importantes para avaliação da eficiência em aplicação biotecnológica (BASHIROVA et al., 2019; SAINI; AGGARWAL, 2019)

2.2.1 Endoglucanases

As endoglucanases ou endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam internamente e aleatoriamente as moléculas de celulose. Neste grupo destaca-se a enzima carboximetilcelulase (CMCase), que atua no meio da cadeia nas ligações internas da região amorfa, criando

extremidades não redutoras e redutoras, para posterior ação das exoglucanases. Tendo como produto final celooligossacarídeos, celobiose e glicose (BASHIROVA et al., 2019; ONI; OKE; SANI, 2020)

2.2.2 Exoglucanases

As exoglucanases ou exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91) fazem a hidrólise do polímero a partir das extremidades, liberando moléculas de celobiose na solução. Entre as mais eficientes exoglucanases estão as celobiohidrolases (CBHs), com nome sistemático β -1,4-D-glucana-celobiohidrolase. Elas agem essencialmente nos processos de decomposição, sendo divididas em: celobiohidrolase tipo I (EC 3.2.1.176) (CBH I), que cliva as regiões terminais redutoras; e a do tipo II (EC 3.2.1.4) (CBH II), que cliva as regiões terminais não redutoras (BARBOSA, 2019; SORENSEN et al., 2015)

Outra importante exoglucanase é a exoglicohidrolase (EC 3.2.1.74), com nome sistemático β -1,4-D-glicana-glicobiohidrolase (GH). Que promove uma degradação da fibra celulósica liberando glicose diretamente do polímero. Tanto as celobiohidrolases quando as exoglicohidrolases sofrem inibição pelo produto da hidrólise (celobiose e glicose, respectivamente) (MENEZES; BARRETO, 2015).

2.2.3 β -glicosidase

A β -glicosidase (EC 3.2.1.21) é uma enzima específica para a celobiose, tendo como produto final a glicose. Ela atua minimizando a ação inibitória que a presença de celobiose exerce sobre as atividades de endo e exoglucanases (SILVA, 2016).

2.3 Actinomicetos

Actinomicetos são bactérias gram positivas, principalmente aeróbicas, que se caracterizam por alta quantidade das bases nitrogenadas guanina e citosina em seu genoma (69-73%). São filamentosas como os fungos e possuem hifas aéreas verdadeiras. São formadoras de esporos e saprófitas. Eles formam uma população estável e persistente em diversos ecossistemas, e são considerados uma importante fonte de produtos com importância médica, industrial e econômica. São conhecidas pela ampla capacidade de produção de compostos bioativos,

incluindo enzimas com inúmeras possibilidades de aplicações biotecnológicas (ABDEL-AZIZ et al., 2019; BALACHANDAR et al., 2018; NABILA; KANNABIRAN, 2018).

Dentre os actinomicetos com alta capacidade para a produção destes compostos está o gênero *Streptomyces*, que faz parte da família *Streptomycetaceae*, possuindo mais de 500 espécies já descritas. As estirpes de *Streptomyces* pertencem as bactérias filamentosas microscópicas mais disseminadas no ambiente podendo ser encontradas em ambientes marinhos e terrestres. *Streptomyces* se caracterizam por colônias de tamanho pequeno, inicialmente lisas, com hifas vegetativas, micélio aéreo e ramificado, raramente fragmentado, os esporos não possuem motilidade (Figura 4). A temperatura ideal para seu crescimento varia de 25°C a 37°C, e o pH entre 6,5-8,0 (ABDEL-AZIZ et al., 2019; BERGEY' et al., 1984; SAHMOUNE, 2018).

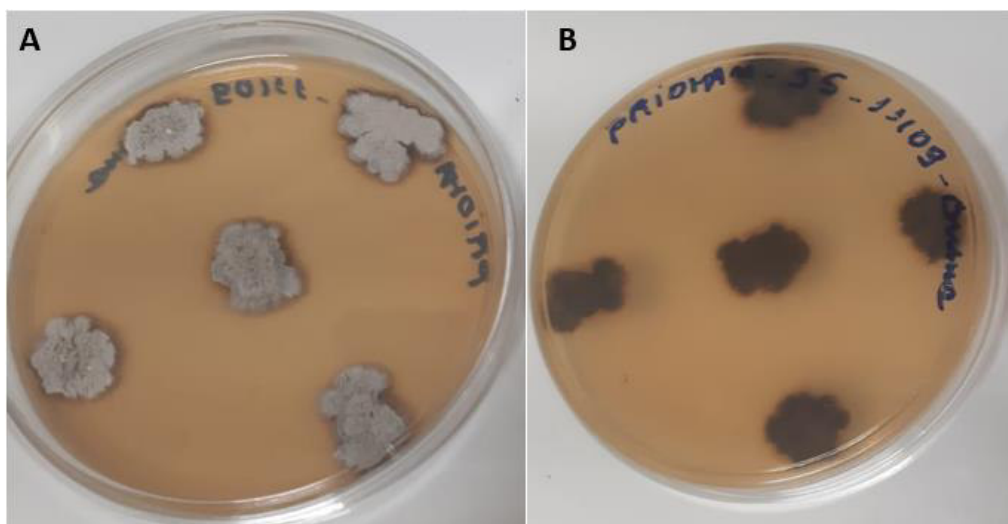


Figura 4. Colônias de *Streptomyces* sp. S5. A: Colônias de *Streptomyces* sp. S5. B: Micélio vegetativo. Fonte: Foto registrada no Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética.

Diversas aplicações biotecnológicas de *Streptomyces* têm sido relatadas. Devido seu potencial para produção de antibióticos, fitohormônios e diferentes metabólitos secundários. Esses compostos apresentam importante atividade biológica, devido a isso, espécies de *Streptomyces* têm sido estudadas para aplicações nas indústrias de alimentos e bebidas, farmacêutica e de papel e celulose (LI et al., 2018; PHUENGMAUNG et al., 2017).

Esse microrganismo também é conhecido por secretar uma vasta gama de enzimas extracelulares importantes em processos industriais, por serem tolerantes a amplas faixas de pH e temperaturas. Sendo as principais delas: celulase, xilanase, quitinase, amilase, pectinase, protease e lipase. Essas enzimas degradam vários biopolímeros na natureza e os *Streptomyces*

podem incorporar esses substratos como nutrientes e metabolizar várias fontes de carbono (LI, et al., 2018).

2.4 Fermentação Submersa

A fermentação é um processo de conversão biológica de substratos através de microrganismos, seja bactérias ou fungos. Durante esse processo são gerados produtos adicionais denominados de metabólitos secundários. A fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES) são as principais metodologias de cultivo de microrganismos, utilizadas frequentemente para produção de enzimas lignocelulolíticas, e outras, como lipases, invertases e esterases. (GMOSER et al., 2019).

A FES se dá pelo cultivo do microrganismo em meio contendo substrato sólido, com baixa ou nenhuma quantidade de água livre. Assim, permite a utilização de diferentes fontes de substratos sólidos para posterior bioconversão, no entanto, exige maior tempo para a fermentação (ABDEL-AZIZ et al., 2019).

Já a FSm se dá pelo crescimento do microrganismo como suspensão em meio líquido, contendo nutrientes solúveis ou com excesso de água. Esse método proporciona uma melhor transferência de calor, permite que o microrganismo permaneça submerso e uniformemente distribuído, favorecendo assim a absorção de nutrientes. Os substratos são utilizados rapidamente, devido a isso necessitam constantemente serem suplementados com nutrientes (ABDEL-AZIZ et al., 2019; GARCIA; LIMA; COURI, 2019; GMOSER et al., 2019).

A FSm é o método mais adequado para cultivo de microrganismos como bactérias, que requerem alto teor de umidade, além de proporcionar maior facilidade na etapa de purificação dos produtos. É a técnica mais viável em escala industrial, devido ao rápido processo de fermentação e maior facilidade no aumento de escala. Mais de 75% das enzimas industriais são produzidas por FSm. (GULLO; VERZELLONI; CANONICO, 2014).

O principal obstáculo na produção de celulasas é seu alto custo de produção. Isso se deve, principalmente, ao tipo e fonte de substrato utilizado na sua produção, e a lenta taxa de crescimento de fungos. Uma alternativa eficaz é substituir a celulose por substratos relativamente mais baratos, como não-celulósicos. Além de utilizar como microrganismos as bactérias, que possuem taxa de crescimento alta, em relação aos fungos. As celulasas

produzidas por bactérias são catalisadores frequentemente mais eficazes, com taxa de inibição menor na presença do material já hidrolisado (ORJI et al., 2016).

2.5 Enzimas na panificação

O pão é um dos alimentos preparados mais antigos, e têm sido fonte básica de nutrientes a milhares de anos. O trigo é o cereal mais importante na panificação e é constituído por três partes principais: endosperma, farelo e gérmen (Figura 5) (REZZETTI; ROSELL, 2015).

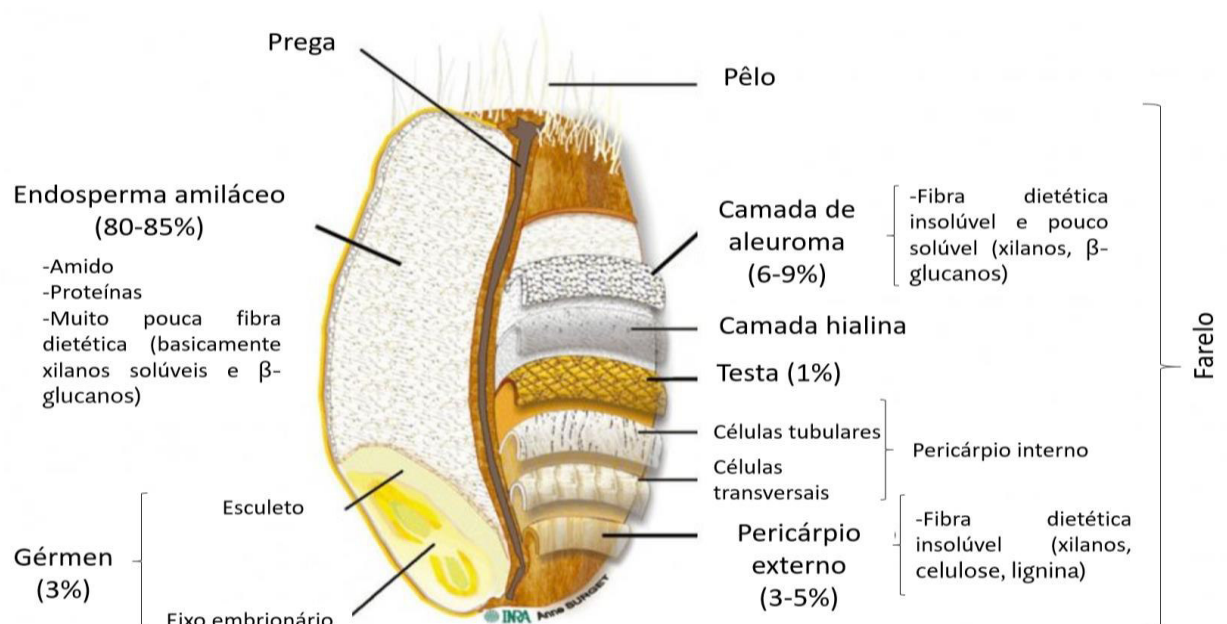


Figura 5. Estrutura e composição do grão de trigo.
Fonte: Adaptado de (ONIFE; JIDEANI; BESWA, 2015)

A maioria dos produtos à base desse cereal, como os pães, são tradicionalmente preparados a partir da farinha refinada, onde há remoção do farelo e do gérmen, que possuem grandes quantidades de fibras e compostos bioativos. Contendo somente o endosperma amiláceo central do trigo, com um pouco de material residual da camada externa (aleurona e pericarpo) (CANKURTARAN; BILGIC, 2019).

O polissacarídeo em maior quantidade na parede do endosperma do trigo é o arabinoxilano (AX), que pode ser dividido em frações solúveis em água (WE-AX), e, insolúveis com água (WU-AX). Seguido por glucanos de ligação mista (MLG) e uma menor quantidade de celulose

(cerca de <5%), que é um constituinte significativo da parede celular do endosperma do trigo, responsável pela integridade estrutural. Apresenta baixo nível de reticulação de ácido ferúlico, que se encontra ligado ao éster na posição C-5 da arabinose do trigo. Segundo modelo estrutural proposto por Gartaula *et al.*, 2018, a parede do endosperma do trigo possui celulose, xilanos e mananos formando a estrutura do núcleo fibroso e os arabinoxilanos e glucanos de ligação mista se associam ao núcleo, formando a estrutura da parede celular do endosperma do trigo (Figura 6) (GARTAULA *et al.*, 2018).

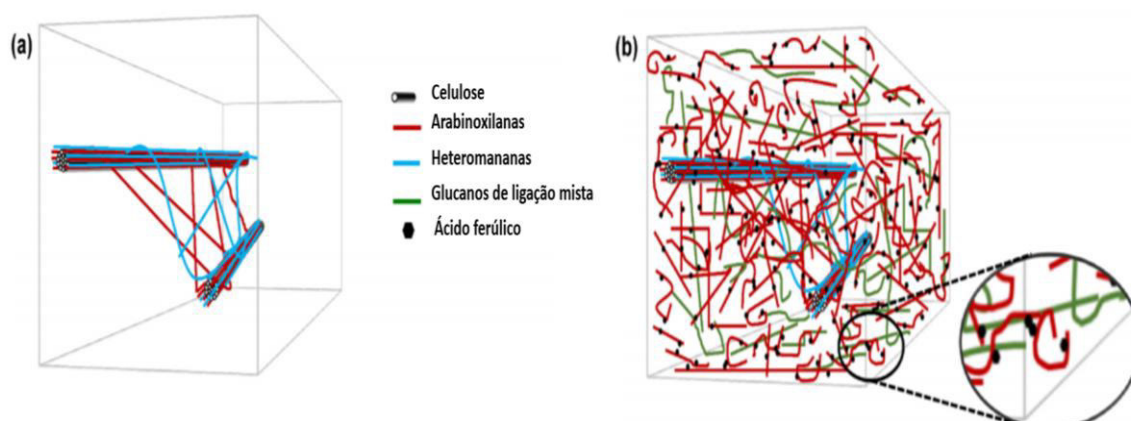


Figura 6. Organização estrutural da parede celular do endosperma do trigo. A) Núcleo composto de celulose, xilanos e heteromananas. B) Núcleo coberto por rede emaranhada de MLG, AX e ácido ferúlico. Fonte: Adaptado de (GARTAULA *et al.*, 2018)

Os produtos de panificação também podem ser preparados com farinha de trigo integral, que contém todos os componentes anatômicos do grão; o endosperma, farelo e gérmen, que fornece mais proteínas, fibra e nutrientes como minerais e fitoquímicos. A presença do farelo e do gérmen, podem proporcionar efeitos adversos nas propriedades da massa dos produtos de panificação com grãos integrais, como a redução do volume, modificações de textura, aparência e sabor. Para minimizar esses efeitos, a indústria de alimentos usa alternativas como a aplicação de técnicas variadas de moagem, uso de enzimas e de componentes de inativação enzimática do farelo e diferentes tratamentos térmicos do grão (BOITA *et al.*, 2016; GENG; HARNLY; CHEN, 2016).

