

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

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE SOLOS
NO ESTADO DA BAHIA E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

ALINE SIMÕES DA ROCHA BISPO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

NOVEMBRO – 2010

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE SOLOS
NO ESTADO DA BAHIA E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

ALINE SIMÕES DA ROCHA BISPO

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, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento

Co-Orientador: Rosalie Reed Rodrigues Coelho

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

NOVEMBRO - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

B622 Bispo, Aline Simões da Rocha.

Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no Estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas. / Aline Simões da Rocha Bispo. Cruz das Almas - Ba, 2010.

107f.; il.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento.

Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

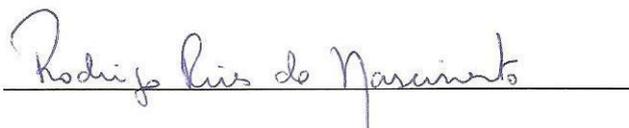
Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

1.Microbiologia. 2.Microorganismos do solo. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 631.417

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

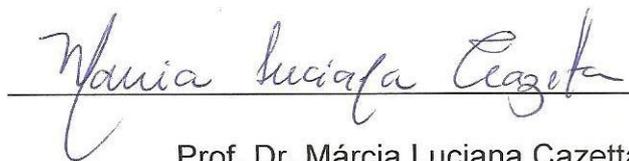
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ALINE SIMÕES DA ROCHA BISPO



Prof. Dr. Rodrigo Pires do Nascimento
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)



Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida
Universidade Estadual de Feira de Santana



Prof. Dr. Márcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
NOVEMBRO - 2010

***Á Deus, por todas as proações de existência, que se tornaram
verdadeiras lições de vida.***

***Dedico aos meus pais, João e Ivete, e meus irmãos, Alex e Lucas, por
todo amor, incentivo e carinho dedicados durante minha vida.***

AGRADECIMENTOS

Este trabalho se constitui parte de um amplo projeto, cujo objetivo principal é estudar o potencial biotecnológico de actinomicetos isolados de diferentes solos do estado da Bahia. E este objetivo só foi alcançado devido ao auxílio de algumas pessoas e instituições, às quais gostaria de agradecer em especial.

Primeiramente, agradeço a Deus, por guiar meus passos para concretização desta etapa, e por ter me orientado a fazer a escolha certa. Agradeço também pela família que me deste, em especial, meu pai, João Bispo, e minha mãe, Ivete Simões, pelo amor incondicional, pela confiança depositada e pela pessoa que sou hoje. Ao meu irmão Lucas, por acreditar no meu potencial, pelo amor e irmandade, e ao meu irmão Alex, por tudo que representa em minha vida e por todo amor. Eu amo vocês mais que tudo nessa vida!

Ao meu namorado Vinicius, pelo amor, companheirismo, compreensão, incentivo, e por sempre ter me dado forças em seguir em frente, diante dos obstáculos encontrados.

Agradeço ao meu orientador, o prof. Dr. Rodrigo Pires do Nascimento, pelo constante incentivo, pela confiança depositada e carinho sempre demonstrado.

A minha co-orientadora, a Prof^a. Dr^a. Rosalie Reed Rodrigues Coelho pela parceria e pelo auxílio sempre que requisitado.

A Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues, pelos ensinamentos do uso da ferramenta estatística aplicada neste trabalho, pela atenção que sempre foi dada, e principalmente, pelo exemplo de pessoa que és.

A Prof^a. Dr^a. Márcia Luciana Cazetta, pelo apoio e disponibilidade em sempre me ajudar.

Ao pesquisador Dr.Éder Jorge, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, por ter disponibilizado o laboratório de Biologia Molecular para conclusão deste

trabalho, em especial ao técnico Raimundão, por toda disponibilidade e atenção dada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB e Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade, em especial, ao coordenador, o Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza pela competência em administrar o curso, e por todo apoio concedido durante o mestrado para que eu pudesse aprofundar meus conhecimentos.

As secretárias da Pós-graduação, Amália, Renata e Reijane, por todo apoio e pela disponibilidade sempre em ajudar, muito obrigada mesmo!

Agradeço carinhosamente, a toda minha família por acreditar nos meus sonhos e me apoiar nas minhas escolhas. A minha vovó Lady, pelo amor, pelas orações e palavras de conforto sempre ditas.

Aos meus “sogrinhos” (Tio César e Tia Quinha) e tios, Nete e Val, por todo amor e incentivo, e principalmente, por me acolherem como uma filha.

A todos os amigos que encontrei no mestrado, Adailson (pela linda amizade que construímos, pela confiança, e amor para sempre, você é meu orgulho!), Manuela (pelo laço forte de amizade, por tudo que vivemos juntas, pela companhia e cumplicidade), Patrícia (por “tão” rápido conseguirmos construir uma linda e verdadeira amizade), Dayse (“DDzinha” linda que eu me apaixonei, por tudo que vivemos, por ser sempre prestativa e por todos os risos), Adri (por todo carinho e por tudo que vem do coração), Lore (pela confiança e amizade), Jackeline, Neide, Carol, Rafael, Mateus e os agregados, “Augustinho” (por estar sempre disposto a ajudar), Tamara e “Juanito”, pelo carinho e por todos os momentos que vivemos juntos, principalmente, os de descontrações e “farras”.

Ao Núcleo de Estudos em Microbiologia Aplicada (NEMA), em especial, as amigas Cris, Lica e Mari, pelo apoio, carinho e amizade. A técnica, Lene, pelo incentivo, pela disposição em ajudar a melhorar a condução dos trabalhos, pelo carinho e amizade sempre demonstrados.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIOM), em especial, a Danilo e Jack, pela constante colaboração, e pelo carinho e amizade sempre demonstrados.

Aos meus grandes amigos, Branca (minha irmã de alma), Helen e Diego, pela fortaleza que é a nossa amizade, pela confiança demonstrada em qualquer situação, por toda nossa história e amor.

Agradeço carinhosamente a Jana, pelas palavras, pela amizade e carinho demonstrados, e a “Papai”, pela irmandade e amor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro dispensado durante a realização deste trabalho.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
1. Os actinomicetos e sua importância biotecnológica.....	03
2. Biomassa lignocelulósica	06
3. Enzimas lignocelulolíticas	10
4. Micro-organismos celulolíticos	13
5. Aplicações biotecnológicas das enzimas	16
6. Mercado mundial de enzimas	18
7. Estratégias de produção de celulasas	20
8. Otimização e Desenho experimental	23
CAPÍTULO 1	
Isolamento e seleção de actinomicetos produtores de celulasas e xilanasas isolados de diferentes solos da região do semi-árido baiano.....	26
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	36
CAPÍTULO 2	
Produção e caracterização de celulasas em resíduos agro-industriais.....	39
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	44
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS	84

RESUMO

BISPO, A. S. da R. Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas com crescimento filamentososo, habitualmente encontrado em diversos ambientes, incluindo, água, ar, material em compostagem, e outros, sendo o solo o seu reservatório mais comum. São de grande interesse industrial devido a sua capacidade de produzir diferentes antibióticos e uma variedade de enzimas capazes de hidrolisar substratos contendo celulose, hemicelulose e lignina. Anualmente, a agricultura gera grandes quantidades de resíduos orgânicos, criando uma variedade de problemas ambientais e sociais, e esta situação têm estimulado o uso de tecnologias capazes de converter materiais lignocelulósicos em etanol. Diante desse panorama, o presente trabalho teve por objetivo isolar e selecionar actinomicetos de diferentes solos do estado da Bahia, produtores de enzimas de interesse industrial e avaliar seu potencial biotecnológico. Foram isolados 196 actinomicetos de 5 diferentes amostras de solo, sendo 111 celulolíticos e 97 xilanolíticos. A estirpe CDPA-01, identificada como *Streptomyces* sp. foi selecionada como a mais promissora quanto a produção de celulasas. A produção da enzima foi conduzida em Fsm, utilizando três diferentes fontes de carbono (farelo de aveia, carboximetilcelulose e bagaço de cana de açúcar) sob concentrações variadas e uma única fonte de Nitrogênio (Milhocina), através do delineamento central composto rotacional, DCCR (11 ensaios). A maior produção de celulase ($0,740 \text{ U.mL}^{-1}$) foi observada quando se utilizou 1,6 % de bagaço de cana e 1,51 % de milhocina, no ensaio 8, ao final de 5 dias de fermentação. Após a validação, a melhor atividade dos extratos foi caracterizada e a temperatura e pH ótimos foram $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e 4,0, respectivamente, a enzima se mostrou termoestável a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e os íons testados não agiram como co-fatores na atividade enzimática. Assim, os resultados preliminares deste trabalho indicam que o micro-organismo estudado bem como os substratos empregados tem elevado potencial para produção de celulase.

Palavras-chave: celulasas, biotecnologia, lignocelulose

ABSTRACT

BISPO, A. S.da R. Bioprospecting of actinomycetes isolated from soils in the state of Bahia and its biotechnological potential production of enzymes lignocellulolytic

Actinomycetes are Gram-positive bacteria with filamentous growth, usually found in diverse environments, including water, air, composting material, and others, and soil your shell more common. The major industrial interest due to its ability to produce different antibiotics and a variety of enzymes capable of hydrolyzing substrates containing cellulose, hemicellulose and lignin. Annually, farming generates large amounts of organic residues, creating a variety of environmental and social problems, and this situation has encouraged the use of technologies capable of converting lignocellulosic materials into ethanol. Against this backdrop, this study aimed to isolate and select actinomycetes in different soils of Bahia, producing enzymes of industrial interest and evaluate their biotechnological potential. 196 actinomycetes were isolated from five different soil samples, and 111 cellulolytic and 97 xylanolytic strains. The CDPA-01 strain, identified as *Streptomyces* sp. was selected as the most promising as the production of cellulases. The enzyme production was conducted in Submerged Fermentation, using three different carbon sources (oat bran, carboxymethylcellulose and sugarcane bagasse) under varying concentrations and a single source of nitrogen (Milhocina) by central composite design, CCRD (11 trials). The higher production of cellulase (0.740 U.mL^{-1}) was observed when using 1.6% (w/v) sugarcane bagasse and 1.51% (w/v) of corn steep liquor, 8 in the test, after 5 days of fermentation. After validation, the best activity of the extracts was characterized and the optimum temperature and pH were 60 °C and 4.0, respectively, the enzyme proved to be thermostable at 50 °C and the ions tested did not act as cofactors in enzymatic activity. Thus, the preliminary results of this study indicate that the micro-organism studied and the substrate used has a high potential for production of cellulase.

Keywords: cellulase, biotechnology, lignocellulose

INTRODUÇÃO

Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo assim, para a redução de problemas ambientais. Um bioprocessos que vêm sendo muito aplicado para obtenção de enzimas é o cultivo submerso, com agitação ou não. Este processo apresenta vantagens como facilidade no controle de variáveis físico-químicas e maior eficiência de absorção de nutrientes.

As enzimas têm atraído uma crescente atenção devido ao seu potencial para o uso em diversas aplicações. Desta forma, estudar a produção de celulasas, objetivando a minimização dos custos de processo e visando sua comercialização é de grande valia para o mercado mundial de enzimas. Vários trabalhos vêm sendo realizados com estas enzimas no âmbito industrial, ambiental e agrícola, em especial na indústria de papel e celulose, têxtil, detergentes, biocombustível, aproveitamento de resíduos agro-industriais e promoção de crescimento em culturas agrícolas de importância econômico-social para a região. Um grupo de enzimas presentes nas mais diversas aplicações são as celulasas, que degradam a celulose, o carboidrato mais abundante sintetizado pelos vegetais. As enzimas celulolíticas são produzidas por uma gama de micro-organismos, principalmente os actinomicetos. Estes são importantes no processo de bioconversão, pois são capazes de colonizar diferentes substratos complexos e hidrolisar vários polímeros.

No primeiro capítulo deste trabalho, apresenta-se a importância de realizar a bioprospecção de actinomicetos em diferentes ambientes brasileiros, e avaliar o potencial biotecnológico com relação à produção de enzimas de interesse industrial e ambiental como as celulasas e xilanases. Foram isoladas

196 diferentes estirpes de actinomicetos, sendo 111 produtores de celulasas e 97 de xilanases.

No capítulo 2, dando continuidade ao observado no capítulo 1, foi selecionada a estirpe mais promissora e investigada a produção de celulasas utilizando diferentes substratos em fermentação submersa através do planejamento fatorial completo 2^2 , com duas variáveis. Em seguida, foi feito a otimização do processo de produção enzimática para conduzir ao processo de caracterização enzimática obtendo, assim, as melhores condições de atividade da enzima, com relação a temperatura e pH.

Objetivo Geral:

Isolar, selecionar e caracterizar actinomicetos produtores de enzimas de interesse ambiental e industrial, visando à aplicação no aproveitamento de resíduos agro-industriais para produção de enzimas.

Objetivos Específicos:

- Isolar estirpes de actinomicetos de diferentes solos e ambientes do estado da Bahia.
- Selecionar as estirpes promissoras quanto à produção de celulasas e xilanases.
- Quantificar as atividades de celulasas da estirpe mais promissora.
- Através do planejamento fatorial completo com duas variáveis, investigar o efeito de diferentes substratos de baixo custo, em diferentes concentrações, para produção de enzimas.
- Determinar as melhores condições de temperatura e pH para as atividades enzimáticas no extrato bruto, bem como sua termoestabilidade e efeito de íons metálicos.
- Identificar a estirpe promissora em nível de gênero.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Os Actinomicetos e sua Importância Biotecnológica

Os actinomicetos são bactérias filamentosas Gram-positivas, que apresentam DNA rico em guanina e citosina (G+C > 72%, no gênero *Streptomyces* e G+C de 64 a 72% no gênero *Nocardia*) possuindo a capacidade de formar hifas em algum estágio de seu desenvolvimento e apresentando grande diversidade de características morfológicas (Fig. 1) (LEBLOND e DECARIS, 1994). As colônias de actinomicetos são formadas por uma massa de hifas, constituindo o micélio. Essa massa é formada a partir do desenvolvimento inicial de esporos, esporângios ou fragmentos de hifas em meio sólido, constituindo primeiramente o micélio vegetativo, de caráter hidrofílico. Crescendo verticalmente, algumas estirpes de actinomicetos diferenciam seu micélio vegetativo em micélio aéreo, de caráter hidrofóbico, o que provoca uma alteração nas características morfogênicas, fisiológicas e ultraestruturais (VOBIS, 1997).

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 (COELHO e NASCIMENTO et al., 2008). Eles têm sido descritos como os principais produtores de antibióticos no solo, e também como um dos principais grupos microbianos produtores de enzimas de interesse comercial, incluindo importantes enzimas industriais envolvidas na degradação lignocelulósica (JANG e CHEN, 2003; GRIGOREVSKI-LIMA et. al., 2005).

A instabilidade genética é uma característica bastante encontrada nos actinomicetos, podendo a frequência de mutação chegar a pelo menos 1 em cada 10^3 células no gênero *Streptomyces*. Assim sendo, a maioria das características fenotípicas relacionadas à diferenciação e metabolismo secundário são geneticamente instáveis, tais como: formação de micélio aéreo, pigmentação, esporulação, resistência a agentes genotóxicos e resistência e/ou produção de antibióticos e enzimas (LEBLOND e DECARIS, 1994).

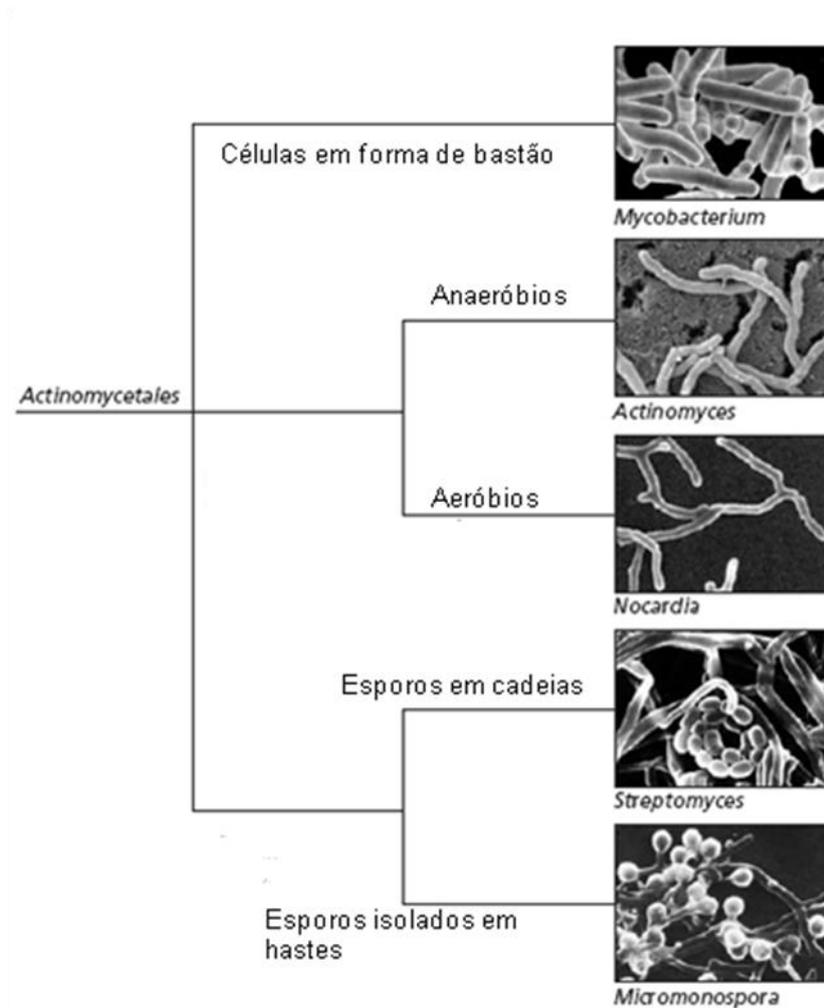


Figura 1- Classificação dos actinomicetos.
Fonte: Hopwood, 2007.

A heterogeneidade bioquímica dos actinomicetos, sua diversidade ecológica e sua capacidade para a produção de metabólitos secundários os fazem um bom alvo para a produção de enzimas, desempenhando novas atividades e/ou especificidades (GOODFELLOW et al., 1988). As enzimas produzidas pelos actinomicetos são capazes de degradar compostos nitrogenados orgânicos, carboidratos, vários esteróides como colesterol, uma variedade de compostos aromáticos, acetileno e muitos outros. Estudos recentes vêm apontando os actinomicetos como fontes emergentes promissoras de uma ampla faixa de importantes enzimas de interesse industrial e ambiental, como aquelas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos (GOODFELLOW et al., 1988; FLORES et al., 1997). A decomposição dos resíduos lignocelulósicos pelos actinomicetos os fazem

potenciais fontes para a bioconversão de resíduos em substâncias químicas de interesse industrial (PIRET e DEMAÏN, 1988). Os actinomicetos isolados de solo têm sido descritos como fonte de importantes 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. Entre as enzimas de alto interesse comercial estão as glicosidases como, por exemplo, amilases, celulasas, xilanases e quitinases, todas importantes na degradação da biomassa (NASCIMENTO et al., 2002; SEMÊDO et al., 2004).

Os actinomicetos estão adaptados a se desenvolverem em substratos sólidos. Suas fontes primárias de carbono no solo são de baixa solubilidade e poliméricos, necessitando da secreção de uma série de enzimas extracelulares, quando ocorre a colonização do substrato pelas hifas (PIRET e DEMAÏN, 1988). As celulasas, por exemplo, são capazes de degradar a celulose, podendo ser úteis nas indústrias têxteis e de detergentes, mas também possuem aplicações na área ambiental, auxiliando no tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose. Podemos citar ainda as xilanases que são responsáveis pela degradação das xilanas, utilizadas em indústrias de alimento e papelaria, para a fabricação de produtos dietéticos e clareamento de polpas de papel, respectivamente (STUTZENBERGER e BODINE, 1992; BRECCIA et al., 1995). Além disso, estas desempenham um papel importante na decomposição de hemicelulose em solos e na recuperação de açúcares fermentáveis a partir de hemiceluloses (BELFAQUIH e PENNINGCKX, 2000; STUTZENBERGER e BODINE, 1998). Temos ainda as quitinases, que são responsáveis pela degradação da quitina, o polímero aminado mais abundante na natureza, e encontrado em crustáceos, fungos e insetos. Estas enzimas vêm sendo utilizadas como controle biológico no combate a fungos fitopatogênicos (GUPTA et al., 1995). Já as proteases, que apresentam variadas classes, em especial, metalo e serina proteinases, agem sobre uma gama de substratos protéicos, sendo aplicadas na indústria do couro, tratamento de efluentes e vários processos de biorremediação (BÖCKLE et al., 1995; MOHAMEDIN, 1999). Dentre os actinomicetos, as espécies termofílicas *Thermonospora* e *Thermoactinomyces* e a mesofílica *Streptomyces*,

correspondem a parte importante da comunidade microbiana responsável pela degradação lignocelulósica, sendo a atuação de suas enzimas semelhante às celulasas fúngicas (LYND et al., 2002).

2. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o principal recurso renovável disponível no meio ambiente (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). A lignocelulose forma a parede celular dos vegetais e é constituída de celulose (polímero de glicose - cerca de 44 % da biomassa lignocelulósica), hemicelulose (heteropolímero formado por pentoses, correspondendo cerca de 30 % da biomassa lignocelulósica) e lignina (macromolécula de origem fenólica, correspondendo a cerca de 15 % da biomassa lignocelulósica) (BASTOS, 2007), como pode ser observado na Tabela 1. As propriedades químicas dos componentes da lignocelulose fazem deste substrato um composto de um enorme valor biotecnológico (MALHERBE e CLOETE, 2003), o que tem incetivado seu uso como fontes promissoras na produção de enzimas.

Tabela 1- Conteúdo lignocelulósico de resíduos agrícolas e resíduos comuns.

Material Lignocelulósico	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Madeira "Hardwood"	40-55	24-40	18-25
Madeira "Softwood"	40-50	25-35	25-35
Sabugo de Milho	45	35	15
Palha de Trigo	30	50	15
Palha de Arroz	32.1	24	18
Semente de Algodão	80-95	5-20	0
Resíduo de Papel de Polpas Químicas	60-70	10-20	5-10
Gramíneas	25-40	25-50	10-30

Fonte: HOWARD et.al. (2003).

A celulose é muito rígida e podem ser encontrados em sua estrutura cerca de 8000–12000 moléculas de glicose conectadas por ligações β -1,4 (ARISTIDOU e PENTTILÄ, 2000; SAHA et al., 2004). As hemiceluloses são polissacarídeos não-celulósicos que são encontrados em tecidos vegetais, compostos de polímeros complexos de carboidrato, onde as xilanas e as glucomanas são os principais componentes (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). Os polímeros de carboidratos que fazem parte das hemiceluloses são compostos principalmente pelos açúcares D-glicose, D-xilose, D-manose, D-galactose, D-arabinose e D-ácido glicurônico (ROWELL et. al., 2005).

