

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE
CELULASE DE RESÍDUOS DO SISAL**

DAYSE BATISTA DOS SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JULHO-2010**

BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASE DE RESÍDUOS DO SISAL

DAYSE BATISTA DOS SANTOS

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2008.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Márcia Luciana Cazetta

Co-Orientador : Rodrigo Pires do Nascimento

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO-2010

FICHA CATALOGRÁFICA

S237

Santos, Dayse Batista dos

Bioprospecção de micro-organismos produtores de celulases de resíduos de sisal / Dayse Batista dos Santos _ Cruz das Almas, BA, 2010.

65 fl. ; il.

Orientador: Márcia Luciana Cazetta

Co-orientador: Rodrigo Pires do Nascimento

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Área de Concentração Ecologia Microbiana.

1. Sisal. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD 633.59

Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da biblioteca central da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
DAYSE BATISTA DOS SANTOS**

Dra. Márcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)

Dra. Eliseth de Souza Viana
EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical

Dr. José Torquato de Queiroz Tavares
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação homologada pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Como sempre, a Ele: meu mestre, meus valores, meus dias ensolarados, amigo, amor incondicional e eterna inspiração... Ao meu pai, seu Dú.

Ao meus amores, que dedico minha vida e alma: Minha Lua, Madrecita Ester, Irmãos: Caninho, Diene, Delfran e Darlan, aos meus Dindos: Darci e Chiquito e a ele companheiro, fonte de inspiração...Meu querido Mateus.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pela oportunidade de realização do curso.

A Deus, pela luz e força que me transmite em todos os dias da minha existência, pelo amor incondicional que ele tem por mim, por sempre atender a minhas preces, por me cobrir de luz e me agraciar em sempre cruzar pelo caminho com pessoas maravilhosas.

A minha família, principalmente aos meus pais Ester e Domingos e irmãos Delfran, Darlan, José Delclânio e Diene sem vocês eu não seria quem eu sou.

Ao meu filho ou filha amada que se encontra em meu ventre, e hoje é a luz dos meus dias.

Aos meus sobrinhos Rute, Diego, Maria Clara, Moisés e Euclânia.

A minha orientadora Profa. Dra. Márcia Luciana Cazetta pelas orientações, compromisso e oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiabilidade e brilhantismo profissional, entusiasmo, disposição e paciência;

Ao co-orientador Prof. Dr. Rodrigo Pires do Nascimento, pela compreensão com os momentos difíceis que passei durante a dissertação, pela atenção e colaboração na análise dos dados estatísticos, pela amizade, orientações e contribuições;

Ao meu companheiro Mateus Santos Machado pela paciência, ajuda mútua, dedicação e amor;

A todos os membros do NEMA, principalmente a funcionária Lene, aos estagiários Marcelo, Lica e Cris e aos amigos Juan, Augusto César e Jurema;

A amiga Aline por tudo que fez para ajudar na concretização do sonho dessa dissertação, pelas orientações, pela disponibilidade de tempo, paciência em acompanhar e ensinar os trabalhos de bancada, pela sua inteligência, pelos trabalhos em conjunto e solidários, e principalmente por ser esse ser humano formidável;

A nossa querida tia Ivete por sempre abrir as portas de sua casa para as reuniões calorosas da Microbiologia.

Aos colegas de curso que se tornaram amigos, por tudo que passamos e que passaremos juntos. Hoje posso afirmar que tenho a família Microbiologia Agrícola no coração, em especial aos amigos Carol Yamamoto, Julian, Emília, Rafael, Manuela, Adailson Feitoza e Adriane;

Aos grandes amigos que fiz ao longo da minha passagem pela UFRB: Rose, Lorena PT, Splinter, Transgênico, Bete, Ciro, Saldanha, Hare, Luana, Gaby e muitos outros.

Aos funcionários da UFRB Geraldo , Ilzinha e todos do Restaurante Universitário.

A todos os professores do curso de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos passados, em especial a querida professora Ana Fermino Soares e ao professor Jorge Teodoro de Souza.

Aos professores e amigos do grupo Alimenta, pelo profissionalismo e por todo o carinho e amizade, Ricardo Luis Cardoso, José Torquato Queiroz, Antônio Augusto Oliveira Fonseca.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A FAPESB pela concessão da bolsa durante todo o período do curso.

“The best way to have a good idea is to have a lot of ideas.”
(Linus Pauling)

*“As coisas mais insignificantes têm às vezes maior importância e é geralmente
por elas que a gente se perde....”*
(Fiódor Dostoiévski)

ÍNDICE

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura	3
1.1. Biologia de Actinomicetos	4
1.2. Papel da Parede Celular nos Actinomicetos	5
1.3. Importância Ecológica dos Actinomicetos	7
1.4. Actinomicetos Produtores de Substâncias de Interesse Médico e Industria.....	8
1.5. Celulases	10
1.6. Processos Fermentativos.....	15
1.7. Biomassa Vegetal	16
1.8. Importância Biotecnológica dos Resíduos do Sisal.....	17

CAPÍTULO 2

Bioprospecção de Actinomicetos Produtores de Celulase de resíduos Agroindustriais.....	21
Introdução	24
Objetivos	26
Material e Métodos.....	27
Resultados e Discussões	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

RESUMO

Na região do Semi-Árido Nordestino, o sisal é uma das principais culturas agrícolas. A fibra das folhas do sisal é utilizada para a fabricação de vários produtos como tapetes, cordas, artesanato, entre outros. No entanto, somente 4% da planta são aproveitáveis, o restante é descartado como resíduo. Estes resíduos, ricos em material lignocelulósico, são uma fonte potencial para isolamento de microrganismos com aplicação biotecnológica, como na produção de enzimas. Os actinomicetos representam uma fração importante dos microrganismos que habitam o solo e compõem a microflora de resíduos lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar, resíduo do sisal, entre outros. Devido à grande diversidade morfológica e taxonômica destes micro-organismos, é importante desenvolver estudos de bioprospecção de enzimas de interesse industrial e ambiental. O objetivo principal trabalho foi selecionar actinomicetos produtores de celulase a partir de resíduos obtidos no beneficiamento do sisal e o estudo da produção de enzimas pelas estirpes mais promissoras, por fermentação submersa, utilizando diferentes substratos como fonte de carbono. Os isolamentos foram realizados dos municípios de Tiquara, Ourulândia, Laje do Batata e Araci. A escolha destes municípios, dentro da região semi-árida da Bahia, refere-se ao potencial destes na produção do sisal. Para o isolamento de micro-organismos 10 gramas de solo e 5 gramas de resíduos lignocelulíticos do sisal foram adicionados a 90 e 95 ml de salina 0,85% estéril, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, respectivamente, e diluídos até 10^{-6} a partir da suspensão original. Nos meios de cultura utilizados (agar batata, agar glicerol-peptona e agar amido caseína) esterilizados, alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram espalhadas, em 3 repetições de cada diluição. As colônias isoladas foram repicadas através da técnica do esgotamento para obtenção de cultura pura. Foram selecionados 166 actinomicetos da região sisaleira. Para isolar micro-organismos produtores de celulase, foram realizados plaqueamentos utilizando-se meios de cultura cuja única fonte de carbono foi a carboximetilcelulose a 1,0%. As placas de Petri foram incubadas a 30°C por 12 dias. A degradação da celulose pode ser observada após adição de solução de Vermelho Congo 1% (p/v) na placa por 15 minutos. Em seguida foram realizadas fermentações submersas em frascos Erlenmeyer contendo meio de sais minerais suplementado com bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de sisal e milhocina, utilizando-se o Delineamento Composto Central Rotacional 3², totalizando 11 experimentos. Dos 166 isolados estudados, 17 foram considerados promissores quanto à degradação da celulose. Contudo, apenas uma estirpe, ARA01, foi selecionada para estudos fermentativos, devido ao seu rápido crescimento. Tanto as fermentações em meio contendo resíduo de sisal quanto bagaço de cana apresentaram boas produções da enzima, embora o bagaço de sisal tenha se mostrado um substrato mais promissor, atingindo 630 U/L contra 260 U/L em bagaço de cana. As análises estatísticas mostraram que a milhocina foi a fonte de nitrogênio que apresentou a maior influência na produção da enzima, pois o aumento de sua concentração elevou significativamente a atividade enzimática, enquanto o aumento da concentração das fontes de carbono não influenciaram na atividade da celulase, na faixa estudada. Assim, os resultados preliminares deste trabalho indicaram que o micro-organismo isolado, bem como os substratos empregados, apresentam potencial para produção de celulase.

ABSTRACT

In the north-eastern semi-arid region of Brazil, sisal (*Agave sisalana*) is situated among the main agricultural crops. Sisal's leaf fibers are used for the manufacturing of rugs, ropes and many different artisanal products. However, only 4% of the whole plant is used, with more than 90% being discharged as residues. These residues are rich in ligno-cellulosic material and constitute a potential source for the isolation of microorganism, as for example enzyme producing organisms. Actinomycetes represents an important portion from soil inhabitant microorganisms as components of the micro-flora in ligno-cellulosic residues as sugar-cane bagasse, sisal's residues, etc. Due to the high morphological and taxonomical diversity of these organisms, is important to develop prospection studies for industrial and environmental applications. The objective of this work was to select cellulose producing actinomycetes from sisal's residues and to study enzymatic production of selected strains by means of submerge fermentation, using different substrata as carbon source. Isolates were obtained from Tiquara, Ourolandia, Laje do Batata and Araci counties. These areas were selected due to their production potential. Microorganisms were isolated from 10 g of soil plus 5 g sisal residues in 90 and 95 ml of 0.85% sterile saline solution and diluted until 10^{-6} . Different sterile culture media were used (agar-potato, agar glycerol-peptone and agar amide- casein), where aliquots of 0,1 ml of each dilution were distributed in 3 replicates for each dilution. Pure cultures were obtained from isolated colonies and 166 actinomycetes were selected. In order to isolate cellulolytic producing microorganisms, culture media containing 1,0% carboxi-methylcellulose as the only carbon source was used. Petri dishes were incubated 12 days at 30°C. Cellulose degradation was observed after adding Red Congo 1% (p/v) solution, subsequently, submerge fermentation was performed in Erlenmeyer flasks using the Central Rotational Compound Design 3^2 , with a total of 11 experiments. From the 166 prospected isolates, 17 were considered as potentially cellulose degradators. However, only one strain, ARA01, was selected for fermentation studies, due to its rapid growth. All fermentations in medium containing sisal residues as well as sugar cane bagasse showed high enzymatic production, although sisal bagasse was the best substratum with 630 U/L versus 260 U/L from sugar-cane bagasse. Statistical analysis showed that milhocin was the Nitrogen source with the highest influence over enzyme production, once the increase on its concentration significantly incremented enzymatic activity, while the increase in carbon sources did not influenced in cellulase activity within the studied range. The preliminary results of this work showed that the isolated microorganism, as well as the substrata used, have potential for cellulase production.

INTRODUÇÃO

O estudo das comunidades microbianas tem sido de grande valia para a descoberta de novas fontes na produção de antibióticos e enzimas de interesse industrial. Muitos dos microrganismos que vivem em solos, sedimentos e mesmo resíduos não são cultiváveis, sendo necessário a utilização de técnicas moleculares para a determinação de perfis microbianos. Dentre as comunidades microbianas mais significativas presentes em solos, sedimentos e resíduos lignocelulósicos, destacam-se as actinobactérias e os fungos, que englobam vários gêneros com diferentes características morfofisiológicas. (SAID, et al, 2004).

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas que apresentam um DNA rico em guanina e citosina possuindo a capacidade de formar filamentos em algum estágio de seu desenvolvimento (VOBIS, 1997). Os actinomicetos se encontram distribuídos no solo, águas e outros ambientes, porém o solo é o seu habitat mais comum. Eles têm sido descritos como os principais produtores de uma gama de fatores bioativos, de alto valor comercial, tais como inibidores imunodepressivos, agentes anti-tumorais e substâncias antimicrobianas, bem como várias enzimas de interesse comercial e ambiental. Essas enzimas são às vezes favorecidas, quando comparadas a outras fontes microbianas ou vegetais, pelo fato de possuírem uma estabilidade maior a altas temperaturas e diferentes valores de pH. Os actinomicetos são responsáveis por cerca de metade de todos os metabólitos secundários bioativos já descobertos, sendo os principais produtores de antibióticos (KIM et al., 2000; LAM, 2006). Além disso, exercem um papel importante na ciclagem de compostos orgânicos nos ambientes naturais e também desempenham um papel promissor na agricultura (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005).

Os actinomicetos representam uma fração importante dos microrganismos que habitam o solo e compõem a microflora de resíduos lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar, resíduo do sisal, entre outros.(NASCIMENTO, et.al 2003) Devido a grande diversidade morfológica e taxonômica destes microrganismos, é de vital importância desenvolver estudos de bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial e ambiental.

No primeiro capítulo desse trabalho foram abordados aspectos morfológicos e de interesse industrial dos actinomicetos, bem como seu potencial para produção de celulases com matérias-primas lignocelulósicas, tais como o bagaço de cana e bagaço de sisal. Aspectos relacionados a produção de enzimas, abrangendo histórico, conceitos, importância biotecnológica dos resíduos do sisal e da cana –de- açúcar foram detalhados neste capítulo.

No segundo capítulo deste trabalho foram apresentados resultados das pesquisas feitas durante o trabalho de bioprospecção de micro-organismos produtores de celulase de resíduos agroindustriais.

Considerando a falta de estudos direcionados ao isolamento de actinomicetos presentes em resíduos de sisal para produção de enzimas, aliada à crescente demanda por métodos alternativos na produção de celulases, o presente trabalho teve como objetivo verificar o uso de actinomicetos na produção de enzimas do complexo celulolítico com resíduos agroindustriais.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Biologia de Actinomicetos

Os actinomicetos são filogeneticamente definidos como um táxon na subdivisão das bactérias Gram-positivas, e a capacidade de formar hifas em algum estágio do seu desenvolvimento. Esses micro-organismos estão amplamente distribuídos em ambientes naturais, como por exemplo, nos rios, nos mares e na atmosfera, porém o solo é o seu reservatório mais comum (NASCIMENTO et al., 2008).

O solo é o local onde os actinomicetos desempenham relevante papel biológico, sendo o subgrupo dos estreptomicetos os representantes mais comuns neste ambiente. Entre estes, contam-se *Streptomyces griseus* e *Streptomyces aureofaciens*. Os representantes do gênero *Streptomyces* produzem importantes antibióticos, como a estreptomicina, sintetizada por *S. griseus*, a clorotetraciclina, sintetizada por *S. aureofaciens*, a terramicina, sintetizada por *S. rimosus*, entre muitos outros. Mais de oitenta antibióticos já foram obtidos de espécies do gênero *Streptomyces*. Os representantes do gênero *Frankia* vivem em simbiose com as raízes de plantas superiores (por exemplo, da casuarina, *Casuarina* sp.), onde levam à formação de nódulos, no interior dos quais ocorre fixação de nitrogênio (MACAGNAN et al. 2008).