As camadas externas do grão de trigo presentes na farinha de trigo integral possuem concentrações relevantes de celulose, lignina e arabinoxilanos insolúveis. Assim, a aplicação de enzimas específicas como as celulasas e xilanasas no processo de produção dos pães podem gerar alterações mais relevantes nas propriedades físico-químicas destes componentes, quando comparadas as alterações ocorrentes nos produtos com farinha de trigo refinada, afetando

positivamente o comportamento da massa e a qualidade dos produtos finais (YOUNG et al., 2019).

Devido à alta demanda pelos produtos de panificação, têm sido estudado formas de melhorar a qualidade do produto. Um exemplo, é a utilização de ácido ascórbico, visando melhorar o volume do pão e a estrutura do miolo; além das dextrinas, que melhoram as propriedades da massa e a qualidade do produto final; e dos agentes emulsificantes que auxiliam no manuseio, melhoram o volume do produto e a estrutura das migalhas. Uma das alternativas mais utilizadas nos últimos anos têm sido a aplicação de enzimas no processo de panificação, visando a melhoria das propriedades físico-químicas e sensoriais do pão (UNAL; ALTINEL, 2017)

As enzimas são utilizadas de forma ampla em diversos seguimentos industriais, por promoverem alterações químicas frente à diversos substratos. As celulases desempenham importante papel nessa utilização. O processamento enzimático é uma ferramenta sustentável e específica de bioprocessamento. Que proporciona produtos naturais, com baixo teor de componentes químicos e com propriedades sensoriais atraentes, além disso, as enzimas não permanecem ativas no produto final (KHOSHNEVISAN et al., 2017; RENZETTI; ROSELL, 2015).

No ano de 1970 iniciou-se a aplicação de enzimas na indústria de panificação, uso este que vem aumentando com o passar dos anos. Dentre as enzimas, incluem as amilases, celulases e xilanases, que atuam gerando aumento no volume do pão, melhorando a estrutura do miolo e promovendo maior vida útil. As enzimas são utilizadas como auxiliares, e adicionadas a farinha durante o processo (ELMS et al., 2003; MOURA; NOGUEIRA; STEEL, 2016).

Entre as enzimas utilizadas estão as oxidativas; como a glicose oxidase e lacase, que agem promovendo ligações dissulfeto nas proteínas do glúten e geleificação de arabinoxilanos ferulilados, alterando positivamente a reologia da massa; As transglutaminases, que promovem a reticulação de proteínas melhorando a rede do glúten; E as lipases, que melhoram a reologia da massa através da hidrólise dos lipídios da farinha de trigo, liberando ácidos graxos com boas propriedades emulsificantes. Levando a uma ligação lipídica com as proteínas do glúten, estabilizando a rede; As hemicelulases, que hidrolisam os pentosanos; E as celulases, que hidrolisam carboidratos complexos da parede celular, promovendo melhorias nas propriedades de manuseio da massa e na qualidade final do pão (BUENO et al., 2016; LI et al., 2019; UNAL; ALTINEL, 2017).

Entre as hemicelulases, as endoxilanases e β -xilosidases são as principais enzimas atuantes na hidrólise do xilano, componente principal da hemicelulose. As xilanases hidrolisam os

arabinoxilanos insolúveis, que são prejudiciais à panificação, aumentando os arabinoxilanos solúveis, que possuem impacto positivo no volume do pão. Assim, a xilanase aplicada na panificação resulta no aumento do volume, redução da viscosidade e endurecimento, e maior vida útil. Podendo substituir o uso de emulsificantes e aditivos usados na fabricação do pão, e possui vantagem de ser inativada pelo processo de cozimento (AHMED et al., 2016; LIU et al., 2017; UNAL, 2017).

A celulase age catalisando a hidrólise das ligações β -1,4-d-glicosídicas da celulose presente, e outros β -glucanos. Gerando como produtos a glicose, celobiose e outros polímeros de glicose. Assim, a celulase cliva a rede da parede celular produzindo carboidratos de baixa massa molecular, além da atuação da celulase expor os AX parcialmente ligados a celulose, possibilitando a ação das endoxilanas. As celulasas possuem maior relevância na aplicação em pães com grãos integrais, já que estes possuem uma maior quantidade de celulose do que os grãos refinados. (ROETS et al., 2015; TEBBEN; SHEN; LI, 2018; YOUNG et al., 2019).

As informações sobre a aplicação da celulase na panificação ainda são escassas, devido seu mecanismo de ação específico. Mas sabe-se que a adição do complexo celulolítico na massa do pão resulta na diminuição da dureza, proporcionando uma migalha macia, retrogradação lenta do amido e melhor qualidade sensorial. Para que a ação das enzimas hidrolíticas gere efeitos benéficos nas propriedades reológicas e sensoriais do pão, é necessário que atuem de forma eficiente durante o desenvolvimento da massa e que sejam estáveis a altas temperaturas, permitindo a ação sobre o substrato durante a primeira fase do cozimento (LIU et al., 2017; ROETS et al., 2015; WANG et al., 2018a).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar e purificar celulase e xilanase produzidas por *Streptomyces* sp. S5, utilizando a técnica de fermentação submersa. Avaliar a aplicação na produção de pães de farinha de trigo refinada e integral.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar o isolado de *Streptomyces* sp. S5 em fermentação submersa.
- Obter extrato parcialmente purificado através dos processos de Ultrafiltração e Cromatografia.
- Caracterizar parcialmente a celulase quanto aos aspectos bioquímicos tais como pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade térmica, ação de inibidores, perfil eletroforético e zimografia.
- Aplicar a enzima obtida na formulação de pão de farinha de trigo refinada e integral
- Avaliar a influência da aplicação da enzima nas propriedades de volume específico, textura e cor dos pães produzidos.

4. METODOLOGIA

4.1 Linhagem da bactéria

Para a realização da fermentação foi utilizada a linhagem da bactéria *Streptomyces* sp. S5. Isolada do solo, pertencente ao banco de bactérias do Laboratório de Bioquímica e Engenharia genética, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

4.2 Fermentação Submersa

A partir de placa já cultivada com *Streptomyces* sp. S5, foram realizados repiques da cepa selecionada retirando os esporos com auxílio de palito de madeira. Que foram distribuídos para formação de cinco colônias em placas contendo meio de cultivo Pridham (extrato de levedura - 4,0 g/L; extrato de malte - 10 g/L; Glicose – 4 g/L; ágar - 20 g/L; água destilada; pH 7.3) (PRIDHAM; GOTTLIEB, 1948). As placas foram incubadas em estufa a 37° C por quatro dias.

Para a realização da fermentação submersa foi utilizado meio Pridham líquido. Contendo Extrato de Levedura – 4 g/L; Extrato de Malte – 10 g/L; Glicose – 4 g/L; água destilada, em pH 7.3. Em frascos Erlenmeyer (500 mL) foram adicionados 300 mL do meio.

Foram colocados 10 mL de água destilada autoclavada na placa contendo o repique de *Streptomyces* sp. S5, os esporos foram soltos com auxílio de alça de vidro. Foi coletada uma suspensão de esporos, a qual foi ajustada para 10^6 / mL (concentração determinada por contagem em Câmara de Neubauer) e adicionada ao frasco Erlenmeyer contendo meio Pridham líquido.

Os frascos foram mantidos em estufa a 37° C, sob agitação de 80 rpm durante 6 dias. Após esse período, os frascos foram retirados da incubação. E o extrato de cultura foi centrifugado a 15.000 rpm, por 15 minutos repetidas vezes. Para que fosse obtido um extrato livre de células, que foi denominado extrato bruto (EB), e armazenado a 4°C para posterior análise e utilização.

4.3 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas

Todas as atividades foram realizadas em triplicata. A quantidade de açúcares redutores liberados após a atividade enzimática foi determinada utilizando o ácido dinitrosalicílico (ADNS) (MILLER, 1959). Para cálculo da atividade de CMCase utilizou-se curva padrão de glicose. Para cálculo da atividade de xilanase foi utilizada curva padrão de xilose. As leituras das absorbâncias da curva foram utilizadas para compor um gráfico, obtendo a equação da reta e utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

4.3.1 Determinação da atividade de celulase (CMCase)

A atividade de celulase foi testada por meio da atividade de CMCase, utilizando como substrato CMC (Carboximetilcelulose). Através de micro ensaio conforme metodologia adaptada de Ramada *et al* (2010).

Em placa de micro ensaio foram adicionados 50 μ L de CMC 1% diluído em tampão citrato de sódio pH 4.8, e 50 μ L de amostra (extrato enzimático). Para o branco foram adicionados apenas 50 μ L de CMC. A placa foi incubada por 1 hora a 50° C em termociclador (Biorad). Em seguida, foram adicionados 50 μ L de amostra no branco, e 100 μ L de ADNS em todos os poços, e a mistura foi aquecida a 100° C por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorbância de 540 nm. Foi determinada que uma unidade de atividade (U) corresponde a 1 μ M de glicose liberada por minuto.

Após a determinação da temperatura ótima e pH ótimo para atividade de CMCase, no extrato parcialmente purificado, os ensaios de atividade para CMCase foram realizados nas condições: CMC 1% diluído em tampão acetato de sódio pH 5.5, e a placa foi inicialmente incubada por 1 hora a 55° C.

4.3.2 Determinação da atividade de xilanase

A dosagem de atividade da xilanase foi determinada por micro ensaio. Utilizando como substrato a solução de xilana “bechwood” (Sigma) a 1% diluída em tampão citrato de sódio pH 4.8. Foram adicionados 10 μ L de amostra (extrato enzimático), e 90 μ L da solução de xilana 1%. E a placa foi incubada a 50° C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 100 μ L de ADNS, e as amostras foram aquecidas a 100° C por 5 minutos. E realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro com a 540 nm. Foi determinado que uma unidade de atividade (U) corresponde a 1 μ M de xilose liberada por minuto.

4.3.3 Determinação da concentração de proteínas

A quantificação de proteínas foi estimada pelo método de Bradford (1976). Utilizando albumina de soro bovino para curva padrão. Foram adicionadas em placa de micro ensaio 10 µL de amostra (extrato enzimático), e 100 µL do reagente de Bradford (0,1 g/L de corante Comassie Brilliant Blue G-250, 0,6 mol/L de ácido fosfórico, e, 0,8 mol/L de etanol). A leitura foi realizada em espectrofotômetro na faixa de 595 nm

4.4 Purificação da enzima Celulase

A purificação parcial das celulasas presentes no extrato bruto de cultivo (EB) iniciou-se pela técnica de ultrafiltração (Ultracel). Utilizando membrana de peso molecular de 10 kDa. O material obtido foi concentrado por liofilização, sendo ressuspenso em água destilada.

Em seguida, o material foi aplicado em coluna de cromatografia de gel filtração, Sephacryl S-100. A coluna foi previamente equilibrada, seguido de eluição com tampão Tris HCL 20 mM, pH 10,0, com fluxo constante de 0,7 mL/min. Foi realizado controle de temperatura com água circulante a 15° C através da camisa da coluna. As frações eluídas (1,5 mL cada fração) foram coletadas por coletor automático.

A presença da celulase foi detectada por ensaio enzimático das frações coletadas. As frações que apresentaram atividade enzimática para CMCase foram separadas, e liofilizadas. Após liofilização foram ressuspensas em água destilada, originando o extrato parcialmente purificado.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-Page)

A elaboração do gel de poliacrilamida foi realizada conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). Utilizando gel de concentração a 2% e gel de separação a 12%. As amostras utilizadas foram inicialmente precipitadas com Acetona P.A gelada (1:2) *overnight*. Em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em tampão de amostra contendo: Tris HCL – 100 mM; SDS 4%; Azul de bromofenol 0,2%; Glicerol 20%; mercaptoetanol 10%. Em seguida, a amostra foi fervida por 5 minutos.

As amostras preparadas foram aplicadas no gel, sendo utilizada uma voltagem 100 V, por aproximadamente 2 horas, o gel foi corado por meio de coloração de prata. Onde o gel foi fixado com solução de ácido acético a 7,5% por 30 minutos. Em seguida, foi lavado 3 vezes por 5 minutos com água destilada, e mergulhado em solução contendo AgNO_3 (1,5 g/L) e formaldeído (0,056%) por 30 minutos. O gel foi novamente lavado com água destilada, e feita a revelação com solução contendo Na_3CO_3 (30 g/L), formaldeído (0,056%) e tiosulfato de sódio (400 mg/L). A revelação foi interrompida com imersão do gel em solução fixadora de 7,5% de ácido acético gelado durante 5 minutos. Posteriormente o gel foi escaneado utilizando o scanner Gel Doc Ez Imager, da Biorad. A massa molecular de cada banda foi analisada de acordo com o marcador BLUeye Prestained Protein Ladder (10 a 245 kDa).

4.6 Zimografia

O zimograma para determinação da atividade de celulase e xilanase foi realizado de acordo com metodologia descrita por Blum et al. (1999). A amostra foi preparada com precipitação em Acetona P.A gelada (1:2) *overnight*. Em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão em tampão de amostra contendo: Tris HCL – 100 mM; SDS 4%; Azul de bromofenol 0,2%; Glicerol 20%. Em seguida, a amostra foi fervida por 5 minutos, e aplicada em gel de SDS-Page. Para atividade de CMCase adicionou-se ao gel 0,2% de CMC (Sigma), para atividade de xilanase, 0,1% de xilana bechwood (Sigma).

Após a corrida de eletroforese, o gel foi incubado por 1 hora em solução Triton X-100 1%, lavado com água destilada. Para atividade de CMCase o gel foi incubado em tampão de renaturação (fosfato de sódio 50 mM pH 6.0) *overnight*, sob refrigeração. E por 2 horas para a atividade de xilanase. Após este período o tampão foi substituído e incubado novamente por 2 horas a 50° C. Em seguida o gel foi submerso em solução vermelho congo 0,1% por 20 minutos, e então lavado com NaCl 1 M até a visualização dos halos correspondentes a atividade enzimática.