A lignina é um polímero altamente ramificado, composta basicamente de unidades de fenilpropano, acoplados de forma irregular, formando assim uma molécula tridimensional e amorfa. Esta estrutura cobre a celulose e hemicelulose (Fig. 2), dando origem a uma barreira física que previne a penetração de soluções e enzimas (HOWARD et al., 2003).

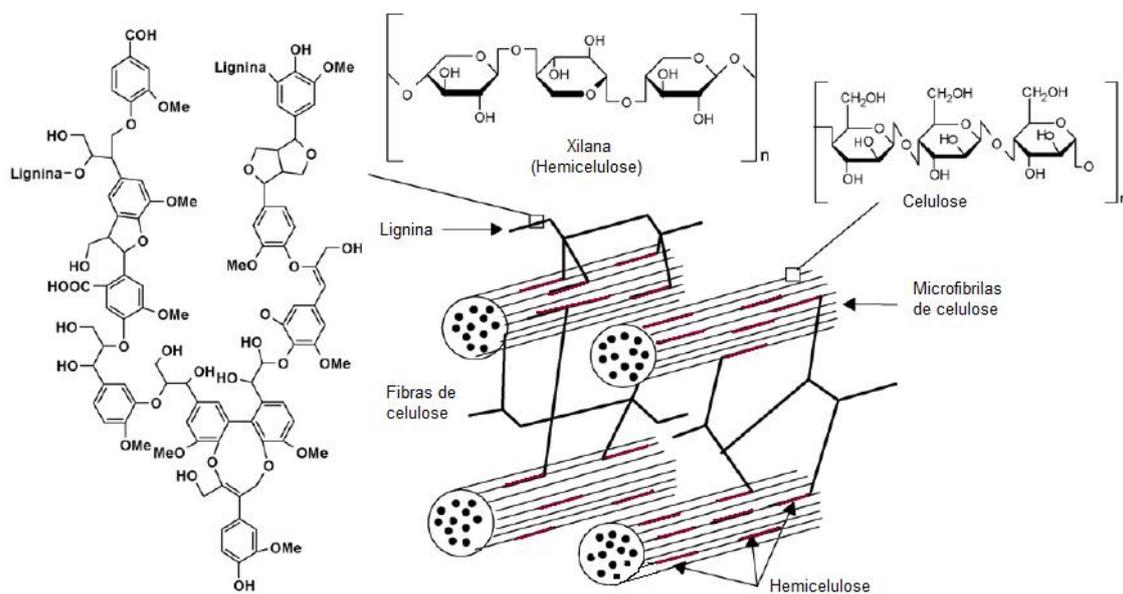


Figura 2- Representação das fibras e seus componentes, microfibrilas de celulose, hemicelulose, e lignina (Adaptado de Graminha et al., 2007).

Quantidades significativas destes "resíduos" lignocelulósicos (Tabela 2) são gerados através de práticas agro-florestais e industriais, como as indústrias

de papel e celulose, indústrias da madeira e muitas outras agroindústrias que representam um problema de poluição ambiental (HOWARD et al., 2003).

Tabela 2- Tipos de materiais lignocelulósicos e sua atual utilização.

Material Lignocelulósico	Resíduos	Uso Corrente
<i>Colheita de Grãos</i> (Trigo, Arroz, Cevada e Milho)	Palha, sabugo, talos e cascas	alimentação animal, queima para energia, compostagem
<i>Grãos Processados</i> (Milho, Trigo, Arroz, Soja)	Águas residuais, farelo	alimentação animal
Colheita de Frutas e Vegetais	Sementes, cascas, talos	alimentação animal, extração de óleos de sementes
Processamento de Frutas e Vegetais	Sementes, cascas, águas residuais, talos, rejeitos de frutas e sucos	alimentação animal, extração de óleos de sementes
Produtos de Cana de Açúcar	Bagaço	queima para energia
Resíduos Animais	Estrume, outros resíduos	condicionadores de solo
Gramíneas	Restos de gramíneas	queima

Fonte: HOWARD et.al. (2003).

2.1. Celulose

A celulose é um polímero linear de unidades de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, sendo um dos principais componentes encontrados na biomassa da planta (SOHAIL, 2009).

As cadeias de celulose formam numerosas ligações de hidrogênio intra e intermolecular, o que conta para a formação de microfibrilas rígidas e insolúveis (BÉGUIN e AUBERT, 1994). Estas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, com cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo. Estas regiões são denominadas regiões cristalinas. A celulose apresenta também regiões com menor grau de ordenação, denominadas regiões amorfas. Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência a hidrólise ácida ou enzimática (BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008), protegendo a célula vegetal contra a ação da pressão osmótica e estresses mecânicos (BÉGUIN e AUBERT, 1994).

A decomposição da celulose parece depender da habilidade das enzimas responsáveis em penetrar entre as cadeias adjacentes da fibra. A hidrólise das fibras de celulose é realizada pelos micro-organismos celulolíticos por intermédio das celulasas, que agem em sítios onde a estrutura do substrato é mais acessível, ou seja, onde a fibra perdeu seu aspecto cristalino, em proveito de um aspecto mais frouxo e amorfo (BAYER e LAMED, 1992; BÉGUIN e AUBERT, 1994). Sendo utilizada por séculos pelo homem, seu enorme potencial como fonte de energia renovável somente foi reconhecido após identificação das enzimas que degradam a celulose, as celulasas (BHAT e BHAT, 1997).

2.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos, nos quais as xilanas e as glucomananas são os principais componentes. Em paredes celulares de plantas terrestres, a xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum, representando de 25–35% da biomassa lignocelulósica (KUMAR et al., 2008), sendo depois da celulose, o polissacarídeo renovável mais abundante na natureza com um alto potencial para a degradação em produto final utilizável (BÉGUIN e AUBERT, 1994; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

A hemicelulose é ligada fortemente a celulose por pontes de hidrogênio e ligações covalentes e não covalentes com lignina, celulose e outros polímeros essenciais a parede celular (POLIZELI et al., 2005).

Existem várias enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose. Na degradação da xilana, por exemplo, a β -1,4 endoxilanase, β -xilosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilxilana esterase, todos atuam sobre os diferentes heteropolímeros disponíveis na natureza (KUMAR et al., 2008).

A heterogeneidade e complexidade estrutural das xilanas resultam numa abundância de enzimas xilanolíticas com variações na especificidade, nas sequências primárias e tamanho, além das limitações destas enzimas pela especificidade ao substrato (COLLINS et al., 2005).

A presença de compostos fenólicos nas ligações cruzadas entre xilanas, e entre xilanas e outros polissacarídeos também tem sido sugerida. Associações não-covalentes entre as xilanas e outros carboidratos também podem ocorrer. As xilanas tendem a se adsorver na celulose e agregados por meio de ligações de hidrogênio, bem como também a outros componentes hemicelulósicos (THOMSON, 1993).

A xilana é um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-xilopiranosil integrados entre si por ligações β -1,4, sendo o principal componente hemicelulósico depositado durante a fase de diferenciação do xilema (FLORES et al., 1997; GREGORY et al. , 1998; NASCIMENTO et al., 2002). Os constituintes mais comuns encontrados na cadeia principal da xilana são resíduos de acetil, arabinofuranosil e/ou glucuronil (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). Baseado nos substituintes comuns encontrados na cadeia principal, as xilanas são categorizadas como homoxilana linear, arabinoxilana, glucuroxilana e glucuroarabinoxilana. Entretanto, em cada categoria delas existe uma heterogeneidade com respeito ao grau e natureza da ramificação. A cadeia principal da xilana está demonstrada na Figura 3. (KULKARNI et al., 1999).

3. Enzimas Lignocelulolíticas

Nos últimos anos, têm-se observado um crescente interesse em sistemas enzimáticos microbianos que degradam o principal componente hemicelulósico em vegetais, a xilana. Os organismos procariotos hemicelulolíticos têm um papel fundamental na decomposição de materiais de origem vegetal, em especial as bactérias do gênero *Bacillus*, que têm sido frequentemente isoladas de solos, feno e adubos, dentre outros (DAHLBERG, et. al., 1993). Além disso, tanto bactérias aeróbicas quanto anaeróbicas podem degradar hemiceluloses presentes em efluentes de indústrias de papel e de celulose (CHEN et.al., 1997).

Os fungos e actinomicetos produzem, em sua grande parte, xilanases extracelulares, o que diminui o custo com sua recuperação em processamentos

utilizando fermentadores para aplicação industrial ou mesmo em processos de purificação. Este é o caso dos actinomicetos mesofílicos, *Streptomyces cyaneus* (WANG et. al., 1993) e *Streptomyces malaysiensis* (NASCIMENTO et al., 2003), dos actinomicetos termofílicos *Thermomonospora* sp. e *Saccharomonospora* sp. (CUROTTO et. al., 1994) e dos fungos termofílicos *Penicillium janthinelum*, *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Thermomyces lanuginosus* (DAMASO, 2000). No entanto, a maior parte das informações sobre enzimas xilanólíticas tem sido encontrada em publicações sobre a aplicação de xilanases de estreptomicetos mesofílicos, no tratamento de polpas na indústria do papel (STUTZENBERGER e BODINE, 1998). As xilanases e celulases de actinomicetos são enzimas extracelulares induzidas, que são freqüentemente produzidas simultaneamente (NASCIMENTO et al., 2002).

3.1. Celulases: Mecanismo de ação

A degradação da celulose pelos micro-organismos depende da capacidade de produção de uma mistura complexa de enzimas: celulases. Estas enzimas, que coletivamente apresentam especificidade para as ligações glicosídicas β -1,4, são necessárias para a solubilização completa da celulose, mesmo das regiões cristalinas, existindo sinergismo na sua forma de atuar (BON, GÍRIO e PEREIRA Jr., 2008).

O complexo enzimático celulolítico consiste de três classes de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose: β -1,4- endoglucanases (EC 3.2.1.4), β -1,4-exoglucanases (EC 3.2.1.91) e celobiasas (EC 3.2.1.21) (JUHÁSZ et al., 2005; CHEN, et.al., 2007).

As endoglucanases ou carboximetilcelulases hidrolisam aleatoriamente (Fig. 3) as cadeias de celulose e liberam celo-oligossacarídeos (JUHÁSZ et al., 2005). Atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade diminui com o encurtamento da cadeia de celulose. Seu substrato natural é a celulose e a xiloglicana (BHAT e BHAT, 1997; LYND et.al., 2002; ZHANG et.al., 2006).

As exoglucanases ou celobiohidrolases hidrolizam o polímero nos terminais não-redutores, liberando glicose ou celobiose como produtos

principais (ARISTIDOU e PENTTILÃ, 2000), este último, pode agir como fator de inibição das celobiohidrolases, necessitando da ação de outras enzimas do complexo celulolítico, as β -glicosidasases (BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008). As exoglucanases possuem ação limitada sobre substratos como o carboximetilcelulose (CMC) (SINGH e HAYASHI, 1995).

As β -glicosidasases são responsáveis pela hidrólise dos oligossacarídeos de cadeia curta e conversão da celobiose em glicose (JUHÁSZ et al., 2005).

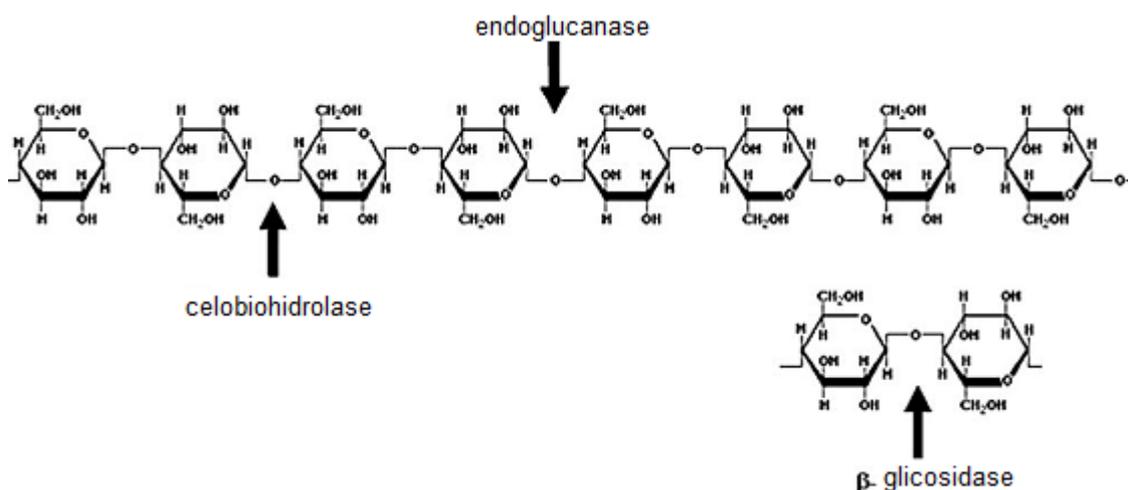


Figura 3- Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase.
Fonte: KUMAR et al., 2008.

3.2. Xilanases: Mecanismo de Ação

A heterogeneidade e complexidade estrutural das xilanas resultam numa abundância de enzimas xilanolíticas com variações na especificidade, nas sequências primárias e tamanho, além das limitações destas enzimas pela especificidade ao substrato (COLLINS et al., 2005). Dentre as enzimas do complexo enzimático destacamos as β -1,4-endoxilanases (β -1,4-D-xilana xilanhidrolase; EC 3.2.1.8), que despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica do esqueleto principal e as β -xilosidasases (β -1,4-D-xilosidase xilohidrolase; EC 3.2.1.37), que quebram pequenos oligossacarídeos. Os grupamentos laterais presentes na xilana são liberados pela ação das α -L-arabinofuranosidasases, α -glucuronidasases e acetilxilana esterases. Todas estas

enzimas agem cooperativamente, de modo a converter a xilana em seus açúcares constituintes (Fig. 4). A presença de tais sistemas xilanolíticos multifuncionais é comum em bactérias e fungos (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; BELFAQUIH e PENNINCKX, 2000; SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002).

As β -1,4-endoxilanases podem ser encontradas tanto em vegetais como em micro-organismos (NASCIMENTO et al., 2003). A hidrólise enzimática de heteroxilanas vegetais envolve a ação de uma série de enzimas, na qual a β -1,4-endoxilanase é a enzima crucial para a despolimerização completa da xilana (BIELY et al., 1992).

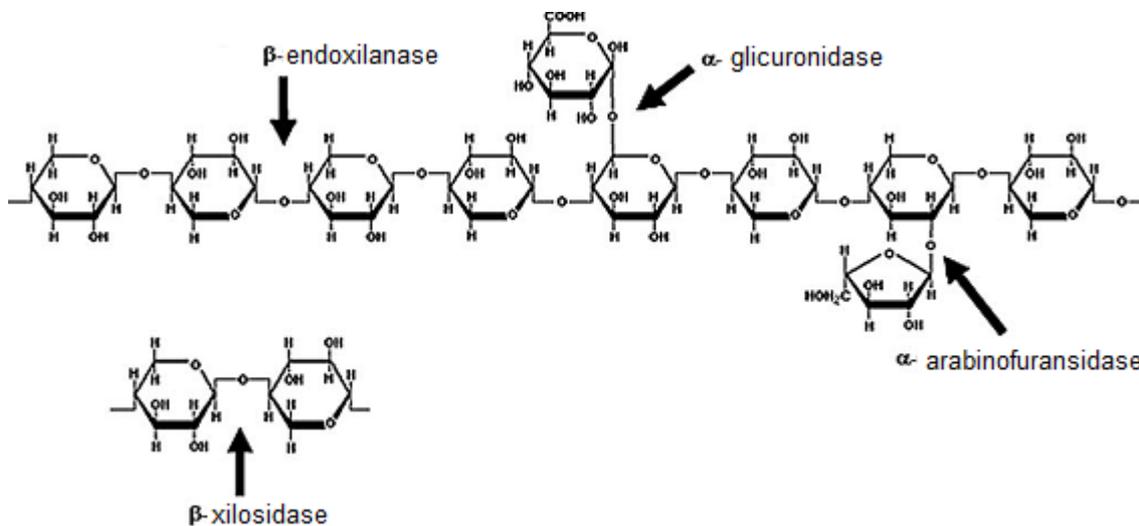


Figura 4- Estrutura química da hemicelulose e metas das enzimas hidrolíticas envolvidas na sua degradação.

Fonte: KUMAR et al., (2000).

4. Micro-organismos celulolíticos

As celulasas são produzidas por um espectro de fungos e bactérias, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Contudo, poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulasas em quantidades suficientes para solubilizar a celulose cristalina (BHAT e BHAT, 1997).

A capacidade dos micro-organismos em degradar polissacarídeos como a celulose é uma característica de considerável interesse, tanto em termos de

ecologia microbiana como do ponto de vista da microbiologia industrial (THEATER e WOOD, 1982).

De acordo com Bon et.al. (2008), o micro-organismo a ser considerado ideal para um processo de produção enzimática, deve apresentar as seguintes características:

- Ser seguro sob o ponto de vista biológico, ou seja, não ser patogênico
- Apresentar elevada capacidade de síntese e excreção da enzima;
- Suportar condições ambientais adversas, relacionadas com a pressão osmótica e a temperatura;
- Ser tolerante a presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular.

Vários micro-organismos são avaliados quanto a sua capacidade de degradar substratos celulósicos em monômeros de glicose, porém, são poucos os que apresentam potencial quanto à produção de celulasas (DAS et.al., 2007; YU et.al., 2007). Apenas os organismos que produzem adequados níveis de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, seriam eficientes degradantes da lignocelulose (KUMAR et al., 2008).

Os fungos *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium* são uns dos mais citados na literatura (PRASAD, SINGH e JOSHI, 2007). As celulasas do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, por exemplo, têm sido estudadas há mais de 50 anos e são as mais utilizadas na produção de bioetanol, tanto em escala de bancada quanto em escala piloto (GRAY e ZHAO, 2006).

O *T. reesei* RUT C-30 é capaz de produzir grandes quantidades de celulasas extracelulares, uma vez que apresenta todo o conjunto de enzimas celulolíticas (endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases), necessárias para atuar sinergicamente na completa degradação da celulose (SZIJÁRTÓ et.al., 2004).

Aparentemente, os fungos parecem ser os mais promissores na produção de celulasas (JECU, 2000). Na verdade a maioria das celulasas comerciais é produzida por fungos, principalmente os pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e grupos de *Penicillium*.

Celulases bacterianas também têm sido bastante estudadas (MAWADZA et.al, 2000), porém muitas bactérias ainda são caracterizadas por apresentar produção de celulases em quantidades relativamente baixas e isto tem sido explicado pela falta de celobiohidrolases no sistema enzimático (MAWADZA et.al., 2000).

Dentre os gêneros de bactérias mais estudados estão: *Acetovibrio*, *Bacteróides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Pseudonocardia*, *Ruminococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Acidothermus*, *Bacillus*, *Celvibrio*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* e *Xanthomonas*. (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002; ZHANG et. al, 2006).

Atualmente, a demanda por enzimas mais estáveis em aplicações industriais está crescendo rapidamente. Com isso, se faz necessário a busca de enzimas microbianas que apresentem estabilidade em faixas elevadas de pH e temperatura. As celulases que apresentam estabilidade em altas temperaturas são mais vantajosas, pois podem ser utilizadas em processos de sacarificação em temperaturas elevadas, que são favoráveis por proteger o substrato e o produto da deteriorização e contaminação microbiana (KHALIL, 2002). Da mesma forma, as celulases alcalofílicas têm a vantagem de manterem sua atividade em valores de pH elevados, muitas vezes necessários para determinados processos biotecnológicos. Neste sentido, algumas estirpes de actinomicetos do gênero *Streptomyces* com características alcalofílicas têm sido isoladas e celulases termoestáveis produzidas por *Streptomyces* transformantes têm sido recuperadas.

Alani, Anderson e Moo-Young (2008) conseguiram isolar uma estirpe de *Streptomyces* produtora de celulases termoalcalofílicas. Outra estirpe de *Streptomyces*, a M23, isolada no Japão, produz um tipo de exoglucanase que apresenta termoestabilidade a 100 °C. Essa celulase pode ser a enzima de maior estabilidade dentre as produzidas pelo gênero *Streptomyces*.

Streptomyces lividans, *S.albaduncus*, *S. reticuli*, *Streptomyces* sp. M7a M7b e *Streptomyces* sp. F2621, *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 isolados de solo já foram relatados como produtores de endoglucanases extracelular de forma significativa nos meios de cultura otimizados usando celulose purificada

ou outra fonte de carbono, sob agitação (CHELLAPANDI e HIMANSHU, 2008; NASCIMENTO et al., 2009).

Apesar das características promissoras de celulases produzidas por estes actinomicetos, ainda são poucas as referências que recomendam a comercialização destas enzimas.

5. Aplicações Biotecnológicas das Enzimas

5.1. Celulases

Hoje, as enzimas são comumente usadas em muitas aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas estão crescendo rapidamente.

A utilização biotecnológica de celulases e hemicelulases começou em 1980, primeiro na indústria de ração animal seguido de aplicações na indústria alimentícia. Posteriormente, estas enzimas foram utilizadas nas indústrias têxteis e lavanderia. Outras áreas incluem a indústria de papel e celulose, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT e BHAT, 1997). Hoje, estas enzimas são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas principalmente as produzidas pelos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000).

As celulases podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias em conjunto com as hemicelulases e pectinases, na extração e clarificação de sucos de fruta e vegetais. Após o prensamento, centrifugação e filtração das frutas, essas enzimas são utilizadas para clarear o suco e aumentar a liquefação através da degradação da fase sólida que é gerada. O processamento enzimático aumenta o rendimento do suco, reduz o tempo de processamento e melhora a qualidade do produto (BHAT, 2000).

Também tem sido utilizada no processo para obtenção de ração animal. O tratamento de silagem com essas enzimas é benéfico, pois aumenta a sua digestibilidade (BÉGUIN e AUBERT, 1994). A utilização de celulases na ração melhora a sua qualidade nutricional e favorece a digestão de ruminantes e monogástricos (BHAT, 2000).

Na indústria têxtil, as celulases têm alcançado um sucesso mundial, devido sua capacidade de modificar fibras celulósicas em um ambiente controlado e de forma desejada, melhorando a qualidade dos tecidos (BHAT, 2000). Elas atuam eliminando microfibrilas superficiais, deixando os tecidos mais lisos, evitam a formação de *pilling* e atuam desbotando jeans, para que obtenham um aspecto de tecido usado (ANDREAUS e CAVACO-PAULO, 2008). Processos como bioestonagem e biopolimento são os mais conhecidos neste setor industrial (VYAS et. al., 2006). As celulases, também estão sendo utilizadas em produtos de lavagens, auxiliando na remoção da sujeira, melhorando a aparência, brilho e cor dos tecidos (CAVACO-PAULO, 1998). Sobretudo, as celulases utilizadas com este fim, devem ser estáveis em valores extremos de pH e temperatura (GEORGE et.al., 2001). Atualmente, esse setor representa o maior mercado dessas enzimas em todo o mundo.