Muitos actinomicetos também causam graves moléstias no homem e nos animais. Entre os patógenos, podemos mencionar o *Mycobacterium tuberculosis*, causador de tuberculose e o *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase (lepra). No gado, a actinomicose é causada por *Actinomyces bovis*. Entre os actinomicetos úteis ao homem, estão os representantes do gênero *Bifidobacterium* (SIQUEIRA & MOREIRA, 2008). Habitantes normais da flora intestinal, estas bactérias imóveis e anaeróbicas desempenham papel fundamental na regulação da atividade intestinal normal, principalmente em lactentes. O alto teor de umidade é desfavorável ao crescimento destes micro-organismos. Espécies do gênero *Streptomyces* são aeróbias, sendo raras em solos alagados. Entretanto, algumas espécies dos gêneros *Actinomyces* e *Agromyces* são microaerofílicas, requerendo baixas tensões de oxigênio para o seu crescimento, o qual ocorre pela ponta hifal (TORTORA, 2005).

A faixa ótima de pH para o desenvolvimento dos actinomicetos está entre 6,5 e 8,0 sendo pH 5,0 limitante para o crescimento da maioria das espécies

em meio de cultura. Os actinomicetos são altamente diversos morfologicamente (Figura 1), variando entre micrococos, bastões pleomórficos, filamentos ramificados e ciclos de vida que combinam ou não tais formas (MOREIRA e SIQUEIRA 2006). As hifas podem ser curtas e rudimentares a extensivamente ramificadas e são estreitas, com diâmetro de 0,5 a 2 μm , podendo ainda penetrar no substrato ou elevar-se acima deles (aéreas). Sua reprodução é por fragmentação de hifas ou de esporos. Os esporos podem ser de vários tipos, como os artóporos (*Streptomyces*) e zoósporos (*Spirillospora* e *Actinoplanes*), sendo produzidos nas hifas (de um a vários em cadeia), em esporângios ou em vesículas (MOREIRA e SIQUEIRA 2006). O nicho ecológico da maioria dos actinomicetos é a zona aeróbica do solo. Uma das características marcante deste grupo é a produção de enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas comumente encontradas no solo, como exemplo, , amido, quitina, húmus, celulose e lignocelulose, além da síntese e excreção de milhares de metabólitos como a geosmina que confere o odor característico à terra molhada. Devido a sua grande diversidade metabólica, os actinomicetos são considerados importantes micro-organismos no ponto de vista industrial. (NASCIMENTO, et al., 2008).

1.2. Papel da Parede Celular nos Actinomicetos

A parede celular dos actinomicetos é composta por várias camadas de peptídeoglicano, enquanto nas Gram negativas observa-se uma maior complexidade química e estrutural da parede, decorrente da presença de camadas lipoprotéica e lipopolissacarídica, localizadas externamente à camada de peptídeoglicano, originando a membrana externa. Estas diferenças, por si só, contribuem em grande parte para as diferenças observadas na forma de captação dos nutrientes (MUSSI, 2007). Devido à presença de uma membrana externa de caráter hidrofóbico (LPS), os actinomicetos apresentam um grande número de *porinas* associadas à camada lipopolissacarídica. As *porinas* correspondem a proteínas, formadas por três subunidades idênticas, que originam um canal de cerca de 1 nm de diâmetro, cujo mecanismo de abertura e fechamento permanece ainda desconhecido. Desta forma, as *porinas* permitem a passagem de moléculas hidrofílicas, de baixa massa molecular. Estas proteínas podem atuar

de forma inespecífica, formando canais aquosos, ou específica, exibindo sítios de ligação para substratos de até 5 kDa, ou ainda, acopladas a proteínas transportadoras (NELSON & COX, 2006).

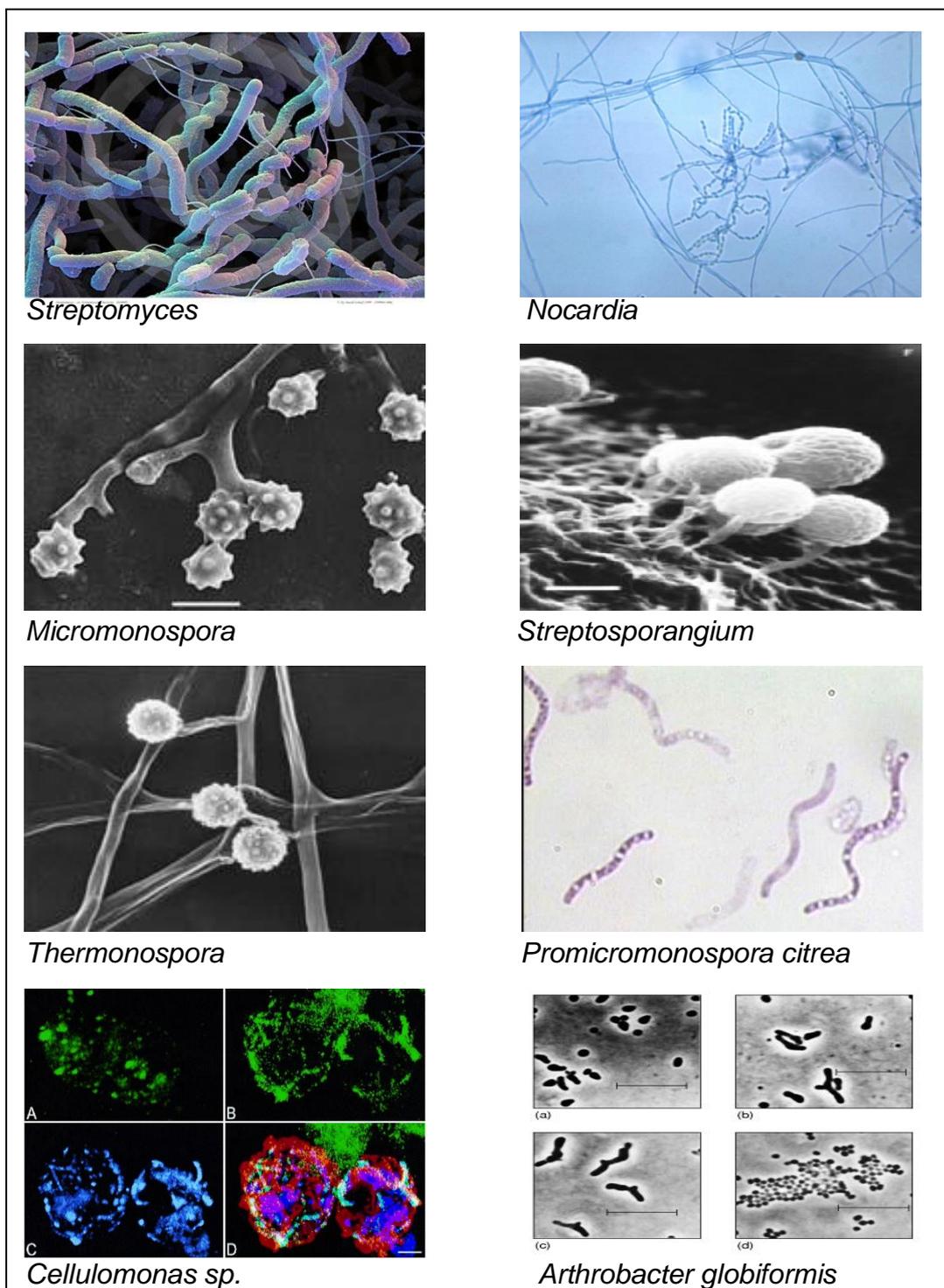


Figura 1: Diversidade morfológica de actinomicetos.

Fonte: (http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info).

1.3 Importância Ecológica dos Actinomicetos

Os actinomicetos têm recebido atenção especial devido aos diversos papéis que desempenham no solo. Atuam na decomposição da matéria orgânica e contribuem para a formação da estrutura do solo, por meio de ligações de suas hifas com as partículas do mesmo. Alguns são fitopatógenos como o *Streptomyces scabies*, causador da “sarna” da batatinha.

Actinomicetos pertencentes ao gênero *Frankia*, se associam a plantas de 8 famílias vegetais, 25 gêneros e 220 espécies, mas segundo Morgante (2007), essas bactérias filamentosas associam-se com plantas de 20 gêneros diferentes, pertencentes a 9 famílias. Em consequência, durante muito tempo acreditou-se que essas bactérias fossem as mais promíscuas dentre os organismos fixadores de nitrogênio que realizam associações. Essa visão tende a ser modificada, uma vez que estudos filogenéticos recentes demonstram a existência de uma grande proximidade entre as 9 famílias em questão. Uma possível explicação seria a pela capacidade dessas plantas de estabelecerem relações simbióticas com *Frankia*, por meio da interação com micorrizas com tolerância a uma ampla faixa de pH e de concentração de sais. É por isso que os actinomicetos podem ser usados para restaurar solos contaminados com metais pesados como o zinco, cádmio, chumbo e cinzas de zonas industriais e de mineração, zonas costeiras e para evitar a desertificação (WHEELER & MILLER, 1999). Este grupo pode ser encontrado em todos os continentes, distribuídos ao longo de um vasto leque de áreas de ecossistemas como geleiras, tundras árticas, sistemas alpinos e margens de rio até ambientes desérticos (GOTTSCHALK, 1999).

Quando os actinomicetos estão associados com plantas são denominados de actinorrizas, sendo os exemplos mais comuns as associações com arbóreas, não leguminosas, como o pinheiro australiano e membros da família *Rosaceae*. As bactérias habitam o solo, vivendo saprofiticamente enquanto em liberdade. Ao encontrarem uma planta hospedeira, penetram em suas raízes para formar nódulos, no interior dos quais passará a fixar o nitrogênio atmosférico. Nessa simbiose, as plantas fornecem os produtos da fotossíntese, enquanto as bactérias fornecem o nitrogênio fixado (sob a forma de NH_4^+) (GOI & SOUZA, 2002). Os nódulos radiculares são constituídos de hifas vegetativas alongadas e vesículas septadas fixadoras de nitrogênio. As vesículas estão envolvidas por um envelope

lipídico que tem a função de proteger contra a inibição que o oxigênio pode causar na atividade da enzima responsável por este processo, a nitrogenase, a qual é altamente sensível ao oxigênio (FREIRE, 1999).

Estes actinomicetos também fixam o nitrogênio atmosférico através do estabelecimento de simbioses com espécies de angiospermas *Alnus*, *Casuarina* e *Myrica*, a maioria de porte arbustivo e arbóreo. Esta simbiose promove a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) pelos nódulos radiculares. Estas plantas são recomendadas para recuperar áreas degradadas com solos de baixa fertilidade, devido à sua boa adaptação e crescimento rápido e boa utilização para madeira e lenha. Podendo assim, ser exploradas para estes fins, além de reduzir a exploração de espécies nativas (EMBRAPA, 2008). Contudo, por serem pouco estudados, há necessidade de aprofundamento no estudo desses micro-organismos. A importância dos actinomicetos no solo tem sido mais relacionada com a produção de antibióticos, cuja ação é evidenciada principalmente em meio de cultura, através da produção de halos de inibição, onde se forma uma zona livre de crescimento microbiano, em torno da colônia do actinomiceto que sintetiza o antibiótico. A influência dos fatores antibióticos no equilíbrio microbiológico está condicionada à atividade dos micro-organismos antagonistas no solo e à ação dos antibióticos sobre as populações sensíveis. Entretanto, a importância dos actinomicetos também tem sido relacionada com a produção de diversas substâncias de aplicação farmacológica e industrial, incluindo antibióticos, enzimas, inibidores enzimáticos e agentes imunomoduladores (NASCIMENTO et al., 2008).

1.4. Actinomicetos Produtores de Substâncias de Interesse Médico e Industrial

Os actinomicetos são utilizados para a produção de antibióticos e vitaminas. O antibiótico neomicina é produzido por células do gênero *Streptomyces*. Essas bactérias e outras do mesmo gênero produzem mais de 60% dos antibióticos naturais devido à sua ampla presença nos solos e pelo seu ciclo de vida rápido e simplificado (Figura 2).

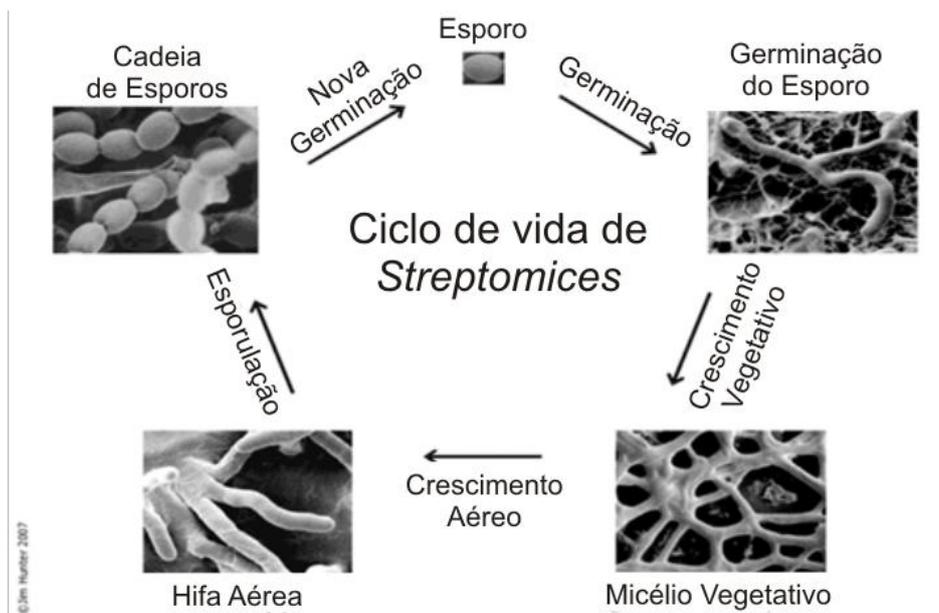


Figura 2: Ciclo de Vida de *Streptomyces*.

Fonte: (<http://www.iitd.pan.wroc.pl/Dept/Mic/grafika/pro/cykl.jpg>).

Os *Streptomyces* também produzem substâncias usadas para o tratamento de câncer ou para impedir a rejeição de órgãos após transplantes. A indústria química utiliza actinomicetos para produzir substâncias como o metanol, butanol e acetona. Por meio da engenharia genética, é possível alterar geneticamente certas bactérias produzindo substâncias economicamente interessantes, como insulina humana produzida por organismos procariontes geneticamente modificados (BONFIM, 2008).