4.7 Caracterização bioquímica da celulase

A partir do extrato parcialmente purificado foi realizada a caracterização da enzima CMCase. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A influência do pH sobre a atividade de CMCase foi avaliada por meio de ensaio enzimático nas faixas de pH de 3.0 a 9.0, com variação de 0.5. A concentração iônica dos tampões utilizados foi de 0,05 mol/L. Sendo os tampões: citrato de sódio (pH 3.0 a 4.5), acetato de sódio (pH 5.0 a 6.5), fosfato de sódio (pH 7.0 a 7.5) e Tris-HCL (pH 8.0 a 9.0).

A influência da temperatura sobre a atividade de CMCase também foi avaliada. Realizando ensaio da atividade enzimática nas condições de temperatura entre 30° C a 80° C, com variação de 5° C.

A análise de termoestabilidade enzimática foi realizada incubando previamente a amostra nas temperaturas de 50° C, 60° C e 70° C. Pelos períodos de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. Nos períodos estabelecidos foram retirados alíquotas e determinadas as atividades por meio de ensaio enzimático.

Também foi avaliada a influência de íons metálicos sobre a atividade de CMCase. Onde foi realizado ensaio enzimático na presença de 10 µL de solução (5 mM) dos íons (CaCl₂, BaCl₂, HgCl₂, MgCl₂, NaCl, KCl, MnSO₄, ZnSO₄, FeSO₄), β-mercaptoetanol e SDS.

4.8 Formulação dos pães

Os pães foram elaborados no Laboratório de Panificação da Faculdade Araguaia, localizada na cidade de Goiânia, Goiás. A formulação do pão foi estabelecida a partir de testes preliminares baseando as porcentagens (%) em relação ao peso da farinha. A formulação está apresentada na Tabela 1. Sendo, 100% farinha de trigo refinada (pão de farinha de trigo refinada) ou farinha de trigo integral (pão de farinha de trigo integral); 60% água; 4% de açúcar; 3% gordura vegetal hidrogenada; 2% de fermento biológico, 1,5% de sal (OLIVEIRA, 2010). Os pães foram adicionados de enzima celulase do extrato parcialmente purificado nas concentrações de 2,5; 5; 7,5 e 15 U/100 g de farinha.

Tabela 1. Formulação dos pães.

Formulação dos pães		
Ingredientes	Pão de farinha de trigo refinada	Pão de farinha de trigo integral
Farinha de trigo refinada	100%	-
Farinha de trigo integral	-	100%
Água	60%	60%
Açúcar	4%	4%
Gordura vegetal	3%	3%
Fermento biológico	2%	2%
Sal	1,5%	1,5%
Celulase (CMCase)	0 - 2,5 - 5 - 7,5 - 15 U/100 g de farinha	0 - 2,5 - 5 - 7,5 - 15 U/100 g de farinha

Porcentagens (%) em relação ao peso da farinha.

A enzima foi dissolvida na água utilizada na produção dos pães, para garantir amplo acesso em toda a massa durante o processo de mistura. A farinha, o açúcar, a gordura vegetal e parte da água foram adicionadas e misturadas por 1 minuto em batedeira planetária (Cadence Orbital Eletronic). O restante da água com o fermento foi adicionado e misturado por mais 1 minuto. Por último, o sal foi adicionado a massa, a qual foi misturada por 15 minutos para o desenvolvimento da rede do glúten.

A massa descansou por 10 minutos e foi dividida em porções de 100 g. Em seguida, foi colocada em formas de alumínio e submetida a fermentação por 40 minutos, em câmara de fermentação, em temperatura de 35° C e 85% de umidade. Após a fermentação, os pães foram assados em forno Prática Technipan a 180° C por 20 minutos. Em seguida foram esfriados por 2 horas a temperatura ambiente (25° C +/-2° C), e embalados com sacos plásticos de polietileno (ALMEIDA et al., 2017).

4.9 Caracterização dos pães

Os pães produzidos foram submetidos a caracterização, por meio da avaliação de volume específico, análise de textura e análise de cor.

4.9.1 Volume específico

Para a análise de volume específico, os pães foram pesados em balança analítica. Em seguida, o volume de cada pão foi determinado através do deslocamento de sementes de painço, de acordo com método descrito por Mohammadi et al., (2015). O cálculo do volume específico foi realizado através da razão entre o volume e a massa dos pães, conforme equação 1.

$$VE = \frac{v}{p} \quad (1)$$

Onde: VE: volume específico; v: volume (mL); p: peso (g)

4.9.2 Análise de Textura

A análise de textura dos pães foi realizada utilizando texturômetro TA.HD Plus Texture Analyser. Considerando os atributos de dureza, elasticidade, coesão e mastigabilidade. Por meio dos seguintes parâmetros: probe cilíndrica 20 mm de diâmetro, força de gatilho (*tigger force*) de 10 g, velocidade pré-teste de 20 mm/s, velocidade teste de 10 mm/s, velocidade pós teste de 10 mm/s. Foram utilizadas fatias de 20 mm de espessura.

4.9.3 Análise de Cor

As análises de cor dos pães foram realizadas utilizando colorímetro Baking Meter BC-10, de acordo com o sistema CIE $L^*a^*b^*$. Os resultados foram expressos em: valores de L^* (luminosidade ou brilho), que variam do preto (0) ao branco (100); valores de a^* , que variam do verde (-60) ao vermelho (+60); e valores de b^* , que variam do azul (-60) ao amarelo (+60). As leituras do parâmetro L^* , a^* e b^* permitiram calcular o ângulo Hue (tonalidade ou matriz)

e o Croma (saturação ou intensidade da cor). O ângulo Hue foi calculado pela Equação 2 e Croma por meio da Equação 3.

$$C^* = (a^*)^2 + (b^*)^2 \quad (2)$$

$$H = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) [graus] \quad (3)$$

4.10 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados utilizando software *Statistica 10.0*. Foi realizado análise de variância unidirecional (ANOVA), e teste de Tukey aplicado com nível de significância de $p < 0,05$. Os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições. Os valores foram relatados como médias e desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de enzima por *Streptomyces* sp. S5 em FSm

Streptomyces sp. S5 foi cultivado em fermentação submersa para produção de enzimas e foi obtido o extrato bruto de cultivo, que apresentou concentração de proteínas de 0,126 mg/mL. A produção enzimática foi avaliada por medição da atividade de CMCase e xilanase no EB após o período de cultivo. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2. *Streptomyces* sp. S5 demonstrou capacidade em produzir enzima celulase, apresentando atividade enzimática de 15,11 U/mL para CMCase e atividade de 411 U/mL para enzima xilanase.

O meio de cultivo utilizado neste trabalho continha glicose em sua composição. É comprovado que a produção de enzimas lignocelulolíticas são inibidas pela presença do produto final (glicose). No presente estudo, apesar da presença de glicose no meio de cultivo houve a produção de celulases. Outros estudos mostraram que diferentes isolados de *Streptomyces* produzem eficazmente endoglucanases em meio contendo glicose. Aparentemente os genes de celulases são expressos constitutivamente, podendo ainda estar presentes em operons sobre outra forma de regulação (CHELLAPANDI; JANI, 2008; LIM et al., 2016).

Tabela 2. Enzimas presentes no EB de cultivo de *Streptomyces* sp. S5 cultivado em FSm.

Enzimas produzidas por <i>Streptomyces</i> sp. S5 presentes no EB de cultivo em FSm	
Enzima	Atividade (U/mL)
CMCase	15,11±0,09
Xilanase	411±0,07

Valores expressos em média e desvio padrão (±)

5.2 Purificação parcial

O extrato de cultivo de *Streptomyces* sp. S5 em FSm foi submetido a diferentes etapas de purificação. Após a cromatografia de gel filtração com coluna Sephacryl S-100, as frações eluídas que apresentaram atividade para CMCase foram colhidas (Figura 7), obtendo assim o extrato parcialmente purificado. O qual apresentou concentração de 0,072 mg/mL de proteínas, 20,38 U/mL de atividade de CMCase e 371 U/mL de atividade de xilanase.

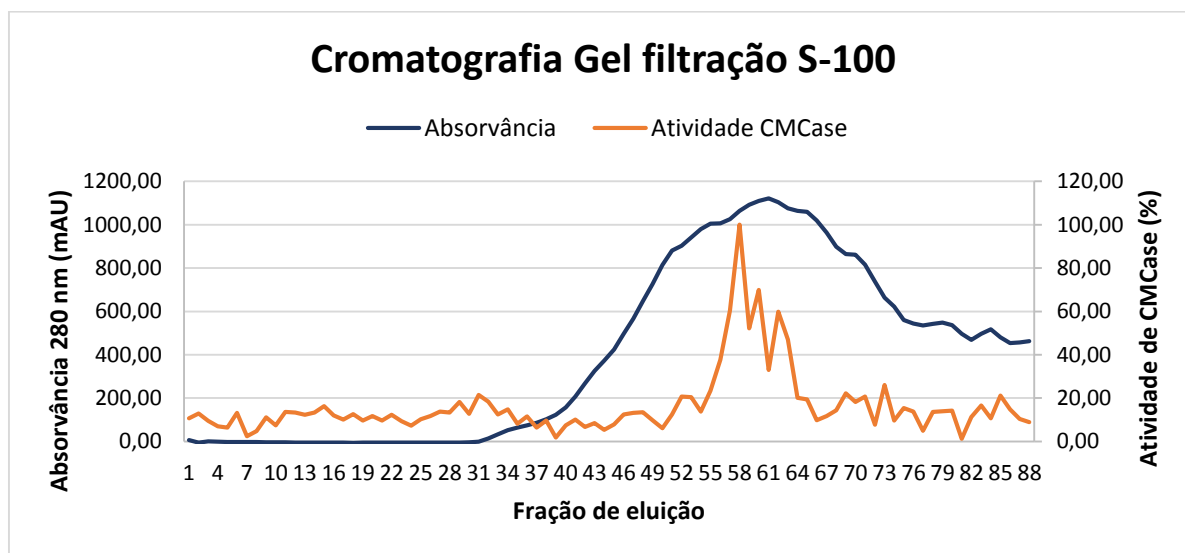


Figura 7. Gráfico cromatografia gel filtração Sephacryl S-100.

A purificação parcial da enzima celulase está resumida na Tabela 3. O extrato bruto apresentou atividade específica de 119,92 U/mg. Durante as etapas de purificação foi observado um aumento gradual da atividade específica de celulase, até finalmente atingir 283,06 U/mg.

Tabela 3. Purificação parcial de celulase produzida por *Streptomyces* sp. S5 cultivado em FSm.

Etapas	Atividade (U/mL)	Atividade Total (U)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (vezes)	Recuperação (%)
Sobrenadante de cultura	15,11	4533,00	0,126	37,8	119,92	1	100
Ultrafiltração (Ultracel 10Kda)	24,42	1221,00	0,153	7,65	159,61	1,33	27

Cromatografia -Sephacryl S- 100	20,38	1019,00	0,072	3,6	283,06	2,36	22
--	-------	---------	-------	-----	--------	------	----

Após a concentração por Ultrafiltração (Ultracel 10kDa) houve aumento da atividade específica em 1,33 vezes, com 27% de recuperação da atividade de celulase. As frações obtidas por meio da cromatografia de gel filtração utilizando coluna Sephacryl S-100 apresentou a atividade específica de 283,06 U/mg. Assim, na preparação final obteve um aumento da atividade específica em aproximadamente 2,36 vezes, com taxa de recuperação da atividade de 22%.

Embora mais de 70% da proteína extraída da cultura tenha sido removida durante a purificação, a enzima teve sua atividade específica dobrada. A diminuição do rendimento pode ter sido ocasionada pela desnaturação da enzima durante os processos de purificação, devido aos diversos fatores de exposição. Sendo necessário otimização da técnica, visando a diminuição de fatores que influenciem a desnaturação da estrutura da enzima (BALA; SINGH, 2017).

No estudo de Yassien, Jiman-Fatam e Asfour (2014), a preparação final apresentou uma recuperação de 13,5% da atividade de celulase, com atividade específica para CMCase elevada em 38,5 vezes, utilizando diferentes métodos cromatográficos para a purificação da celulase produzida por *Streptomyces sp.* Já Kumar *et al* (2018) submeteram a enzima do extrato bruto a cromatografia de gel filtração, onde obtiveram nível máximo de purificação com rendimento de 72,8% e taxa de purificação de 3,7 vezes (KUMAR *et al.*, 2018; YASSIEN; JIMAN-FATANI; ASFOUR, 2014).

5.3 Perfil eletroforético e zimografia

O perfil eletroforético do EB está apresentado na Figura 8 (A1). A análise do gel de eletroforese revelou que várias proteínas foram secretadas por *Streptomyces sp.* S5 em fermentação submersa. Os actinomicetos produzem um sistema múltiplo de enzimas, sendo comum encontrar proteínas com massas moleculares variadas, como observado no perfil eletroforético do EB, que apresentou massas moleculares entre 15 e 75 kDa. No entanto, o perfil apresentada menor quantidade de proteínas do que comumente ocorre, o que se deve a presença

da glicose no meio de cultivo gerar uma regulação negativa na produção de proteínas pelo microrganismo (VINHA et al.; 2011).

Após as etapas de purificação obteve-se o extrato parcialmente purificado, e seu perfil eletroforético está apresentado na Figura 8 (A2). É observada a presença 3 bandas, com massa molecular de aproximadamente 30 kDa, 32 kDa e 60 kDa. Por meio de análise de zimograma foi identificado a presença de uma única banda com atividade para CMCase com aproximadamente 32 kDa (Figura 8 B), e a de 60 kDa corresponde a banda de atividade para xilanase (Figura 8 C). Não foi identificada em zimograma o correspondente a banda de 30 kDa.