As celulases e hemicelulases têm sido utilizados na indústria de papel e celulose para os diferentes finalidades. Porém, a mistura de enzimas ou enzimas purificadas devem ser bem caracterizada no que diz respeito a especificidade do substrato e seu modo de ação, antes de utilizar para uma determinada aplicação na indústria de celulose e papel. A utilização de celulases na polpa de celulose atua nas propriedades das fibras, permitindo seu desenxague, aumentando a velocidade de fabricação do papel (BHAT, 2000). E na fabricação de papel reciclado, a ação enzimática promove a despigmentação da matriz celulósica formando folhas de papel com o mínimo de brilho exigido para impressão e escrita (PÉLACH et al., 2003).

Outra importante área é a de tratamento de resíduos lignocelulósicos, que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de etanol, preparo de substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis e diretamente na alimentação animal (SÁNCHEZ, 2009). A bioconversão destes por ação de enzimas tem sido mais utilizada para conversão em glicose e posterior fermentação na produção de combustíveis (HOWARD et.al., 2003). Muitas pesquisas têm sido feito na busca de um combustível alternativo que utiliza métodos biológicos por causa dos seus benefícios ambientais.

5.2. Xilanases

Durante as últimas décadas, o potencial das aplicações biotecnológicas de xilanas e xilanases tem recebido um particular interesse pelos pesquisadores. Atualmente, os principais produtos finais da xilana, que são considerados importantes são o furfural e o xilitol. A produção de furfural é derivada principalmente de resíduos agro-industriais, enquanto que o xilitol é obtido de resíduos de madeira. Os produtos de hidrólise da xilana (xilose e xilooligossacarídeos) têm possíveis aplicações na indústria alimentícia como espessantes, ou como substituintes de gordura ou como um aditivo alimentar anticongelante, e podem ser subsequentemente convertidos a combustíveis líquidos, “single-cell protein”, solventes e adoçante artificial de baixa caloria (WONG e SADDLER, 1993; KULKARNI et. al., 1999).

A biotecnologia, através da utilização de enzimas altamente selecionadas, surge como uma estratégia para substituir os processos tradicionalmente utilizados, ou ao menos otimizá-los, de modo a reduzir a carga tóxica liberada ao meio ambiente. As enzimas envolvidas na degradação de lignocelulose, tais como endoxilanases, peroxidases e celulasas, podem ter aplicações em biotecnologia como uma alternativa aos tratamentos químicos. Apresentam como vantagem a elevada especificidade e condições de reações suaves, não produzindo inibidores tóxicos como aqueles presentes na hidrólise química (vanilina e furaldeído) e não provocando a perda de substrato devido às possíveis modificações químicas (TUNCER et al., 1999). Em alguns processos se faz necessário à utilização de enzimas purificadas. Por outro lado, em outras aplicações, a presença de enzimas com atividade adicional é necessária. As principais aplicações comerciais sugeridas para xilanases envolvem a conversão da xilana em xilose, a qual está presente em efluentes de indústrias alimentícias e agrícolas (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

6. Mercado Mundial de Enzimas

Historicamente, a demanda por enzimas tem-se concentrado em mercados mais desenvolvidos devido ao alto valor agregado das enzimas e

aos recursos técnicos significativos necessários para a produção, desenvolvimento e aplicação das enzimas. No entanto, nota-se que existem mercados emergentes em países em desenvolvimento, que poderão apresentar as maiores taxas de crescimento (FREEDONIA, 2005).

O mercado mundial de enzimas industriais está dividido em dois grandes segmentos: enzimas (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). Em termos percentuais, as enzimas de uso industrial representam mais de 60 % do mercado mundial de enzimas (BON, et.al., 2008).

No que diz respeito ao mercado de enzimas, a demanda global aumentará 6,3 % ao ano, ou seja, chegará a US\$ 7 bilhões em 2013, impulsionado pela forte demanda no segmento de enzimas especiais, além de um bom crescimento na alimentação animal e nos mercados de produção de etanol. (FREEDONIA, 2009). Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologias de baixo custo energético, com baixo impacto ambiental e que utilizam matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria (FREEDONIA, 2005).

A demanda mundial por enzimas cresceu a um ritmo de quase dois dígitos de 2003 para 2008, auxiliada em grande parte, pelo aumento rápido dos preços mundiais de energia (produzida por processos enzimáticos e produtos relacionados com melhor custo-benefício e facilitou a legislação de uma rápida expansão do mercado de etanol combustível, sobretudo nos Estados Unidos) e o sucesso do lançamento de vários produtos farmacêuticos que contêm enzimas. O mercado de enzimas tem se tornado muito mais desafiador, desde então, e o crescimento será significativamente moderado daqui para frente. (FREEDONIA, 2009).

6.1. Enzimas industriais

As enzimas industriais são grandes representantes dos processos biotecnológicos. O setor de produção de enzimas apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de diversos produtos

novos e no melhoramento dos processos e do desempenho dos produtos já existentes no mercado (BCC, 2005). No entanto, o custo de uma enzima é um dos principais fatores que determinam sua produção. Reduzir os custos de produção por otimização do meio fermentativo e do processo é o objetivo da pesquisa básica para aplicações industriais (PARK et al., 2002).

O mercado de enzimas industriais está dividido em: enzimas técnicas, destinadas principalmente aos setores de produtos de limpeza, têxtil, de couros, de álcool como combustível e de papel e celulose; enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para ração animal. As principais enzimas industriais são: proteases, amilases, lípases, celulases, xilanases e fitases (BON et.al., 2008).

Entre os mercados de enzimas industriais, alimentos para animais e a produção de etanol irão atingir avanços acima da média (FREEDONIA, 2009). Isso ocorre devido ao grande interesse dos criadores de aves e suínos em aumentar o valor nutricional da ração e facilitar sua digestibilidade, visando maximizar o ganho de peso de seus animais (BON, et.al., 2008). No entanto, os alimentos e o mercado de bebidas vão crescer a um ritmo favorável. Da mesma forma, o crescimento de produtos de limpeza e outros mercados industriais estarão acima da média até 2013 (FREEDONIA, 2009).

7. Estratégias de Produção de Celulases

O cultivo industrial de micro-organismos com a finalidade de obter enzimas, resultantes do seu metabolismo, é uma atividade biotecnológica em ampla expansão. Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: Fermentação submersa (FSm) e Fermentação no estado sólido (FES).

As principais diferenças entre os dois tipos de fermentação podem ser visualizadas no Quadro 1.

Quadro 1- Principais diferenças entre Fermentação em Estado Sólido (FES) e Fermentação Submersa (FSm)

FATOR	FES	FSm
Substratos	Polímeros insolúveis ou pouco solúveis	Compostos geralmente solúveis em água
	Geralmente fornece todos os nutrientes	Cada composto tem uma função diferencial
	O micro-organismo cresce firmemente aderido ao substrato	O micro-organismo encontra-se distribuído uniformemente no sistema
Assepsia (Escala Industrial)	Trabalha-se com baixos níveis de assepsia ou há tratamento termico do sistema	O sistema é esterilizado com calor ou filtração. É necessário um estrito controle de contaminação
Inoculação	Relação inóculo/meio geralmente é alta	Relação inóculo/meio geralmente é baixa
Controles de processo	Controle de temperatura é complexo devido a baixa condutividade térmica do substrato	Controle de temperatura simples devido as características do sistema
	O pH geralmente não é controlado e, quando é, utiliza-se solução tampão ou o próprio substrato já é tamponante	Controle de pH é fácil devido as características do sistema
Aeração	A fase gasosa ocupa os espaços entre as partículas, fornecendo oxigênio ao sistema	O oxigênio é transferido continuamente ao meio por injeção de ar
Concentração e recuperação de produtos	Recuperação relativamente simples. Altamente concentrados (100-300g.L ⁻¹)	Recuperação pode ser complexa. Baixa concentração (30-80 g.L ⁻¹)
Contaminação	Baixa devido a baixa umidade no sistema	Grande. As condições de cultivo precisam ser estritamente controladas
Geração de efluentes	Dependendo do processo, os resíduos são poucos e a capacidade poluente é mínima	Geração de grandes volumes com alta capacidade poluente
Agitação	Evita-se	Geralmente

Fonte: Adaptado de Raimbault, 1998.

Os processos de fermentação submersa têm sido bastante estudados e aplicados industrialmente. Em relação à fermentação em estado sólido, a fermentação submersa tem como vantagens a possibilidade de ter melhor racionalização e padronização do processo (HOLKER e LENZ, 2005), além de permitir um sistema de cultivo homogêneo, com facilidade de controle das variáveis físico-químicas do processo e maior eficiência de adsorção e excreção de metabolitos secundários pela célula, diminuindo o tempo de processo e, conseqüentemente, a ganho de produtividade (BON et al., 2008).

7.1. Fatores que influenciam a produção de celulasas

A produção de celulasas por actinomicetos mesofílicos e termofílicos apresenta características bioquímicas diferentes das produzidas por fungos. Isto porque, estudos tem relatado celulasas de actinomicetos com grande estabilidade e alta atividade em condições de pH e temperatura mais extrema (COELHO e NASCIMENTO, 2008).

O efeito da temperatura na atividade enzimática é bastante importante. A grande maioria dos actinomicetos apresenta valores ótimos de atividade na faixa de 40 a 60 °C (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005; JANG e CHEN, 2003), podendo chegar a valores entre 60 e 70 °C, como é o caso das celulasas de *Thermomonospora*. Da mesma forma, celulasas produzidas por actinomicetos apresentam um ótimo de atividade numa faixa de pH entre 4,0 e 8,0, (GRIGOREVSKI-LIMA., 2005) o que é consideravelmente vantajoso do ponto de vista biotecnológico.

O substrato utilizado no meio também é considerado um fator limitante, por isso, sua escolha deve ser adequada. O substrato considerado ideal é aquele que fornece tanto a fonte de carbono (energia) como a fonte de nitrogênio para o micro-organismo (PANDEY et al., 1999). Em relação à principal fonte de carbono utilizada pelos micro-organismos, os substratos podem ser divididos dentro de 3 (três) principais grupos: amiláceos, compostos por celulose ou lignocelulose e aqueles que possuem açúcares solúveis (PANDEY et al., 2000).

Outros fatores afetam a produção enzimática e pesquisas têm sido realizadas na busca de estratégias para a otimização dos processos de produção. A escolha do melhor substrato indutor de celulase e do micro-organismo, o efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção da enzima, a concentração do inóculo, a influência da agitação e aeração nos sistemas são as principais variáveis que influenciam na produção da enzima por FSm .

8. Otimização e Desenho Experimental

O método de desenho experimental pode ser amplamente encontrado em diversas áreas, sendo uma ferramenta criticamente importante na engenharia para aumentar o desempenho de processos de produção (MONTGOMERY, 1997). A pronta aplicação de técnicas de desenho experimental pode resultar em: (i) aumento do rendimento do processo; (ii) redução do tempo de desenvolvimento; (iii) redução dos custos totais; (iv) variabilidade reduzida e conformidade mais próxima do requerimento alvo (MONTGOMERY, 1997).

Em um experimento de caracterização, usualmente determina-se as variáveis do processo que afetam a resposta. A etapa mais lógica a seguir será a otimização, para a qual é necessário determinar a região de importância em que os fatores podem dar uma melhor resposta (RODRIGUES e IEMMA, 2005). A otimização pode ser dividida em estágios que caracterizam-se por: (i) definição da função objetivo (resposta), podendo ser observado um ou mais critérios; (ii) seleção das variáveis (fatores) que apresentam influências significativas sobre a resposta que deseja-se otimizar; (iii) otimização propriamente dita, isto é, procurar a combinação dos valores dos fatores selecionados que resultem na melhor resposta (maximização ou minimização).

Um procedimento criterioso para a otimização deve envolver as seguintes etapas de: (i) realização de experimentos de varredura para caracterizar as variáveis do sistema, usando um planejamento fatorial; (ii) localização da região ótima ou ideal; (iii) certificação e/ou ajuste fino da região ótima, usando planejamento fatorial e/ou superfície de respostas, dependendo de quão apurados se desejam os resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Muitos experimentos envolvem o estudo de efeitos de 2 ou mais fatores. Geralmente, os desenhos fatoriais são mais eficientes para este tipo de experimento. O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, no qual as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Para realizar um

planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores (MONTGOMERY, 1997).

De um modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^a , no qual "a" é o número de fatores e o "b" é o número de níveis escolhidos. Em função do número de fatores e de níveis, o planejamento fatorial pode ser indicado como sendo 2^3 , quando são estudados 3 variáveis, sugerindo que o número de experimentos diferentes sejam 8.

Em geral, os planejamentos fatoriais do tipo 2^a são os mais comuns. Um dos aspectos favoráveis deste tipo de planejamento é a realização de poucos experimentos. Entretanto, a utilização de um número reduzido de níveis não permite explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis. Entretanto podemos observar tendências importantes para a realização de investigações posteriores. Contudo, alguns cuidados devem ser observados para que se possa obter o máximo de informação na realização do planejamento fatorial. As replicatas devem ser repetições autênticas, devendo representar adequadamente o espaço experimental no qual o planejamento fatorial foi desenvolvido. Outro cuidado a ser observado refere-se à realização dos experimentos. É importante que todos os ensaios e replicatas previstos no desenvolvimento do fatorial sejam realizados de forma aleatória. Estes cuidados visam evitar distorções estatísticas que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados para as variáveis estudadas.

Nos planejamentos experimentais em que as variáveis são exploradas em 2 níveis é comum codificá-los usando os sinais (+) e (-). A atribuição destes sinais aos níveis superiores ou inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir esquematizar o planejamento na forma de matrizes. Os efeitos são definidos como "a mudança ocorrida na resposta quando se move do nível baixo (-) para o nível alto (+)" e podem ser classificadas em duas categorias: efeitos principais e efeitos de interação. Para o cálculo dos efeitos, além da codificação das variáveis utilizando os sinais (+) e (-), é necessário incluir mais colunas na matriz de planejamento. O conteúdo das novas colunas representa o efeito de interação entre as variáveis e é obtido levando-se em consideração

os sinais já atribuídos às variáveis envolvidas, como se fosse uma operação matemática de multiplicação.

O planejamento fatorial não determina valores ótimos em uma única etapa, porém este procedimento indica satisfatoriamente o caminho a ser tomado para que se possa atingir o objetivo proposto.

CAPÍTULO 1

Isolamento e seleção de actinomicetos produtores de celulasas e xilanases isolados de diferentes solos da região do semi-árido baiano

RESUMO

Bispo, A. S. da R. Isolamento e seleção de actinomicetos produtores de celulasas e xilanases isolados de diferentes solos da região do semi-árido baiano.

Os actinomicetos têm sido bastante usados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como: enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides. Dentre as enzimas secretadas por estes micro-organismos, estão as xilanases e celulasas, que têm sido bastante estudadas devido ao seu potencial biotecnológico. O presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar actinomicetos oriundos de diferentes solos do semi-árido baiano, com potencial de produção de xilanases e celulasas. A atividade enzimática foi verificada em meio de cultura específico, com xilana *oat spelts*, ou carboximetilcelulose de baixa viscosidade como únicas fontes de carbono, constatado pelo método de coloração Vermelho Congo, através da presença de zona de hidrólise. Foram isoladas 196 estirpes de actinomicetos. Destas, 111 apresentaram zonas de hidrólise ao redor do crescimento em meio de carboximetilcelulose, e 97 em meio com xilana. A seleção também revelou um grupo de 67 actinomicetos que não apresentaram zona de degradação. A maior zona ao redor da colônia foi apresentada pela estirpe CDPA-01, igual a 3,2 cm, para produção de celulase. Na análise do potencial xilanolítico, a estirpe CDCI-21 destacou-se das demais com halo igual a 2,5 cm. A descoberta de novas linhagens de micro-organismos potencialmente produtores de enzimas poderá criar novas soluções biotecnológicas e contribuir com novas perspectivas para problemas ambientais.

Palavras-chave: seleção, xilanolíticos, celulolíticos

ABSTRACT

BISPO, A. S. R. Isolation and screening of actinomycetes producing cellulases and xylanases isolated from different soils from the Bahia semi-arid region.

Actinomycetes have been widely used as producers of different substances of economic interest, such as enzymes, antibiotics, vitamins, amino acids and steroids. Among the enzymes secreted by these microorganisms are xylanases and cellulases, which have been extensively studied because of their biotechnological potential. This study aimed to isolate and select actinomycetes from different soils in semi-arid region of Bahia, with potential production of cellulases and xylanases. The enzyme activity was observed in specific culture medium with xylan oat spelts or low viscosity carboxymethylcellulose as the sole source of carbon, determined by Congo red staining method, through the presence of zone of hydrolysis. We isolated 196 strains of actinomycetes. Of these, 111 presented hydrolysis zones around the growth medium of carboxymethylcellulose, and 97 in medium with xylan. The selection also revealed a group of 67 actinomycetes that showed no degradation zone. The larger zone around the colony was presented by the CDPA-01 strain, equal to 3.2 cm for production of cellulase. Analysis of the potential xylanolytic strain the CDCI-21 stood out from the others with a halo of 2.5 cm. The discovery of new strains of micro-organisms potentially producing enzymes may create new biotechnological solutions and bring new perspectives to environmental problems.

Keywords: screening, xylanolytic, cellulolytic

INTRODUÇÃO

Dentre os principais produtos representantes dos processos biotecnológicos estão as enzimas, as quais são produzidas comercialmente principalmente a partir de micro-organismos, devido à sua diversidade, facilidade de controle operacional e maior rendimento em relação aos processos com tecidos animais e vegetais. Investimentos em pesquisa e no desenvolvimento de novas aplicações e de bioprocessos no setor industrial de produção de enzimas têm sido realizados recentemente.

Os actinomicetos isolados de solo têm sido descritos como fontes importantes 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. Dentre as enzimas secretadas por estes micro-organismos estão as xilanases e celulases, que têm sido bastante estudadas devido ao seu potencial biotecnológico e importância na degradação da biomassa.

Os solos tropicais, em particular os solos brasileiros como os da Mata Atlântica sob vegetação de floresta, e os solos sob vegetação de cerrado, são habitats bastante peculiares, com características próprias e únicas, cuja atividade biológica é extremamente rica (COELHO e NASCIMENTO, 2008). Estes solos possuem uma ampla biodiversidade e os actinomicetos e os fungos, que englobam vários gêneros com diferentes características morfofisiológicas, podem ser isolados (SAID et al., 2004).

Trabalhos realizados comprovam a abundância destes micro-organismos no solo e, a partir de então, surgiu a idéia de isolar e selecionar estirpes com potencial para produção de celulases e xilanases, visando aplicações biotecnológicas. A utilização destas enzimas em diversas áreas da indústria faz com que os micro-organismos sejam estudados e suas enzimas caracterizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolamento e manutenção dos micro-organismos

Os actinomicetos foram isolados de diferentes solos do estado da Bahia: Rampa do Caim e Poço azul na região da Chapada Diamantina, Lage do Batata, Ouroândia e Tiquara na caatinga, especificamente na região sisaleira.

Foram coletadas 4 amostras de solo, abaixo de 10 cm da superfície em uma área de 4 m² na Rampa do Caim. No solo de Poço Azul foi coletada uma amostra de solo depositado sob uma pedra dentro da caverna, em uma fenda de aproximadamente 20 cm de altura por 60 cm de largura e 50 cm de profundidade. O solo da Caatinga foi coletado na região do horizonte A de áreas virgens, a cerca de 15 cm de profundidade e peneirados em malha de 2mm.

O isolamento dos actinomicetos das amostras de solo da Chapada Diamantina e Caatinga foi realizado através da técnica convencional das diluições seriadas em placas, onde 10 g de amostra de solo foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina (0,85 % NaCl) estéril em frascos de Erlenmeyer de 250 mL (diluição 10⁻¹). A suspensão foi misturada em agitador rotatório, a 150 rpm por 30 minutos, a temperatura ambiente. A segunda diluição (10⁻²) foi realizada transferindo-se 1 mL da diluição 10⁻¹ para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85 % NaCl), e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁵. As amostras foram plaqueadas em três diferentes meios de cultivo, (i) Ágar-Amido-Caseína (AAC), (ii) "Actinomycete Isolation Agar" (ambos seletivos para actinomicetos) e (iii) Glicerol-Peptona, todos contendo 150 mg.L⁻¹ do antifúngico Fluconazol.

As diluições 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ foram utilizadas para análise do perfil de actinomicetos, sendo retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição e inoculada em triplicata na superfície do meio solidificado, espalhando-se homogeneamente com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em BOD a 28°C, por 10 dias. As colônias com características morfológicas de actinomicetos foram transferidas para o meio de manutenção Ágar-extrato de malte-extrato de levedura (ISP-2), pH 7.0, pela técnica de esgotamento por

estrias em placa para posterior obtenção das culturas puras. As estirpes purificadas foram mantidas na forma de suspensão de células/espores em glicerol 20 %, a temperatura de - 20 °C (HOPWOOD et. al, 1985).

Seleção dos actinomicetos Celulolíticos e Xilanolíticos

Para seleção de estirpes celulolíticas e xilanolíticas, os actinomicetos foram cultivados em meio de sais minerais (BRECCIA et.al., 1995) modificado (NaNO_3 , 1,2 g.L⁻¹; KH_2PO_4 , 3,0 g.L⁻¹; K_2HPO_4 , 6,0 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g.L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g.L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g.L⁻¹; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g.L⁻¹; Agar, 15,0 g.L⁻¹) suplementado com 1 % (p/v) de carboximetilcelulose sal sódico de baixa viscosidade ou 1 % (p/v) de xilana *oat spelts*, respectivamente. As estirpes foram inoculadas sob forma de *spots*, três por placa, com auxílio de uma alça de platina. A incubação foi conduzida a 28 °C durante 12 dias. Após este período, para a visualização da formação de zonas de hidrólise, foi adicionado à superfície das placas, solução Vermelho Congo 0,1 % (p/v), permanecendo em contato com o meio por 10 minutos. Após este período, foram realizadas lavagens sucessivas com solução NaCl 1M até a visualização de zonas de hidrólise circunscrevendo o crescimento das colônias.

A medida das zonas de hidrólise e da colônia foi realizada com auxílio de um paquímetro, e os resultados expressos em cm.