Após os antibióticos, as enzimas são os compostos mais importantes produzidos pelos actinomicetos. As vantagens da utilização de micro-organismos, incluindo os actinomicetos, na produção de enzimas em substituição às tradicionais fontes animais e vegetais, são o rendimento relativamente alto, a eficiência de custo e a facilidade de serem manipuladas geneticamente. Atualmente as enzimas de origem microbiana são utilizadas no processamento de alimentos, na manufatura de detergentes, nas indústrias têxtil e farmacêutica, na terapia médica e em estudos de biologia molecular. Os actinomicetos possuem ampla diversidade ecológica e bioquímica, e, por possuírem também uma alta capacidade de produção de metabólitos secundários, podem ser considerados uma excelente fonte para a pesquisa de novas enzimas com novas especificidades (NASCIMENTO et al., 2008).

As enzimas extracelulares hidrolíticas constituem uma das principais classes de enzimas produzidas por actinomicetos, que são amplamente descritas na literatura como promissoras para aplicações biotecnológicas. Como exemplo, podemos citar a celulase, sendo a clivagem das fibras de celulose realizado pelos micro-organismos celulolíticos, por intermédio desta enzima. A produção de celulases por actinomicetos mesófilos e termófilos é amplamente relatada na literatura e apresenta características bioquímicas distintas daquelas obtidas por fungos. As enzimas de actinomicetos apresentam na sua maioria, valores ótimos na faixa de 40 a 60° C, podendo atingir valores mais altos, como é o caso das celulases produzidas por *Thermomonospora*. Outros exemplos são as hemicelulases produzidas por *Streptomyces lividans* e por *Thermatoda*, as peptidases produzidas por *Streptomyces lactamdurans*, *Streptomyces fradiae* e *S. rimonus* e as quitinases produzidas por *Streptomyces griseus* (NASCIMENTO et al., 2008).

As enzimas microbianas podem ser classificadas em três principais campos de aplicação: aquelas utilizadas para síntese de compostos, aquelas responsáveis por reações de bioconversão e aquelas capazes de despolimerizar substâncias naturais em monômeros de interesse econômico, as hidrolases (VANDAME & DERYCKE, 1983).

Cerca de 75% das enzimas aplicadas industrialmente são constituído pelas hidrolases. Dentre estas, as proteases dominam o mercado, representando 40% de todas as enzimas comercializadas. As proteases são empregadas em várias indústrias como as de detergentes, de alimentos, de couro e a indústria farmacêutica. O segundo maior grupo de hidrolases que encontra aplicações industriais é composto pelas carboidrases, enzimas utilizadas na panificação, cervejaria, indústrias de amido, têxteis e de papel (SAID & PIETRO, 2004).

1.5. Celulases

A estrutura da celulose pode ser quebrada por intermédio de um complexo enzimático que reconhece ligações β -1,4 entre moléculas de glicose, denominados celulases (CAO & TAN, 2002). As etapas envolvidas na degradação microbiana da celulose ainda não estão totalmente esclarecidas. A célula microbiana é impermeável à molécula polissacarídica, portanto esta deve ser

quebrada pela ação das celulasas, que são sintetizadas intracelularmente e liberadas para o meio extracelular (GHOSH & GHOSH, 1993). As celulasas podem ser separadas em 2 classes, basicamente: endoglucanases e exoglucanases. Uma terceira classe, a β -glucosidase, ou celobiase, não é estritamente uma celulase, mas possui função importante na hidrólise da celulose.

As endoglucanases (EG), ou 1,4- β -D-glucan-glucanohidrolase [EC 3.2.1.4], são caracterizadas pela sua capacidade em clivar derivados de celulose substituída, como a carboximetilcelulose (CMC), de forma randômica, produzindo uma mudança rápida no grau de polimerização. A taxa de hidrólise de cadeias longas de celooligossacarídeos é alta, e esta taxa aumenta com o grau de polimerização. A glicose e a celobiose são os produtos finais da reação. A transglicosilação é característica de algumas, mas não de todas as endoglucanases. A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial (SAID & PIETRO, 2004).

As exoglucanases, também chamadas exocelobiohidrolases (CBH) ou 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolase [EC 3.2.1.91] são definidas por sua capacidade em liberar unidades de celobiose a partir do final não redutor da cadeia de celulose microcristalina. São encontradas como o maior componente de alguns sistemas de celulasas, mas estão ausentes em outros. A celulose microcristalina é utilizada como substrato preferencial (PÉREZ-PONS et al., 1995).

As β -D-glucosidases [EC 3.2.1.21] completam a hidrólise até glicose, a partir de pequenas cadeias de celooligossacarídeos e celobiose, as quais são liberadas por outras enzimas. A hidrólise completa da celulose é o resultado combinado da ação sinérgica destas enzimas (WOOD & BATH, 1988; WACHINGER *et al.*, 1989; WOOD & GARCIA-CAMPAYO, 1990; DENG & TABATABAI, 1995; PÉREZ-PONS, et al., 1995).

As propriedades de EG, CBH e β -glucosidase têm sido comparadas. As EG hidrolisam primariamente celulose amorfa, como a carboximetilcelulose (CMC), produzindo açúcares redutores de modo a reduzir a viscosidade da CMC. As CBH agem sobre celulose microcristalina, papel de filtro e algodão, e além destes, outros substratos também são utilizados, como a xilana, por exemplo. Alguns substratos são degradados por mais de um tipo de celulase. O papel de filtro, por exemplo, apesar de sofrer grande parte da ação das CBH, sofre também ação

das EG, embora em menor intensidade. A ação conjunta destas enzimas sobre o papel de filtro é conhecida como FPase. O peso molecular das CBH varia de 41 a 68 kDa, o qual é maior do que o peso molecular das EG, que varia de 12,5 a 50 kDa. As β -glucosidases agem sobre sofrorose (2-0- β -glucopiranosil-D-glucose) e celobiose, possuindo alto peso molecular (73 a 150 kDa). Todas essas enzimas parecem ser glicosiladas, mas a quantidade relativa da porção glicosídica é variável. Por exemplo, as β -glucosidases possuem mais açúcares do que as CBH e EG, que raramente têm sido relatadas com algum carboidrato. Possivelmente a glicosilação pode não ser essencial para a biossíntese ou secreção destas duas enzimas, porém na CBH existe uma região rica em prolina, serina e treonina que é altamente O-glicosilada, o que pode proteger contra ação de enzimas proteolíticas (WOOD & GARCIA-CAMPAYO, 1990). As CBH parecem conter ainda ácidos aminados acídicos (GHOSH & GHOSH, 1993).

Em comparação com as celulases de fungos, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais as bactérias degradam celulose. Isto talvez pelo fato de que a maioria das bactérias degrada a fibra celulósica pela erosão da superfície e usam as enzimas ligadas à célula. Entretanto, parece possível que procariotos como actinomicetos e corinebactérias degradem celulose usando mecanismos similares aos dos fungos (WOOD & GARCIA-CAMPAYO, 1990; SINGH & HAYASHI, 1995).

Em relação às bactérias, foi introduzido o conceito de celulosomas para a bactéria anaeróbia *Clostridium thermocellum*. Estes são complexos de multienzimas agregadas, cuja integridade é essencial para a ação efetiva na celulose cristalina. São encontrados no meio de cultura e na superfície de células, onde formam protuberâncias. Após a interação com o substrato, as protuberâncias se alongam formando “corredores de contato”, que parecem ser compostos de material amorfo e fibrilar (BAYER & LAMED, 1992). Estruturas semelhantes aos celulosomas foram observadas ainda em outras espécies de *Clostridium* e em outros gêneros bacterianos, como *Cellulomonas*, *Bacteroides* e *Ruminococcus* (BAYER & LAMED, 1992), e a presença de protuberâncias semelhantes às de *C. thermocellum* também já foram encontradas no actinomiceto *Thermomonospora* (BÉGUIN & AUBERT, 1994).

As celulases individuais são incapazes de hidrolisar o polímero de celulose cristalina de maneira eficiente, isto é, elas precisam agir em conjunto. Para

explicar este fenômeno, várias hipóteses têm sido propostas: o requerimento de um elemento não catalítico de dissociação da ligação hidrogênio (desfibrilamento); a simples combinação da ação exo e endo; o requerimento de duas diferentes exoglucanases para justificar as duas possíveis formas estereoquímicas no resíduo terminal da cadeia de glicose; o requerimento para o ataque múltiplo simultâneo das cadeias, o qual pode ser realizado por diferentes enzimas. Existe o consenso de que a celobiose como produto final é inibitória para que haja uma atividade celulolítica eficiente e a ação da β -glucosidase é essencial para um efeito sinérgico máximo (BAYER & LAMED, 1992).

Várias enzimas celulolíticas possuem um domínio não catalítico de ligação à celulose, chamado CBD (do inglês *cell-binding-domain*). Geralmente está localizado no NH₂ ou COOH terminal da enzima e está separado do domínio catalítico por segmentos ricos em prolina, treonina e serina. Apesar da semelhança entre vários domínios, a propriedade de se ligar à celulose só foi demonstrada para alguns deles. Não há dúvida, porém, que sejam funcionais, apesar de que devem existir diferenças no grau de afinidade da ligação (BÉGUIN & ALBERT, 1994).

Estes domínios não catalíticos parecem participar na ligação ao substrato, formação do complexo enzimático ou possivelmente na fixação da superfície da célula. Presumivelmente, auxiliam na degradação da celulose cristalina, prevenindo as enzimas de serem retiradas do substrato e focalizando a hidrólise em áreas restritas, nas quais o substrato é sinérgicamente desestabilizado por eventos de quebras múltiplas, facilitando assim a recuperação de produtos solúveis de degradação (BÉGUIN & ALBERT, 1994; ALI *et al.*, 1995; LYMAR, *et al.*, 1995).

Na maioria dos organismos celulolíticos, a síntese de celulase é reprimida na presença de fontes de carbono solúveis, facilmente metabolizáveis e induzida na presença de celulose. A indução de celulases parece ser afetada por produtos solúveis gerados pela degradação da celulose realizada por enzimas celulolíticas sintetizadas constitutivamente em baixos níveis. Estes produtos são, presumivelmente, convertidos em verdadeiros indutores por reação de transglicosilação (BÉGUIN & ALBERT, 1994; LANDAUD *et al.*, , 1995).

A pesquisa sobre a ação das celulases e polissacarídeos relacionados começou nos anos 50, devido ao enorme potencial dessas enzimas em

converterem lignocelulose a glicose e açúcares solúveis. Pesquisas básicas e aplicadas durante os anos 70 e 80 demonstraram que a bioconversão de lignocelulose a açúcares solúveis pela ação de enzimas era difícil e economicamente inviável. Entretanto, o progresso nas pesquisas em celulasas, hemicelulasas e pectinases revelou o potencial biotecnológico destas enzimas para o uso em vários tipos de indústrias, como a alimentícia, papelreira e têxtil, tendo diversas funções nos processos industriais (BHAT, 2000).

Atualmente, as enzimas são largamente utilizadas em muitas aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis e específicas é cada vez maior. A Europa produz 60 % do total de enzimas industriais no mundo, ficando os 40% restantes com os EUA e Japão (BHAT, 2000).

O uso das celulasas pela indústria começou ainda na década de 80, inicialmente na fabricação de ração animal e posteriormente nas indústrias alimentícias. Subseqüentemente, o uso das celulasas foi ampliado para a indústria têxtil e de detergentes, assim como a papelreira. Por isso, as celulasas constituem atualmente uma parcela significativa do mercado mundial de enzimas, sendo produzida principalmente por *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000).

As celulasas alcançaram a importância atual na indústria têxtil devido a sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de uma forma controlada, aumentando assim a qualidade dos produtos. Embora as celulasas tenham sido introduzidas nesse tipo de indústria há cerca de uma década, são o terceiro grupo de enzimas mais usado atualmente nessas aplicações. Os processos têxteis mais conhecidos onde as celulasas são utilizadas são o biopolimento e a bioestonagem (BHAT, 2000; BELGHITH et al., 2001).

Além da indústria têxtil, outras indústrias se utilizam das vantagens proporcionadas pelo uso das celulasas. As indústrias de detergente em pó, assim como a têxtil, utilizam estas enzimas pela sua capacidade de degradar fibras celulósicas controladamente e de maneira ordenada. Nesse caso, as celulasas presentes nos detergentes realizam cortes finos nas microfibrilas, as quais tendem a esticar as fibras do algodão após vários ciclos de lavagem, auxiliando assim na restauração da maciez, do brilho e da cor do tecido (BHAT, 2000). Na indústria alimentícia, as celulasas têm uma ampla gama de aplicações. Na extração e clarificação de sucos de frutas, as celulasas atuam em conjunto com outras enzimas, como pectinases, hemicelulasas e α -amilases, formando as

chamadas “enzimas de maceração”, que serão usadas na indústria, após o processamento mecânico das frutas, aumentando a degradação da fase sólida formada neste processamento inicial. Dessa forma, há uma liquefação maior da fruta, aumentando a quantidade de suco extraído e reduzindo o tempo de extração (CORREIA, 2010).

1.6. Processos Fermentativos

A fermentação do ponto de vista bioquímico é um termo geral que denota a degradação anaeróbia da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos (característicos para diferentes organismos) para obter energia na forma de ATP (NELSON & COX, 2006). É um processo comumente desenvolvido por micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) cujo desempenho depende muito da composição do meio de cultura (SCHMIDELL, 2001), pois cada ser vivo responde de maneira única ao ambiente, usando mecanismos físicos ou químicos para a formação do produto desejado (COONEY, 1981). O meio de cultivo deve atender à demanda nutricional do micro-organismo produtor, aos objetivos do processo e à escala de operação. Sua seleção depende, para a maioria dos processos em larga escala, do custo, disponibilidade e características dos seus componentes (MORAES, 2001). Os substratos que compõem os meios devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento como vitaminas do complexo B, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos (SANT’ANA JR, 2001). As fontes de carbono, especialmente carboidratos, podem ser: glicose (pura ou de amido hidrolisado), lactose (pura, soro de leite ou de queijo), amido ou fécula de cevada, centeio, trigo, aveia, farinhas e farelos diversos, soja, amendoim, algodão, batata, batata-doce, mandioca, sorgo e sacarose (melaço de cana, de beterraba ou açúcar refinado).

As fontes nitrogenadas podem ser: cevada, melaço de beterraba, água de maceração de milho (milhocina), farinha de aveia, farinha de centeio, farelo de soja e soro de leite. Os traços de metais necessários geralmente estão presentes na água corrente ou na maioria das matérias-primas. Sais minerais são adicionados, especialmente como fontes suplementares de nitrogênio, fósforo, enxofre ou cálcio. A maioria dos fatores de crescimento necessários pertence ao

grupo de vitaminas do complexo B, certos aminoácidos ou ácidos graxos (MORAES, 2001).