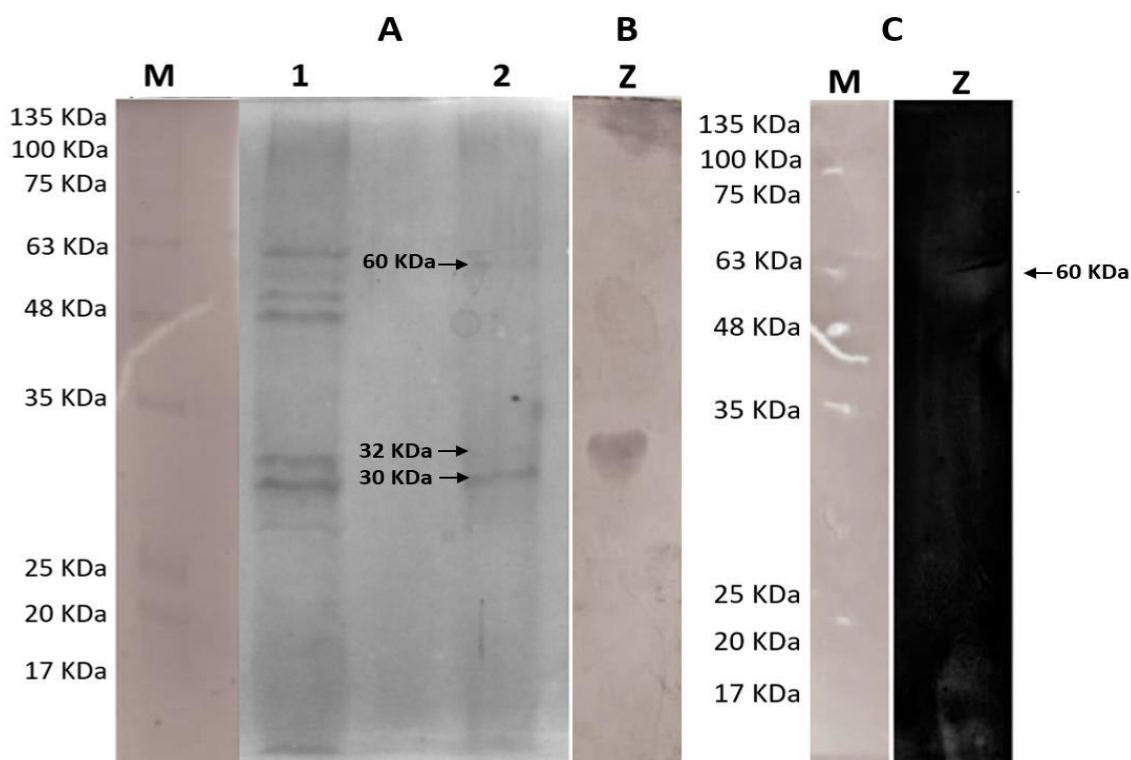


Figura 8. SDS-page 12% poliacrilamida, e Zimograma com extrato bruto e parcialmente purificado obtido do cultivo de *Streptomyces* sp. S5 em FSm. A: M: Marcador; 1: Extrato bruto (EB); 2: Extrato parcialmente purificado. B: Z: Zimograma para atividade de CMCase no extrato parcialmente purificado. C: M: Marcador; Z: Zimograma para atividade de Xilanase no extrato parcialmente purificado.

A análise do zimograma para celulase do extrato parcialmente purificado apresentou uma única banda de atividade, com massa molecular de aproximadamente 32 kDa, compatível com uma das bandas apresentadas no SDS-Page. A celulase produzida por cultivo de *Streptomyces* sp. S5 em fermentação submersa neste estudo, é compatível com a faixa de massa molecular da maioria das celulases expressas por *Streptomyces* sp., que variam entre 23 e 82 kDa. Esta é

também semelhante as celulasas produzidas por *S. reticuli*, que apresentou massa molecular de 36 kDa. Enquanto a produzida por *S. longispororuber* apresentou massa de 42 kDa. Nossa enzima possui massa molecular maior que as celulasas de 24-27 kDa de *S. ruber*, e menor que a celulase produzida por *S. viridobrunneus*, de 119 kDa (SALAMONI, 2005; YASSIEN; JIMAN-FATANI; ASFOUR, 2014)

No estudo de Brito-Cunha *et al* (2012) utilizando *Streptomyces thermocerradoensis* I3 em meio suplementado com farelo de trigo, foram observadas três bandas com massas moleculares estimadas de 17, 19 e 45 kDa. Pinheiro, Azevedo-Martins e Albano (2016) avaliaram as celulasas produzidas por *Streptomyces* sp., utilizando como meio de cultura o meio mínimo com bagaço de cana, e também identificaram 3 bandas com atividades para CMCase em zimograma (BRITO-CUNHA *et al.*, 2015; PINHEIRO; AZEVEDO-MARTINS; ALBANO, 2016)

Diferentemente dos estudos acima, em nosso trabalho foi identificada apenas uma banda com atividade para CMCase. Isto pode ser devido a presença de glicose no meio de cultivo, que levou a inibição de alguns genes responsáveis pela expressão celulolítica. A sequência do genoma do gênero *Streptomyces* inclui vários genes codificadores de celulasas e quando é cultivado em meio contendo glicose, pode ocorrer uma regulação negativa da degradação das fontes de carbono e biopolímeros, devido ao controle que a glicose exerce na atividade gênica catabólica do microrganismo (CHELLAPANDI; JANI, 2008).

A análise de zimograma para xilanase produzida por *Streptomyces* sp. S5 apresentou uma única banda correspondente a banda de massa molecular de 60 kDa presente no SDS-Page. Este dado está em concordância com os dados apresentados por Phuengmaung *et al*, 2017, onde a enzima xilanase produzida por *Streptomyces* sp. SWU10 apresentou massa molecular de 60 Kda, sendo indicada como uma proteína monomérica, como arabinofuranosidase ou xilosidade bifuncional. E compatível também com a xilanase produzida por *Streptomyces* sp. SG-13 (60 kDa), e diferente da produzida por *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 (45 kDa), e *Streptomyces rameus* L2001(21,1 kDa) (PHUENGMAUNG *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017).

Embora tenha sido constatado a presença de atividade para xilanase no extrato parcialmente purificado, a caracterização bioquímica e demais experimentos foram realizados somente avaliando a atividade para CMCase. Tal fato se deve a descontinuação da produção comercial de xilana beechwood, sem o substrato tornou-se difícil realizar os experimentos necessários.

5.4 Caracterização da CMCase parcialmente purificada.

5.4.1 pH e temperatura ótimos para atividade de CMCase

Foram avaliadas as influências de pH (3.0 a 10.0) e temperatura (30 a 80° C) sobre a atividade de CMCase. O gráfico da figura 9 mostra a influência do pH na atividade de CMCase. É possível observar melhor atuação da CMCase em pH 5.5, sendo este o valor ideal de pH para sua aplicação. E a manutenção de mais de 70% da atividade na faixa de pH entre 4.0 e 9.0.

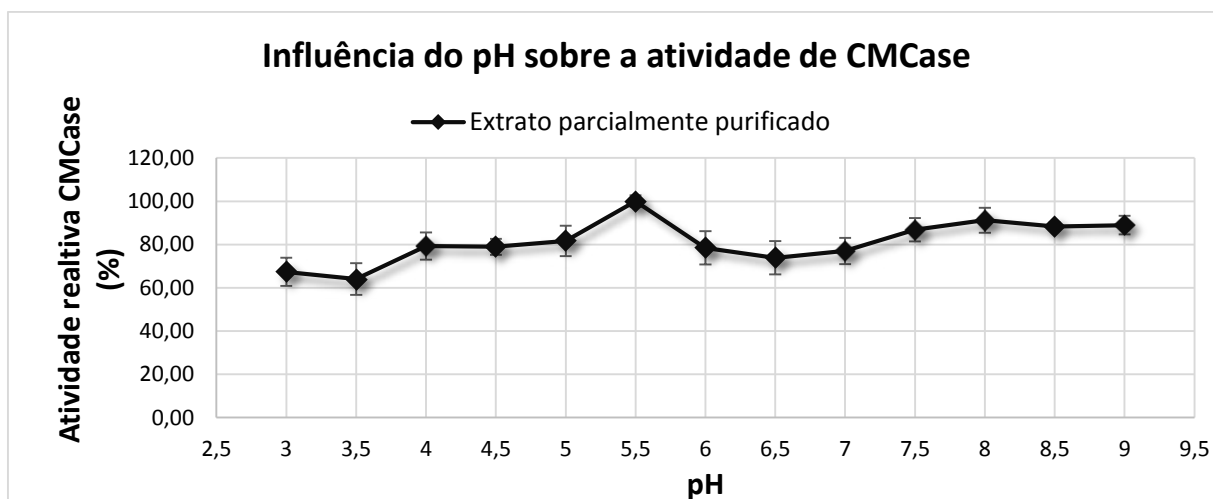


Figura 9. pH ótimo para atividade de CMCase (55° C) no extrato parcialmente purificado, produzida por *Streptomyces* sp. S5 cultivado em FSm. A concentração iônica para os tampões foi de 0,05 mol/L: citrato de sódio (pH 3.0 a 4.5), acetato de sódio (5.0 a 6.5), fosfato de sódio (pH 7.0 a 7.5), Tris-HCL (pH 8.0 a 9.0). Percentual de atividade expressa em relação a maior atividade.

Essa enzima é mais estável a essa faixa de pH do que a relatada por Gama *et al* (2019) produzida por *S. thermocerradoensis* I3, onde somente 60% da atividade foi mantida na faixa de pH entre 4.0 e 9.0 e apresentou pH ótimo de 6.0 (GAMA, et al., 2019). Apresentar estabilidade numa ampla faixa de pH é uma característica importante para uma enzima ser utilizadas em processos biotecnológicos. A notável atividade em ampla faixa de pH revela estabilidade em meios ácidos, tornando-a apropriada para aplicações alimentares, como na panificação (TRABELSI et al., 2019).

O gráfico da Figura 10 mostra a influência das diferentes temperaturas sobre a atividade da CMCase do extrato parcialmente purificado. A enzima demonstrou maior atividade na temperatura de 55°, seguido de segundo pico de atividade a 70°C. A atividade da enzima se manteve acima de 60% na faixa de temperatura de 40 a 55° C e entre 65° a 70° C. Outros estudos também revelaram dois ou mais picos de atividade para celulase em função da temperatura, sugerindo a presença múltiplas celulase com atividade ótima em temperaturas diferentes, que é comum em enzimas produzidas por actinomicetos (BRITO-CUNHA et al., 2015; VILELA, 2013).

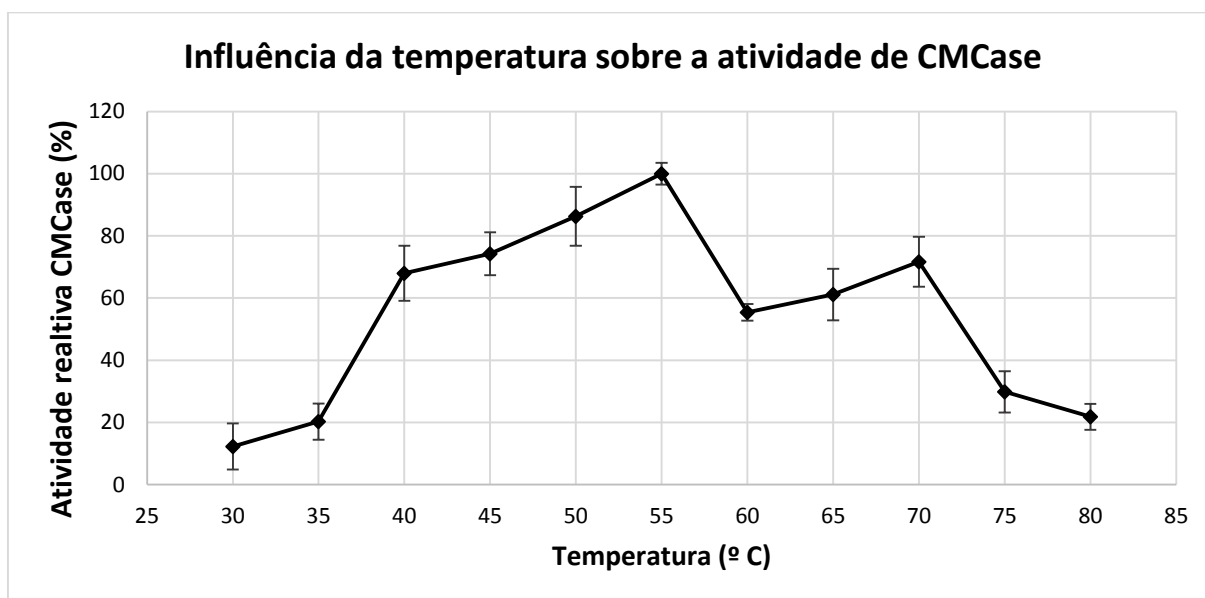


Figura 10. Temperatura ótima para atividade de CMCase (pH 5.5) no extrato parcialmente purificado, produzida por *Streptomyces* sp. S5 cultivado em FSm. As temperaturas variam de 30 a 80° C. Percentual de atividade expressa em relação a maior atividade.

A temperatura ótima da celulase produzida neste estudo é compatível ao obtido pela CMCase de Gama *et al* (2019), que também apresentou atividade ótima a 55°C. Ventorino *et al* (2016) avaliou os efeitos da endocelulase produzida pelas estirpes *S. argenteolus* AE58P, *S. argenteolus* AP51A, *S. argenteolus* AE710A e *S. argenteolus* AE82P na temperatura e pH ótimos. E a celulase produzida por todas as cepas demonstrou uma ótima atividade em pH 5.0 e temperatura de 50°C, valores estes próximos aos encontrados para melhor atividade em nosso estudo (GAMA et al., 2019; VENTORINO et al., 2016)

Para que a aplicação de enzimas em processos biotecnológicos seja viável, é necessário que elas atuem em ampla faixa de pH e temperatura, pois estes fatores levam a desnaturação e

inativação da enzima, tornando ineficiente sua ação na hidrólise, exigindo o uso de maior quantidade de enzima, e consequentemente elevando os custos. Assim, a utilização de enzimas estáveis a altas temperaturas e variados pH é vantajosa pela alta taxa de reação, aumento da viabilidade técnica e econômica dos processos de aplicação biotecnológica (BALA; SINGH, 2017).

5.4.2 Termoestabilidade enzimática de CMCase

A avaliação da termoestabilidade da CMCase do extrato parcialmente purificado está apresentada na Figura 11. Diferentes perfis foram obtidos em 50, 60 e 70° C.