Identificação da estirpe promissora

Em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos, no Instituto de Microbiologia *Prof. Paulo de Góes*, na UFRJ, as estirpes promissoras CDPA-01 e CDCI-21 foram identificadas como pertencente ao gênero *Streptomyces* sp., através da análise do seqüenciamento do RNA16S.

RESULTADOS

Isolamento e seleção dos actinomicetos

Os procedimentos utilizados foram eficientes para isolamento dos actinomicetos (Fig. 1). Ao todo, foram isoladas 196 estirpes de actinomicetos, destas 116 foram da Região da Chapada Diamantina e 80 da Caatinga.



Figura 1- Isolamento e Purificação de Actinomicetos do solo (detalhe da estirpe CDPA-01) através da Técnica de esgotamento.
Fotos: Rodrigo Pires do Nascimento.

Através da análise dos resultados foi verificado que a maioria dos isolados da Chapada Diamantina, representando 60 % (69) dos actinomicetos foram obtidos quando se utilizou o meio específico para crescimento de actinomicetos (AIA) e 40 % (47) quando se utilizou o meio Ágar-Amido-Caseína (AAC). Já da Caatinga, 86 % (69) dos isolados foram obtidos no meio Glicerol Peptona (GP), representatividade muito maior do que quando se utilizou o meio AAC, com 14 %, ou seja, 11 isolados (Fig. 2). Provavelmente, estes resultados subestimam a população total daqueles micro-organismos, em termos de diversidade, uma vez que somente foram selecionadas as bactérias capazes de se desenvolverem nos meios de cultura utilizados.

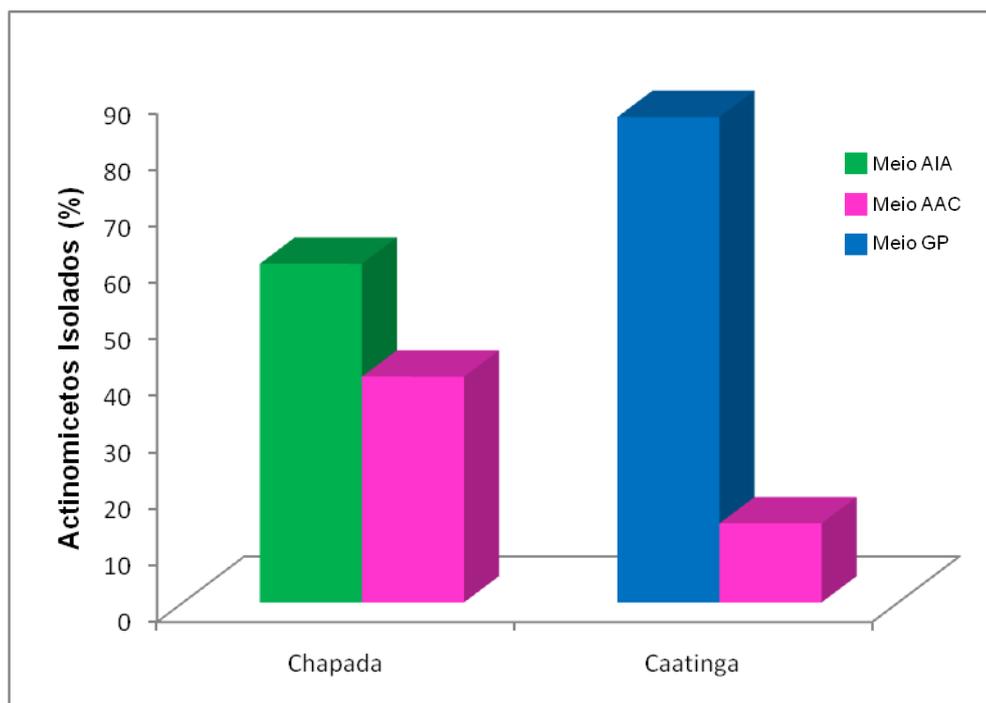


Figura 2– Número de isolados de actinomicetos da Chapada Diamantina e Caatinga em relação aos meios de cultivo utilizados.

Todos os isolados foram examinados quanto à capacidade em degradar polímeros vegetais, como celulose e xilana em meio de sais minerais (Tabela 1).

Tabela 1- Seleção dos actinomicetos em relação ao seu potencial quanto à produção de celulasas e xilanasas.

Locais	Amostra de Solo	Nº de isolados	Celulolíticos			Xilanolíticos		
			(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)
Chapada Diamantina	Caverna (Poço Azul)	84						
	Campestre (Rampa do Caim)	32	28	61	2	39	48	18
Caatinga	Lage do Batata	64						
	Ourolândia	10	54	9	10	52	8	17
	Tiquara	6						
	TOTAL	196						

Zona de hidrólise: (-) negativo, (+) diâmetro do halo $\geq 1,0$ cm até 1,9 cm, (++) diâmetro do halo $\geq 2,0$ cm.

Destes, 73 % (85) representando a diversidade da Chapada Diamantina, apresentaram zonas de hidrólise ao redor do crescimento em meio de carboximetilcelulose (Fig. 3A), sendo positivos para produção de celulases, enquanto que 63 % (73) apresentaram zonas de hidrólise ao redor do crescimento em meio de xilana (Fig. 3B), ou seja, positivos para produção de xilanases. Enquanto que na região da Caatinga, 33 % (26) foram caracterizados como celulolíticos e 30 % (24), como sendo xilanolíticos.

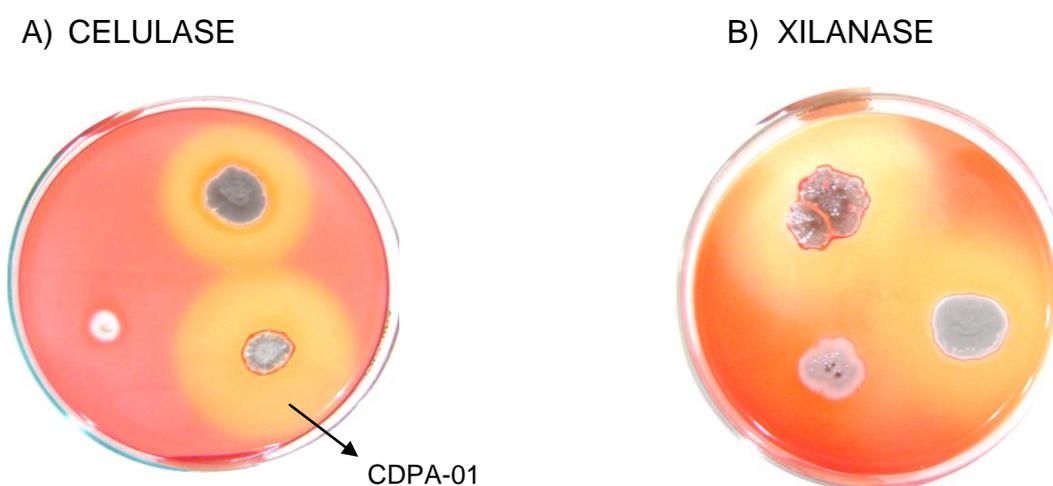


Figura 3– Seleção de actinomicetos celulolíticos (A) e xilanolíticos (B), após revelação com solução Vermelho Congo 0,1 %.
Fonte: Rodrigo Pires do Nascimento

Foi observado que 34 % (67) dos isolados não apresentaram zonas de hidrólise tanto para detecção da atividade xilanolítica como para celulolítica, nas condições estudadas, sendo a maioria (42) oriundo do solo de caatinga.

No intuito de visualizar micro-organismos capazes de degradar xilana e carboximetilcelulose dos 116 isolados da Chapada Diamantina, 63 % (73) produziram zona de hidrólise circunscrevendo a colônia, mostrando-se eficientes na produção das duas enzimas. Dentre os 80 isolados da região da Caatinga, apenas 20 % (16), apresentaram esta capacidade.

Com relação aos locais de coleta do solo, se destaca o solo característico de caverna (Poço Azul), de onde se obteve a maior população dos actinomicetos encontrados, dos quais 72 % (60) foram capazes de

hidrolisar a xilana do meio de cultivo, com formação de halos claros ao redor da colônia, e 81 % (68) foram capazes de hidrolisar o substrato CMC presente no meio. Do solo campestre (Rampa do Caim), 32 isolados foram obtidos, sendo 41 % (13) capazes de produzir xilanases e 53 % (17) celulases, de acordo com formação das zonas de hidrólise circunscrevendo a colônia.

Na região do solo de caatinga, a maior diversidade, 80 % (64) dos actinomicetos foram obtidos do solo de Lage do Batata, e a minoria, 7 % (6) foram encontrados no solo de Tiquara, enquanto, do solo de Ourolândia, obteve-se 13 % (10) dos isolados, como pode ser observado na figura 4.

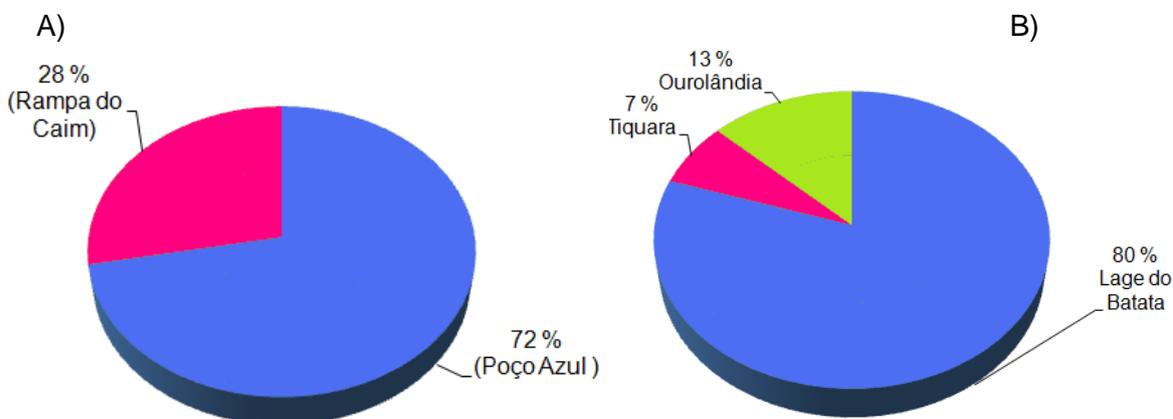


Figura 4 – Diversidade de actinomicetos isolados de diferentes solos da Chapada (A) e Caatinga (B).

Apesar de 2 cepas se mostrarem como promissoras (halo $\geq 2,0$ cm), nos dois substratos entre os 111 actinomicetos que exibiram zonas de hidrólise para produção de celulase, a estirpe CDPA-01 foi escolhida devido à seu melhor crescimento e esporulação mais abundante e rápida, destacando-se com halo igual a 2,7 cm. Este micro-organismo foi isolado de um solo de Caverna, coletado na Chapada Diamantina (Bahia, Brasil) e identificado pela técnica do seqüenciamento rRNA 16S, como pertencente ao gênero *Streptomyces* sp.

DISCUSSÃO

KULKARNI (1999) enfatiza que, apesar da produção comercial das celulasas e xilanases se concentrar principalmente nos fungos *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp., novos micro-organismos estão sendo alvo de estudos devido a demanda por cepas produtoras de enzimas com maior rendimento, alta estabilidade em condições extremas de temperatura e pH.

Actinomicetos são bactérias conhecidas por constituir grande parte da microbiota da rizosfera. Eles são importantes produtores de compostos bioativos e são também encontrados nos mais diversos ambientes. Por seu crescimento semelhante aos de fungos filamentosos, estes micro-organismos possuem uma vantagem no que diz respeito ao aumento da área de contato com o substrato juntamente com sua capacidade de degradar estes materiais.

As estirpes foram selecionadas como xilanolíticas e celulolíticas, após observação de zonas de hidrólise circunscrevendo o seu crescimento, em meio sólido contendo xilana *oat spelts* (Sigma) e carboximetilcelulose (Sigma). Neste trabalho, de todas as estirpes testadas, 50 % foram capazes de produzir xilanases e 57 % celulasas.

Segundo Basílio et al. (2003), os gêneros de actinomicetos mais comumente encontrados no solo são *Streptomyces* e *Micromonospora*. Apesar de três estirpes serem promissoras para produção de celulasas e xilanases, somente uma estirpe, produtora de celulasas, foi escolhida para estudos posteriores. A estirpe selecionada, CDPA-01, foi isolada de solo de caverna, coletado na região da Chapada Diamantina, Poço Azul, Bahia, pela técnica convencional das diluições seriadas em placas, e foi identificada como pertencente ao gênero *Streptomyces* através da técnica de seqüenciamento do rRNA 16S. De acordo com Xu et al. 1996, este gênero no solo desempenha as funções ecológicas mais importantes, representando mais de 90 % do total de actinomicetos.

NASCIMENTO et al. (2003) isolou três actinomicetos promissores para produção de xilanases, entre os trinta actinomicetos que exibiram zonas de hidrólise, e a estirpe AMT-3 (identificada como *Streptomyces malaysiensis*) foi

escolhida devido à seu melhor crescimento e características de esporulação, o mesmo critério utilizado para escolha da CDPA-01, deste trabalho.

Resultados relevantes foram encontrados por Ramirez e Cocha (2003), onde 92 % dos actinomicetos testados foram capazes de apresentar atividade celulolítica na presença de CMC.

A metodologia descrita por Breccia e colaboradores (1995) utilizada para a seleção de micro-organismos xilanolíticos e celulolíticos, é adequada, de fácil e rápida utilização, e não tóxica ao micro-organismo. A solução age formando zonas claras em forma de halos, indicando a ação enzimática da celulase ou xilanase, enquanto que a parte não afetada pela enzima cora-se de vermelho (MULLINGS, 1985).

A demonstração de que a solução Vermelho Congo mostra uma forte interação com polissacarídeos que contém ligações glicosídicas β -1,4 proporciona uma nova base para os ensaios de atividades endoglucanase, utilizando substratos não solúveis em uma sistema de difusão de agar em placa (TEATHER e WOOD, 1983). As vantagens potenciais deste sistema, enumerar e caracterizar micro-organismos celulolíticos e xilanolíticos, derivam em grande parte da cor intensa do complexo, que permite o uso de concentrações muito baixas do substrato e uma correspondente diminuição do tempo necessário para detectar pequenos níveis de atividade enzimática, sendo caracterizado como um método facilmente adaptável a qualquer micro-organismo viável (TEATHER e WOOD, 1983).

A natureza dos testes aplicados neste estudo impede qualquer comparação quantitativa da atividade enzimática. Variações na taxa de crescimento entre as cepas, os meios de cultivo utilizados e, no caso da técnica em placas, torna possíveis as variações na taxa de produção da enzima (THEATER e WOOD, 1982). No entanto, o tamanho do halo produzido no teste qualitativo, ou o índice enzimático, pode não corresponder, necessariamente à maior produção da enzima em fermentação, provavelmente porque as condições utilizadas para a fermentação podem não ser as melhores para todas as cepas (temperatura, tempo, nutrientes, etc.). De uma forma geral, o teste qualitativo auxilia na escolha das cepas que produzem a enzima de interesse, e dentre os que produzem os maiores halos, poderão ser

encontrados aqueles que produzem as maiores quantidades de enzima (TEN et al., 2004).

As enzimas celulolíticas têm sido estudadas devido o seu potencial em biotecnologia, incluindo uso em alimentos e bebidas, detergente, indústria têxtil, polpa e papel.

CAPÍTULO 2

**Produção e caracterização de celulases em resíduos agro-
industriais**

RESUMO

Bispo, A. S. da R. Produção e Caracterização de Celulases em Resíduos Agro-Industriais.

As celulases são enzimas de grande potencial biotecnológico, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de processos industriais, sendo os actinomicetos e fungos os grandes produtores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de resíduos agro-industriais para produção e caracterização de endoglucanases por *Streptomyces* sp.CDPA-01, em fermentação submersa, utilizando diferentes concentrações de bagaço de cana, farelo de aveia e carboximetilcelulose (CMC), como fontes de carbono e milhocina, como fonte de nitrogênio, utilizando a matriz do planejamento fatorial DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). A estirpe foi cultivada em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio de saís, suplementado com diferentes combinações entre as fontes, sendo inoculada com 50 µL de suspensão de esporos padronizada ($1,27 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹) e os extratos enzimáticos coletados em intervalos de 24 horas durante 5 dias, foram centrifugados, filtrados e congelados. A medida da atividade enzimática foi determinada através do método DNS. A maior produção de celulases (0,740 U.mL⁻¹) foi observada para bagaço de cana, após 5 dias. Contudo, valores próximos de atividade de CMCase (0,680 U.mL⁻¹ e 0,620 U.mL⁻¹) foram observadas para CMC e farelo de aveia, respectivamente após 4 dias de cultivo. A caracterização enzimática foi conduzida nas diferentes fontes de carbono, sendo a condição ótima de 60 °C e pH 4.0 para bagaço de cana, 50 °C e pH 3.0 e 8.0, para CMC e farelo de aveia, respectivamente. As enzimas do extrato obtido de bagaço de cana e farelo de aveia se mostraram estáveis a 50 °C, ao passo que do extrato de CMC foi inferior a 50 % após 4 horas. O efeito dos íons metálicos foi negativo para o extrato de bagaço de cana e positivo para os extratos de farelo de aveia e CMC. De acordo com os dados obtidos, as características bioquímicas da enzima são adequadas para uso industrial.

Palavras-chave: *Streptomyces*, bioprocessos, resíduos lignocelulósicos, CMCases, fermentação submersa

ABSTRACT

Bispo, A. S. da R. Production and Characterization of cellulases in agro-industrial residues.

Cellulases are enzymes of great biotechnological potential, can be applied in a wide variety of industrial processes and actinomycetes and fungi are major producers. The aim of this study was to evaluate the potential of agro-industrial residues for production and characterization of endoglucanases by *Streptomyces* sp.CDPA-01 in submerged fermentation using different concentrations of sugarcane bagasse (SCB), oat bran (OB) or carboxymethylcellulose (CMC), as sources carbon and corn steep liquor as nitrogen source, using the matrix of the factorial design CCRD (Central Composite Rotational Design). The strain was grown in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL medium of salts, supplemented with different combinations of sources, and inoculated with 50 μL of standardized spore suspension (1.27×10^{10} UFC.mL⁻¹) and enzyme extract collected every 24 hours for 5 days were centrifuged, filtered and frozen. The measurement of enzyme activity was determined by DNS method. The higher production of cellulase (0.740 U.mL⁻¹) was observed for SCB, after 5 days. However, close values of CMCase activity (0.680 U.mL⁻¹ and 0.620 U.mL⁻¹) were observed for CMC and OB, respectively after 4 days of cultivation. The enzymatic characterization was carried out at different carbon sources, and the optimum condition of 60 °C and pH 4.0 for SCB, 50 °C and pH 3.0 and 8.0, and CMC for OB, respectively. The enzyme extract obtained from SCB and oat bran were stable at 50 °C, while the extract of CMC was less than 50 % after 4 hours. The effect of metal ions was negative for the extract of SCB and positive for the extracts of OB and CMC. According to the data, the biochemical characteristics of the enzyme are suitable for industrial use.

Keywords: *Streptomyces*, bioprocesses, lignocellulosic residues, CMCase, submerged fermentation

INTRODUÇÃO

Cada vez mais existe a necessidade de utilizar matérias primas renováveis, bem como criar um uso adequado para a utilização de resíduos agroindustriais, derivados de milho, cana, trigo, arroz e outros cereais, bem como os resíduos da indústria de papel e celulose, fontes consideradas úteis para conversão de lignocelulose em açúcares fermentáveis, (HERNÁNDEZ-SALAS et.al., 2009). Devido à dificuldade de degradação de celulose em condições ambientais, resíduos celulósicos se acumulam o que os torna um transtorno para o meio ambiente. Estima-se que aproximadamente 4×10^9 toneladas de celulose são geradas anualmente e que são degradadas no ambiente pela ação de micro-organismos (ARO et al., 2005). Alguns dos resíduos agroindustriais possuem uma proporção de celulose e hemicelulose superior a 75 % em seu conteúdo, o que justifica o uso deste material na produção de celulases (ADSUL et al., 2004), ou bioconversão em metabólitos de alto valor agregado, como etanol.

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma gama de micro-organismos, principalmente os actinomicetos, pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Estes micro-organismos são muito importantes no processo de bioconversão, pois são capazes de colonizar substratos complexos e hidrolisar vários polímeros, além de crescerem em temperaturas elevadas e serem habitantes naturais do solo. 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. Os substratos que compõem os meios devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento. 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, melado de beterraba, água de maceração de milho (milhocina), farinha de aveia, farinha de centeio, farelo de soja e soro de leite. Os sais minerais são adicionados, especialmente como fontes suplementares de nitrogênio, fósforo, enxofre ou cálcio.

Sendo assim, este trabalho objetivou estudar a produção de celulasas, por *Streptomyces* sp.CDPA-01 em diferentes substratos lignocelulósicos sob fermentação submersa, devido a possibilidade de ter melhor racionalização e padronização do processo, o que é fundamental para a indústria, além de permitir um sistema de cultura homogêneo. Em seguida, caracterizar a enzima quanto a melhor atividade no perfil ótimo de temperatura e pH, determinação da termoestabilidade e influência de íons metálicos.

A caracterização do perfil bioquímico da enzima é importante, pois a produção das celulasas com características bioquímicas adequadas à aplicação industrial representa objeto de estudo relevante, cujo enfoque no desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias visando aumento de produtividade, de escala e redução de custos torna-se de extrema importância.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção do Micro-organismo

A estirpe celulolítica *Streptomyces* sp.CDPA-01, isolada de solo de caverna na Região da Chapada Diamantina, no Estado da Bahia, foi mantida em glicerol 20 % a -20 °C.

Preparo para obtenção do inóculo

Para realizar a suspensão de esporos, o micro-organismo foi inoculado em cinco placas de Petri contendo o meio Agar-extrato de malte-extrato de levedura (ISP-2), e incubado a 30 °C por 12 dias (formação do micélio aéreo), em BOD. Após este período, pequenos fragmentos do meio com crescimento de biomassa celular, foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 g de arroz parbolizado e autoclavado (120 °C por 55 minutos), segundo Soares et al, (2007).

Os frascos Erlenmeyers foram incubados em B.O.D a temperatura de 30 °C por aproximadamente 8 dias, até que todo o arroz estivesse coberto com crescimento celular. Decorrido este período, adicionou-se 75 mL de solução salina 0,85 % nos frascos, sob agitação orbital, por aproximadamente 10 minutos. Após a homogeneização, procedeu-se a filtração com gaze estéril. O filtrado foi transferido para Tubos de 50 mL (Falcon) (Separação de esporos do micélio), e centrifugado (CIEN TEC-CT 4000) a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” formado (esporos) foi ressuscitado em 4 mL de glicerol 20 % e agitado em Vortex (BIOMIXER, QL-901), por aproximadamente, 2 minutos. Em seguida, determinou-se a concentração através do método de diluições seriadas, onde retirou-se 1 mL da suspensão e adicionou em 9 mL de solução salina 0,85 %, repetindo-se este procedimento até perfazer 8 diluições (10^{-8}). O plaqueamento foi feito em meio Ágar-extrato de malte-extrato de levedura (ISP-2) das diluições 10^{-6} a 10^{-8} , em triplicata. As placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias, para posterior contagem das colônias (HOPWOOD et.al., 1985).