Os meios de cultivo podem ser divididos em sintéticos e naturais (ou complexos). Os sintéticos apresentam composição química bem conhecida, já os naturais apresentam composição química complexa, geralmente desconhecida sendo, todavia, normalmente preferidos pelo menor custo (SCHMIDELL, 2001). Os processos fermentativos para obtenção de um dado produto a partir de micro-organismos podem ser bem variados; dependem do tipo de reator utilizado, do estado da fermentação (submersa ou sólida) e de outras características como ser descontínuo, descontínuo alimentado, semicontínuo ou contínuo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

1.7. Biomassa Vegetal

A parede celular vegetal é o maior reservatório de fonte de carbono renovável fixado na natureza e contém três importantes constituintes poliméricos: a celulose (fibras insolúveis de β -1,4-glucanas, correspondendo a cerca de 30-45% do peso total), as hemiceluloses (polissacarídeos não-celulósicos, incluindo glucanas, mananas, arabinanas, galactanas e xilanas, correspondendo a cerca de 25-45% do peso total) e a lignina (estrutura polifenólica complexa, correspondendo a cerca de 15 a 30% do peso total). Sendo o principal componente do suporte estrutural, a parede celular vegetal é construída para resistir à degradação microbiana (KLASS, 1983; ARISTIDOU & PENTTILÄ, 2000).

A distribuição relativa dos componentes lignocelulósicos na parede celular depende da espécie do vegetal e do estágio de crescimento e desenvolvimento do mesmo. A composição monomérica do material lignocelulósico pode variar amplamente, dependendo da fonte da biomassa (Tabela 1). Estes elementos não tendem a se acumular na natureza, pois sofrem degradação microbiana, como parte integrante do ciclo do carbono (KLASS, 1983; PULS & SCHUSEIL, 1993; ARISTIDOU & PENTTILÄ, 2000).

Em geral, a fração de carboidratos contém primariamente açúcares tipo hexoses (com seis carbonos), como a glicose e, em menor quantidade, manose e galactose. Entretanto, a fração de pentoses é mais significativa: xilose (5 – 20 %) e arabinose (1 – 5 %). A xilose é o segundo açúcar mais abundante na natureza

após a glicose e é ainda o mais comum em resíduos hemicelulósicos de “*hardwood*” (ARISTIDOU & PENTTILÄ, 2000).

Tabela 1: Composição de diferentes biomassas vegetais com relação à presença (%) de carboidratos (pentoses ou hexoses) e outros componentes.

	Sabugo de milho	Farelo de trigo	Farelo de arroz	Casca de arroz	Fibra de bagaço- cana	Papel de impressão
Carboidrato						
Glucose (C6)	39,0	36,6	41,0	36,1	38,1	64,4
Manose (C6)	0,3	0,8	1,8	3,0	-	16,6
Galactose (C6)	0,8	2,4	0,4	0,1	1,1	-
Xilose (C5)	14,8	19,2	14,8	14,0	23,3	4,6
Arabinose (C5)	3,2	2,4	4,5	2,6	2,5	0,5
Total de hexoses	40,1	39,8	43,2	39,2	39,2	81,0
Total de pentoses	18,0	21,6	19,3	16,6	25,8	5,1
Não-carboidrato						
Lignina	15,1	14,5	9,9	19,4	18,4	21,0
Cinzas	4,3	9,6	12,4	20,1	2,8	0,4
Proteína	4,0	3,0	-	-	3,0	-

Fonte: Aristidou & Penttilä, 2000.

A degradação da parede celular vegetal por micro-organismos é geralmente vista como um processo enzimático, sendo um fenômeno complexo ainda não compreendido totalmente. Sabe-se que certos micro-organismos têm desenvolvido estratégias efetivas para invadir plantas e hidrolisar polissacarídeos (LEQUART et al., 2000). Em tecidos lignificados, a abertura da estrutura da parede celular pode ser muito dificultada em parte pela presença de polímeros de lignina inseridos, o que faz com que polissacarídeos se tornem menos acessíveis às celulasas e hemicelulasas microbianas. A barreira de lignina na ligninocelulose pode ser removida pela utilização de lignina peroxidases, deixando a estrutura mais susceptível ao ataque das celulasas e hemicelulasas (TUNCER et al., 1999).

1.8. Importância Biotecnológica dos Resíduos do Sisal

Anualmente, o uso da biomassa (alimentos, combustíveis, fibras, materiais de construção e muitos outros produtos) gera grandes quantidades de resíduos orgânicos, tais como resíduos agrícolas, resíduos de sisal obtidos após o

processamento das folhas para a obtenção da fibra, resíduos de madeira florestal, obtidos após processamento em indústrias madeireiras, resíduos da indústria papelreira, restos e resíduos do processamento alimentar e resíduos urbanos sólidos (KLASS, 1983; INGRAM & DORAN, 1995).

Uma variedade de problemas ambientais e sociais e a compreensão de que fontes fósseis são limitadas, têm estimulado investigações adicionais de novas tecnologias para converter materiais lignocelulósicos renováveis (resíduos agro-industriais) em etanol combustível e/ou outros substituintes do petróleo, levando em consideração que essa uma fonte alternativa de energia de baixo custo (INGRAM & DORAN, 1995; ARISTIDOU & PENTTILÄ, 2000).

Um dos principais desafios da sociedade no século XXI é conciliar a demanda crescente de energia para a utilização em meios de transporte, aquecimento, processos industriais seguindo o caminho da sustentabilidade. Tendo em vista que as fontes de energia fóssil são limitadas e que seus custos tendem a ser cada vez mais onerosos, somando-se a adição de toneladas de carbono lançadas ao ano na atmosfera, a busca por fontes energéticas ecologicamente corretas vem estimulando pesquisas no mundo todo (HENRIQUES, 2004).

O etanol, amplamente produzido no Brasil a partir da cana-de-açúcar e nos EUA a partir do milho, já é uma fonte alternativa menos poluidora no que se refere a sistemas energéticos sustentáveis. Contudo, toneladas de outras fontes lignocelulósicas são produzidas anualmente, sem receber nenhum destino ou tratamento. Estas fontes podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção do bioetanol, por meio de processos enzimáticos (hidrólise enzimática), físico-químicos e microbiológicos (fermentação alcoólica). Dentre estes resíduos podemos destacar o bagaço da cana-de-açúcar, farelo de trigo, entre inúmeros outros. O bagaço de cana já vem sendo utilizado em fornalhas na geração de energia, embora isso implique na produção de gás carbônico sendo lançado na atmosfera. Assim, agregar valor aos resíduos, tornando-os uma fonte rentável e sustentável de energia, pode ser uma alternativa para reduzir os problemas de aquecimento global que assolam o planeta Terra (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

A fibra do sisal (*Agave sisalana*) contém cerca de 65% de celulose e 12% de hemiceluloses, portanto representa uma fibra resistente para sua utilização em

termos tecnológicos. O sisal é a principal fibra dura produzida no mundo, correspondendo a aproximadamente 70 % da produção comercial de todas as fibras desse tipo. No Brasil, a agaveicultura (cultivo do sisal) se concentra em áreas de pequenos produtores, com predomínio do trabalho familiar. Além de ser fonte de renda e emprego para muitos trabalhadores, o sisal fixa o homem no semi-árido nordestino, sendo esta cultura a principal alternativa para essa região (MEDINA, 1954).

A produção do sisal é destinada principalmente para a extração da fibra, utilizada na manufatura cordas, fios, barbantes, tapetes, sacos e bolsas, entre outros. Também pode ser utilizada na fabricação de pasta celulósica, empregada na confecção do papel Kraft e de outros tipos de papéis finos. Além dessas aplicações, a fibra de sisal pode ser empregada na indústria automotiva, de móveis e eletrodomésticos, na mistura com polipropileno e na construção civil (EMBRAPA ALGODÃO, 2004). Durante o processamento da fibra, são gerados resíduos sólidos e líquidos que atualmente não recebem um destino adequado (SALAZAR & LEÃO, 2006). De acordo com o Sindicato das Indústrias de Fibras Vegetais do Estado da Bahia (SINDIFIBRAS, 2007) no setor sisaleiro nordestino, cerca de apenas 4 % da folha são aproveitadas para a retirada da fibra. O restante constitui os denominados resíduos do desfibramento, compostos pela mucilagem (15 %), suco (80 %) e bucha (1 %).

Dentre as possibilidades de uso desses subprodutos estão o emprego da mucilagem como complemento alimentar de bovinos e caprinos, da bucha como adubo orgânico e do suco para extração de um fármaco que serve como medicamento e pode ser utilizado como bioinseticida, sabonete e pasta cicatrizante. (SALAZAR & LEÃO, 2006) Uma outra viabilidade de utilização dos resíduos sisaleiros seria como matéria-prima para produção de enzimas de importância industrial e também na geração de açúcares redutores para a fermentação alcoólica integrando, de modo sistêmico, toda a cadeia produtiva do sisal. A utilização de enzimas celulolíticas no bagaço do sisal pode promover a quebra das fibras residuais, aumentando o teor de açúcares fermentáveis. Conseqüentemente, o resíduo sólido hidrolizado pode ser considerado uma importante fonte de açúcares para a produção de bioetanol, de forma natural, econômica e ambientalmente correta.

Substratos como melaço de cana, farelos de trigo, milho e arroz podem ser considerados como fontes alternativas de baixo custo para produção de enzimas microbianas como celulasas (NASCIMENTO et al., 2002). As enzimas microbianas apresentam características bioquímicas altamente favoráveis, podendo ser consideradas importantes ferramentas em processos biotecnológicos, especialmente na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos como o sisal.

Assim o presente trabalho poderá agregar valor ao resíduo do sisal através de estudos de hidrólise enzimática para geração de açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol através do estudo da biodiversidade de actinomicetos e seu potencial biotecnológico. Este novo enfoque para a área sisaleira poderá melhorar as condições sócio-econômicas da região, permitindo investimentos futuros no desenvolvimento de novas tecnologias.

Como exposto acima, a manufatura do sisal gera vários resíduos, resultantes da extração da fibra. No entanto, este ainda é um nicho pouco explorado com relação ao isolamento e estudo de micro-organismos com potencial biotecnológico. A rica composição destes subprodutos os torna uma importante fonte de pesquisa na área da microbiologia, especialmente em processos de fermentações. Considerando que a celulose é um dos principais componentes do sisal, o objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e a seleção de micro-organismos produtores de celulase e estudar seu potencial na produção dessa enzima.

CAPÍTULO 2

Bioprospecção de Actinomicetos Produtores de Celulase de Resíduos Agroindustriais

RESUMO

A aplicação biotecnológica de actinomicetos tem sido muito estudada devido à sua capacidade de produzir diversas substâncias de interesse industrial como antibióticos, no setor de alimentos, biocombustíveis e enzimas. Recentemente, a produção de celulase por actinomicetos tem despertado grande interesse devido à aplicação desta enzima na produção de biocombustíveis, especialmente etanol, a partir de material lignocelulósico. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar o isolamento de actinomicetos do solo e de resíduos da cultura do sisal e estudar seu potencial na produção de celulase. Para isso, foram realizadas fermentações submersas em frascos Erlenmeyer contendo meio de sais minerais suplementado com bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de sisal e milhocina, utilizando-se o Delineamento Composto Central Rotacional 3^2 , totalizando 11 experimentos. Dos 166 isolados estudados, 17 foram considerados promissores quanto à degradação da celulose. Contudo, apenas uma estirpe, ARA01, foi selecionada para estudos fermentativos, devido ao seu rápido crescimento. Tanto as fermentações em meio contendo bagaço de sisal quanto bagaço de cana apresentaram boas produções da enzima, embora o bagaço de sisal tenha se mostrado um substrato mais promissor, atingindo 630 U/L contra 260 U/L em bagaço de cana. As análises estatísticas mostraram que a milhocina foi a fonte de nitrogênio que apresentou a maior influência na produção da enzima, pois o aumento de sua concentração elevou significativamente a atividade enzimática, enquanto o aumento da concentração das fontes de carbono não influenciaram na atividade da celulase, na faixa estudada. Assim, os resultados preliminares deste trabalho indicaram que o micro-organismo isolado bem como os substratos empregados tem elevado potencial para produção de celulase.

ABSTRACT

Biotechnological use of actinomycetes has been extensively studied due to its potential to produce diverse substances of industrial interest, such as antibiotics, food products, biofuel and enzymes. Cellulase production by actinomycetes has been studied due to the application of this enzyme for biofuel production, specially ethanol produced from lignocellulose materials. This work had the aim to isolate actinomycetes from soils and residues from sisal and to study its potential as cellulase producing microorganisms. Submerge fermentations were performed in Erlenmeyer flasks containing mineral salt medium supplemented with sugar-cane bagasse, sisal bagasse and milhocin, using the Central Rotational Compound Design 3^2 , with a total of 11 experiments. From 166 studied isolates, 17 were considered having potential as cellulose degrading microorganisms. However, only one strain, ARA01, was selected for fermentation studies due to its rapid growth. Fermentations containing sisal bagasse as well as sugar-cane bagasse showed high enzyme production, however sisal bagasse had shown a better substrate, achieving 630 U/L versus 260 U/L from sugar-cane bagasse. Statistical analysis showed that milhocin was the Nitrogen source with the highest influence over enzyme production, once the increment on its concentration significantly increased enzymatic activity, while the concentration increment of carbon sources had no influence in cellulase activity, within the studied range. Thus, these preliminary results showed that the isolated microorganism, as well as the used substrata, have high potential for cellulase production.

INTRODUÇÃO

Celulases são enzimas que compõem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, gerando sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol.

Estas enzimas começaram a ser estudadas durante a Segunda Guerra Mundial, desde então, cada década foi marcada por significativos avanços em estudos sobre as enzimas do complexo celulolítico. Os progressos das pesquisas sobre celulases ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Ao longo dos anos, e até os dias atuais, contribuições científicas vêm sendo geradas sucessivamente, no que tange ao isolamento de micro-organismos produtores de celulases, e à demonstração produção dessas enzimas por materiais lignocelulósicos.

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, principalmente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre essas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração.

Na região do Semi-Árido Nordeste, o sisal é uma das principais culturas agrícolas. O sisal (*Agave sisalana*), família Agavaceae é utilizada para fins comerciais, sendo uma planta resistente á aridez e ao sol intenso do sertão nordestino. É a fibra vegetal mais dura que existe. O *A. sisalana* é cultivado em regiões semi-áridas. No Brasil, os principais produtores são os estados da Paraíba e da Bahia, neste último, especialmente na região sisaleira, onde está localizado o maior pólo produtor e industrial do sisal do mundo, que é a cidade de Valente, no estado da Bahia. Do sisal, utiliza-se principalmente a fibra cordéis, tapetes das folhas que, após o beneficiamento, é destinada majoritariamente à indústria de cordoaria, porém , somente 4% da planta são aproveitáveis, o restante é descartado como resíduo (SINDIFIBRAS, 2007). Estes resíduos, ricos

em açúcares e material lignocelulósico, é uma fonte potencial para isolamento de microrganismos com potencial biotecnológico, como na produção de enzimas.

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo Geral

Estudar a produção de celulase por actinomicetos isolados da região sisaleira utilizando substratos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de sisal e Milhocina® (Corn Products Brasil), água concentrada resultante da maceração de milho, com teor de proteínas de 25%.