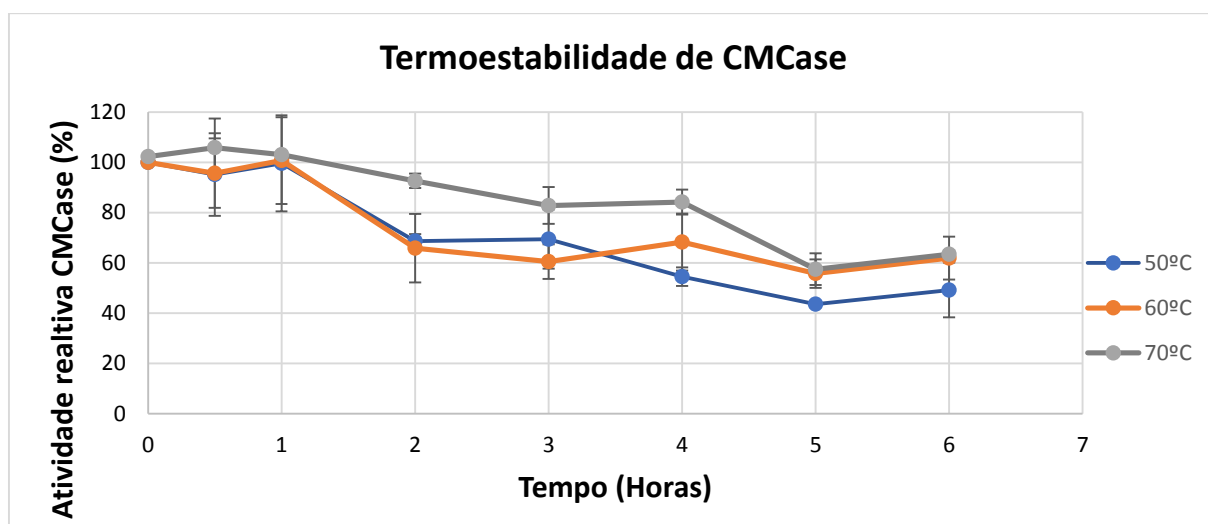


Figura 11. Termoestabilidade em 50, 60 e 70° C para atividade de CMCase, no extrato parcialmente purificado, produzida por *Streptomyces* sp. S5 cultivado em FSm. Percentual de atividade expressa em relação a atividade inicial (100%).

Em 50° C a enzima manteve mais de 60% da sua atividade até a terceira hora de incubação. Em 60° C a atividade se manteve acima de 90% até a primeira hora de incubação, depois se manteve acima de 60% nos demais períodos, exceto na quinta hora. Já em 70° C a enzima apresentou aumento da atividade em relação a inicial até a primeira hora. Houve diminuição da atividade nas horas posteriores, que se mantiveram acima de 80% no período de 2 a 4 horas de incubação.

Enzimas termoestáveis que apresentam atividade a altas temperaturas reduzem a possibilidade de contaminação microbiana durante os processos industriais, além de permanecerem ativas por mais tempo durante procedimentos de alta temperatura. As celulasas que apresentam alta estabilidade térmica em temperatura elevadas, apresentam interesse para

aplicações industriais, na área de alimentos, têxteis, papel e conversão de biomassa. Pois, possuem vantagens como; o menor tempo necessário para hidrólise, devido à alta atividade específica; e, proporcionam menor risco de contaminação no processo. Assim, um dos critérios importantes para aplicação de enzimas é que a proteína seja resistente as condições severas dos processos, como temperaturas elevadas (BALA; SINGH, 2017; HUZAIRI et al., 2019).

A enzima celulase produzida por *Streptomyces* sp. S5 em FSm demonstra potencial para aplicação biotecnológica por apresentar estabilidade a uma ampla faixa de pH e elevada temperatura, e ser termoestável a temperaturas de 50, 60 e 70°C. Podendo assim, ser útil na indústria de panificação, que necessita de enzima estável a ampla faixa de pH, e termoestável, que continue exercendo sua atividade durante as primeiras etapas do processo de cozimento.

5.4.3 Efeito de íons metálicos, SDS e β - mercaptoetanol sobre atividade de CMCase

Considerando o potencial uso de celulasas em aplicações biotecnológicas, a influência de alguns íons metálicos na sua atividade foi avaliada. Os íons testados foram selecionados de acordo com a literatura, sendo os íons que comumente induzem ou inibem ação de enzimas e que podem estar presentes nos processos biotecnológicos. Os resultados da avaliação são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito de íons metálicos, β - mercaptoetanol e SDS na atividade de CMCase do extrato parcialmente purificado produzido por *Streptomyces* sp. S5 cultivado em FSm.

Influência de íons metálicos na atividade de CMCase	
Íons	Atividade relativa de CMCase (%)
Controle	100 $\pm$ 0
CaCl ₂	71,41 $\pm$ 1,68
BaCl ₂	83,39 $\pm$ 6,67
HgCl ₂	52,49 $\pm$ 6,27
MgCl ₂	50,67 $\pm$ 4,93
NaCl	71,51 $\pm$ 2,92
KCl	42,62 $\pm$ 3,16
MnSO ₄	91,14 $\pm$ 8,09
ZnSO ₄	80,17 $\pm$ 5,62
FeSO ₄	22,09 $\pm$ 6,68
β -mercaptoetanol	89,93 $\pm$ 8,71
SDS	73,73 $\pm$ 9,53

Concentração final dos íons de 0,05 mM.

Atividade relativa expressa em porcentagem em relação ao controle.

Foi observado uma diminuição considerável (>20% de inibição) da atividade de CMCase na presença de CaCl_2 , HgCl_2 , MgCl_2 e NaCl e mais de 50% de inibição foi observada na presença de KCl e FeSO_4 . Os íons ZnSO_4 , FeSO_4 e MnSO_4 são comumente citados como os maiores inibidores da atividade de celulasas microbianas devido a ligação que leva alteração na conformação, substituição de cofatores de metais nativos ou celulose bloqueando acessibilidade para celulase, ou via mecanismo redox. No entanto, no presente estudo, a atividade da celulase foi reduzida somente em 20% na presença de ZnSO_4 , e menos de 10% na presença de MnSO_4 (GAMA et al., 2019; TEJIRIAN; XU, 2010).

Na presença de SDS a atividade de celulase foi reduzida em mais de 20%. Já na presença de β - mercaptoetanol a redução da atividade ocorreu marginalmente. β - mercaptoetanol é frequentemente descrito como inibidor da atividade enzimática devido a sua ação redutora em ligações dissulfeto. No entanto, têm sido demonstrado manutenção da atividade enzimática na sua presença (ALMEIDA et al., 2017).

Embora tenha sido apresentada redução da atividade da celulase na presença de NaCl , ela se manteve em mais de 70%. Sendo a tolerância ao sal uma importante característica para aplicação da enzima nos processos de panificação. Já que o NaCl é um constituinte essencial na formulação do pão. Permitindo assim, que a enzima continue a exercer sua função mesmo após a adição do sal no processamento (SIMSEK; MARTINEZ, 2016).

A resistência da atividade enzimática na presença de diferentes íons é importante para viabilizar sua aplicação biotecnológica. As celulasas são propensas a inibição por meio destes íons. Os quais, em um processo industrial podem ser derivados do tratamento da biomassa utilizada como matéria prima. O efeito dos íons metálicos que agem como inibidores ou ativadores da atividade enzimática está relacionado com alterações na solubilidade da enzima, devido a ionização dos substratos; e, alterações nas propriedades catalíticas da própria enzima, por meio de ligações no sítio ativo (BEDADE et al.; 2017; GAMA et al.; 2019).

5.5 Aplicação da celulase na formulação de pão de farinha de trigo refinada e pão de farinha de trigo integral

As celulasas têm sido utilizadas na panificação para melhorar as qualidades da massa e do pão (WANG et al., 2018a). A celulase produzida mostrou características que a tornam útil para uso na panificação como estabilidade a ampla faixa de pH e termoestabilidade. Devido a isso, a celulase foi adicionada na formulação dos pães de farinha de trigo refinada, e farinha de trigo integral nas concentrações de enzima de 2,5, 5, 7,5 e 15 U/100 g de farinha. As imagens dos pães produzidos estão apresentadas na Figura 13

Houve aumento do volume do pão com adição de enzimas seja no pão de farinha de trigo refinada e no pão com farinha de trigo integral. Além da adição de celulase na formulação dos pães ter proporcionado migalhas mais abertas, com área celular maior. Esta alteração é mais evidente no pão com farinha de trigo refinada, com adição de 7,5 e 15 U/100 g de farinha. Os consumidores preferem pães com migalhas mais abertas e maior tamanho de células, do que com migalhas compactas e densas com poros menores (ENCINA-ZELADA; CADAVEZ; TEIXEIRA, 2019).

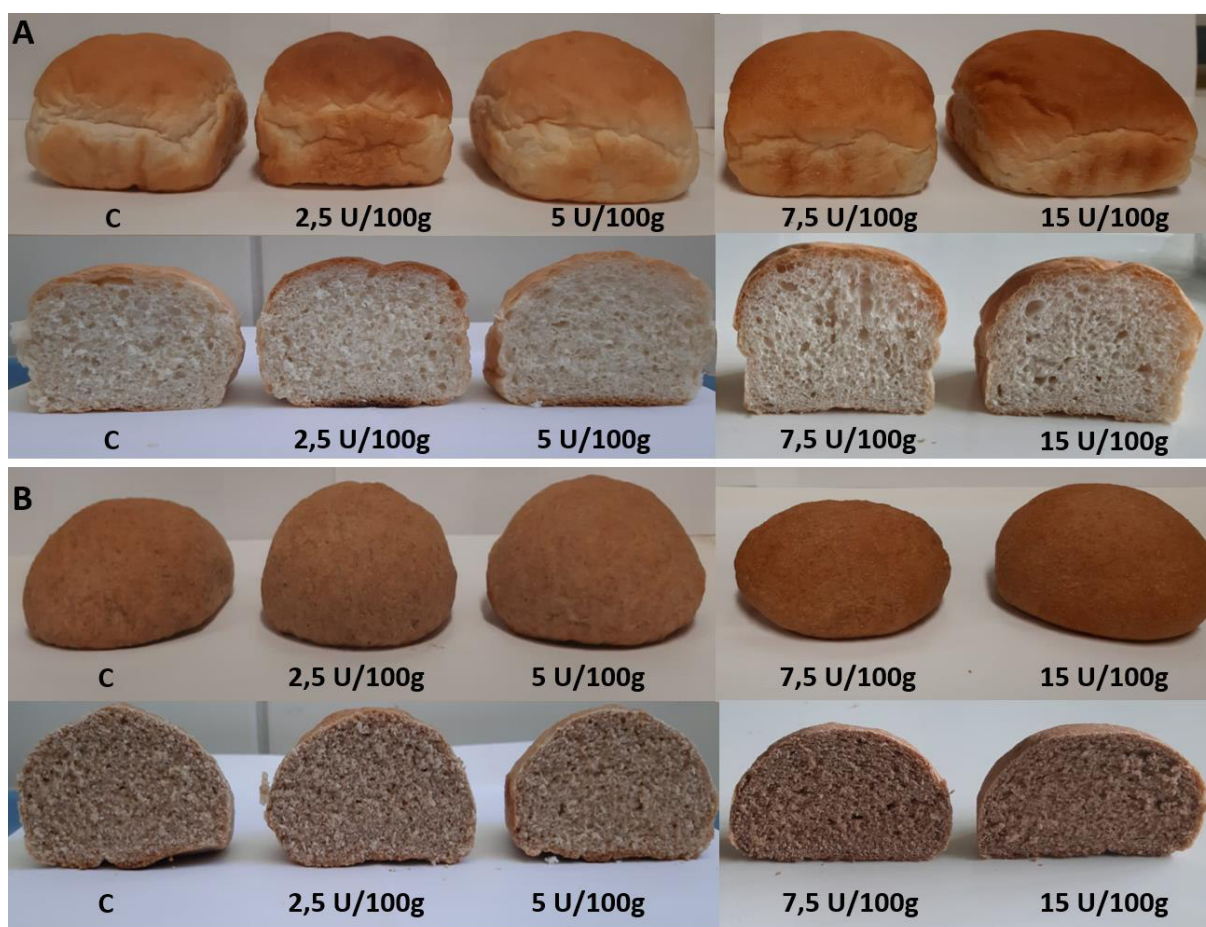


Figura 12. Efeito de diferentes concentrações da celulase na formulação de pães. Imagem de A) pão de farinha de trigo refinada e B) pão de farinha de trigo integral. Pão com formulação de C: controle (sem adição de enzima); com adição de 2,5 U, 5 U, 7,5 U e 15 U por 100 g de farinha.

A Tabela 5 apresenta os valores médios obtidos para volume específico e os atributos da análise de textura (dureza, elasticidade, coesão e mastigabilidade) dos pães testados. Em ambos os pães, o tratamento com todas as concentrações de enzima resultou em alterações significativas no volume específico, que é refletido na diminuição da dureza dos pães. Os tratamentos com enzima não produziram alterações significativas nos parâmetros de elasticidade, coesão e mastigabilidade.

Tabela 5. Valores médios das análises de volume específico e textura do pão de farinha de trigo refinada e integral.

Tipo de pão	Tratamento	Volume	Dureza	Elasticidade	Coesão	Mastigabilidade
Pão de farinha de trigo branca	Controle	3,83 ± 0,40 ^c	8,01 ± 1,36 ^a	1,00 ± 0,04 ^a	0,72 ± 0,04 ^a	5,40 ± 1,01 ^a
	2,5 U	4,09 ± 0,10 ^{bc}	7,61 ± 1,50 ^{ab}	0,99 ± 0,02 ^a	0,72 ± 0,02 ^a	5,75 ± 1,14 ^a
	5 U	4,72 ± 0,25 ^{abc}	6,08 ± 0,74 ^{abc}	1,18 ± 0,21 ^a	0,76 ± 0,02 ^a	5,31 ± 1,22 ^a
	7,5 U	5,07 ± 0,36 ^a	4,42 ± 0,64 ^c	0,99 ± 0,20 ^a	0,70 ± 0,12 ^a	3,29 ± 1,11 ^a
	15 U	4,78 ± 0,50 ^{ab}	5,12 ± 0,75 ^c	1,09 ± 0,08 ^a	0,75 ± 0,02 ^a	4,47 ± 0,55 ^a
Pão de farinha de trigo integral	Controle	1,49 ± 0,28 ^b	53,49 ± 4,33 ^a	0,87 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,04 ^a	23,53 ± 2,22 ^a
	2,5 U	1,61 ± 0,17 ^{ab}	50,40 ± 6,18 ^{ab}	0,87 ± 0,03 ^a	0,53 ± 0,02 ^a	23,52 ± 2,29 ^a
	5 U	2,08 ± 0,02 ^{ab}	45,62 ± 4,39 ^{ab}	0,86 ± 0,07 ^a	0,53 ± 0,02 ^a	20,73 ± 0,54 ^a
	7,5 U	2,12 ± 0,24 ^{ab}	43,71 ± 1,80 ^{ab}	0,87 ± 0,03 ^a	0,53 ± 0,01 ^a	20,04 ± 0,87 ^a
	15 U	2,36 ± 0,12 ^a	42,27 ± 2,14 ^b	0,88 ± 0,02 ^a	0,53 ± 0,02 ^a	19,61 ± 1,46 ^a

Controle (sem adição de enzima); com adição de 2,5 U, 5 U, 7,5 U e 15 U por 100 g de farinha.