A diluição escolhida para contagem das colônias baseou-se no critério das placas que continham entre 20 a 200 colônias. E o cálculo para padronização do inóculo, foi feito segundo a equação abaixo, e o resultado expresso em UFC.mL⁻¹.

$$C = MC \times FCP \times FD \quad \left\{ \begin{array}{l} C = \text{Contagem em UFC.mL}^{-1} \\ FD = \text{Fator de diluição (titulação)} \\ FCP = \text{Fator de correção do plaqueamento (10)} \\ MC = \text{Média da contagem das colônias} \end{array} \right.$$

Produção de celulases em Fermentação submersa

Os seguintes substratos foram testados:

- Farelo de aveia, fornecido pela indústria de cereais Jasmine (rico em glucanas);
- Carboximetilcelulose de baixa viscosidade (Sigma)
- Bagaço de cana de açúcar (fornecido por uma Usina Sucro-alcooleira da região de Jussiapé, BA) – a fibra foi triturada, lavada e seca a 50° C por 48 horas.
- Milhocina (“Corn Steep Liquor” – SIGMA)

Para a produção de CMCases em fermentação submersa, as células foram cultivadas em meio de sais mineirais (BRECCIA et al., 1995) modificado contendo (g.L⁻¹): 2,0 NaCl; 3,0 KH₂PO₄; 6,0 K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,02 CaCl₂.2H₂O e 1 mL de Solução de Elementos traços (0,64 g CuSO₄.5H₂O; 0,15 g ZnSO₄.7H₂O; 0,11 g FeSO₄.7H₂O; 0,79 g MnCl₂.4H₂O em 100 mL de água destilada), suplementado com diferentes concentrações de fontes de carbono (farelo de aveia, carboximetilcelulose e bagaço de cana de açúcar) e fonte de nitrogênio orgânica (milhocina), de acordo delineamento composto central rotacional, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Valores codificados e reais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2² para produção de celulases.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Fonte de Carbono (%)	0,47	0,8	1,6	2,4	2,73
Fonte de Nitrogênio (%)	0,1	0,3	0,8	1,3	1,51

A estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 foi cultivada em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL do meio descrito previamente (pH 7,0), sendo inoculada com 50 μ L de suspensão de esporos padronizada ($1,27 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹). Os frascos foram incubados em agitador orbital (Fig. 1), a 150 rpm durante 6 dias a 30 °C, sendo retirado um frasco em intervalos de 24 horas (Fig. 2). Os sobrenadantes brutos foram obtidos através da centrifugação a 3000 rpm/15 minutos, foram filtrados em filtro de vidro sinterizado e aferido os valores de pH pelo método potenciométrico segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Em seguida, foram congelados (-20°C) para determinação da atividade enzimática.



Figura 1- Fermentação submersa utilizando erlenmeyers de 250 mL em agitador orbital.



Figura 2- Frascos retirados a cada 24 h para coleta do extrato enzimático bruto.

Delineamento Composto Central Rotacional- DCCR

A otimização das condições de produção de CMCase, foi realizada por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), ou seja, um 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, como mostra a Tabela 2, segundo Rodrigues e lemma, 2005. A variável dependente selecionada para este estudo foi a atividade enzimática, expressa em $U.mL^{-1}$, enquanto que as variáveis independentes foram a concentração das fontes de carbono e nitrogênio.

Como fontes de carbono, foram utilizados farelo de aveia, carboximetilcelulose e bagaço de cana de açúcar, enquanto que a fonte de nitrogênio utilizada foi a milhocina. O sistema foi conduzido em frascos de Erlenmeyers (250 mL), por fermentação submersa, e a melhor combinação entre as fontes de cada experimento e também o melhor dia de produção, foram analisados no intuito de definir faixas mais adequadas para cada resposta.

Tabela 2- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (valores reais e codificados) para determinação da atividade enzimática

ENSAIO	Níveis		Fonte de C	Fonte de N
			(%)	(%)
1	- 1	- 1	0,8	0,3
2	+ 1	- 1	2,4	0,3
3	- 1	+ 1	0,8	1,3
4	+ 1	+ 1	2,4	1,3
5	- 1,41	0	0,47	0,8
6	+ 1,41	0	2,73	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

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATISTICA 7.0® (StatSoft).

Ensaio Analítico

Medida da atividade enzimática

A determinação da atividade CMC_{Case} foi conduzida através da quantificação dos açúcares redutores gerados na presença de carboximetilcelulose 2 % (p/v) em tampão citrato de sódio, 50 mM, pH 4.8, pelo método DNS (MILLER, 1959), como descrito por Ghose (1987). O sistema enzimático foi incubado a 50°C por 20 minutos e a leitura foi feita em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-220) a 540 nm.

Uma unidade de atividade CMC_{Case} (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto nas condições do ensaio.

Determinação do perfil ótimo de temperatura

O estudo foi realizado sob as mesmas condições descritas no item anterior. As temperaturas de incubação variaram de 20 a 100 °C. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a pH 4,8, nas respectivas temperaturas segundo GRIGOREVSKI-LIMA et. al. (2005), e após o tempo de reação de 20 minutos, a atividade foi interrompida em banho de gelo. A dosagem dos açúcares redutores produzidos após atividade enzimática foi determinado pelo método DNS (MILLER, 1959).

Determinação do perfil ótimo de pH

Para o estudo do efeito do pH, a atividade CMC_{Case} foi determinada na temperatura ótima obtida a partir do item anterior. A mistura reacional foi incubada em banho-maria, com as faixas de pH variando de 2,0 a 10,0, utilizando como tampões: Glicina-HCl 50mM (pH 2,0–3,0), Citrato de sódio

50mM (pH 3,0–6,0), Fosfato 50mM (pH 6,0–8,0), Tris-HCl 50mM (pH 8,0–9,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0–10,0). Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por Colowick & Kaplan (1955). A mistura reacional foi incubada em banho-maria, nos respectivos pH e após o tempo de reação de 20 minutos, a atividade foi interrompida em banho de gelo. A dosagem dos açúcares redutores produzidos após atividade enzimática foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959).

Termoestabilidade

O estudo foi realizado através da incubação do extrato enzimático bruto na temperatura de 50 °C. O extrato enzimático foi incubado por 8 horas, sendo as atividades determinadas após 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas, nos ótimos de temperatura e pH.

Influência de íons metálicos e Outros aditivos

O efeito de diferentes íons metálicos na atividade celulolítica foi estudado a partir da determinação da atividade enzimática na presença da solução do respectivo sal na concentração de 10mM na mistura reacional. O ensaio enzimático foi realizado na presença dos seguintes sais: magnésio (MgSO₄), zinco (ZnSO₄), cobre (CuSO₄), sódio (NaCl), potássio (KCl), cobalto (CoCl₂), cálcio (CaCl₂), manganês (MnCl₂), ferro III (FeCl₃) e Bário (BaCl₂). Também foi estudado o efeito do EDTA na atividade celulásica. A quantidade de açúcares redutores produzidos durante a incubação de 0,6 mL de amostra, 0,3 mL de solução de íons (80 mM) com 0,3 mL de carboximetilcelulose 2% (p/v) nas condições ótimas de temperatura e pH, durante 20 minutos, foi medida pelo método do DNS a 540nm (MILLER, 1959), após interrupção da reação enzimática por imersão em gelo.

RESULTADOS

Produção de celulasas por fermentação submersa

Para padronização do inóculo, a diluição 10^{-7} foi escolhida por estar dentro da faixa de 20 a 200 colônias como é recomendado por muitos autores. A média das placas foi de 127 colônias, e após o cálculo de obtenção do inóculo padrão, as fermentações foram realizadas inoculando 50 μ l da suspensão de esporos ($1,27 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹) em cada frasco Erlenmeyer.

A análise dos sobrenadantes obtidos com o crescimento da estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 ao longo do tempo permitiu-nos determinar o melhor sistema, o melhor tempo, e o melhor substrato para produção da enzima.

- Estudo da produção de celulase em meio contendo farelo de aveia (FA) e milhocina (CSL)

A Figura 2 mostra a cinética de produção de endoglucanases pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 em fermentação submersa, utilizando diferentes combinações de farelo de aveia (FA) como fonte de carbono e milhocina (CSL), como fonte de nitrogênio. A atividade enzimática máxima obtida nessas condições foi de 0,620 U.mL⁻¹, no ensaio 8, quando se utilizou 1,6 % (p/v) da fonte de carbono e a concentração máxima da fonte de nitrogênio [1,51 % (p/v)], após 4 dias de crescimento. Entretanto, quando a mesma concentração da fonte de carbono foi utilizado com a concentração mínima [0,1 % (p/v)] da fonte de nitrogênio (CSL), no ensaio 7, a atividade máxima foi de 0,280 U.mL⁻¹, ao fim de 4 dias, diminuindo para 0,070 U.mL⁻¹ após 6 dias de fermentação, demonstrando assim o efeito significativo da fonte de nitrogênio.

De acordo com os resultados obtidos, o tempo 4, que determinou a melhor atividade, foi escolhido para construção da superfície de resposta e através desta análise foi possível determinar as condições otimizadas, conhecendo a significância estatística da resposta.

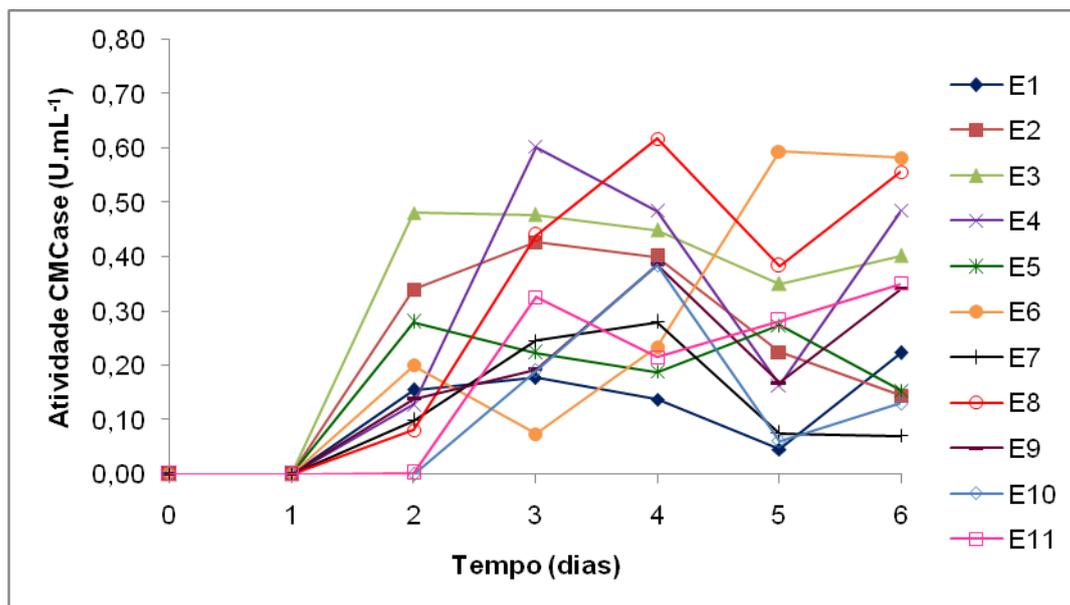


Figura 2- Cinética da produção de CMCases por *Streptomyces* sp. CDPA-01 em fermentação submersa, utilizando farelo de aveia como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

- Estudo da produção de celulase em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) e milhocina (CSL)

A maior atividade celulásica ($0,680 \text{ U.mL}^{-1}$) ocorreu no 4º dia de fermentação, quando a maior concentração [2,73% (p/v)] da fonte de carbono (CMC) foi utilizada juntamente com 0,8 % (p/v) da fonte de nitrogênio (CSL), no ensaio 6 (Fig. 3). Este pico de atividade se destacou dos demais ensaios, devido a ligeira queda ($0,150 \text{ U.mL}^{-1}$) na produção após este período.

No ensaio 7, onde a concentração [0,1% (p/v)] de milhocina é mínima, pode-se observar que a produção se manteve baixa ao longo da fermentação, enquanto que o ensaio 9 [1,6 % (p/v) de CMC e 0,8 % (p/v) de CSL] mostrou uma boa produção de celulases ($0,370 \text{ U.mL}^{-1}$) no 2º dia de fermentação (Fig. 3). Contudo, o tempo 4 foi escolhido para construção da superfície de resposta do planejamento fatorial utilizando estes substratos.

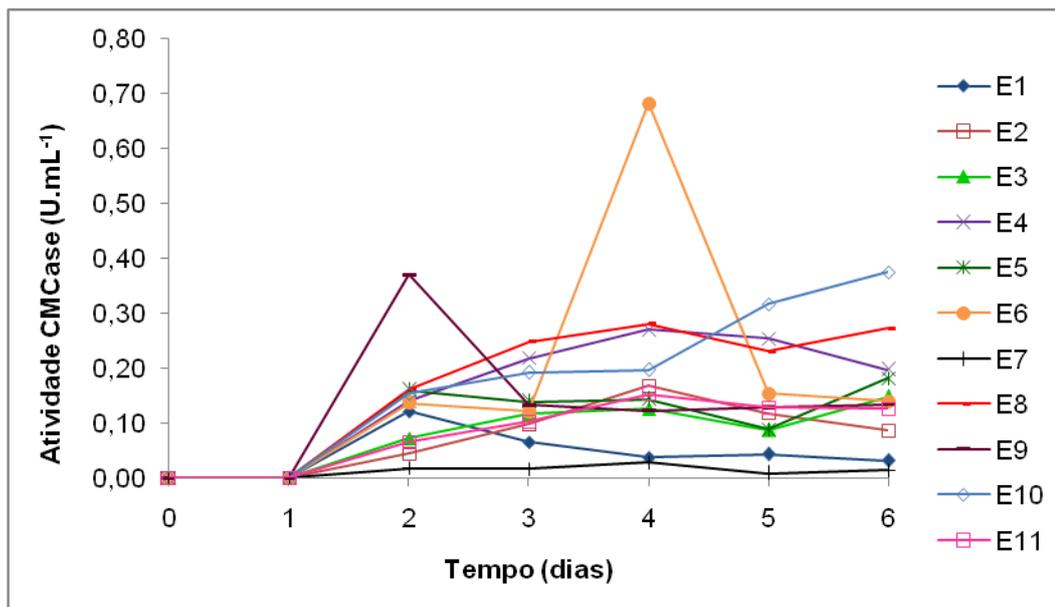


Figura 3- Cinética da produção de CMCases por *Streptomyces* sp. CDPA-01 em fermentação submersa, utilizando carboximetilcelulose como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

- Estudo da produção de celulase em meio contendo bagaço de cana de açúcar (BC) e milhocina (CSL)

A maior atividade enzimática celulásica ($0,740 \text{ U.mL}^{-1}$) quando se utilizou 1,6 % (p/v) de BC como fonte de carbono e 1,51 % (p/v) de CSL como fonte de nitrogênio ocorreu após 5 dias de fermentação, no ensaio 8, como mostra a Figura 4.

O ensaio 4 apresentou uma queda acentuada na produção ($0,030 \text{ U.mL}^{-1}$) no terceiro dia de crescimento, quando se utilizou a concentração de 2,4 % (p/v) da fonte de carbono, ao contrário do ensaio 2, que com a mesma concentração teve sua atividade elevada para $0,340 \text{ U.mL}^{-1}$, ou seja, aumentou em 90 % a produção de celulases, fato que pode ser explicado pelo aumento da concentração de milhocina de 0,3 % (ensaio 2) para 1,3 % (ensaio 4).

Diante destes resultados, o tempo 5 foi selecionado para construção do gráfico de superfície de resposta para posterior análise das condições otimizadas de produção.

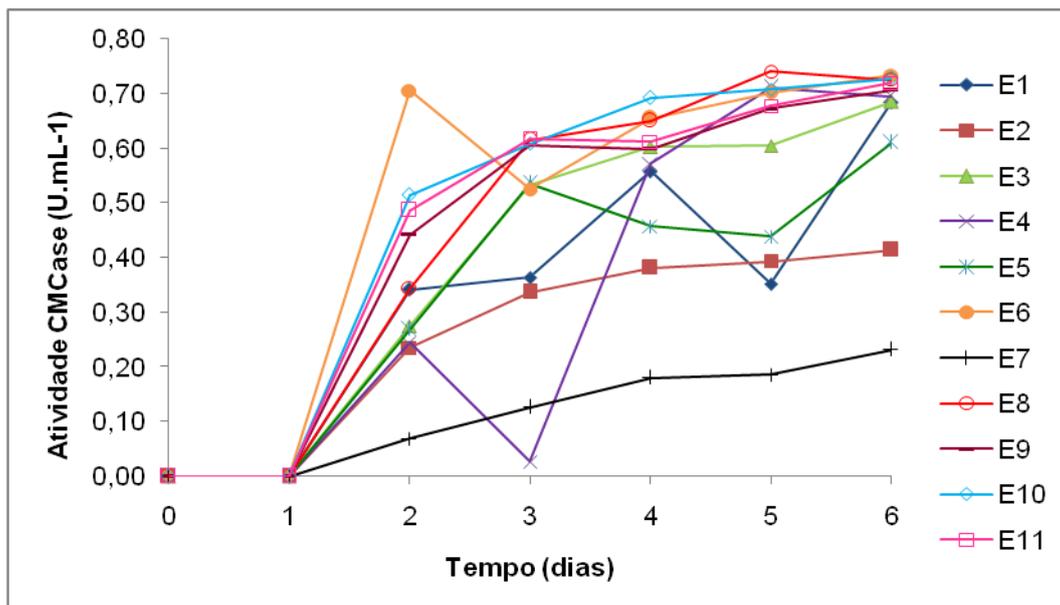


Figura 4- Cinética da produção de CMCases por *Streptomyces* sp. CDPA-01 em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

Com relação aos valores de pH, quando se utilizou CSL como fonte de nitrogênio, tanto com CMC, como com BC, não houve muita alteração, mantendo-se entre 6,8 e 7,2. Por outro lado, quando se utilizou FA como fonte de carbono, a faixa de variação de pH foi maior, de 6,8 a 7,7 nos ensaios 2 e 4, quando se utilizou uma alta concentração [2,4 % (p/v)] da fonte de carbono. Ao final de cada fermentação foi possível observar que o aumento do valor de pH coincide com a queda na produção da enzima provavelmente devido a morte celular.

Respeitando a cinética do processo, para cada um dos 11 ensaios do DCCR foram retiradas amostras em função do tempo para determinação da atividade de celulase. A tabela 3 apresenta os níveis estudados do delineamento experimental e os resultados foram analisados utilizando o Statistica ® 7.0, StatSoft. A atividade da enzima quando utilizou-se FA como fonte de carbono e CSL como fonte de nitrogênio, variou de 0,140 U.mL⁻¹ (ensaio 1) para 0,620 U.mL⁻¹ (ensaio 8), de 0,030 U.mL⁻¹ (ensaio 7) para 0,680 U.mL⁻¹ (ensaio 6) quando se utilizou CMC e CSL, enquanto que para o BC e

CSL, a produção variou de 0,190 U.mL⁻¹ (ensaio 7) para 0,740 U.mL⁻¹ (ensaio 8).

Segundo os dados apresentados na Tabela 3, é relevante citar que os valores obtidos nas condições dos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) houve pouca variação nos valores da atividade celulásica obtida, indicando assim, a reprodutibilidade dos dados. No experimento com BC e CSL, por exemplo, é possível observar a qualidade da repetibilidade dos experimentos com uma menor variabilidade do processo, onde os valores obtidos estão muito próximos do predito pelo modelo, podendo indicar uma maior homogeneidade do processo, enquanto que com a utilização de CMC, a variabilidade aumentou, e isto pode ser devido ao ensaio 10, onde a atividade enzimática aumentou rapidamente.

Tabela 3- Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com resultados obtidos e preditos no melhor sistema para cada substrato utilizado.

Ensaio	% Fonte de C	% Fonte de N	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade
			Experimental (U.mL ⁻¹)	Predita (U.mL ⁻¹)	Experimental (U.mL ⁻¹)	Predita (U.mL ⁻¹)	Experimental (U.mL ⁻¹)	Predita (U.mL ⁻¹)
			Farelo de Aveia + Milhocina		Carboximetilcelulose + Milhocina		Bagaço de cana de açúcar + Milhocina	
1	0,8 (-1)	0,3 (-1)	0,140	0,180	0,040	0,023	0,350	0,290
2	2,4 (+1)	0,3 (-1)	0,400	0,260	0,170	0,278	0,390	0,410
3	0,8 (-1)	1,3 (+1)	0,450	0,400	0,130	0,158	0,600	0,630
4	2,4 (+1)	1,3 (+1)	0,490	0,480	0,270	0,423	0,710	0,750
5	0,47 (-1,41)	0,8 (0)	0,190	0,183	0,140	0,156	0,440	0,485
6	2,73 (+1,41)	0,8 (0)	0,230	0,297	0,680	0,524	0,700	0,655
7	1,6 (0)	0,1 (-1,41)	0,280	0,264	0,030	0,001	0,190	0,230
8	1,6 (0)	1,51 (+1,41)	0,620	0,576	0,280	0,199	0,740	0,710
9	1,6 (0)	0,8 (0)	0,390	0,420	0,120	0,160	0,670	0,690
10	1,6 (0)	0,8 (0)	0,390	0,420	0,200	0,160	0,710	0,690
11	1,6 (0)	0,8 (0)	0,370	0,420	0,150	0,160	0,680	0,690

No entanto, de acordo com a análise estatística dos resultados, foi possível determinar os coeficientes de regressão, a análise de variância e os gráficos de superfície de resposta para atividade CMCCase nos diferentes substratos utilizados, como serão apresentados a seguir.

Vale ressaltar que todos os parâmetros estudados foram considerados com p - valores menores que 5 % ($p < 0,05$), e que nas tabelas de coeficientes de regressão (4, 6 e 8) os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos com à letra Q.

Farelo de Aveia e Milhocina

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na tabela 4. Com exceção da interação ($p = 0,0720$) e do termo quadrático da concentração da fonte de nitrogênio ($p = 0,0864$), todos os parâmetros do modelo foram significativos, podendo-se elaborar um modelo com as variáveis codificadas: Equação 1

$$\text{Equação 1: } Y = 0,38 + 0,04x_1 - 0,08x_1^2 + 0,11x_2 + 0,04x_2^2 - 0,05x_1x_2$$

De acordo com a análise de variância (ANOVA), como mostra a tabela 5, verificamos que o F calculado (19) foi cerca de 4 vezes maior que o F tabelado (5,05), mostrando que o modelo é significativo e o coeficiente de determinação (R^2), foi de 95 %. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na tabela 3.