2.1.2. Objetivos Específicos

- Isolar actinomicetos do solo, mucilagem e bagaço do sisal, testando seu potencial biotecnológico na produção de enzimas, especialmente celulase.
- Estabelecer uma coleção de culturas de actinomicetos associados aos resíduos lignocelulósicos do sisal;
- Otimizar a produção de celulase pela estirpe mais promissora, por fermentação submersa, utilizando diferentes substratos como fonte de carbono e nitrogênio.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Isolamento dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram isolados de resíduos de sisal e solo coletados em fazendas produtoras de sisal, localizadas nos municípios de Tiquara, Orolândia, Laje do Batata, Araci, Jacobina e Campo Formoso. A escolha de localidades pertencentes à região semi-árida da Bahia, deve-se ao fato de destacarem-se como grandes produtoras de sisal. Para o isolamento de actinomicetos, 10 gramas de solo e 5 gramas de resíduos lignocelulolíticos do sisal (raízes, mucilagem) foram adicionados individualmente a 90 e 95 mL de solução salina (0,85 %) estéril, contidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, respectivamente. A suspensão foi homogeneizada em agitador rotativo, a 150 rpm por 30 minutos. Foram preparadas diluições seriadas, de 10^{-1} a 10^{-6} , a partir da suspensão original. Os meios de cultura utilizados (agar glicerol-peptona e agar amido caseína, seletivos para actinomicetos) foram esterilizados e adicionado-se 150 mg/L de fluconazol (anti-fúngico), sendo em seguida vertidos em placas de Petri estéreis e após solidificados, alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram espalhadas na superfície do meio utilizando alça de Drigalsky. Foram realizadas 3 repetições de cada diluição.

Após o período de incubação, 166 colônias morfologicamente distintas foram selecionadas e repicadas para os mesmos meios de cultura utilizados no isolamento inicial, objetivando purificar as colônias, empregando-se a técnica de esgotamento. As colônias purificadas foram transferidas para microtubos contendo solução de glicerol a 20% e armazenado em freezer a -20°C .

Para testar a capacidades em degradar celulose (produtores de celulase) pelos actinomicetos isolados, foram realizados plaqueamentos utilizando-se meio mineral de sais cuja única fonte de carbono foi a carboximetilcelulose a 1,0 %. As placas de Petri foram incubadas a 30°C por 12 dias em B. O. D. A revelação da degradação da celulose foi conduzida após adição de solução de Vermelho Congo 1 % (p/v) na placa por 15 minutos, sendo lavada com solução salina 1 M sucessivas vezes até a remoção do excesso de corante e visualização das zonas de hidrólise circunscrevendo a colônia (Figura 3).

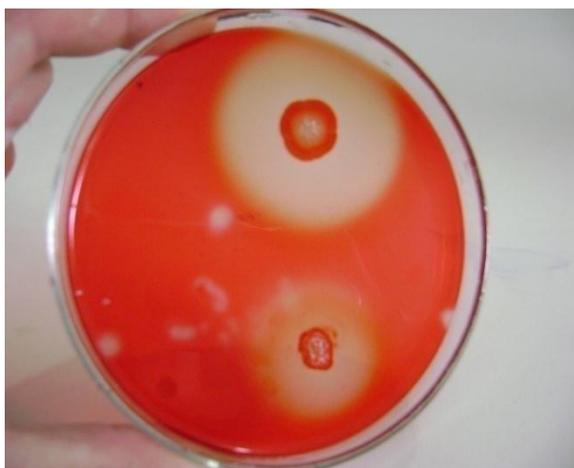


Figura 3: Crescimento de actinomicetos produtores de celulase, em meio mineral de sais contendo carboximetilcelulose a 1% como única fonte de carbono.

2.2.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para estudo da produção de celulase em bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sisal.

Nos ensaios fermentativos para estudo da produção de celulase em meio mineral de sais suplementados com duas fontes de carbono (bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sisal) e uma fonte de nitrogênio (milhocina) utilizou-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 3^2 segundo Rodrigues e Lema (2009), com três repetições no ponto central, onde as variáveis estudadas foram: concentração da fonte de carbono (X1) e concentração da fonte de nitrogênio (X2). Para ajustar as respostas experimentais e utilizar um modelo quadrático, foram acrescentados dois pontos axiais (+1,41 e -1,41), que consiste em um planejamento idêntico, girado de 45° em relação à orientação original. Assim, foram realizados, no total, 11 experimentos, sendo 3 no ponto central e 4 pontos axiais (Tabelas 2 e 3). A variável independente (resposta) foi a produção de celulase (U/L).

Tabela 2: Valores codificados e decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 3^2 para produção de celulase.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Fonte de Carbono (%) (bagaço de cana ou sisal)	0,5	0,8	1,6	2,4	2,7
Fonte de Nitrogênio (%) (milhocina)	0,1	0,3	0,8	1,3	1,5

Tabela 3: Matriz do delineamento com valores codificados e decodificados do Delineamento Composto Central Rotacional 3².

Ensaio	X ₁	X ₂	Fonte de Carbono (%)	Fonte de Nitrogênio (%)
1	-	-	0,8	0,3
2	+	-	2,4	0,3
3	-	+	0,8	1,3
4	+	+	2,4	1,3
5	-1,41	0	0,5	0,8
6	+1,41	0	2,7	0,8
7	0	-1,41	1,6	0,1
8	0	+1,41	1,6	1,51
9	0	0	1,6	0,8
10	0	0	1,6	0,8
11	0	0	1,6	0,8

2.2.3. Fermentações para obtenção de celulase

Antes de iniciar as fermentações, padronizou-se o inoculo para o preparo da suspensão de esporos, segundo a metodologia descrita por Hopwood et al., (1985). Para isso, o isolado ARA 01 foi cultivado em meio de arroz contido em Erlenmeyer de 250 mL, com adição de 1,0 mL de solução salina esterilizada e incubado a 30°C durante 12 dias em estufa B. O. D. (Figura 4).



Figura 4: Suspensão de esporos ARA 01

Após o período de incubação da suspensão de esporos, realizou-seo plaqueamento (por espalhamento na superfície do meio) em triplicata com diluições de 10⁻³ à 10⁻⁸ das colônias em meio de malte a 10 %, e as mesmas foram incubadas a 30° C por 5 dias em estufa B. O. D. (Figura 5). A diluição utilizada foi a 10⁻⁶, pois foi a que apresentou uma média de 70,5 colônias,

estando dentro da faixa recomendada pela metodologia, que é entre 50 e 150. Em seguida foram feitos os cálculos para padronização do inóculo (ARA01), segundo a equação abaixo.

$$C = D \times M \times Fc$$

Onde:

- D: diluição invertida
- M: média de colônias contadas
- Fc: fator de correção do plaqueamento

$$C = 10^{-6} \times 70,5 \times 10$$

$$C = 7,05 \times 10^{-8} \text{ UFC/ mL}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$10^{-8} \times V_i = 10^{-5} \times 50 \text{ mL}$$

$$V_i = 0,05 \text{ mL}$$

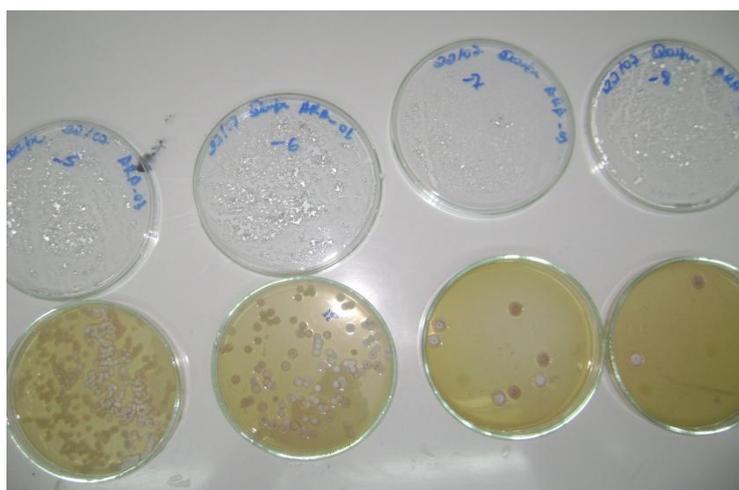


Figura 5: Plaqueamento para padronização do inóculo do isolado ARA01

Para dar início às fermentações utilizando-se o isolado ARA 01, produtor de celulase, foi inoculado 0,05 mL da suspensão de esporos, considerando-se o cálculo de padronização, em 66 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de sais minerais (pH 7.0), composto de (g/L): 3,0 KH_2PO_4 ; 6,0 K_2HPO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 CaCl_2 ; 2,0 NaCl ; 2,6 $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$; 1,0 ml solução de elementos traços (solução em g/100 mL: 0,64 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,15 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,11 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,79 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), além das fonte de carbono e fonte de

nitrogênio, de acordo com a matriz do DCCR 3² (Tabelas 2 e 3). Os frascos foram inoculados de acordo com a metodologia utilizada por Nascimento et al. (2002, 2003) e incubados em “shaker” a 30°C por 6 dias, sob agitação de 180 rpm (Figura 6).



Figura 6: Frascos incubados com o isolado ARA 01, em meio de sais minerais a 30°C por 6 dias, sob agitação de 180 rpm.

Diariamente, as amostras de extrato enzimático (50 mL) foram coletadas no mesmo horário da inoculação, centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos, em seguida filtradas, utilizando filtro de vidro sinterizado e aferidos os valores de pH. Posteriormente, as amostras foram congeladas em frascos de polipropileno de 30 mL esterilizados para a determinação da atividade enzimática (Figura 7).



Figura 7: Extratos enzimáticos do isolado ARA 01.

2.2.4. Determinação do pH

O pH de cada ensaio foi determinado logo após a etapa de filtração pelo método potenciométrico segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.2.5. Determinação da atividade de CMCase

A atividade endoglucanásica (CMCase), foi determinada segundo a metodologia proposta por Ghose (1987), utilizando-se carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto (GHOSE, 1987). Na reação enzimática, utilizou-se 0,5 mL da amostra filtrada e 0,5 mL da solução de CMC a 2% (p/v), preparada em tampão citrato de sódio a 50 mM e pH 4,8. A reação foi incubada em banho Maria a temperatura de 50° C por 20 minutos e interrompida pela a adição de 500 μL do reagente ácido dinitrossalicílico - DNS (MILLER, 1959). Para a reação com o ácido dinitrossalicílico, os tubos foram colocados em banho de água fervente, e, após 5 minutos, foram resfriados em gelo até a temperatura ambiente. As amostras foram então diluídas (6,5 mL de água destilada) para a determinação da absorvância em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de glicose produzida pelas enzimas foi estimada através de coeficientes angulares obtidos a partir de uma curva de calibração de glicose.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1. Isolamento de actinomicetos produtores de celulase

Dos 166 micro-organismos isolados, 86 foram positivos para celulase (Tabela 4). Destes, 17 isolados apresentaram zonas de hidrólise, no meio mineral de sais contendo 1 % de carboximetilcelulose, maiores que 4,1cm de diâmetro. No entanto, para os estudos de produção de celulase por processo fermentativo, foi selecionada apenas a estirpe ARA01, pois foi a que apresentou crescimento mais rápido.

Tabela 4: Produção de celulase por actinomicetos isolados de solo e resíduo de sisal.

Município	Nº de Isolados	Zona de Hidrólise			
		-	+	++	+++
Campo Formoso	22	4	1	13	4
Araci	18	6	3	7	2
Laje do Batata	55	33	12	8	2
Ourolândia	27	17	4	5	1
Tiquara	26	12	1	9	4
Jacobina	18	6	3	5	4

Celulase: () Não houve zona de hidrólise; (+) 0,5 – 1,9 diâmetro; (++) 2,0 – 4,0 cm diâmetro; (+++) > 4,1 cm diâmetro.

2.3.2. Produção de celulase pelo isolado ARA01 em meio de sais minerais suplementado com bagaço de cana-de-açúcar e milhocina.

Respeitando a cinética do processo, para cada ensaio do DCCR foram retiradas amostras em função do tempo para determinação da atividade de celulase e do pH.

A Figura 8 mostra que a maior atividade enzimática ocorreu após o segundo dia no ensaio 4, atingindo 230 U/L (produtividade $Y=115 \text{ U/L.dia}^{-1}$). Embora no ensaio 11 tenha sido atingida uma atividade enzimática maior, 290 U/L, isto ocorreu somente após o sexto dia de cultivo, resultando em uma produtividade de $48,33 \text{ U/L.dia}^{-1}$. Assim, para análise estatística dos resultados foi escolhido o tempo de 2 dias.

Os dados obtidos no presente estudo são superiores aos valores máximos obtidos por Latifian et al., (2007) utilizando o *Trichoderma reesei* em substrato de farelo de arroz (103 U/L.dia^{-1}) No entanto, a comparação dos resultados de diferentes estudos é limitada dada às diferenças do tipo de substrato, micro-organismo e das condições operacionais utilizadas.

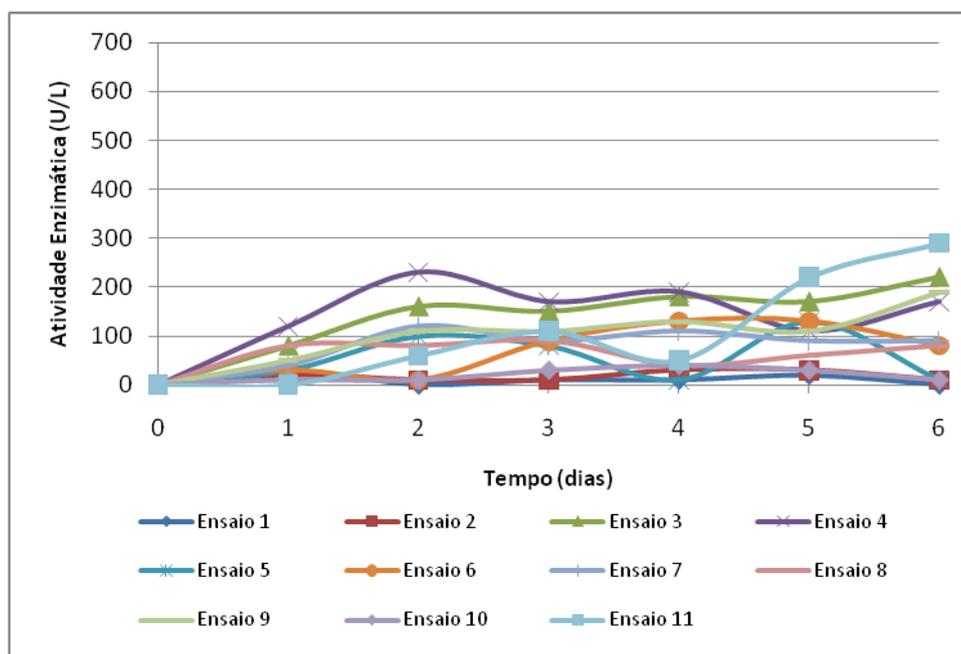


Figura 8: Cinética da produção de celulase pelo isolado ARA01 em bagaço de cana-de-açúcar e milhocina a 30°C por 6 dias.