*Valores na mesma coluna com letras iguais não são estatisticamente diferentes. Nível de significância ($p < 0,05$)

5.5.1 Volume específico dos pães

O volume específico do pão é um importante parâmetro para avaliação da sua qualidade. Já que, sua diminuição ou aumento se dá pela força da rede do glúten, podendo ser elucidado como a capacidade da rede de glúten em reter o CO₂ produzido durante o processamento. Pães com volume específico baixo são visualmente desagradáveis para o consumidor, e estão associados ao maior teor de umidade, cozimento inadequado, baixa aeração, dificuldade na mastigação, sabor inadequado e menor vida útil (BRITO-CUNHA et al., 2018; MUDGIL D, BARAK S, 2016)

É conhecido que o volume do pão produzido a partir de farinha integral é menor do que o do pão produzido com farinha refinada. Em nosso estudo o volume apresentado pelos pães de farinha integral foram visivelmente inferiores aos dos pães com farinha refinada como observado na Figura 13, o que está em acordo com os dados apresentados por Unal, 2017. Isso ocorre devido à grande quantidade de farelo presente na farinha integral gerar uma interferência mecânica, prejudicando a formação da rede de glúten. Além dos arabinoxilanos insolúveis presentes no farelo reduzirem a capacidade de retenção de gás da massa, e consequentemente, o volume do pão (OGNEAN; OGNEAN; BUCUR, 2011; UNAL; ALTINEL, 2017).

No pão de farinha de trigo refinada é observado um aumento gradual do volume específico em função do aumento da concentração de celulase adicionada, atingindo maior volume na concentração de 7,5 U/100 g de farinha. A adição da maior quantidade de enzima, na concentração de 15 U/100 g de farinha, gerou uma diminuição do volume específico em comparação a formulação com 7,5 U/100 g de farinha, que pode ser visualizado na Figura 13.

Tal fato, por ter ocorrido devido ao excesso de enzima provocar uma instabilidade na rede de glúten, que resultou em menor capacidade de retenção de gás, e consequentemente, na diminuição do volume específico. O mesmo ocorreu no estudo de Brito Cunha *et al*, 2018, utilizando a enzima xilanase, onde houve aumento do volume dos pães com adição da enzima em relação ao controle. No entanto, quando adicionado a maior concentração de enzima testada (30 IU/100 g de farinha) o volume reduziu em comparação aos demais tratamentos (7,5 e 15 IU/100 g de farinha) (BRITO-CUNHA *et al.*, 2018).

No pão de farinha de trigo integral foi observado um aumento gradual do volume específico, de acordo com elevação na concentração de celulase adicionada a formulação. Esse aumento ocorre com maior significância utilizando a concentração de enzima de 15 U/100 g de farinha.

A atuação da celulase na hidrólise das ligações β -1,4 glicosídicas das unidades de glicose dos polissacarídeos não amiláceos da farinha de trigo resulta em melhor resistência da massa ao processamento e cria uma massa mais flexível e estável, com maior capacidade de retenção de gases, proporcionando pães com maior volume específico. Além da ação da celulase elevar a quantidade de açúcares fermentáveis disponíveis para ação fermentativa da levedura, elevando a liberação de gás e proporcionando maior volume (MATSUSHITA *et al.*, 2017; XUE *et al.*, 2020).

A ação da celulase contribui também para melhor exposição dos arabinoxilanos, facilitando o acesso das endoxilanas. Assim, a xilanase age convertendo arabinoxilanos insolúveis em solúveis, que formam soluções viscosas na fase aquosa da massa, aumentando a estabilidade em torno das células de gás. Impedindo a difusão de gás da massa, aumentando a capacidade de retenção de gás, e consequentemente, o volume específico (OGNEAN; OGNEAN; BUCUR, 2011; TEBBEN; SHEN; LI, 2018)

Tanto a xilose quanto a celulose estão presentes em maior quantidade na farinha de trigo integral do que na farinha de trigo refinada, devido a presença do farelo e gérmen. Tornando a ação das celulasas e xilanases mais intensas na farinha de trigo integral. No entanto, neste estudo, a enzima agiu de forma semelhante em ambas os tipos de farinhas. O mesmo ocorreu no estudo de Tebben, 2016, com melhora do volume específico de ambos os tipos de pães por meio da adição da celulase (MATSUSHITA et al., 2017; TEBBEN, 2016).

5.5.2 Análise de textura dos pães

Os pães com farinha de trigo refinada e integral foram submetidos a análise de textura. Foi utilizada quatro fatias de 20mm de cada amostra de pão, e os valores médios e desvio padrão estão apresentados na Tabela 5.

A dureza se dá pela força exercida para promover uma deformação e é um fator relevante na avaliação da qualidade dos produtos de panificação, devido sua forte correlação com a percepção dos consumidores sobre o frescor do pão. No pão de farinha de trigo refinada e de farinha de trigo integral, houve redução gradual da dureza de acordo com o aumento da concentração de celulase na formulação. A diminuição da dureza do pão está diretamente associada ao aumento do volume. A celulase pode proporcionar maior estabilidade para a formação da rede do glúten, com maior capacidade de retenção de gás e expansão. Proporcionando produtos com maior volume e maciez, características que são cada vez mais desejáveis pelos consumidores. (KOHAIJDOVA et al., 2017; TEBBEN, 2016; XUE et al., 2020).

Elasticidade é a medida que refere o quanto o material deformado é capaz de retornar à condição não deformada após remoção da força de deformação e é um parâmetro importante para definição do grau de endurecimento do produto de panificação (KOHAIJDOVA et al., 2017). Foi observado no presente estudo, que a adição de enzima celulase não proporcionou

alterações significativas no parâmetro de elasticidade em relação ao controle, no pão com farinha de trigo refinada e no pão com farinha de trigo integral.

A coesão é caracterizada pela resistência do produto a uma segunda deformação em relação ao comportamento na primeira deformação. Geralmente, é desejável uma coesão elevada no pão, para que se forme um bolo em vez de se desintegrar durante a mastigação. Além da menor coesão indicar maior suscetibilidade do produto a fraturas e desintegrações durante seu armazenamento. (KOHAJDOVA et al., 2017) No presente estudo não foi observada alterações significativas no parâmetro de coesão quando adicionada qualquer concentração de celulase, em ambos os tipos de pães. Porém, a faixa de valores obtida neste estudo para coesão é compatível com a faixa de valores de outros estudos, indicando valores adequados para o produto de panificação (CAROCHO et al., 2019; CARVALHO et al., 2017) .

A mastigabilidade se dá pela energia requerida para triturar uma alimento sólido até um estado pronto para deglutição (BOZ; KARAOĞLU, 2013). Não houve alterações significativas na mastigabilidade de ambos os pães quando adicionada a enzima na formulação, em qualquer concentração.

Nossos dados para análise de textura são semelhantes aos apresentados no estudo de Haros, Rosell e Benedito, 2002, onde a adição de celulase na formulação dos pães promoveu redução na firmeza do pão, mas sem alterações na elasticidade e coesividade (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002). Neste estudo, o uso de celulase resultou em pães (de farinha de trigo refinada e farinha de trigo integral) com características físicas e sensoriais melhoradas, particularmente em relação a maciez e volume. A busca constante por melhorias nos atributos sensoriais do pão é indispensável para satisfazer as necessidades e desejos dos consumidores e obter vantagem no mercado competitivo. Portanto, a celulase produzida possui excelente potencial para aplicação como aditivo na indústria alimentícia. (TEUBER; DOLGOPLOVA; NORDSTRÖM, 2016).

5.5.3 Coloração dos pães

A cor é um parâmetro importante para a aceitação do produto pelo consumidor. O efeito da aplicação da enzima na coloração da casca dos pães de farinha de trigo refinada e integral está apresentado na tabela 6. A análise da cor da casca dos pães é um importante parâmetro para acompanhar a evolução das reações de Maillard e de caramelização, responsáveis pela

formação da cor marrom. No entanto, a comparação dos valores das análises de cor com a literatura não é adequada, pois a cor do pão varia de acordo com a formulação e condições de cozimento (PINHO; FERREIRA, 2018).

Tabela 6. Valores médios das análises de cor da casca do pão de farinha de trigo refinada e integral.

Influência da aplicação de CMCase na coloração da casca dos pães						
Tipo de pão	Tratamento	L*	a*	b*	Hue	Croma
Pão de farinha de trigo branca	Controle	66,00 ± 2,91 ^{ab}	11,60 ± 0,82 ^a	27,0 ± 0,61 ^a	65,94 ± 2,68 ^a	28,81 ± 0,76 ^a
	2,5 U	55,10 ± 4,49 ^c	14,46 ± 0,90 ^a	23,50 ± 3,40 ^{ab}	57,67 ± 4,71 ^b	27,34 ± 1,82 ^a
	5 U	67,33 ± 3,84 ^a	10,56 ± 3,11 ^a	25,90 ± 1,97 ^a	68,03 ± 4,74 ^a	28,22 ± 3,10 ^a
	7,5 U	57,27 ± 3,46 ^{bc}	11,86 ± 0,29 ^a	18,30 ± 1,35 ^b	57,00 ± 2,62 ^b	21,87 ± 0,89 ^b
	15 U	57,43 ± 0,92 ^{bc}	11,23 ± 0,83 ^a	18,23 ± 1,21 ^b	57,37 ± 2,05 ^b	21,42 ± 1,55 ^b
Pão de farinha de trigo integral	Controle	62,13 ± 0,15 ^a	9,90 ± 0,32 ^b	20,53 ± 0,42 ^a	64,04 ± 0,34 ^a	22,62 ± 0,60 ^a
	2,5 U	61,67 ± 0,76 ^a	10,40 ± 1,05 ^{ab}	20,80 ± 0,75 ^a	63,18 ± 0,87 ^a	23,45 ± 1,27 ^a
	5 U	61,00 ± 0,32 ^a	10,40 ± 0,21 ^{ab}	20,63 ± 0,51 ^a	63,61 ± 0,16 ^a	23,27 ± 0,65 ^a
	7,5 U	57,27 ± 1,10 ^b	11,40 ± 0,36 ^{ab}	17,63 ± 0,64 ^b	56,38 ± 2,32 ^b	21,61 ± 0,46 ^a
	15 U	56,7 ± 1,13 ^b	11,90 ± 0,59 ^a	17,96 ± 0,86 ^b	56,10 ± 1,19 ^b	21,36 ± 0,93 ^a

Controle (sem adição de enzima); com adição de 2,5 U, 5 U, 7,5 U e 15 U por 100 g de farinha. Nível de significância (p < 0,05)

*Valores na mesma coluna com letras iguais não são estatisticamente diferentes. Nível de significância (p < 0,05).

A análise colorimétrica realizada na casca dos pães de farinha de trigo refinada apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Com redução do valor de luminosidade (L*) (varia de 0 a 100) indicando pães mais escuros nas formulações com adição 2,5, 7,5 e 15 U/100 g de farinha. O que sugere coloração mais escura da crosta dos pães, causado por um aumento nas reações de Maillard. A reação de Maillard ocorre durante o forneamento, pela interação de proteína ou aminoácido com um açúcar redutor, que forma um polímero de cor marrom conhecida como melanoidina, que confere cor e o aspecto característico aos produtos assados ou cozidos. Assim, a ação das enzimas hidrolíticas aumentam a disponibilidade de açúcares para que ocorra a reação. Wang *et al*, 2018 observaram que a enzima celulase e xilanase contribuíram para coloração mais escuras dos pães devido a indução da reação de Maillard na presença de açúcares (WANG et al., 2018a).

A escala do parâmetro a^* varia do índice de saturação verde (-) ao vermelho (+). Todos os valores apresentados são positivos, constando uma tendência a coloração avermelhada. Os valores de a^* na casca dos pães de farinha de trigo refinada não apresentaram diferenças significativas quanto a adição de enzima em qualquer concentração. Com relação ao parâmetro b^* que varia do índice de saturação azul (-) e amarelo (+), as amostras dos pães utilizando farinha de trigo refinada encontram-se dentro da escada de intensidade do amarelo. Houve diferença significativa em relação ao controle com a adição de enzimas nas concentrações de 2,5, 7,5 e 15 U/100 g de farinha.

No $^{\circ}\text{Hue}$, um atributo qualitativo de cor, houve diferença significativa nas formulações com 2,5, 7,5 e 15 U/100 g de farinha, com redução do valor em comparação ao controle. Todos os tratamentos tiveram valores médios entre 57,00 a 68,03, indicando que as cascas dos pães com farinha de trigo refinada se encontram na tonalidade alaranjada. E quanto ao índice Croma, um indicador quantitativo da coloração, foram apresentadas diferenças significativas em relação ao controle nas formulações com maiores concentrações de enzima, de 7,5 e 15 U/100 g de farinha, onde houve diminuição dos valores de Croma, indicando menor intensidade de cor com aplicação dessas formulações.

A análise de cor das cascas dos pães com farinha de trigo integral apresentou diferenças significativas, com redução do valor de luminosidade (mais escuros) (L^*), nos pães com adição de enzimas nas concentrações de 7,5 e 15 U/100 g de farinha.

O parâmetro a^* se apresenta na escala de intensidade da cor avermelhada (+), com diferença significativa em relação ao controle, dos pães com adição de enzima em todas as concentrações, apresentando aumento dos valores de a^* . Quanto ao parâmetro b^* as amostras se encontram dentro da intensidade de cor amarela (+), e apresentou diferença significativa em relação ao controle, com diminuição os valores de b^* com a adição de 7,5 e 15 U/100 g de farinha de enzima na formulação dos pães.

O $^{\circ}\text{Hue}$ foi significativamente diferente em relação ao controle nas amostras de pão com 7,5 e 15 U/100 g de farinha, com diminuição dos valores médios. Que estão na faixa de 56,10 a 64,04, indicando que a casca dos pães com farinha de trigo integral se encontra na tonalidade alaranjada. O parâmetro Croma não foi alterado significativamente em relação ao controle com a adição de enzima em nenhuma das formulações.

O efeito da aplicação da enzima celulase na coloração do miolo dos pães de farinha de trigo refinada e integral estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Valores médios das análises de cor do miolo pão de farinha de trigo refinada e integral.