Tabela 4- Coeficientes de regressão para a resposta atividade CMCCase (4 dias de fermentação), utilizando farelo de aveia e milhocina como substratos.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim.de conf.-95%	Lim.de conf.+95%
Média	0,38	0,03	13,7	0,0000	0,31	0,46
Fonte de C (L)	0,04	0,02	2,6	0,0478	0,00	0,09
Fonte de C (Q)	-0,08	0,02	-3,8	0,0131	-0,13	-0,02
Fonte de N (L)	0,11	0,02	6,4	0,0013	0,07	0,15
Fonte de N (Q)	0,04	0,02	2,1	0,0864	-0,01	0,10
CXN	-0,06	0,02	-2,3	0,0720	-0,12	0,01

Tabela 5- ANOVA para atividade CMCase no quarto dia de fermentação com Farelo de aveia e milhocina

Fontes de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ftab
Regressão	0,19	5	0,038		
Resíduos	0,01	5	0,002	19	5,05
Total	0,20	10	0,020		

% variação explicada (R^2) = 95 %; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Carboximetilcelulose e Milhocina

Neste estudo foram considerados todos os parâmetros, mas somente o termo linear da concentração de CMC ($p=0,0278$) foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Isto significa que o aumento da concentração de carbono proporcionou um aumento na produção de celulase. Por outro lado, a concentração de milhocina não apresentou valores significativos, mostrando que essa variável não interferiu na produção da celulase na faixa estudada (Tabela 6).

A análise da variância (ANOVA), apresentada na tabela 7, foi utilizada para avaliação de significância do modelo. Baseado no teste F, o modelo é capaz de prever a atividade enzimática em relação às variáveis independentes. O valor F calculado (3,43) foi menor que o F tabelado (5,05), mostrando que o modelo gerado, Equação 2, não foi estatisticamente significativo para o nível de 95 % de confiança.

Equação 2: $Y = 0,16 + 0,13x_1 + 0,09x_1^2 + 0,07x_2 - 0,03x_2^2 + 0,0025x_1 \cdot x_2$

O valor de R^2 de 77,5 % pode ser considerado razoável para este tipo de processo, em comparação aos demais substratos.

Tabela 6- Coeficientes de regressão para a resposta atividade CMCase (4 dias de fermentação), utilizando carboximetilcelulose e milhocina como substratos.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim.de conf.-95%	Lim.de conf.+95%
Média	0,16	0,07	2,28	0,0716	-0,02	0,33
Fonte de C (L)	0,13	0,04	3,07	0,0278	0,02	0,24
Fonte de C (Q)	0,09	0,05	1,88	0,1189	-0,03	0,22
Fonte de N (L)	0,07	0,04	1,61	0,1674	-0,04	0,18
Fonte de N (Q)	-0,03	0,05	-0,67	0,5353	-0,16	0,10
CXN	0,00	0,06	0,04	0,9681	-0,15	0,16

Tabela 7- ANOVA para atividade CMCase no quarto dia de fermentação com CMC e milhocina

Fontes de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ftab
Regressão	0,24	5	0,048		
Resíduos	0,07	5	0,014	3,43	5,05
Total	0,31	10	0,031		

% variação explicada (R^2) = 77,5 %; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Bagaço de cana de açúcar e Milhocina

Observando a tabela 8 é possível perceber que todos os termos dos coeficientes de regressão obtidos foram estatisticamente significativos a 95 % de confiança, exceto a de interação C e N, sendo que este foi incorporado a falta de ajuste para cálculo da ANOVA que está apresentada na tabela 9.

Tabela 8- Coeficientes de regressão para a resposta atividade CMCase (5 dias de fermentação), utilizando bagaço de cana de açúcar e milhocina como substratos.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim.de conf.-95%	Lim.de conf.+95%
Média	0,69	0,03	25,11	0,0000	0,62	0,75
Fonte de C (L)	0,06	0,02	3,86	0,0083	0,02	0,11
Fonte de C (Q)	-0,06	0,02	-2,99	0,0244	-0,11	-0,01
Fonte de N (L)	0,17	0,02	10,06	0,0001	0,13	0,21
Fonte de N (Q)	-0,11	0,02	-5,62	0,0014	-0,16	-0,06
CXN	0,02	0,02	0,71	0,5109	-0,05	0,08

Tabela 9- ANOVA para atividade CMCase no quinto dia de fermentação com bagaço de cana de açúcar e milhocina

Fontes de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ftab
Regressão	0,34	4	0,085		
Resíduos	0,01	6	0,001	85	4,53
Total	0,35	10	0,035		

% variação explicada (R^2) = 97 %; $F_{4;6;0,05} = 4,53$

O coeficiente de determinação foi igual a 97 %. O teste F foi altamente significativo, sendo o modelo adequado para descrever os resultados através de superfície de resposta. O parâmetro estatisticamente não significativo (interação) foi eliminado do modelo e adicionado aos resíduos.

O modelo codificado foi utilizado para gerar a Equação 3, que prediz a atividade de CMCase em função das variáveis independentes:

$$\text{Equação 3: } Y = 0,69 + 0,06x_1 - 0,06x_1^2 + 0,17x_2 - 0,11x_2^2$$

A partir dos modelos obtidos foi então possível obter as superfícies de resposta e curvas de contorno para analisar as melhores condições da utilização das fontes de carbono e nitrogênio para produção de celulasas que levam a um maior valor de atividade celulolítica.

Através da superfície de resposta obtida para otimização da produção de celulasas em diferentes concentrações de farelo de aveia e milhocina, figura 5 (A e B), pode-se obter as condições favoráveis que resultem em maior valor de atividade. É possível verificar através da superfície e curvas de contorno que a

faixa mais baixa estudada na fonte de nitrogênio (0,1 a 0,8 %) minimiza a produção de celulases. Nesta faixa a fonte de carbono (0,47 a 2,74 %) não afeta esta resposta. Entretanto, para maximizar a atividade é necessário aumentar a concentração da fonte de nitrogênio dentro da faixa central da fonte de carbono, uma vez que está dentro da faixa considerada ótima para atividade.

Para otimização do processo em diferentes concentrações de CMC e milhocina, a superfície de resposta e curvas de contorno, apresentadas na figura 6 (A e B) mostram que a faixa estudada (0,47 a 2,4 %) da fonte de carbono não teve efeito significativo na atividade enzimática, porém o termo linear da fonte de carbono ($p = 0,0278$) foi significativo, indicando que o aumento de CMC poderá resultar em maior valor de atividade. Entretanto, a fonte de nitrogênio não afeta esta resposta dentro das faixas estudadas. Diante disso, podemos observar que as concentrações utilizadas nos ensaios 4 e 6 foram as que mais se aproximaram da região ótima para otimização do uso das fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, sendo aconselhável fixar a milhocina em 1,3 % e aumentar a concentração do CMC.

No estudo com bagaço de cana e milhocina, o modelo foi altamente significativo, e segundo a análise da superfície de resposta e curvas de contorno (figura 7 A e B) geradas, pode-se obter as melhores condições para otimização da produção de celulases. Verificou-se que para a fonte de carbono a faixa ótima é de 1,6 a 2,4 % e para a fonte de nitrogênio entre 1,0 e 1,3 %, porém, o ensaio 4 está dentro da condição ótima para produção de celulases, e como a porcentagem utilizada de milhocina não esta associada a maiores valores de atividade, é aconselhável fixar a fonte de nitrogênio em 1,3 % e variar a fonte de carbono de modo a melhorar a produção com economia de substrato.

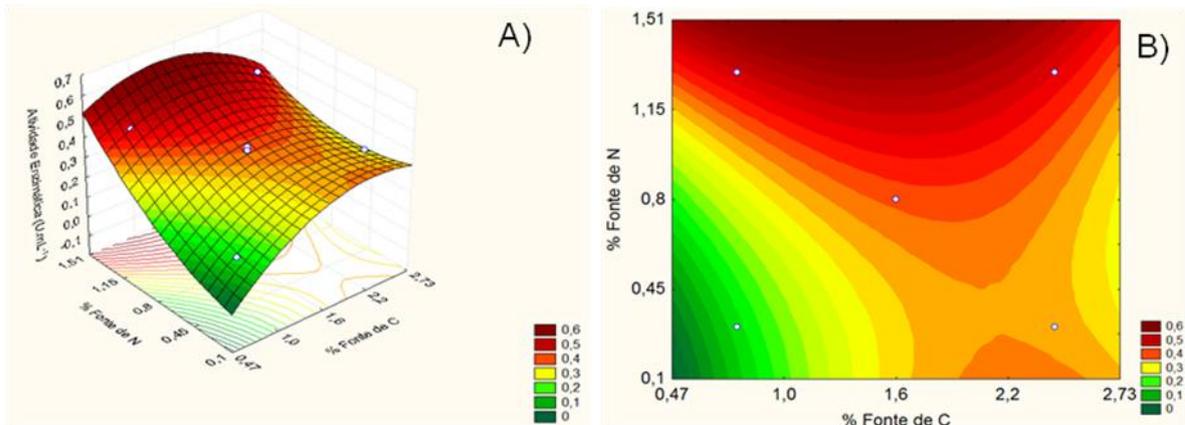


Figura 5- Análise de Superfície de resposta para a otimização da produção de CMCases pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 em diferentes concentrações de Farelo de aveia (CARB) e Milhocina (NIT), após 4 dias de fermentação.

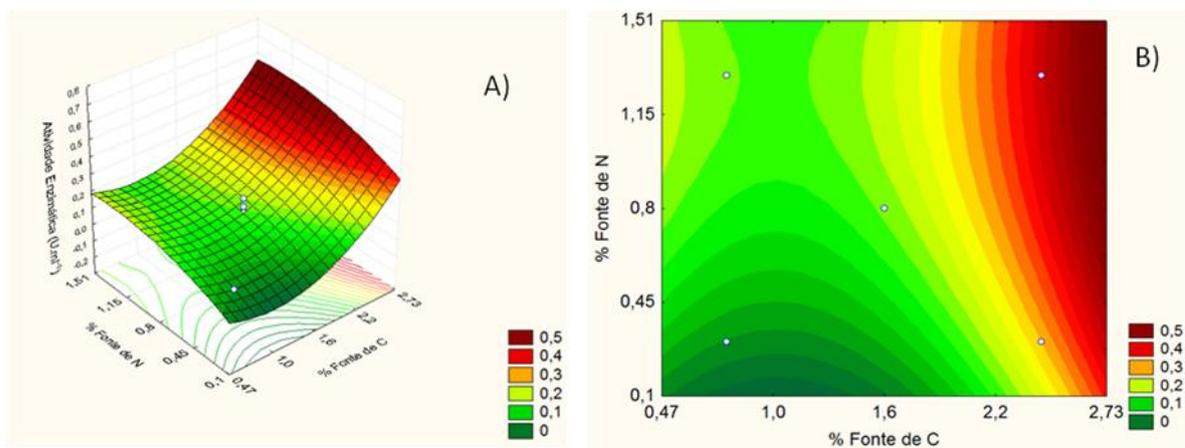


Figura 6- Análise de Superfície de resposta para a otimização da produção de CMCases pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 em diferentes concentrações de CMC (CARB) e Milhocina (NIT), após 4 dias de fermentação.

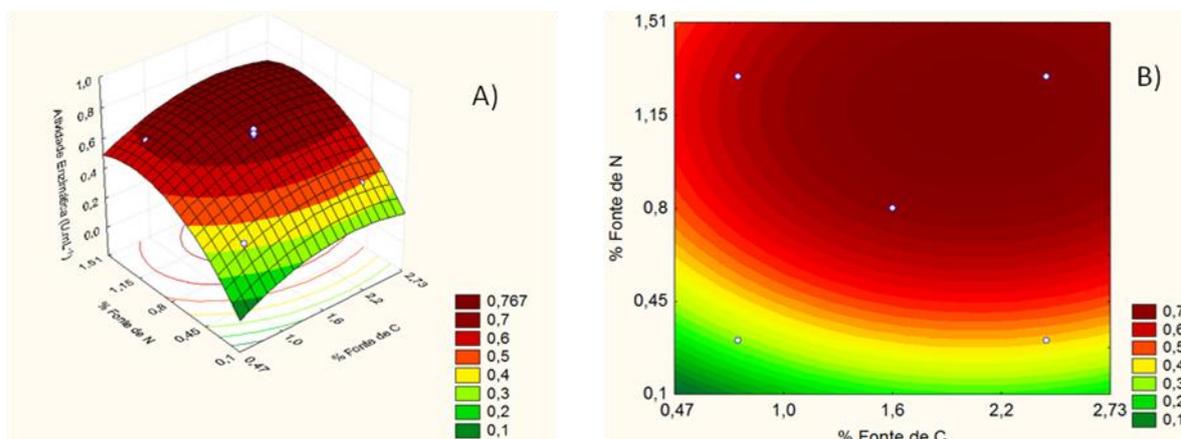


Figura 7- Análise de Superfície de resposta para a otimização da produção de CMCases pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 em diferentes concentrações de bagaço de cana de açúcar (CARB) e Milhocina (NIT), após 5 dias de fermentação.

Essas observações podem ser reforçadas pelos diagramas de Pareto (Figura 8), que fornece o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis [A) FA e CSL; B) CMC e CSL; C) BC e CSL] possui sobre a atividade celulásica, estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do grau de confiança estabelecido para a análise estatística (95%), ou seja, $p \geq 0,05$.

Cabe destacar que os fatores correspondentes ao efeito linear das variáveis fontes de carbono e nitrogênio (figura 8 A e C), mostraram significância estatística, enquanto que na figura 8B, apenas o termo linear da fonte de carbono foi significativo para produção de celulasas. Do mesmo modo, o efeito quadrático da fonte de carbono foi significativo nas concentrações de farelo de aveia e bagaço de cana (figura 8 A e C), enquanto que na figura 8B nenhuma das fontes teve efeito significativo. Em todos os casos, pode-se observar que a interação com as variáveis não apresentaram significância estatística.

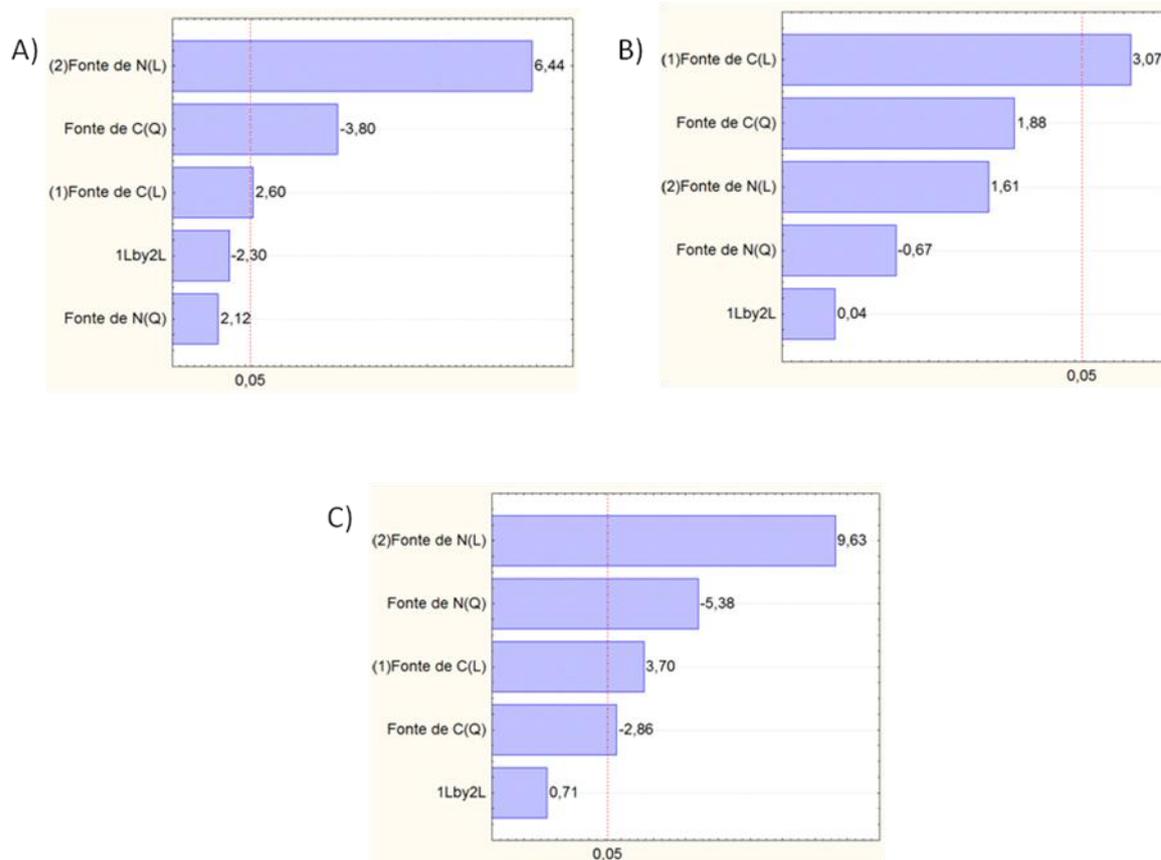


Figura 8- Diagramas de Pareto (efeitos estimados) para atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp.CDPA-01 em fermentação submersa, mostrando as variáveis significativas com $p \geq 0,05$. A) FA e CSL, B) CMC e CSL e C) BC e CSL.

Confirmação experimental das condições otimizadas

No planejamento experimental, é muito interessante realizar alguns ensaios na condição otimizada, para verificar a dinâmica de produção da enzima, validando experimentalmente as condições estabelecidas pela análise de superfície de resposta. Assim, foram realizados ensaios em triplicata com o meio otimizado (tabelas 10, 11 e 12), e posteriormente foi feita a caracterização enzimática com os extratos brutos obtidos.

Tabela 10- Validação dos resultados obtidos na produção de celulases por *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando farelo de aveia e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de cultivo.

Ensaio	Fonte de C (%)	Fonte de N (%)	Atividade (U.mL⁻¹)
1	2,0	1,50	0,842
2	2,0	1,65	1,039
3	2,0	1,80	0,749

Tabela 11- Validação dos resultados obtidos na produção de celulases por *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando carboximetilcelulose e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de cultivo.

Ensaio	Fonte de C (%)	Fonte de N (%)	Atividade (U.mL⁻¹)
1	2,80	1,3	1,325
2	2,95	1,3	1,544
3	3,10	1,3	1,351

Tabela 12- Validação dos resultados obtidos na produção de celulases por *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando bagaço de cana de açúcar e milhocina em fermentação submersa, após 5 dias de cultivo.

Ensaio	Fonte de C (%)	Fonte de N (%)	Atividade (U.mL⁻¹)
1	2,4	1,3	1,180
2	2,3	1,3	1,177
3	2,2	1,3	1,167

De acordo com os resultados obtidos a partir da média das triplicatas, a máxima atividade foi de 1,039 U.mL⁻¹ (para FA e CSL), 1,544 U.mL⁻¹ (para CMC e CSL) e 1,180 U.mL⁻¹ (para BC e CSL), nos ensaios 2, 2 e 1, respectivamente. Estes extratos foram utilizados para determinar o perfil de temperatura, pH, termoestabilidade e influência de íons metálicos na atividade celulásica produzida.

Caracterização Enzimática

Perfil ótimo de temperatura

Foi observado que a temperatura ótima para as atividades enzimáticas de celulases foi de 50 °C (Figuras 9 e 10), quando se utilizou farelo de aveia e carboximetilcelulose como fontes de carbono, e 60 °C (figura 11), quando se utilizou o bagaço de cana. Em todos os casos, foi possível observar uma significativa queda na atividade a partir do ótimo de atividade para cada substrato utilizado. Porém, a atividade relativa em 40 e 60 °C, na utilização de CMC (figura 10), ficou em torno de 50 e 60 %, respectivamente, enquanto, que com o bagaço de cana (figura 11), a atividade relativa em 40 e 50 °C foi de 80 e 95 %.

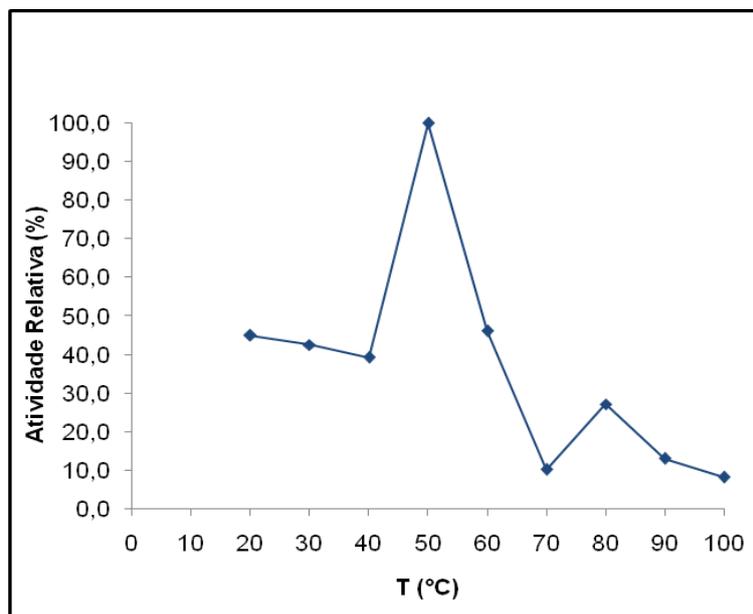


Figura 9- Efeito da temperatura na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando farelo de aveia e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de crescimento. A atividade relativa está expressa como a percentagem do máximo (100% de atividade = 1,039 U.mL⁻¹).

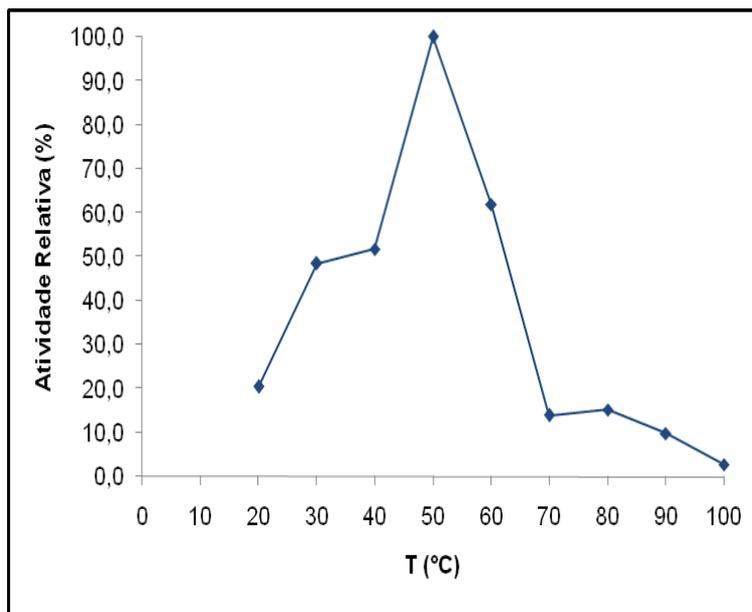


Figura 10- Efeito da temperatura na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando carboximetilcelulose e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de crescimento. A atividade relativa está expressa como a porcentagem do máximo (100% de atividade = $1,544 \text{ U.mL}^{-1}$).