A Figura 9 descreve os resultados dos valores de pH ao longo de 6 dias em todos os ensaios do DCCR para produção de celulase em meio de sais minerais suplementados com bagaço de cana-de-açúcar e milhocina. Pode-se observar que o pH variou pouco ao longo do tempo, de 6,7 a no máximo, 7,2. Semêdo et al., (2000) encontraram pH ótimo igual a 7,0 para celulases produzidas por *Streptomyces drozdowiczii*. Jan e Chen (2003) também encontraram valores ótimos de produção de celulases de *Streptomyces* T3-1 com pH ótimo igual a 7,0.

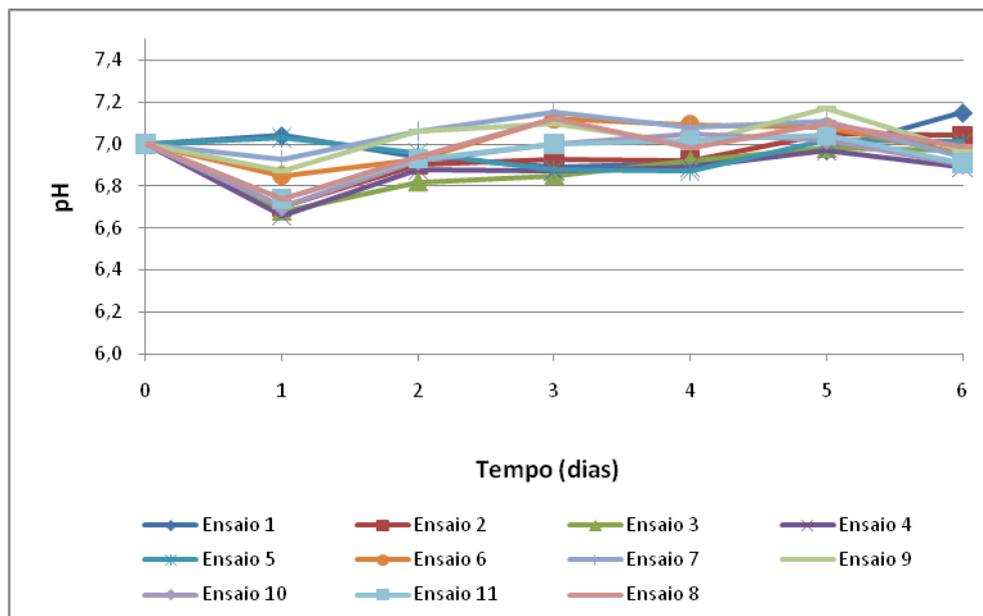


Figura 9: Valores de pH dos extratos enzimáticos do isolado ARA01, cultivado em meio de sais minerais suplementado com bagaço de cana-de-açúcar e milhocina.

A Tabela 5 descreve as produções de celulase pelo isolado ARA 01 em todas as condições de cultivo definidas pelo DCCR. É possível observar que, de acordo com as diferentes concentrações de fonte de carbono e nitrogênio, a produção de celulase variou de 10 U/L (ensaio 7) a 230 U/L (ensaio 4). A maior produção ocorreu nas maiores concentrações de bagaço de cana (2,4 %) e milhocina (1,3 %). Comparando-se os ensaios 2 e 4 é possível observar a influência da concentração de milhocina no aumento da produção de celulase. Nestes ensaios, a concentração de bagaço é a mesma (2,4 %), mas o aumento da concentração de milhocina de 0,3 % (ensaio 2) para 1,3 % (ensaio 4) elevou a produção de celulase em 56%. O mesmo ocorreu com os ensaios 7 e 8, onde o aumento da concentração de milhocina de 0,1 para 1,5 % elevou a atividade enzimática de 10 U/L para 60 U/L, em uma concentração fixa de bagaço de cana.

Da mesma forma, com relação à fonte de carbono, os ensaios 3 e 4 mostram que o aumento da concentração de bagaço de 0,8 % para 2,4 % também influenciou positivamente na produção de celulase, que subiu de 160 U/L para 230 U/L. Os ensaios 5 e 6 confirmam esta tendência, pois o aumento da concentração de bagaço de cana de 0,5 % para 2,75 % elevou a atividade da celulase de 80 U/L para 110 U/L, respectivamente.

Tabela 5: Matriz do delineamento e resposta (atividade enzimática) para produção de celulase em bagaço de cana e milhocina.

Ensaio	X ₁	X ₂	Fonte de Carbono (%)	Fonte de Nitrogênio (%)	Atividade enzimática (U/L)
1	-	-	0,8	0,3	0,0
2	+	-	2,4	0,3	100
3	-	+	0,8	1,3	160
4	+	+	2,4	1,3	230
5	-1,41	0	0,5	0,8	80
6	+1,41	0	2,7	0,8	110
7	0	-1,41	1,6	0,1	10
8	0	+1,41	1,6	1,5	60
9	0	0	1,6	0,8	100
10	0	0	1,6	0,8	100
11	0	0	1,6	0,8	120

No entanto, de acordo com a análise estatística dos resultados, somente o termo linear da concentração de milhocina ($p=0,066856$) foi estatisticamente significativo ($p < 0,1$). Isto significa que o aumento da concentração de milhocina proporcionou um aumento na produção de celulase. Por outro lado, a concentração de bagaço de cana não apresentou valores significativos, mostrando que essa variável não interferiu na produção da celulase na faixa estudada, mas somente a concentração da fonte de nitrogênio (Tabelas 6 e 7).

O valor de R^2 de 0,63625 indica que não houve uma boa correlação entre as respostas preditas e observadas (Figura 11). Porém, comparando-se o valor de F calculado (5,448759) com F tabelado (3,45), é possível concluir que o experimento foi estatisticamente significativo, sendo possível gerar uma equação deste modelo (Equação 1):

$$Y = 106,67 + 26,55x_1 + 8,54x_1^2 + 45,09x_2 - 21,46x_2^2 - 7,50x_1 \cdot x_2$$

Equação 1

Tabela 6: Coeficiente de regressão para a resposta atividade de celulase no tempo de 48 horas.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t (5)	p-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
Efeitos Médios	106,6667	31,54311	3,381615	0,019640	43,1058	170,2276
Bagaço L (1)	26,5533	19,31613	1,374670	0,227644	12,3696	65,4762
Bagaço Q (2)	8,5417	22,99080	0,371525	0,725470	37,7859	54,8692
Milhocina L (2)	45,0888	19,31613	2,334258	0,066856	6,1659	84,0118
Milhocina Q	-21,4583	22,99080	-0,933344	0,393486	67,7859	24,8692
1 x 2	-7,5000	27,31714	-0,274553	0,794642	62,5454	47,5454

L – Linear; Q- Quadrático

Tabela 7: ANOVA para atividade de celulase

Fatores	SQ	GL	QM	F	P
(1) Bagaço (L)	5640,62	1	5640,62	1,889716	0,227644
(2) Bagaço (Q)	412,01	1	412,01	0,138031	0,725470
Milhocina (L)	16264,02	1	16264,02	5,448759	0,066856
Milhocina (Q)	2600,25	1	2600,25	0,871132	0,393486
1 x 2	225,00	1	225,00	0,075379	0,794642
Resíduo	14924,52	5	4885,95		
Total	41018,18	10			

R²; 0,63625; p-valor <0,1%; F_{tab. 0,1%}: 3,45.

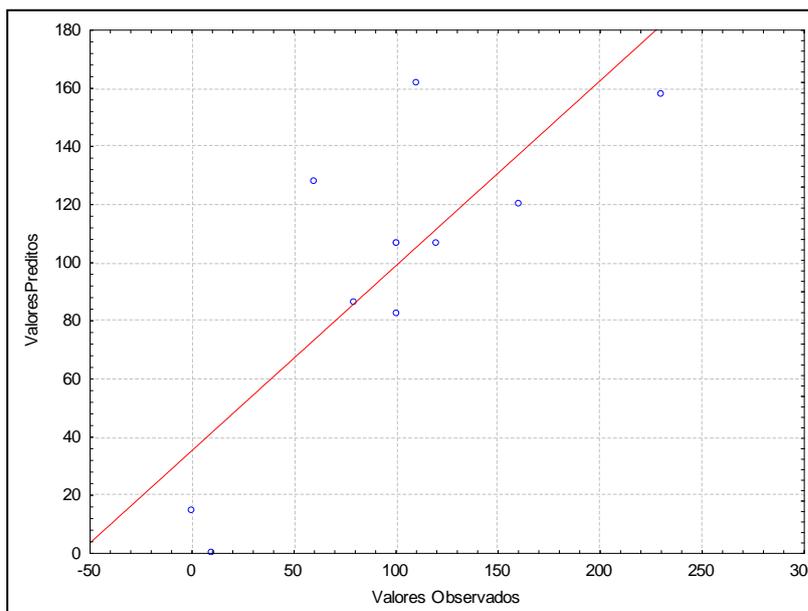


Figura 10: Valores de atividade de celulase obtidos experimentalmente (observados) versus valores preditos pelo modelo da equação I.

Através do modelo foi possível gerar uma superfície de resposta e curvas de contorno (Figuras 11 A e 11B), através das quais pode-se confirmar que as condições de maior concentração de milhocina resultaram em maior valor de atividade enzimática. Essas observações podem ser reforçadas pelo diagrama de Pareto (Figura 12), que mostra que apenas o parâmetro linear da concentração de milhocina foi significativo para a produção de celulase. Nascimento et al. (2009), demonstraram em seu estudo com duas fontes de nitrogênio, milhocina e extrato de levedura, na produção de celulase por *Streptomyces malaysiensis* que as maiores produções da enzima nos cultivos com milhocina. Isto representa uma grande vantagem, pois a milhocina apresenta menos custo em comparação com outras fontes tradicionais de nitrogênio como a peptona e o extrato de levedura. Além disso, apresenta composição rica em nutrientes, principalmente aminoácidos e polipeptídeos, os quais são excelentes fontes de nitrogênio para os micro-organismos. Além disso, estão presentes também vitaminas do complexo B e vários minerais como cálcio, ferro, magnésio, manganês, fósforo, potássio, enxofre, zinco, entre outros.

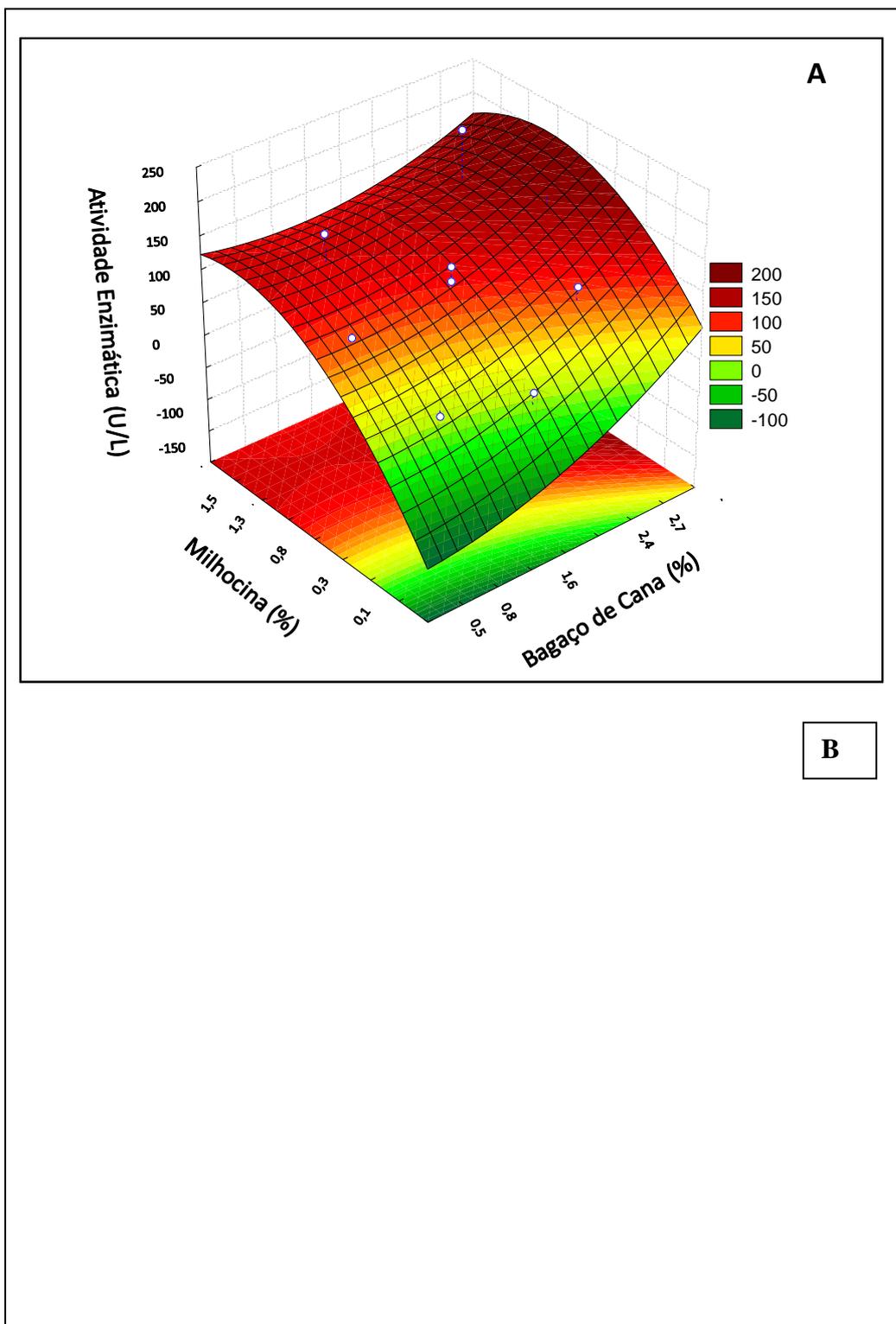


Figura 11: A) Superfície de resposta e B) curvas de contorno para atividade de celulase em função da concentração de bagaço de cana-de-açúcar e milhocina pelo isolado ARA01.