Influência da aplicação de CMCase na coloração do miolo dos pães						
Tipo de pão	Tratamento	L*	a*	b*	°Hue	Croma
Pão de farinha de trigo branco	Controle	73,23 ± 1,88 ^a	0,96 ± 0,64 ^a	10,60 ± 0,38 ^a	83,56 ± 2,35 ^a	10,65 ± 0,41 ^{ab}
	2,5 U	72,40 ± 2,64 ^a	0,70 ± 0,21 ^a	11,40 ± 2,05 ^a	86,66 ± 0,26 ^a	11,41 ± 1,56 ^a
	5 U	73,63 ± 0,46 ^a	0,60 ± 0,21 ^a	8,70 ± 0,40 ^{ab}	85,57 ± 1,47 ^a	8,71 ± 0,36 ^{bc}
	7,5 U	72,40 ± 2,64 ^a	0,70 ± 0,21 ^a	11,40 ± 2,05 ^a	86,66 ± 0,26 ^a	11,41 ± 1,56 ^a
	15 U	73,63 ± 0,42 ^a	0,60 ± 0,21 ^a	6,60 ± 0,58 ^b	84,37 ± 1,87 ^a	7,69 ± 0,62 ^c
Pão de farinha de trigo integral	Controle	61,80 ± 1,27 ^a	6,60 ± 0,06 ^a	16,20 ± 0,15 ^a	67,15 ± 0,89 ^a	17,49 ± 0,12 ^a
	2,5 U	61,70 ± 3,97 ^a	6,43 ± 0,64 ^a	16,10 ± 0,15 ^a	68,19 ± 2,00 ^a	17,30 ± 0,28 ^a
	5 U	61,20 ± 0,15 ^a	6,80 ± 0,56 ^a	16,40 ± 0,53 ^a	67,18 ± 0,96 ^a	17,61 ± 0,71 ^a
	7,5 U	63,00 ± 0,57 ^a	5,50 ± 0,14 ^a	9,80 ± 0,28 ^b	60,54 ± 0,15 ^b	11,21 ± 0,28 ^b
	15 U	64,20 ± 1,27 ^a	5,95 ± 0,07 ^a	10,70 ± 0,00 ^b	60,94 ± 0,31 ^b	12,22 ± 0,07 ^b

Controle (sem adição de enzima); com adição de 2,5 U, 5 U, 7,5 U e 15 U por 100 g de farinha. Nível de significância (p < 0,05).

*Valores na mesma coluna com letras iguais não são estatisticamente diferentes. Nível de significância (p < 0,05).

A análise colorimétrica realizada no miolo dos pães de farinha de trigo refinada não apresentou diferenças significativas no valor de luminosidade (L*) em nenhuma das formulações, em relação ao controle.

A escala do parâmetro a* apresentou todos os valores positivos constando uma tendência a coloração avermelhada. Os valores de a* não apresentaram diferenças significativas quanto a adição de enzima na formulação. Com relação ao parâmetro b* as amostras dos pães utilizando farinha de trigo refinada encontram-se dentro da escada de intensidade do amarelo. Houve diferença significativa em relação ao controle com a adição de enzimas nas concentrações de 5 e 15 U/100 g de farinha, onde ocorreu diminuição do valor de b*.

Em relação ao °Hue não houve diferença significativa com nenhuma das formulações. Os valores médios se mantiveram na faixa de 83,56 a 86,66 indicando coloração amarelada do miolo dos pães de farinha de trigo refinada. E quanto o índice Croma foram apresentadas

diferenças significativas em relação ao controle nas formulações com concentrações de enzima, de 5 e 15 U/100 g de farinha, com redução dos valores indicando menor intensidade de cor com a aplicação dessas formulações.

Sobre a coloração do miolo dos pães com farinha de trigo integral, não foram apresentadas diferenças significativas no valor de luminosidade (L^*) em decorrência da adição de enzimas na formulação.

O parâmetro a^* se apresenta na escala de intensidade da cor avermelhada (+), sem diferença significativa em nenhuma das formulações. Quanto ao parâmetro b^* as amostras se encontram dentro da intensidade de cor amarela (+). Apresentou diferença significativa em relação ao controle, com diminuição os valores de b^* , com a adição de maiores concentrações da enzima de 7,5 e 15 U/100 g de farinha na formulação dos pães.

O mesmo ocorreu com o $^{\circ}$ Hue, com redução dos valores médios nas formulações com 7,5 e 15 U/100 g de farinha. Os valores se mantiveram entre 60,54 a 68,19, indicando tonalidade na cor alaranjada no miolo dos pães com farinha de trigo integral. O Croma, também foi significativamente diferente em relação ao controle nas amostras de pão com 7,5 e 15 U/100 g de farinha. Onde houve redução dos valores indicando menor intensidade de cor com a aplicação dessas concentrações de enzima.

A definição dos requisitos de qualidade para a produção do pão é feita pelo produtor e/ou consumidor. Os principais parâmetros que influenciam fortemente a escolha do produto são: volume específico, onde pães maiores são mais atraentes; cor da crosta, onde há maior aceitabilidade a produtos de cor marrom dourada; a forma do pão e a frescura, relacionada a estrutura da migalha, percebida como o grau de porosidade, que também indica maciez; e a maciez, que é verificada pressionando o pão (ENCINA-ZELADA; CADAVEZ; TEIXEIRA, 2019; ŽIVANČEV et al., 2016).

Todos estes atributos foram melhorados com a adição da enzima celulase na formulação dos pães, em todas as concentrações. Assim, a celulase produzida por *Streptomyces* sp. S5 em FSm possui características que lhe conferem potencial para aplicação na produção de pães de farinha de trigo refinada e integral, proporcionando melhorias nos atributos principais de qualidade do pão.

Para o pão de farinha de trigo refinada a concentração ideal de enzima é de 7,5 U/ 100 g de farinha, sendo a que gerou maiores melhorias nos atributos de qualidade, sem provocar

efeitos adversos decorrente do excesso de enzima, como quando adicionada a concentração de 15 U/100 g de farinha. Para o pão de farinha de trigo integral a concentração ideal de enzima foi 15 U/ 100 g de farinha, devido a maior quantidade de substratos disponíveis pela presença integral do grão, que requer maior concentração enzimática para que os efeitos positivos possam ser obtidos. Uma alternativa para otimizar os efeitos positivos da enzima na panificação seria a produção de pães sem sal, já que foi demonstrado inibição de mais de 20% da atividade da enzima na presença de NaCl.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que, o isolado de *Streptomyces* sp. S5 apresentou um bom desempenho na produção de celulase em fermentação submersa. Após purificação, o extrato parcialmente purificado apresentou enzima com massa molecular de aproximadamente 32 kDa, com atividade para CMCase comprovada por meio de atividade enzimática e análise de zimograma.

A CMCase obtida apresentou maior atividade no pH de 5.5, e temperatura de 55° C. Com termoestabilidade de 60% de atividade em 50° C em até a terceira hora. Manteve acima de 60% de atividade a 60° C em todos os períodos, exceto na quinta hora. Em 70° C a enzima apresentou aumento da atividade em relação a inicial, se mantendo acima de 100% até a primeira hora e se mantiveram acima de 80% no período de 2 a 4 horas de incubação.

A atividade enzimática é inibida consideravelmente na presença de CaCl₂, HgCl₂, MgCl₂ e NaCl, KCl e FeSO₄.

As propriedades da celulase obtida neste estudo a torna útil para aplicação em diversos processos biotecnológicos e industriais, inclusive na panificação. Ela foi aplicada na produção de pão com farinha de trigo refinada e com farinha de trigo integral.

A presença da enzima em diferentes concentrações resultou em pães com maior volume específico devido a maior capacidade de retenção de gás, e maior porosidade da migalha, que influenciou a diminuição da dureza. Gerou redução da luminosidade, indicando maior indução da reação de Maillard. Os parâmetros de cor, a* b*, °Hue indicam características de cor

adequadas ao produto de panificação, com diminuição da intensidade de cor. Melhorando assim as características principais para definição da qualidade dos pães.

Para o pão de farinha de trigo refinada a concentração ideal de enzima na formulação é de 7,5 U/100 g de farinha e para o pão de farinha de trigo integral a concentração ideal é de 15 U/100 g de farinha.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permite termos como perspectivas:

Definir a espécie do *Streptomyces* S5 utilizada no estudo.

Otimizar as condições de cultivo para obter uma elevada produtividade de enzima.

Otimizar as condições de purificação para redução de perda de rendimento.

Para melhor avaliação dos efeitos da aplicação da enzima celulase produzida na produção de pães, faz-se necessário análises como; propriedades reológicas da massa, aspectos microbiológicos, vida útil e análise sensorial.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDEL-AZIZ M. S; HATHOUT AS; EL-NELEETY AA; HAMED AA. Molecular identification of actinomycetes with antimicrobial , antioxidant and anticancer properties. **Comunicata Scientiae Horticultural Journal**, v. 10, n. 2, p. 218–231, 2019.

AHMED AS; SALEH AAS; MOSTAF FA; ABD AA; ATY E; AMMAR HAM. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134–144, 2016.

ALMEIDA E; MENDES L; ANA P; UETANABARO T; GALVÃO E; BRITO L; PRIMINHO C; MIURA A. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum* : Application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1499–1506, 2017.

ARAÚJO, A. Production and characterization of cationic polyelectrolytes derived from cellulose. **Dissertação. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais**, 2019.

BAJAJ P; MAHAJAN R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8711–8724, 2019.

BALA, A.; SINGH, B. Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and their applicability in bread making. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 109, p. 1–10, 2017.

BALACHANDAR R; KARMEGAM N; SARAVANAN M; SUBBAIYAR; GURUMOORTHY P. Synthesis of bioactive compounds from vermicast isolated actinomycetes species and its antimicrobial activity against human pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 155–165, 2018.

BARBOSA, K. Production, characterization and purification of cellulase from bacteria in the intestinal tract of *Diatraea saccharalis*. Tese. **Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia**, 2019.

BASHIROVA A; PRAMANIK S; VOLKOV P; ROZHKOVA A; SCHWANEBERG U; DAVARI M. Disulfide Bond Engineering of an Endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to Improve Its Thermostability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1602, 2019.

BEDADE DK; SINGHAL TO; DESKA J; SHAMEKH S. Biochemical Characterization of Extracellular Cellulase from *Tuber maculatum* Mycelium Produced Under Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, p. 772–783, 2017.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases: Recent Advances and Improvement Strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656–669, 2015.

BERGEY; MURRAY RGE; BRENNER DJ; HOLT JG; KRIEG NR; MOULDER JW; PFNUNG N; SNEATH PH; STALEY JT; WILLAMS ST. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 1984, 2299-2616.

BOITA ERF; ORO T; BRESSIANI J; SANTETTI GS; BERTOLIN TE; GUTKOSKI LC.

Rheological properties of wheat flour dough and pan bread with wheat bran. **Journal of Cereal Science**, v. 71, p. 177–182, 2016.

BOZ, H.; KARAOĞLU, M. Improving the quality of whole wheat bread by using various plant origin materials. **Czech Journal of Food Science**, v. 31, n. 5, p. 457–466, 2013.

BRITO-CUNHA, CCQ; GAMA AR; JESUÍNO RSA; FARIA FP; BATAUS; LAM. Production of Cellulases from a Novel Thermophilic *Streptomyces thermocerradoensis* I3 Using Agricultural Waste Residue as Substrate. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 90–99, 2015.

BRITO-CUNHA, CCQ; GAMA AR; CINTRA C; BATAUS LAM; JOSÉ C. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. **Plos One**, v. 13, n. 2, p. 1–14, 2018.

BUENO MM; CRUZ R; THYS S; RODRIGUES RC. Microbial Enzymes as Substitutes of Chemical Additives in Baking Wheat Flour — Part I: Individual Effects of Nine Enzymes on Flour Dough Rheology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 2012–2023, 2016.

CANKURTARAN, T.; BILGIC, N. Influence of wheat milling by-products on some physical and chemical properties of filled and unfilled fresh pasta. **Journal Food Scientists & Technologists**, v. 56, n. June, p. 2845–2854, 2019.

CAROCHO M; MORALES P; CIUDE-MULERO M; FERNANDEZ V; FERREIRA E; HELENO S; RODRIGUES P; BARROS L; FERREIRA I. Comparison of different bread types: chemical and physical parameters. **Food Chemistry**, p. 125954, 2019.

CARVALHO, E; PAULA A; UETANABRA T; GALVÃO E; BRITO L; PRIMINHO C; MIURA A. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1499–1506, 2017.

CHELLAPANDI, P.; JANI, H. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiol**, v. 39, p. 122–127, 2008.

CHYLENSKI P; FORSBERG Z; STAHLBERG J; VARNAI A; LERSCH M; BENGTSSON O; SAEBO S; HORN SJ; EIJSINK VGH. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 16–23, 2017.

COELHO GD; FREITAS CS; BARBOSA GE; BELEM GL; SILVA LRIS; LEÃO MC; RODRIGUES LR; NASCIMENTO VC. Production and characterization of cellulase (CMCase) by fungus isolated from the thermophylic phase of a process of composting in fermentation in solid state with coconut bagasse green as a substrate. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 323–338, 2018.

DESAI SH; RABINOVITCH-DEERE CA; FAN Z; ATSUMI S. Isobutanol production from cellobionic acid in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 52, p. 1–10, 2015.

ELMS J; FISHWICK D; WALKER J; RAWBONE R; JEFFREY P; GRIFFIN P; GIBSON M; CURRAN AD. Prevalence of sensitisation to cellulase and xylanase in bakery workers. **Occup Environ Med**, v. 60, p. 802–804, 2003.

ENCINA-ZELADA, C. R.; CADAVEZ, V.; TEIXEIRA, J. A. Optimization of Quality Properties of Gluten-Free Bread by a Mixture Design of Xanthan, Guar, and Hydroxypropyl Methyl Cellulose Gums. **Foods**, v. 8, n. 5, p. 1–23, 2019

GAMA AR; BRITO-CUNHA CCQ; CAMPOS ITN; SOUZA GRL; CARNEIRO LC; BATAUS LAM. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel bifunctional xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**, 2019.

GARTAULA G; DHITAL S; NETZEL G; FLANAGAN B; YAKUBOV G; BEAHAN C; COLLINS H; BURTON R; BACIC A; GIDLEY M. Quantitative structural organisation model for wheat endosperm cell walls : Cellulose as an important constituent. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, n. May, p. 199–208, 2018.

GENG, P.; HARNLY, J. M.; CHEN, P. Differentiation of bread made with whole grain and refined wheat (*T. aestivum*) flour using LC/MS-based chromatographic fingerprinting and chemometric approaches. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 92–100, 2016.

GMOSER R; SINTCA C; TAHERZADEH M; LENNARTSSON P. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus. **Waste Management**, v. 97, n. 2019, p. 63–70, 2019.

GOESAERT H; SLADE L; LEVINE H; DELCOUR J. Amylases and bread firming – an integrated view. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 345–352, 2009.