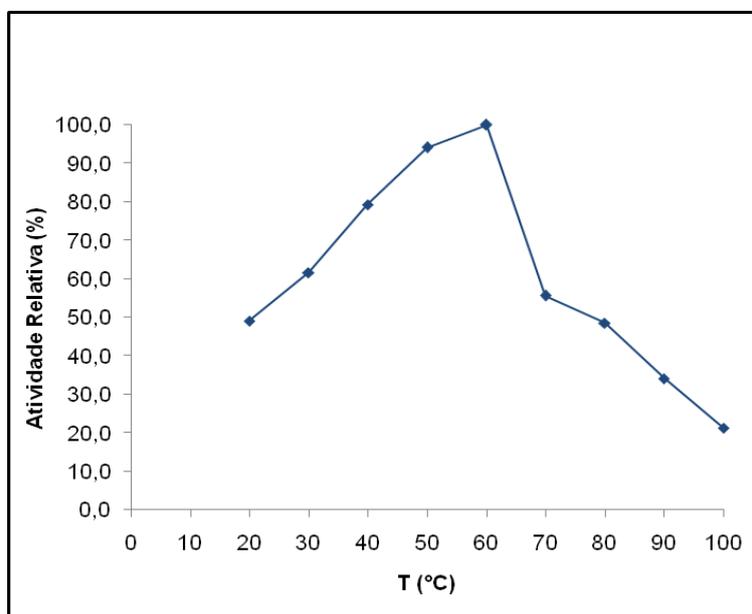


Figura 11- Efeito da temperatura na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando bagaço de cana e milhocina em fermentação submersa, após 5 dias de crescimento. A atividade relativa está expressa como a porcentagem do máximo (100% de atividade = $1,585 \text{ U.mL}^{-1}$).

Perfil ótimo de pH

Quanto ao pH, a atividade celulásica dos sobrenadantes obtidos a partir da utilização de FA, CMC e BC, como fontes de carbono, apresentaram um ótimo em pH 8,0 (Figura 12), pH 3,0 (Figura 13) e pH 4,0 (Figura 14), respectivamente. Foi possível observar na figura 12, que o máximo de atividade foi mantida acima de 60 % na faixa de pH 5,0 - 9,0, já na figura 13, todos os pH (2,0 - 10,0) testados, mostraram atividade relativa superior a 70 %, assim como mostra a figura 14, porém na faixa de pH 2,0 - 9,0. Estas características podem ser importantes quando se pensa em aplicações industriais.

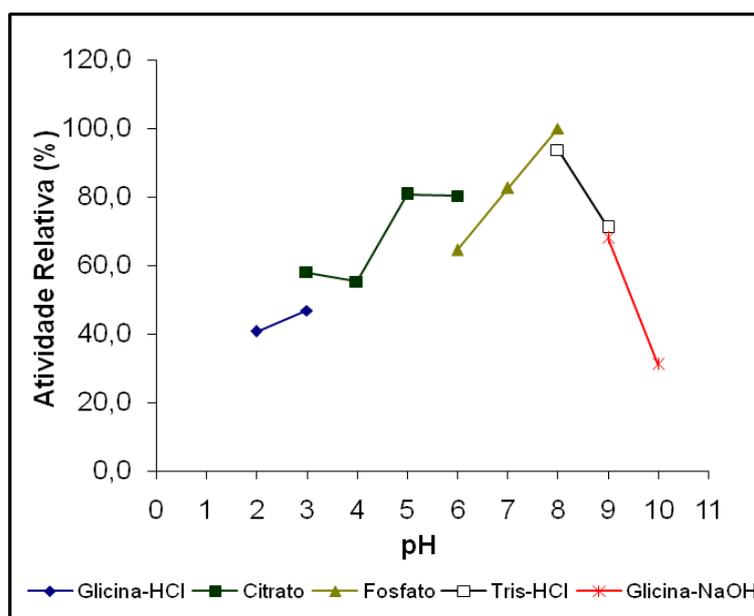


Figura 12- Efeito do pH na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando farelo de aveia e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de crescimento. A atividade relativa está expressa como a percentagem do máximo (100% de atividade = 1,094 U.mL⁻¹).

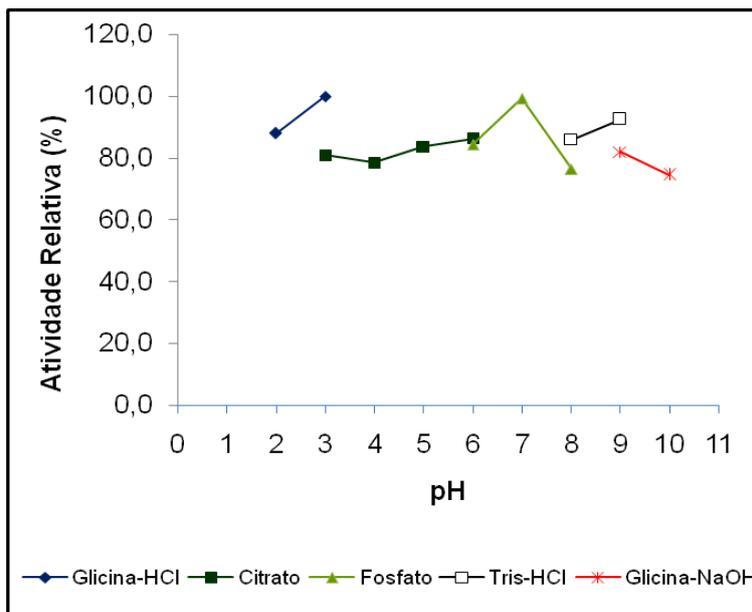


Figura 13- Efeito do pH na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando carboximetilcelulose e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de crescimento. A atividade relativa está expressa como a porcentagem do máximo (100% de atividade = 1,237 U.mL⁻¹).

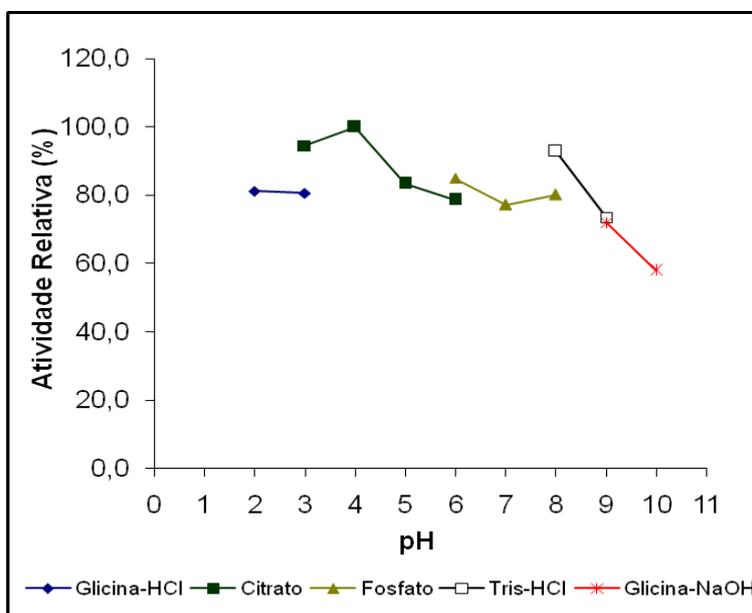


Figura 14- Efeito do pH na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando bagaço de cana e milhocina em fermentação submersa, após 5 dias de crescimento. A atividade relativa está expressa como a porcentagem do máximo (100% de atividade = 1,674 U.mL⁻¹).

Termoestabilidade

O estudo da termoestabilidade dos extratos enzimáticos demonstrou que a atividade celulásica se manteve bastante estável a 50 °C. Os sobrenadantes obtidos do cultivo com farelo de aveia e bagaço de cana se apresentaram mais estáveis, mantendo valores de atividade em torno de 68 % da inicial após 8 horas de incubação (Figuras 15 e 17). Tal aspecto não foi observado para o extrato obtido a partir do cultivo em carboximetilcelulose, onde verificou uma queda acima de 50 % da atividade após 6 horas de incubação (Figura 16).

Quando o sobrenadante obtido a partir do cultivo em farelo de aveia (Figura 15) foi incubado a 50° C manteve cerca de 82% de sua atividade inicial por até duas horas. Entretanto, o sobrenadante obtido a partir do CMC (Figura 16), após 1 hora de incubação já havia perdido 35 % de sua atividade relativa.

É possível observar (Figura 17) que após 30 minutos de incubação do sobrenadante obtido do bagaço de cana, houve uma perda de aproximadamente 24 % na atividade enzimática, sendo esta considerada maior, em relação aos tempos estudados.

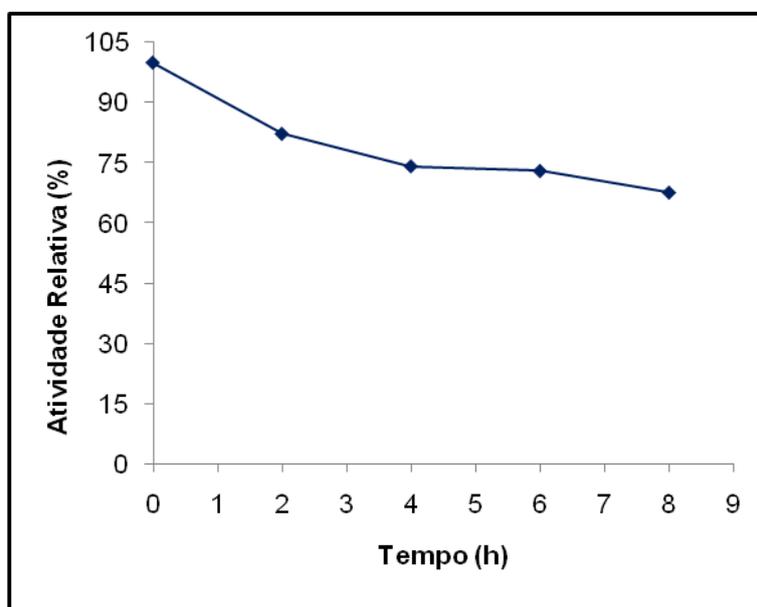


Figura 15- Estudo da termoestabilidade (temperatura de 50 °C) na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando farelo de aveia e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de crescimento.

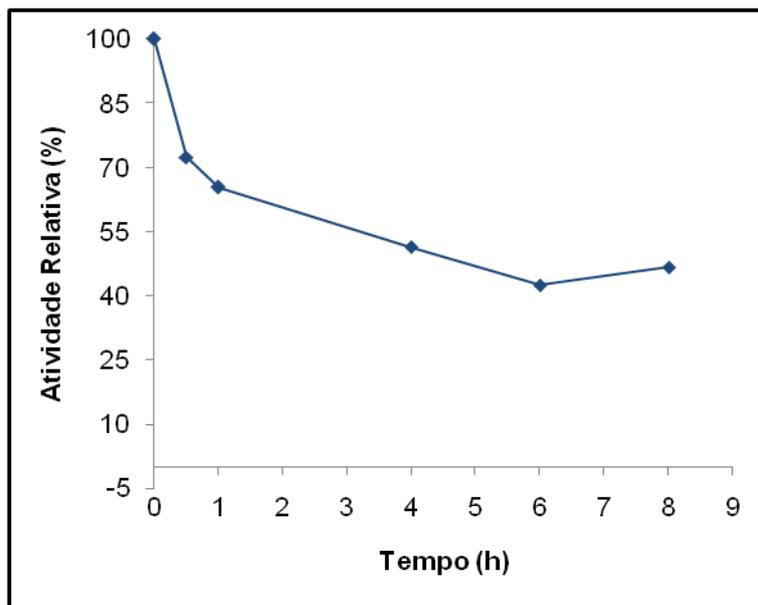


Figura 16- Estudo da termoestabilidade (temperatura de 50 °C) na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando carboximetilcelulose e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de crescimento.

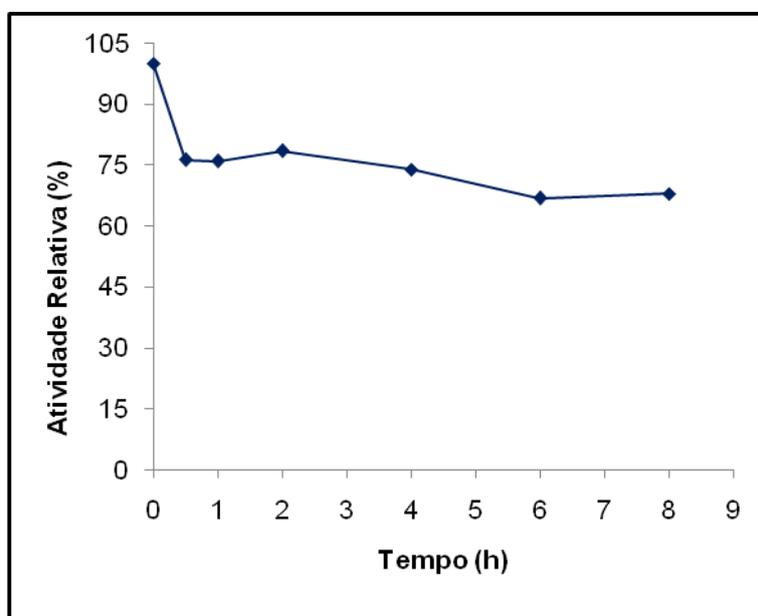


Figura 17- Estudo da termoestabilidade (temperatura de 50 °C) na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando bagaço de cana e milhocina em fermentação submersa, após 5 dias de crescimento.

Influência dos íons metálicos e outros aditivos

No que diz respeito aos íons metálicos (Tabela 13), a atividade de celulásica não sofreu nenhum efeito de ativação quando a fonte de carbono para obtenção do sobrenadante foi o bagaço de cana. Entretanto, na presença de íons, como Fe (29,51 %), Ca (3,35 %), Cu (1,79 %), Mg (24,97 %) e o aditivo EDTA (29,33%) ocorreu uma forte inibição (superior a 70%) da atividade. Vale ressaltar que a inibição causada pelo Ca e Cu corresponde a 96,65 % e 98,21 %, respectivamente. A influência dos íons Zn (62,96 %) e Mn (61,17 %), provocaram um fraco efeito inibitório (inferior a aproximadamente 38 %).

Quando se utilizou farelo de aveia e carboximetilcelulose para obtenção dos sobrenadantes, a atividade enzimática na presença de todos os íons testados, exceto Cu (no sobrenadante obtido a partir de CMC, redução de 35 %) tiveram efeito positivo, aumentando consideravelmente os valores de atividade. Cabe ressaltar que o uso de Co e Ca, elevaram a atividade em mais de 100 %, na atividade dos extratos com farelo de aveia e milhocina, enquanto que no extrato obtido do cultivo com CMC, o Mn que teve este mesmo efeito. Estes resultados podem sugerir a presença de mais de uma enzima com atividade endoglucanase, contudo mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Tabela 13- Efeito dos íons metálicos na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, utilizando diferentes substratos em fermentação submersa. A atividade relativa está expressa como a percentagem do máximo [100% de atividade (FA) = 1,094 U.mL⁻¹; (CMC) = 1,237 U.mL⁻¹ e (BC) = 1,674 U.mL⁻¹].

Íons	Atividade Relativa	Atividade Relativa	Atividade Relativa
	(%) FA + CSL	(%) CMC + CSL	(%) BC + CSL
Controle	100,00	100,00	100,00
Zn⁺²	193,05	185,39	62,96
Ba⁺²	146,53	179,61	44,98
Fe⁺²	163,44	141,17	29,51
K⁺	159,60	172,12	33,87
Mn⁺²	160,79	211,58	61,17
Co⁺²	200,73	174,85	37,22
Na⁺	153,84	152,39	30,53
Ca⁺²	254,66	166,00	3,35
Cu⁺²	153,11	64,97	1,79
Mg⁺²	153,47	162,94	24,97
EDTA	158,50	143,55	29,33

DISCUSSÃO

Dentre os vários micro-organismos degradadores de materiais lignocelulósicos, os actinomicetos, um grupo de bactérias filamentosas Gram positivas, são considerados grandes produtores de enzimas lignocelulolíticas (WANG et al., 1993; GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005), sendo a atividade celulolítica uma das mais importantes (NASCIMENTO et al., 2009). A grande maioria dos representantes dos actinomicetos cresce em forma micelilar, invasiva, semelhantemente aos fungos filamentosos. Esta característica torna-se vantajosa para o micro-organismo, pois aumenta a área de contato com o substrato e conseqüentemente aumenta sua capacidade de degradação. Por habitarem o solo, os actinomicetos já estão adaptados a colonizar resíduos sólidos, como restos vegetais e animais, participando ativamente da ciclagem da matéria orgânica. No presente trabalho, a estirpe celulolítica *Streptomyces* sp. CDP-A-01, isolada do solo da Chapada Diamantina, foi utilizada em estudos de otimização da produção de celulases utilizando resíduos de baixo custo. Outros estudos, visando a caracterização da atividade celulolítica também foram realizados.

A maioria das pesquisas referentes à produção de enzimas de interesse industrial vem utilizando cultura submersa, a qual permite maior controle do grau de aeração, pH e temperatura do meio, bem como o controle de outros fatores ambientais requeridos para o crescimento ótimo do micro-organismo (SOUZA et.al., 2001). Neste tipo de cultivo, o acúmulo de açúcares redutores tem sido relatado como um efeito negativo na produção de celulases (BÉGUIN e AUBERT, 1994; LYND et al., 2002), já que a presença de açúcares inibe a produção da enzima.

As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de produção são os principais fatores que afetam a produção de enzimas e seus níveis. Por outro lado, parece óbvio que os custos de produção são diretamente proporcionais ao tempo de produção, de modo que para minimizar os custos de produção a enzima deve ser produzida no menor tempo possível. Como a celulose no meio de produção é uma macromolécula complexa, a produção enzimática requerida para hidrolisar tal estrutura macromolecular pode atingir seu máximo somente

após a biomassa bacteriana ter atingido certo nível de concentração (SEYIS e AKSOZ, 2005). Processos baseados em micro-organismos têm custos de produção específicos. Aproximadamente 30–40% do custo de produção de muitas enzimas é atribuído ao custo do substrato de crescimento (TECHAPUN et al., 2003). Conseqüentemente espera-se reduzir os custos de produção de maneira significativa com o uso de substratos de baixo custo para a produção de enzimas industriais. Os altos custos do extrato de levedura como fonte de nitrogênio (US\$ 1,800.00/ton) impossibilita seu uso na produção de enzimas industriais. Certamente, os custos de produção de celulasas pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 podem sofrer grandes reduções utilizando-se farelo de aveia, bagaço de cana e milhocina como matérias-primas, se comparado com alguns dos meios de fermentação contendo substrato comercial. Assim sendo, resíduos agro-industriais, como farelo de aveia, bagaço de cana, e a carboximetilcelulose, como substrato comercial, foram utilizados como fontes de carbono em diferentes concentrações e suplementados com diferentes concentrações de milhocina, como fonte de nitrogênio para estudo da produção de celulasas por *Streptomyces* sp. CDPA-01.

A produção máxima de celulase em resíduos agro-industriais pela estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01, especialmente em bagaço de cana e milhocina, ao término de 5 dias de fermentação ($0,740 \text{ U.mL}^{-1}$) foi superior aquelas obtidas em farelo de aveia ($0,620 \text{ U.mL}^{-1}$) e carboximetilcelulose ($0,680 \text{ U.mL}^{-1}$), após 4 dias de fermentação. Quando se utilizou uma fonte de carbono complexa (bagaço de cana) na concentração de 1,6 % (p/v) e uma fonte orgânica e complexa de nitrogênio (milhocina) na concentração de 1,51 % (p/v), obteve-se a melhor atividade ($0,740 \text{ U.mL}^{-1}$). Estes resultados foram superiores aos encontrados por Semêdo et al. (2000), onde *Streptomyces* sp. M23, que apresentou um pico de atividade de CMCcase de $0,552 \text{ U.mL}^{-1}$, quando cultivada em farelo de trigo, e de $0,327 \text{ U.mL}^{-1}$, quando cultivada em bagaço de cana de açúcar.

Assim como nos resultados deste trabalho, Semêdo et al. (2000) também observou que os substratos de baixo custo favoreceram uma maior produção de endoglucanases, em comparação com os níveis obtidos quando esta mesma estirpe foi cultivada em um meio de cultura mais caro.

A estirpe *Streptomyces drozdowiczii* M7A também apresentou resultados favoráveis quando crescida em farelo de trigo, onde foi capaz de produzir 0,339 U.mL⁻¹ de atividade de CMCase. Esta estirpe já havia sido utilizada em trabalhos anteriores visando a produção de celulases, utilizando meio contendo celulose microcristalina (Sigma), extrato de levedura e proteose peptona e nessas condições a atividade máxima de CMCase foi de 0,235 U.mL⁻¹ (SEMÊDO et. al., 2000). Esta mesma estirpe, quando crescida em um meio mais rico, contendo 0,3 % de extrato de levedura e 1,0 % de CMC, obteve os melhores resultados, de 0,595 U.mL⁻¹. Porém, em meio contendo 1,0 % de farelo de trigo e 0,3 % de milhocina a mesma apresentou pico de atividade CMCase de 0,221 U.mL⁻¹, (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005). Os resultados aqui mostrados indicam que as concentrações de milhocina utilizadas no presente trabalho (1,51% e 0,8%) favoreceram uma maior produção enzimática quando comparado aos resultados aqui discutidos, independente da fonte de carbono utilizada.

Nascimento et al. (2009), demonstraram em seu estudo com duas fontes de nitrogênio, milhocina e extrato de levedura, para produção de celulase por *Streptomyces malaysiensis*, que as maiores produções da enzima foram nos cultivos com milhocina, que é considerada um dos principais sub-produtos da indústria de beneficiamento do milho (PAREKH, 1999), capaz de substituir o extrato de levedura como fonte rica de nutrientes. Este resíduo tem sido utilizado na produção de diversas enzimas (DE AZEREDO et al., 2004; CHEN, et. al., 2007), inclusive celulases (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2009)

Os resultados promissores obtidos com a utilização da milhocina para produção de enzimas pode ser explicado pela sua 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.