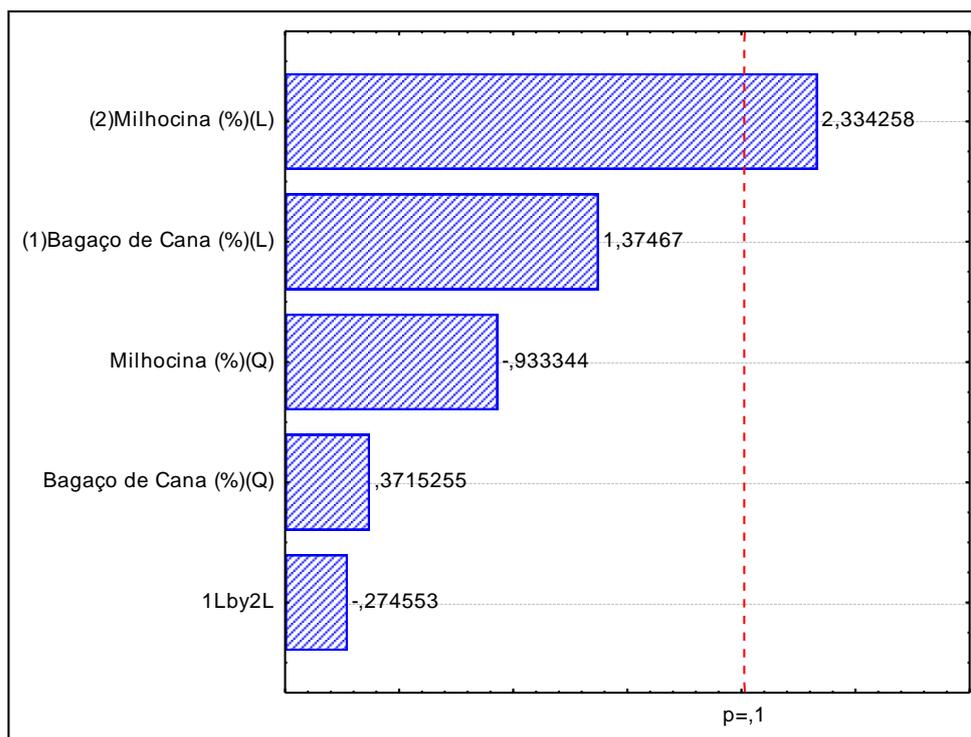


Figura 12: Diagrama de Pareto para atividade de celulase pelo isolado ARA01 cultivado em meio de sais minerais suplementado com bagaço de cana-de-açúcar e milhocina, a 30°C por 6 dias.

A principal desvantagem da milhocina é a sua composição variável, decorrente das variedades e tipo de solo de cultura do milho e processamento do amido.

Embora estatisticamente não significativo, ambas as figuras mostram uma tendência de aumento da atividade de celulase com o aumento da concentração do bagaço de cana. Assim, novos experimentos precisam ser realizados em uma faixa de concentração de bagaço de cana maior para confirmação destes resultados.

2.3.3. Produção de celulase pelo isolado ARA01 em bagaço de sisal e milhocina.

A Figura 13 mostra o perfil cinético da produção de celulase utilizando-se bagaço de sisal como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio. Pode-se observar que os dois melhores ensaio para a produção de celulase foram o ensaio 8, com 630 U/L após 3 dias, e o ensaio 5 com 510 U/L, após 5 dias de cultivo. Como o ensaio 8 apresentou a melhor produtividade, 210 U/L.dia⁻¹

¹, os valores de atividade enzimática deste ensaio, no tempo de 3 horas, foram escolhidos para a análise estatística dos resultados.

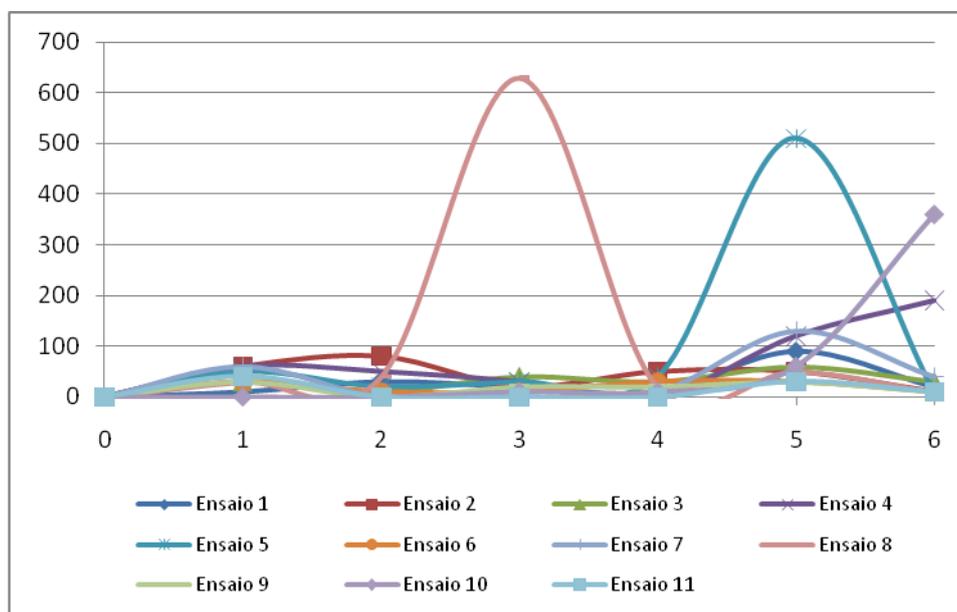


Figura 13: Cinética da produção de celulase pelo isolado ARA01 cultivado em meio de sais minerais suplementado com bagaço de sisal e milhocina a 30°C por 6 dias.

A Figura 14 mostra o perfil do pH ao longo do tempo nos diferentes ensaios fermentativos, onde é possível observar que o pH variou bastante ao longo do tempo, chegando a 8,87 em alguns ensaios. Essa variação é bastante significativa, especialmente considerando-se que o pH está em escala logarítmica, o que significa que aumentou, em média, quase 20 vezes desde o início da fermentação.

O bagaço de sisal é um resíduo bastante alcalino e, mesmo tendo sido neutralizado antes do início das fermentações, este não conseguiu manter o pH constante ao longo do tempo, como aconteceu com o bagaço de cana. Assim, os ensaios que continham as maiores concentrações de bagaço de sisal, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, foram os que atingiram pH mais elevado no final da fermentação, de 8,15 até 8,75. Os ensaios 1, 3 e 5, que continham de 0,5% a 0,8% de bagaço de sisal conseguiram manter o pH relativamente constante durante todo o tempo (Figura 14 e Tabela 8). Ainda assim, a maior atividade enzimática foi atingida em um ensaio com concentração elevada de bagaço de sisal, o que indica que a celulase é resistente a pHs alcalinos. Como mostra estudos realizados por Lima

et al.,(2005), que encontraram celulases de *Streptomyces* com pH ótimo entre 8,0 e 10.

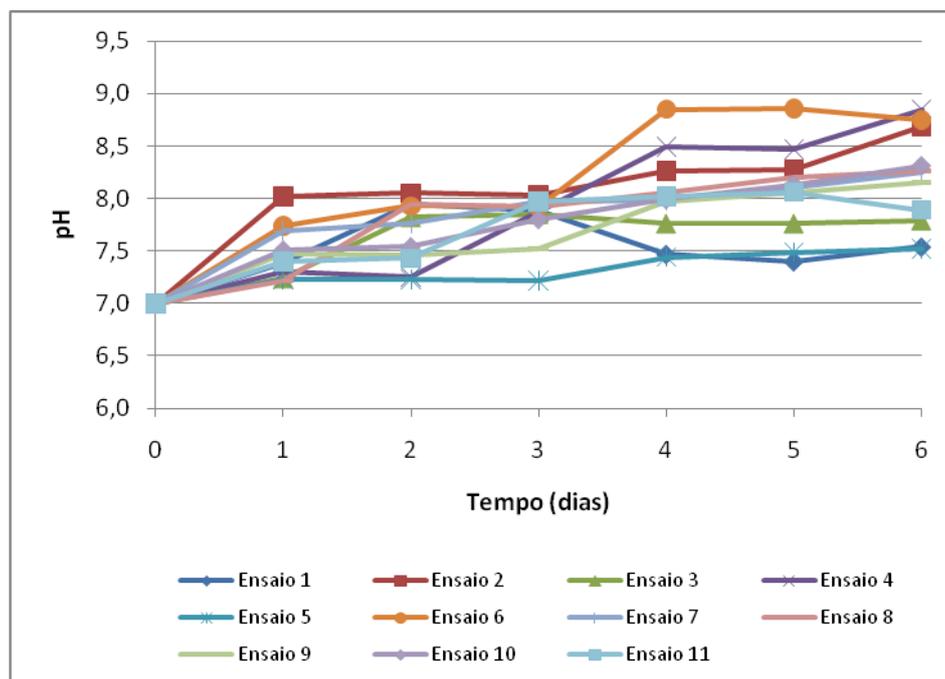


Figura 14: Valores de pH dos extratos enzimáticos do isolado ARA01 cultivado em meio de sais suplementado com bagaço de sisal e milhocina a 30°C por 6 dias.

A Tabela 8 mostra a matriz do delineamento experimental e as atividades enzimáticas obtidas em todos os ensaios do DCCR para o bagaço de sisal e milhocina.

Os resultados mostraram que a maior atividade enzimática foi obtida no ensaio 8 (1,6 % de bagaço de sisal e 1,5 % de milhocina), atingindo 630 U/L. Nos demais ensaios a atividade enzimática apresentou valores significativamente inferiores, na faixa de 10 a 40 U/L. Esta produção foi superior a de *Streptomyces drozdowiczii* que atingiu 595 U/L com carboximetilcelulose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (LIMA et al., 2005), os quais são substratos de custo elevado.

Tabela 8: Matriz do delineamento e reposta (atividade enzimática) para produção de celulase em bagaço de sisal e milhocina cultivada a 30°C por 6 dias.

Ensaio	X ₁	X ₂	Fonte de Carbono (%)	Fonte de Nitrogênio (%)	Atividade enzimática (U/L)
1	-	-	0,8	0,3	20
2	+	-	2,4	0,3	20
3	-	+	0,8	1,3	40
4	+	+	2,4	1,3	30
5	-1,41	0	0,5	0,8	30
6	+1,41	0	2,7	0,8	10
7	0	-1,41	1,6	0,1	10
8	0	+1,41	1,6	1,5	630
9	0	0	1,6	0,8	20
10	0	0	1,6	0,8	10
11	0	0	1,6	0,8	10

Os dados apresentados na Tabela 8 demonstram que o aumento da concentração do bagaço de sisal (ensaios 1 a 7) foi pouco expressivo na produção da celulase. Nestes mesmos ensaios, o aumento da concentração de milhocina influenciou positivamente na produção da enzima, como pode ser observado comparando-se os ensaios 1 e 3, que subiu de 20 U/L para 40 U/L a atividade enzimática, bem como os ensaios 2 e 4, cujo aumento da concentração de milhocina elevou a produção da enzima de 20 para 30 U/L. Porém, pode-se observar que essas concentrações de milhocina, de 0,3 % a 1,3 % não resultaram em produções expressivas da enzima. O ensaio 8, no entanto, comprovou que a milhocina influenciou positivamente na produção da celulase, pois quando sua concentração foi elevada para 1,5 %, a atividade de celulase chegou a 630 U/L.

Pela análise de variância, entretanto, nenhum fator ou suas interações mostraram efeito significativo na produção de celulase, em nível de 90 % de significância. No diagrama de Pareto (Figura 15) isto é confirmado, pois todas as barras encontram-se à esquerda do valor p.

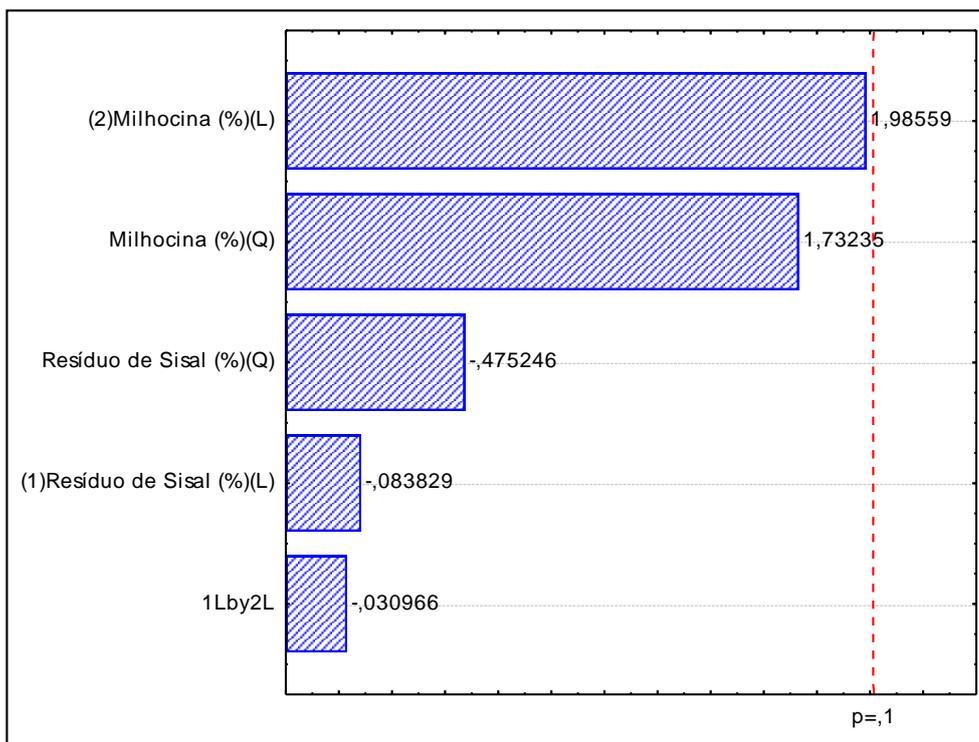


Figura 15: Diagrama de Pareto para atividade de celulase pelo isolado ARA01 cultivado em meio de sais minerais suplementado com bagaço de sisal e milhocina.

Contudo, o parâmetro linear da concentração de milhocina apresentou um p-valor de 0,104333. Considerando a grande variabilidade dos processos microbiológicos, especialmente na produção de enzimas, podemos considerar esta variável estatisticamente significativa ($p < 0,1$) (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Coeficiente de regressão para a resposta atividade de celulase no tempo de 72 horas.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t (5)	p-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	13,3333	93,22280	0,143027	0,891854	-174,515	201,1818
(1) Bagaço (L)	-4,7855	57,08707	0,083829	0,936445	-119,819	110,2477
(2) Bagaço (Q)	-32,2917	67,94721	0,475246	0,654647	-169,209	104,6252
Milhocina L (2)	113,3516	57,08707	1,985590	0,103833	-1,682	228,3848
Milhocina Q	117,7083	67,94721	1,732350	0,143755	-19,209	254,6252
1 x 2	-2,5000	80,73331	0,030966	0,976495	-165,182	160,1815

L- Linear; Q- Quadrático.

Tabela 10: ANOVA para atividade de celulase

Fatores	SQ	GL	QM	F	P
(1) Bagaço (L)	183,2	1	183,2	0,007027	0,936445
(2) Bagaço (Q)	5888,5	1	5888,5	0,225859	0,654647
Milhocina (L)	102788,6	1	102788,6	3,942570	0,103833
Milhocina (Q)	78241,4	1	78241,4	3,001036	0,143755
1 x 2	25,0	1	25,0	0,000959	0,976495
Resíduo	130290,7	3	43430,2		
Total	339272,7	10			

R²: 0,615; p-valor <0,1%; F_{tab. 0,1%}: 3,45.