GUEIROS J; SIQUEIRA W; RODRIGUES C; PORTO L; VANDENBERGHE S; WOICIECHOWSKI A; SOCCOL R. Biomass and Bioenergy Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels : A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, n. November 2019, p. 105419, 2020.

GULLO, M.; VERZELLONI, E.; CANONICO, M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production : Process and biotechnological aspects. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1571–1579, 2014.

HAN X; GUO Y; LIU X; XIA Q; WANG Y. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into hydrocarbons: a mini review. **Catalysis Today**, v. 319, p. 2–13, 2019a.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh

bread texture and bread staling. **Eur Food Res Technol**, v. 215, p. 425–430, 2002.

HUZAIRI M; ZAINUDIN M; MUSTAPHA NA; HASSAN MA. A highly thermostable crude endoglucanase produced by a newly isolated *Thermobifida fusca* strain UPMC 901. **Scientific Reports**, v. 9, n. 13526, p. 1–8, 2019.

ISLAM M; SARKAR P; MOHIUDDIN AKM; SUZAUDDULA. Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. **Malaysian Journal of Halai Research Journal**, v. 2, n. 2, p. 19–24, 2019.

KHOSHNEVISAN K; VAKHSITEH F; BARKHI M; BAHARIFAR H. Immobilization of cellulase enzyme onto magnetic nanoparticles : Applications and recent advances. **Molecular Catalysis**, v. 442, p. 66–73, 2017.

KOHAJDOVA K; VAKHSHITEH F; BARKHI M; BAHARIFAR H. Effects of cellulose fiber with different fiber length on rheological properties of wheat dough and quality of baked rolls. **Food Science and Technology International**, v. 23, n. 6, p. 490–499, 2017.

KUMAR B; BHARDWAJ N; ALAM A; AGRAWAL K; PRASAD H; VERMA P. Production , purification and characterization of an acid / alkali and thermo tolerant cellulase from *Schizophyllum commune* NAIMCC - F - 03379 and its application in hydrolysis of lignocellulosic wastes. **AMB Express**, v. 8, n. 173, p. 1–16, 2018.

LAHIJI R; XU X; REIFENBERGER R; RAMAN A; RUDIE A; MOON R. Atomic Force Microscopy Characterization of Cellulose Nanocrystals. **Langmuir**, v. 26, n. 6, p. 4480–4488, 2010.

LEE C; CHI Q; LIM J; DHAKSNAMOORTHY V; HONG S. Expression and characterization of the processive exo- β -1 , 4- cellobiohydrolase SCO6546 from *Streptomyces coelicolor* A (3). **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 310–321, 2018.

LI; WANG; JEWETT; MICHAEL. Expanding the palette of Streptomyces-based cell-free protein synthesis systems with enhanced yields. **Biochemical Engineering Journal**, v. 130, p. 29–33, 2018.

LI D; ZHAO Y; FEI T; WANG Y; LEE B; SHIM J; XU B; LI Z; LI X. Effects of Streptococcus thermophilus GtfB enzyme on dough rheology , bread quality and starch digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 96, n. April, p. 134–139, 2019.

LIM J; LEE C; DHAKSHNAMOORTHY V; PARK J; HONG S. Molecular characterization of Streptomyces coelicolor A (3) SCO6548 as a cellulose 1 , 4- β -cellobiosidase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, p. 1–8, 2016.

LIMA LGR; GONÇALVES MMM; COURI S; MELO VF; SANT'ANA GCF; COSTA ACA. Lipase Production by Aspergillus niger C by Submerged Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. 1–14, 2019.

LIU W; BRENNAN M; SERVENTI L; BRENNAN C. Effect of cellulase , xylanase and α -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. **Food Chemistry**, v. 234, p. 93–102, 2017.

MA Y; GUAN Y; ZHANG K; XU G; YANG Y; STEVENSON P. Dependency of the Combustion Behavior of Energy Grass and Three Other Types of Biomass upon Lignocellulosic Composition. **Environmental Progress e Sustainable Energy**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2017.

MARQUES, N. P. Prospection of degradation enzymes of plant material in endophytic fungi. **Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química**, 2013.

MATSUSHITA K; SANTIAGO DM; NODA T; TSUBOI K; KAWAKAMI S; YAMAUCHI H. The bread making qualities of bread dough supplemented with whole wheat flour and treated with enzymes. **Food Science and Technology Research**, v. 23, p. 403–410, 2017.

MENEZES, C. R. DE; BARRETO, A. R. Biodegradation of lignocellulosic wastes by basidiomycetes fungi: Characterization of waste and study of fungal enzyme complex. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**, v. 19, n. 2, p. 1365–1391, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOURA, R. M.; NOGUEIRA, A. C.; STEEL, C. J. Effect of the addition of maltogenic amylase, glucose oxidase and xylanase on the rheology of wheat flour doughs. **XXV Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, 2016.

MUDGIL D, BARAK S, K. B. Optimization of bread firmness, specific loaf volume and sensory acceptability of bread with soluble fiber and different water levels. **J Cereal Sci**, v. 70, p. 186–191, 2016.

NABILA, M. I.; KANNABIRAN, K. Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) from actinomycetes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, n. May, p. 56–62, 2018.

NAM Y; NIHIRA T; ARAKAWA T; SAITO Y; KITAOKA M; NAKAI H; FUSHINOBU S. Crystal Structure and Substrate Recognition of Cellobionic Acid Phosphorylase, Which Plays a Key Role in Oxidative Cellulose Degradation by Microbes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 30, p. 18281–18292, 2015.

NASCIMENTO, D. “Green” hydrogen reinforced with nanocrystals and cellulose nanofibrilles. Tese. **Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Ceará.**, 2017.

NOTHAFTH; PARCHE S; KAMIONKA A; TITGEMEYER F. In Vivo Analysis of HPr Reveals a Fructose-Specific Phosphotransferase System That Confers High-Affinity Uptake in *Streptomyces coelicolor*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 929–937, 2003.

OGNEAN, M.; OGNEAN, C.; BUCUR, A. Rheological effects of some xylanase on doughs from high and low extraction flours. **Proc Food Sci**, v. 1, p. 308–314, 2011.

OLIVEIRA, D. Application of xylanase and/or cyclodextrin glycosyltransferase (CGTASE) in bread production. **Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade “Júlio de Mesquita Filho”**, 2010.

ONI, O. D.; OKE, M. A.; SANI, A. Mixing of *Prosopis africana* pods and corn cob exerts contrasting effects on the production and quality of *Bacillus thuringiensis* crude endoglucanase. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.

ONIPÉ, O. O.; JIDEANI, A. I. O.; BESWA, D. Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 2509–2518, 2015.

ORJI F; ADEKUNLE L; SUBERU Y; FAMOTEMI C. Properties of *Aspergillus flavus* Cellulase Produced from Solid State Fermentation of Brewers' Spent Grain (BSG) as Substrate. **British Biotechnology Journal**, v. 13, n. 1y, p. 1–9, 2016.

PHUENGMAUNG P; FUJIWARA D; SUKHUMSIRICHART W; SAKAMOTO T. Enzyme and Microbial Technology Identification and characterization of the first β -1,3-D-xylosidase from a gram-positive bacterium, *Streptomyces* sp. SWU10. **Enzyme and Microbial Technology**, n. November, 2017.

PIETROBON VC; MONTEIRO RTR; POMPEU GB; LOPES BML; AMORIM HV; CRUZ SH; VIEGAS EKD. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with acid or alkali. **Braz. Arch. Bio. Techn.**, v. 52, p. 229–233, 2011.

PINHEIRO, G. L.; AZEVEDO-MARTINS, A. C. DE; ALBANO, R. M. Comprehensive analysis of the cellulolytic system reveals its potential for deconstruction of lignocellulosic biomass in a novel *Streptomyces* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.

PINHO, Z. E. M. O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Impact of new ingredients obtained from brewer's spent yeast on bread characteristics. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 5, p. 1966–1971, 2018.

PRIDHAM, T. G.; GOTTLIEB, D. The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. **Journal of Bacteriology**, v. 56, n. 1, p. 107–114, 1948.

RAVINDRAN R; JAISWAL S; ABU-GHANNAM N; JAISWAL A. A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. **Bioresour. Technol.**, v. 248, p. 272–279, 2018.

RENZETTI, S.; ROSELL, C. M. Role of enzymes in improving the functionality of proteins in non-wheat dough systems. **Journal of Cereal Science**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

ROCHA-MARTÍN J; MARTINEZ-BERNAL C; PÉREZ-COBAS Y; REYES-SOSA F; GARCIA B. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 244, p. 48–56, 2017.

ROETS SH; ROSE M; MULLER M; MANLEY C. Laboratory and commercial-scale evaluation of the effect of pure and commercial endoxylanases and endoglucanases on wheat

flour bread quality. **Acta Alimentaria**, v. 44, n. 2, p. 276–288, 2015.

SAHMOUNE, M. N. Performance of *Streptomyces rimosus* biomass in biosorption of heavy metals from aqueous solutions. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 87–95, 2018.

SAINI, A.; AGGARWAL, N. K. Environmental Effects Enhanced endoglucanase production by soil inhabiting *Streptomyces* sp . strain NAA9 using lignocellulosic biomass. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 41, n. 13, p. 1630–1639, 2019.

SALAMONI, S. P. Produção e caracterização de celulasas secretadas por *Streptomyces* sp. isolado de processo de compostagem. **Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós graduação em microbiologia agrícola e do ambiente**, 2005.

SASAKI, T. Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water. **The Journal of Supercritical fluids.**, v. 13, p. 261–268, 1998.

SHARMA, A., PAREEK, V., ZHANG, D. Biomass pyrolysis - A review of modelling, process parameters and catalytic studies. **Energy Rev**, v. 50, p. 1081–1096, 2015.

SHARMA, S.; SHARMA, V.; KUILA, A. Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemmically preteated biomass. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 139, 2016.

SHARMA A; MANISHA T; BHATTACHARYA M; MANDAL T. Commercial application of cellulose nano-composites – A review. **Biotechnology Reports**, v. 21, n. 2018, 2019.

SILVA, J. Enzymatic catalysis in the production of second generation ethanol. **Monografia**.

Universidade Federal de São João del-Rei Coordenadoria do Curso de Química, 2016.

SIMSEK, S.; MARTINEZ, M. O. Quality of dough and bread prepared with sea salt or sodium chloride. **Journal of food process engineering**, v. 39, n. 2015, p. 44–52, 2016.

SORENSEN T; CRUYES-BAGGER N; WINDAHL MS; BADINO SF; BORCH K; WESTH P. Temperature Effects on Kinetic Parameters and Substrate Affinity of Cel7A Cellobiohydrolases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 36, p. 22193–22202, 2015.

SUBRAMANIAM, R; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. **International journal of science and nature**, v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.

SUN S; SUN S; CAO X; SUN R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresour. Technol.**, v. 199, p. 49–58, 2016.

TAO W; KASUGA T; LI S; HUANG H; FAN Z. Homoethanol production from cellobionate and glycerol using recombinant *Klebsiella oxytoca* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, n. September, p. 107364, 2019.

TEBBEN, L. Individual effects of enzymes and vital wheat gluten on whole wheat dough and bread properties. **Department of Grain Science and Industry, College of Agriculture, Kansas State University**, 2016.

TEBBEN, L.; SHEN, Y.; LI, Y. Improvers and functional ingredients in whole wheat bread : A review of their effects on dough properties and bread quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, n. August, p. 10–24, 2018.

TEJIRIAN A; XU F. Inhibition of cellulose-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 76, p. 7673- 7682, 2010.

TEUBER, R.; DOLGOPOLOVA, I.; NORDSTRÖM, J. Some like it organic, some like it purple and some like it ancient: Consumer preferences and WTP for value-added attributes in whole grain bread. **Food Quality and Preference**, v. 52, p. 244–254, 2016.

TRABELSI S; BE, S; MOUNA M; RIHAB K; SAHNOUN M; MEZGHANI M; BEJAR S. The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid- stable alpha- amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1–13, 2019.

UNAL, S.; ALTINEL, B. The effects of certain enzymes on the rheology of dough and the quality characteristics of bread prepared from wheat meal. **Journal Food Scientistis & Technologists**, v. 54, n. 6, p. 1628–1637, 2017.

VENTORINO V; IONATA E; BIROLO L; MONTELLA S; MARCOLONGO L; CHIARO A; ESPRESSO F; FARACO V. Lignocellulose-Adapted Endo-Cellulase Producing *Streptomyces* Strains for Bioconversion of Cellulose-Based Materials. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. December, p. 1–15, 2016.

VILELA, E. Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces* sp . **Dissertação. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia**, 2013.

VINHA; GRAVINA-OLIVEIRA; FRANCO; MACRAE; COELHO. Cellulase Production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 Using Lignocellulosic Biomass as Inducer Substrate. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 164, p. 256–267, 2011.

WANG X; PEI D; TENG Y; LIANG J. Effects of enzymes to improve sensory quality of frozen dough bread and analysis on its mechanism. **Journal of Food Science and**

Technology, v. 55, n. 1, p. 389–398, 2018a.

WANG, X.; WU, Y.; ZHOU, Y. Transglycosylation , a new role for multifunctional cellulase in overcoming product inhibition during the cellulose hydrolysis. **Bioengineered**, v. 8, n. 2, p. 129–132, 2017.

WANG Z; ZHANG T; LONG L; DING S. Biotechnology for Biofuels Altering the linker in processive GH5 endoglucanase 1 modulates lignin binding and catalytic properties. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 332, p. 1–11, 2018b.

WU H; CHENG X; ZHU Y; ZENG W; CHEN G; LIANG Z; IOENG J; IOSCI B. Purification and characterization of a cellulase-free , thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, n. xx, p. 6–11, 2017.

XUE Y; CUI X; ZHANG Z; ZHOU T; GAO R; LI Y; DING X. Effect of β -endoxylanase and α -arabinofuranosidase enzymatic hydrolysis on nutritional and technological properties of wheat brans. **Food Chemistry**, v. 302, n. 2020, p. 125332, 2020.

YASSIEN, M. A.; JIMAN-FATANI, A. A. M.; ASFOUR, H. Z. Production , purification and characterization of cellulase from *Streptomyces* sp . **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 4, p. 348–354, 2014.

YOUNG E; PATRICK P; BYUNG F; BAIK K. Effect of bran hydration with enzymes on functional properties of flour – bran blends. **Cereal Chemistry**, v. 96, p. 273–282, 2019.

ŽIVANČEV D; TORBICA A; TOMIC J; JANIC E. Possibility of utilization alternative cereals (millet and barley) for improvement tehnological properties of bread gained from flour of poor technological quality. **Journal on processing and energy in agriculture**, v. 20, p. 165–169, 2016.