Desta forma, assim como ocorreu com as fermentações com bagaço de cana, aqui também o aumento na concentração da fonte de nitrogênio elevou a atividade enzimática. A superfície de resposta e as curvas de contorno, geradas pelo modelo, confirmam esta observação, enquanto o aumento na concentração de bagaço de sisal não apresentou influência nesta resposta (Figuras 16A e 16B).

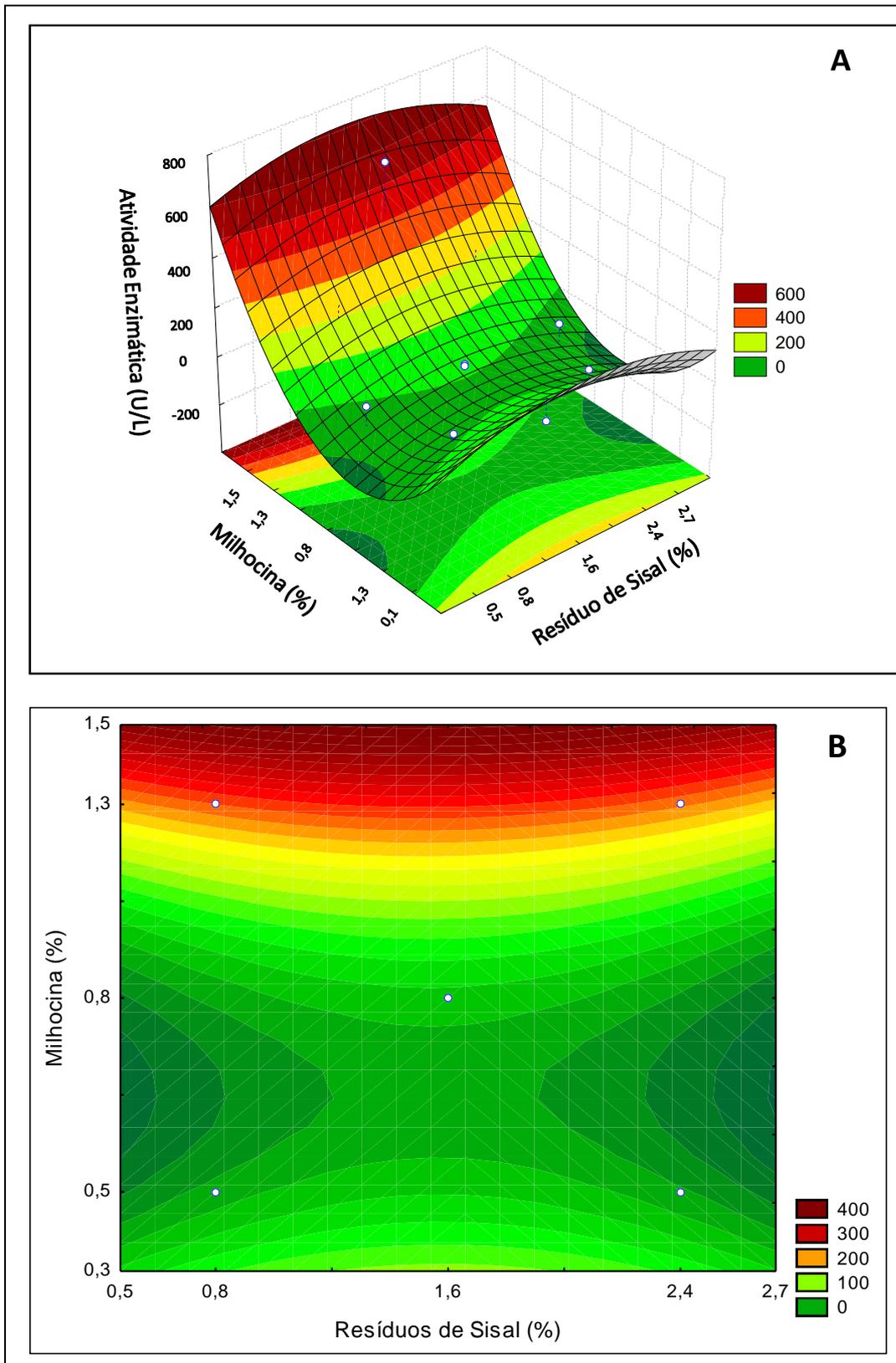


Figura 16: A) Superfície de resposta e B) curva de contorno para atividade de celulase em função da concentração de suco de sisal e milhocina pelo isolado ARA01.

Nos ensaios com bagaço de sisal, o valor de F calculado (3,942570) foi menor que o de F tabelado (5,54), mostrando que o modelo gerado não foi estatisticamente significativo em nível de 90 % (Equação 2). O valor de R^2 (0,615) também foi baixo, revelando falta de correlação entre as respostas observadas e preditas, respectivamente.

$$Y=13,33 -4,79x_1 -32,29x_1^2 +113,35x_2 + 117,708x_2^2 - -2,50x_1.x_2$$

Equação 2

Assim, novos ensaios fermentativos precisam ser realizados para ajuste do modelo e confirmação dos resultados. As elevadas produções de celulase pelo isolado ARA01 tanto no utilizando bagaço de sisal quanto de cana-de-açúcar, justificam a continuidade dos estudos utilizando estes resíduos agroindustriais como substrato.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Celulases são enzimas que estabelecem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, causando sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol. No Brasil as matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas, sendo compreendidas, principalmente, pelos resíduos agroindustriais. Desta forma o processo de produção de enzimas é uma etapa fundamental e limitante para converter por processos enzimáticos os resíduos agroindustriais em etanol, bem como produzir enzimas que possam atuar nas indústrias têxteis, alimentícias, dentre outras. Assim, para uma economia de processo, é importante produzir enzimas com custo mais baixo possível. No presente trabalho foram avaliados dois resíduos agroindustriais, que foram o bagaço de cana e o bagaço e resíduos sólidos do sisal, como substrato para a produção de celulase por actinomicetos. O bagaço de sisal se mostrou como o substrato mais eficiente em termos de produtividade enzimática, principalmente pelo valor protéico em relação ao bagaço de cana. No entanto os dois resíduos avaliados representaram um bom potencial para aplicação na produção de enzimas por Fermentação Semi-sólida, requerendo estudos complementares para ajuste dos parâmetros operacionais do processo fermentativo.

Apesar deste estudo ter sido realizado em laboratórios, em escala de bancada, os resultados alcançados servem como ponto de partida para novos estudos, e o mesmo poderá vir a gerar um impacto representativo, pois viabiliza uma rota tecnológica que permite o aproveitamento de resíduos agroindustriais como material celulósico para a produção de enzimas por actinomicetos.

REFERÊNCIAS

- ALI, B. R. S., ZHOU, L., GRAVES, F., FREEDMAN, R.B., BLACK, G.W., GILBERT, H.J. e HAZLEWOOD, G.P. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. **FEMS Microbiology Letters**. v. 125, 15-22, 1995.
- ANDRADE, D. S.; GOES, K. C. G. P.; AMARAL, H. F.; RIGONATO, J. Caracterização fenotípica de isolados de *Frankia* sp. de Casuarináceas. **Revista Brasileira de Agroecologia/out**. 2007 Vol.2 No.2, Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>. Acesso em: 23 Julho de 2009.
- ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 11, p. 187-198, 2000.
- BAYER, E.A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. **Biodegradation**. v. 3, p.171-188, 1992.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology. Reviews**. v. 13, p. 25-58, 1994.
- BELGHITH, H.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GARGOURI, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. **Journal of Biotechnology**. v.89, 257-262, 2001.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology. Advances**. v. 18, p.355-383, 2000.
- BONFIM, D. B. S. **Tecnologia Enzimática**. São Paulo, Sp. 235-237p. 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrates. Research**. v. 337, p.1291-1296, 2002.
- CHIEN, C.; LEE, W.; LIN, T. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 29, p. 252-257, 2001.
- COONEY, C. L. "Growth of microorganisms", in *Biotechnology*, v. 2, p.,73-112, Rehm, H.J. & Reed, G. eds. 1981.
- CORREIA, A. A. S. Maceração enzimática da polpa de Noni (*Morinda citrifolia* L.). 2010, 106 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Cellulase activity of soils: effect of trace elements. **Soil Biology Biochemistry**. v. 27, n. 7, p. 977-979, 1995.

DONEV, T.; ABRASHEV, I.; RACHEV, R. Investigation of the microbial associations in water basins polluted with oil. **Journal of Culture Collections**, v. 3, 2002, p 38-42.

EMBRAPA ALGODÃO. Embrapa apresenta sisal como suporte na alimentação de rebanho. www.embrapa.br, 2004. Acesso em: 25 Julho de 2009.

GHOSE T. K. Measurements of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. v. 59, p. 257-268, 1987.

GHOSH, B. K.; GHOSH, A. Degradation of cellulose by fungal cellulase. In: **Microbial Degradation of Natural Products**. p. 84-121. G. Winkelman (ed.) VCH. 1993.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. Springer-Verlag, New York. 1999. 359p.

GOI, S. R; SOUZA, F. A.; **Diversidade de Microrganismos do Solo**. EMBRAPA Agrobiologia, vol 1. 2002. 102p.

GRIGOREVSKI-LIMA, A.L., NASCIMENTO, R.P., BON, E.P.S.; COELHO, R.R.R. Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 272-277, 2005.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol the fuel of tomorrow from residues today. **Trends in Biotechnology**. v. 24, p. 549-556, 2006.

HENRIQUES, R. M. Aproveitamento energético dos resíduos sólidos urbanos: uma abordagem tecnológica. 2004, 204 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

INGRAM, L. O.; DORAN, J. B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 16, p. 235-241, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1985, V1: Métodos físicos e químicos para análise de alimentos.

JAN, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from Streptomyces transformant T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.19., p.263-268, 2003.

KIM, B.; AL-TAI, A. M.; KIM, S. B. SOMASUNDARAM, P. e GOODFELLOW, M. *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. Inter. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 50, p. 505-509, 2000.

- KLASS, D. L. **Energy and synthetic fuels from biomass and wastes**. In: Handbook of energy Technology and Economics, p. 712-788, MEYERS, R. A. (ed), Wiley, 1983.
- LAM, K.S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion of Microbiology**. v. 9, n.3, p. 245-251, 2006.
- LANDAUD, S.; PIQUEREL, P. e POURQUIÉ, J. Screening for bacilli producing cellulolytic enzymes active in neutral pH range. **Letters Applied Microbiology**. v. 21, 319-321, 1995.
- LEQUART, C.; RUEL, K.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; KURET, B. Abiotic and enzymatic degradation of wheat straw cell wall: a biochemical and ultrastructural investigation. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p. 249-259, 2000.
- LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37., p.272-277, 2005.
- LYMAR, E. S., LI, B.; RENGANATHAN, V. Purification and characterization of a cellulose - binding β -glucosidase from cellulose - degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 61, n. 8, p. 2976-2980, 1995.
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G. S.; POMELLA, A. W. V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauete expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa phytopathol.** , Botucatu, v. 34, n. 1, 2008
- MEDINA, J. C. **O sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 286p., 1954.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.
- MORAES, R. N. S. **Decomposição das palhadas de sorgo e milho, mineralização de nutrientes e seus efeitos no solo e na cultura do milho em plantio direto**. 2001, 90p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo- 2ª Edição**- Editora UFLA, 2006.
- MUSSI, M. M.; KOROLKOVAS, ANDREJUS . Fármacos para microrganismos do aparelho respiratório. RBM - **Revista Brasileira de Medicina**, Editorial Moreira Jr., SP, v. 51, n. 11, p. 1656-1674, 2007.
- NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S., ALVES, L., GÍRIO, F. M., BON, E. P. S. e AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial

characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian Cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, 549-555, 2002.

NASCIMENTO, R. P.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F.; COLLAÇO, M. T. A.; SACRAMENTO, D. R.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. A novel strain of *Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo-b-1,4-xylanase titres. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 879-881, 2003.

NASCIMENTO, R. P. COELHO, R. R. R. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: Elba P. S. Bom; Maria Antonieta Ferrara; Maria Luisa Corvo; Alane B. Vermelho; Carmem L. A. Paiva; Ricardo B. Alencastro; Rosalie R. R. Coelho. (org). *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, v. 1, p. 71-94.

NASCIMENTO, C. B. Isolamento de Microorganismos Endofíticos da Rizosfera de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e Análise da Diversidade Genética, Antimicrobiana e celulolítica, **Revista de Biologia Neotropical**. v. 3, n. 2, p. 187-188. 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2006.

PARK, J. P.; BAE, J. T.; YOU, D. J.; KIM, B. W.; YUN, J. W. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from *Xanthomonas* sp. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, p. 1043-1046, 1999.

PÉREZ-PONS, J. A., REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Induction and preliminary characterization of intracellular β -glucosidases from a cellulolytic *Streptomyces* strain. **FEMS Microbiology Letters**. v.128, 235-239, 1995.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. **Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose and enzymes required for hydrolysi**. In: Hemicelluloses and hemicellulases. Coughlan, M.P.; Hazlewood, G.P. (eds) p. 1-28. Portland Press, London, 1993.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**: Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 316 p.

SALAZAR, V. L. P.; LEÃO, A. L. **Biodegradação das fibras de Coco e de Sisal aplicadas na indústria automotiva**. São Paulo- Sp. 2006.

SANT'ANA JR, GL. **Produção de enzimas microbianas**. In: LIMA, U.A. (Coord.) *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 1 ed., v. 3., São Paulo, 2001;

SCHMIDELL, W. **Agitação e aeração em biorreatores**. IN: SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*, v.2, Edgard Blücher Ltda., p.277-331, 2001.

SINDIFIBRAS – **Sindicato das Indústrias de Fibras Vegetais da Bahia**.
www.brazilsisal.com., 2007.

SINGH, A. & HAYASHI, K. Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**. v. 40, p. 1-44, 1995.

SIQUEIRA, O. J.; MOREIRA, F. S. M. **Microbiologia e bioquímica do solo - 2ª EDIÇÃO**. Editora UFLA, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R., CASE, C. L.. **Microbiology** - An Introduction, California: Addison Wesley Longman, Inc., 832p.1997.

VOBIS, G. In: **Atlas of Actinomycetes**. Hamada, M., Hotta, K., Kudo, T., Seino, A., Vobis, G.; Yokoto, A. (eds.) pp. 178–191. Asakura Publishing Co. Ltda. Tokyo. 1997.

WACHINGER, G., BRONNEMMEIER, K., STAUDENBAUER, W. L. & SCHREMPF, H. Identification of mycelium - associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 55, p. 2653-2657, 1989.

WHEELER, K. G., and MILLER, J. G. **The relocation decision: Transfers within the organization versus moving to a new organization**. Paper presented at the Southern Management Meetings. 1999.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: **Methods in Enzimology**. Academic Press Inc., Publishers, N.Y. v. 160, n. 87, p. 87-112, 1998.

WOOD, T. M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**. v. 1, p. 147-161, 1990.