Embora vários relatos estejam disponíveis a respeito do rendimento da produção de CMCases, é difícil comparar os resultados obtidos, uma vez que os micro-organismos produtores das enzimas-alvo, as condições de cultivo e

produção, o substrato testado, as condições dos ensaios enzimáticos e a forma de definir as unidades são bastante variáveis. Porém, de um modo geral, a estirpe *Streptomyces* sp.CDPA-01 é uma excelente produtora de celulases, fornecendo valores de atividade enzimática bem superiores ou comparáveis a literatura, quando resíduos agro-industriais são utilizados.

Dentre várias estirpes de actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces*, a produção de celulases por *Streptomyces* sp. 12CC2 e *Streptomyces* sp. 8CMC2, crescidas em 1 % de CMC, variou de 1,01 a 2,49 U.mL⁻¹, respectivamente no trabalho realizado por Ramirez e Cocha (2003). Estes resultados são superiores aos obtidos no presente estudo, onde a produção com este mesmo substrato, na faixa de 0,47 % a 2,73 %, variou de 0,030 a 0,680 U.mL⁻¹, em seu melhor dia de produção.

Vários outros trabalhos são citados na literatura, mostrando a produção de endoglucanases por actinomicetos, em especial *Streptomyces*, em diferentes substratos. Uma estirpe de *Streptomyces* T3-1, produziu 40,3 U.mL⁻¹ em 1,5 % de CMC e sulfato de amônio, uréia e peptona (JANG e CHEN, 2003), porém a estirpe era transformante, e os nutrientes utilizados não eram substratos de baixo custo.

ALANI e colaboradores (2008) isolaram do solo do Canadá um actinomiceto do gênero *Streptomyces* sp. que foi cultivada em uma solução de sais de Mandel contendo peptona, tween 80 em 1,0% de celulose cristalina e produziu 11,8 U.mL⁻¹ de CMCase. Entretanto, *Thermomonospora* sp., um actinomiceto alcalotermofílico (GEORGE et.al., 2001), quando cultivado em meio contendo celulose de papel em pó, extrato de levedura e Tween 80, apresentou um pico de atividade de 23 U.mL⁻¹, enquanto que quando cultivada em farelo de trigo a atividade foi de 8,5 U.mL⁻¹.

Altas concentrações de fontes complexas de nitrogênio para bactérias produtoras de hidrolases podem melhorar o crescimento em relação a produção da enzima, devido a presença de açúcares simples. Também, fontes complexas como extrato de levedura, triptona e peptona podem liberar amônia, o que poderia estimular o crescimento e ao mesmo tempo aumentar o rendimento da produção da enzima por causa de uma possível inibição natural

de peptidases que poderiam estar presentes no sobrenadante (SUBRAMANIYAN et al., 2001).

Contudo, é possível observar que valores bem mais elevados do que os encontrados em nosso trabalho tem sido relatados com outras estirpes, outros substratos, as vezes mais caros ou não, porém vale ressaltar que utilização de resíduos de baixo custo, como a milhocina, o farelo de aveia e o bagaço de cana, utilizados neste estudo, são fontes importantes e promissoras para produção de endoglucanases por actinomicetos.

Outro fator que pode ajudar a otimizar a produção de enzimas é a aplicação de ferramentas estatísticas. Geralmente, um conhecimento prévio de procedimentos matemáticos é necessário para que se desenvolva um modelo estatístico. As três etapas de um desenho experimental incluem fazer experimentos estatisticamente desenhados, estimar os coeficientes em modelos matemáticos predizendo a resposta e checar a aplicabilidade do modelo (TECHAPUN et al., 2002). Esta metodologia utilizada fornece uma informação bem adequada pelo número de ensaios realizados. No entanto, os resultados obtidos dentro da faixa ótima das variáveis (fontes de carbono e nitrogênio) é muito mais interessante do que apenas um valor pontual, pois ele fornece informação sobre a “robustez” do processo. Ou seja, qual a variação das fontes que pode ser admitida para a otimização das condições dos meios de cultivo, com farelo de aveia, carboximetilcelulose e bagaço de cana, como fontes de carbono, combinadas com a milhocina, como fonte de nitrogênio. De acordo com a teoria da Superfície de Resposta, a atividade CMCase das amostras estudadas pode ser descrita como uma função das variáveis selecionadas. A ANOVA é uma ferramenta muito útil para verificar a confiabilidade do modelo, mas é essencial para avaliar o seu poder de previsão em condições que não foram utilizadas no delineamento experimental, por isso é recomendado fazer a validação do experimento em triplicata, em diferentes condições das utilizadas, garantindo a otimização do processo através do planejamento experimental.

No presente trabalho, as variáveis (fontes de carbono e nitrogênio) foram estatisticamente otimizadas e a validação foi realizada em condições de ensaios ao redor do ótimo de atividade celulolítica, nos tempos considerados

ótimos para produção. Após a validação, os valores de atividade CMC_{Case} aumentaram em 40 % (0,620 U.mL⁻¹ para 1,039 U.mL⁻¹) no extrato obtido com 2,0 % de farelo de aveia e 1,65% de milhocina (ensaio 2), após 4 dias de fermentação, 56 % (0,680 U.mL⁻¹ para 1,544 U.mL⁻¹) foi obtido no ensaio 2, no qual as concentrações de carboximetilcelulose e milhocina, foram utilizados nos seus níveis médios (2,95 % e 1,3 %), respectivamente, após 4 dias de fermentação. Para o extrato obtido a partir do cultivo com 2,4 % de bagaço de cana e 1,3 % de milhocina, no ensaio 1, a atividade aumentou em aproximadamente 37 % (0,740 U.mL⁻¹ para 1,180 U.mL⁻¹), após 5 dias de fermentação.

Assim, a partir da análise dos resultados encontrados com a confirmação experimental das condições otimizadas, foi realizada a caracterização enzimática (determinação da melhor temperatura, melhor pH, termoestabilidade e influência de íons metálicos) dos sobrenadantes obtidos em diferentes concentrações de fontes de carbono e nitrogênio.

Diversos trabalhos têm reportado máxima atividade de celulasas à temperatura de 50 °C a 60 °C (JANG e CHEN, 2003; GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005). Os resultados obtidos neste trabalho para determinar a temperatura ideal para atividade CMC_{Case} produzida por *Streptomyces* sp. CDPA-01 estão de acordo com outros encontrados na literatura. Jang e Chen (2003), descreveram uma CMC_{Case} produzida por uma cepa de *Streptomyces* termofílica T3-1 com temperatura ótima de 50 °C, enquanto Grigorevski-Lima et al. (2005) citaram uma CMC_{Case} de *Streptomyces drozdowiczii* com ótima atividade entre de 50 °C a 60 °C. George et al. (2001) descreveram uma endoglucanase de *Thermomonospora* com ótimo a 50 °C, semelhantemente a Nascimento et al. (2009) com a estirpe *Streptomyces malaysiensis*.

O perfil de pH apresentou atividade endoglucanásica acima de 70 % nos valores de 3 a 8, sendo a atividade máxima obtida em pH 3,0, 4,0 e 8,0, para os sobrenadantes obtidos do cultivo com carboximetilcelulose, bagaço de cana e farelo de aveia, respectivamente, semelhantemente ao obtido por Grigorevski-Lima et al. (2005) e Alani et al. (2008) para outras estirpes de *Streptomyces*. Os resultados obtidos quando se utilizou bagaço de cana como fonte de carbono corroboram com os encontrados por Nascimento et al. (2009)

que comprovaram o mesmo resultado de atividade ótima em pH 4,0 na produção de celulases com bagaço de cana e milhocina, pela estirpe *Streptomyces malaysiensis*.

Celulases produzidas por outros gêneros de actinomicetos, como *Thermomonospora* sp., apresentaram pH 5,0 como seu ótimo e uma tolerância em ampla faixa de pH (4,0-10,0) onde a enzima permanece com 80% da atividade (GEORGE et. al., 2001). Da mesma maneira, as celulases produzidas por duas estirpes de *Streptomyces* sp. BRC1 e BRC2, apresentaram uma ótima atividade dentro desta faixa, com pico de atividade em pH 7,0 e 7,5, respectivamente (CHELLAPANDI e HIMANSHU, 2008).

Muitas das celulases utilizadas na indústria hoje em dia parecem ser de origem mesofílica e/ou neutrofílica, ainda que enzimas de fontes extremofílicas possam ser de grande utilidade em muitos processos biotecnológicos. Em particular, enzimas que combinam um número de características extremofílicas poderiam ser utilizadas em muitos processos tecnológicos (COLLINS et al, 2005). Em processos industriais, o tempo é fundamental e o estudo de termoestabilidade enzimática em diferentes tempos de incubação é importante para determinar o quanto e por quanto tempo a preparação enzimática pode suportar as condições aplicadas à indústria de interesse. Celulases termoestáveis podem ser utilizadas na indústria alimentícia, onde ocorrem processos que requerem altas temperaturas como a pasteurização. Outras aplicações incluem as indústrias de polpa e papel, tratamento de efluentes industriais e processamento de materiais celulósicos (JANG e CHEN, 2003).

Sendo assim, as CMCases presentes nos extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo da estirpe *Streptomyces* sp. CDPA-01 em bagaço de cana e farelo de aveia foram estáveis a 50 °C, sendo possível verificar uma atividade relativa superior a 68 % mesmo após 8 horas de incubação, embora a atividade no extrato com CMC tinha perdido cerca de 50 % da sua atividade após 4 horas de incubação. Estes resultados são semelhantes a vários outros encontrados na literatura para outros actinomicetos, como é o caso de *Streptomyces* T3-1 que produziu endoglucanases altamente termoestáveis a 40 °C e 50 °C (JANG e CHEN, 2003), *Streptomyces drozdowiczii* M7A, que foi capaz de reter 100 % de sua atividade a 50 °C por uma hora (GRIGOREVSKI-

LIMA et al., 2005) e uma estirpe de *Termomonospora* sp. que apresentou endoglucanases com 100 % de estabilidade a 50 °C mesmo após 72 horas de incubação (GEORGE et. al., 2001). Assim, os resultados aqui apresentados da nossa estirpe sugerem que a atividade enzimática apresenta um perfil amplo em termos de temperatura, importante ferramenta quando se sugere uma utilização para processos biotecnológicos.

Uma das alternativas para identificar as enzimas, que são termoestáveis e ativas a pH alcalinos, é explorar fontes naturais em que se encontram organismos alcalotermofílicos. Eles são conhecidos por produzirem enzimas com maior termoestabilidade do que aqueles derivados das suas contrapartes mesofílicas. A estabilidade da enzima também pode ser aumentada através de modificação química, ligações cruzadas, imobilização, tratamento com aditivos e engenharia de proteína. A adição de pequenos compostos na solução de proteínas e modificação de microambientes provém uma simples medida prática para aumentar a estabilidade da enzima (GEORGE et al. 2001).

De acordo com Querido et.al., (1987), aproximadamente um terço das enzimas conhecidas possuem metais como parte de suas estruturas. As enzimas podem ser moduladas pela interação de cátions com resíduos de aminoácidos presentes no seu sítio ativo. Tais interações podem aumentar (modulação positiva) ou diminuir (modulação negativa) a atividade catalítica (BRECCIA et al., 1998; GHANEM et al., 2000). Os dados referentes à inibição ou estímulo de íons metálicos na atividade enzimática de enzimas de interesse industrial são de fundamental importância, pois permite selecionarmos previamente certas condições do processo, impedindo prejuízos futuros quando se passa da escala laboratorial para a escala industrial. Assim sendo, os resultados obtidos no estudo do efeito dos íons metálicos nos sobrenadantes obtidos a partir da fermentação com bagaço de cana e milhocina, demonstraram que nenhum dos íons testados afetaram de forma positiva a atividade da enzima. Todos os íons testados apresentaram efeito inibitório na atividade enzimática CMCase, variando de 98% (Cu^{2+}) até 37% (Zn^{2+}). No sobrenadante bruto de *Streptomyces drozdowiczii*, o Cu^{2+} causou perdas de 30% na atividade, enquanto os íons Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Na^+ estimularam a atividade enzimática (GRIGOREVSKI - LIMA et al., 2005).

A forte inibição do cobre sobre a atividade de endoglucanases contrasta com a purificação de uma endoglucanase do fungo *Mucor circinelloides*, que não sofreu efeitos em sua atividade na presença de cobre (SAHA, 2004). Contudo, o íon Cu^{2+} causou perdas na atividade enzimática de endoglucanases purificadas de *Gloeophyllum sepiarium* e de *Gloeophyllum trabeum* (MANSFIELD et al., 1998).

Quando se verificou a influência de íons na atividade dos sobrenadantes obtidos a partir de farelo de aveia e carboximetilcelulose, como fontes de carbono e milhocina, como fonte de nitrogênio, todos os íons testados estimularam a atividade CMCase. Resultados semelhantes foram encontrados por Saha (2004), quando todos os íons testados tiveram efeito positivo satisfatório na atividade endoglucanase, exceto o Mn. Porém, estes resultados podem sugerir a presença de mais de uma enzima com atividade endoglucanásica, fazendo com que sejam necessários mais estudos para confirmar esta hipótese. O acréscimo de EDTA permitiu uma melhor atividade de endoglucanases, o que já foi relatado em *M. circinelloides* (SAHA, 2004). A presença de EDTA fez com que as atividades de exoglicanases e endoglicanases purificadas *A. nidulans* de aumentassem (BAGGA et al, 1990).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os actinomicetos são importantes micro-organismos produtores de substâncias bioativas, incluindo antibióticos e enzimas, sendo de grande interesse a procura de novas fontes com potencial biotecnológico, em especial a produção de enzimas para aplicação industrial. As celulasas, por exemplo, são enzimas que estabelecem um complexo capaz de atuar sobre materiais lignocelulósicos, causando sua hidrólise, e liberando açúcares, como a glicose, que pode ser convertido em etanol de 2ª geração. A produção de enzimas a baixo custo é muito importante para processo que requerem sua utilização em larga escala, por isso, estudos têm sido realizados com substratos indutores como fontes de energia barata.

Desta forma, no presente trabalho foram isolados 196 actinomicetos, e todos selecionados quanto à produção de celulasas e xilanasas, e que hoje compõem a coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIOM) da UFRB. A partir desses resultados, selecionamos a estirpe CDPA-01, pertencente ao gênero *Streptomyces*, para avaliar seu potencial de produção celulolítica em fermentação submersa em três fontes de resíduos agroindustriais, farelo de aveia e bagaço de cana, como fontes de carbono, e milhocina, como fonte de nitrogênio. O bagaço de cana se mostrou mais eficiente em termos de produtividade, no entanto, todos os resíduos avaliados representaram um bom potencial para aplicação na produção de enzimas por fermentação submersa, requerendo estudos complementares para ajuste dos parâmetros operacionais do processo fermentativo.

Posteriormente, foi feita a caracterização enzimática com todos os substratos testados, e os resultados demonstraram que as atividades enzimáticas máximas de celulasas foram nas temperaturas de 50 e 60 °C. O pH considerado ótimo foi 3,0, 4,0 e 8,0, quando se utilizou CMC, bagaço de cana e farelo de aveia para obtenção dos extratos brutos enzimáticos, respectivamente. Quanto à termoestabilidade, a atividade celulásica dos extratos obtidos de farelo de aveia e bagaço de cana se manteve estável a 50

°C, no período de oito horas de incubação, com atividade relativa em torno de 70 %. Enquanto que o extrato obtido do substrato industrial, CMC, em oito horas de incubação, já tinha perdido mais de 50 % de atividade. Para a caracterização frente à presença de sais, os íons devem ser melhor investigados.

Pesquisas futuras são indispensáveis para identificação da presença de mais de uma enzima nos extratos, o que pode ser explicado pelos dados obtidos na análise da influência de íons metálicos na atividade enzimática. Porém, considerando os resultados obtidos com a estirpe selecionada, *Streptomyces* sp. CDPA-01, podemos dizer que esta, possui sob vários aspectos, um importante potencial para aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G., GHULE, J. E., SINGH, R., SHAIKH, H., BASTAWDE, K. B., GOKHALE D. V., VARMA A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2004.
- ALANI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 1, p. 123-126, 2008.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. IN: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; FERRARA, M. A.; COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 179-204, 2008.
- ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 187-198, 2000.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.29, p. 719 –739, 2005.
- BAGGA, P. S.; SANDHU, D. K.; SHARMA, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 61-68, 1990.
- BASILIO, A., GONZÁLEZ, I., VICENTE, M., GORROCHATEGUI, J., CABELLO, A., GONZÁLEZ, A.; GENILLOU, O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 814–823, 2003.
- BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. BNDES Setorial, 25, p. 5-38, 2007. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set2501.pdf> Acessado em 29 de setembro de 2010.
- BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, p. 171-188, 1992.
- BCC – BCC Research, 2005. Enzymes for Industrial Applications. Disponível em: www.bccresearch.com/chem/C147U.html. Acessado em: 18 de setembro de 2010.
- BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 13, p. 25–58, 1994.

BELFAQUIH, N.; PENNINGCKX, M. J. A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 114-121, 2000.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.

Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; KUCÁR, S. Identification and mode of action of endo-(1 \rightarrow 4)- β -xylanases. In: VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A. and VORAGEN, A. G. J. (Eds.) **Xylans and Xylanases, Progress in Biotechnology 7**. Elsevier. 1992.

BÖCKLE, B.; GALUNSKY, B.; MÜLLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DMS 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3705-3710, 1995.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 241-271, 2008.

BRECCIA, J. D.; CASTRO, G. R.; BAIGORÍ, M. D.; SIÑERIZ, F. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal Applied Bacteriology**, v. 78, p. 469-472, 1995.

BRECCIA, J. D.; SINERIZ, F.; BAIGORI, M. D.; CASTRO, G. R.; HATTI-KAUL, R. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 42-49, 1998.

CAVACO-PAULO, A. Mechanism of cellulase action in textile processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 273-277, 1998.

CHEN, C.; CHEN, J. L.; LIN, T. Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 91-96, 1997.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 85-89, 2007.

CHELLAPANDI, P.; HIMANSHU, M. J. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 122-127, 2008.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p.71-94, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Eds.) Section I. General Preparative Procedures. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 138-146, 1955.

CUROTTO, E.; CONCHA, M.; CAMPOS, V.; MILAGRES, A. M. F.; DÚRAN, N. Production of extracellular xylanases by *Penicillium janthinellum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, p. 107-116, 1994.

DAHLBERG, L.; HOLST, O.; KRISTJANSSON, J. K. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 40, p. 63-68, 1993.

DAMASO, M. C. T., ANDRADE, C. M. M., JUNIOR, N. P. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 821-834, 2000.

DAS, M.; ROYER, T. V.; LEV, L. G. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 756–767, 2007.

DE AZEREDO, L. A. I., FREIRE, D. M. G., SOARES, R. M. A., LEITE, S. G. F.; COELHO, R. R. R. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 354-358, 2004.

DOELLE, H. R.; MITCHELL, D. A.; ROLS, C. Solid substrate cultivation. London: **Elsevier Applied Science**, p.466, 1992.

FLORES, M. E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 410-416, 1997.

FREEDONIA - The Freedonia Group Incorporated, 2005. **Word Enzymes to 2009**. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/pdf/1949smwe.pdf>
Acessado em: 18 de setembro de 2010.

FREEDONIA- The Freedonia Group Incorporated, 2009. **World Enzymes to 2013**. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>. Acessado em: 18 de setembro de 2010.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 171–175, 2001.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 113 -121, 2000.

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

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. **Actinomycetes in Biotechnology**. M. GOODFELLOW, S. T. WILLIAMS e M. MORDARSKI (Eds.). Academic Press, London. 1988.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**. p.1-22. (2007). doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; Emptage, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GREGORY, A. C. E.; O'CONNEL, A. P.; BOLWELL, G. P. Xylans. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 439-455, 1998.

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

GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDI, P.; VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **Journal Applied Bacteriology**, v. 78, p. 378-383, 1995.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v.100, p.1238–1245, 2009.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.301-306, 2005.

HOPWOOD, D. A.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F.; KIESER, T.; BRUTON, C. J.; KIESER, H. M.; LYDIATE, D. J.; SMITH, C. P.; WARD, J. M.; SCHREMPF, H. Genetic manipulation of *Streptomyces*. **A laboratory Manual**. The John Innes Institute, Norwich, United Kingdom, 1985.

HOPWOOD, D. A. **Streptomyces in Nature and Medicine**. The antibiotic makers. Oxford, University Press, cap.1, p. 8-27, 2007.

HOWARD, R. L. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. V.1: Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. Ed.3. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

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

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1–5, 2000.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KHALIL, A. I. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 753-759, 2002.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377–391, 2008.

LEBLOND, P.; DECARIS, B. New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, p. 223-232, 1994.

LYND, R.L.; WEIMER, J. P.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. **Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, p. 105-114, 2003.

MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N.; GUBITZ, G. M. Characterization of Endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 133–140, 1998.

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

MILLER, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMEDIN, A. H. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 43, p. 13-21, 1999.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. Chapter 1, 6, 7. 4th edition. John Wiley & Sons, New York, 1997.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, Cap.5, p.191-241, 2002.

MULLINGS, R. Measurement of saccharification by cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 586-591, 1985.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S., ALVES, L., GÍRIO, F. M., BON, E. P. S.; 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, p. 549-555, 2002.

NASCIMENTO, R. P.; D'AVILA-LEVY, C. M.; SOUZA, R. F.; BRANQUINHA, M. H.; BON, E. P. S.; PEREIRA Jr., N.; COELHO, R. R. R. Production and partial characterization of extracellular proteinases from *Streptomyces malaysiensis*, isolated from a Brazilian cerrado soil. **Archives of Microbiology**, v. 184, n. 3, p. 194-198, 2005.

NASCIMENTO, R. P.; JUNIOR, N. A.; PEREIRA JUNIOR, N.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 529–535, 2009.

NASCIMENTO, R. P.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; SACRAMENTO, D. R.; BOM, E. P. da 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.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153- 1169, 2000.

PAREKH, M.; FORMANEK, J.; BLASCHEK, H. P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 152-157, 1999.

PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S., KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 761-766, 2002.

PÉLACH, M. A.; PASTOR, F. J.; PUIG, J.; VILASECA F.; MUTJÉA, P. Enzymic deinking of old newspapers with cellulose. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1063-1067, 2003.

PEREIRA, P. S.; DUARTE, J. C.; FERRARA, M. A.; LACERDA, P. S. B.; ALVES, F. C.; Biocatálise: Estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; BICCA, R. A.; COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, p.433-462, 2008.

PIRET, J. M.; DEMAÏN, A. L. **Actinomycetes in Biotechnology: An overview**. In: Actinomycetes in Biotechnology. GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T. e MORDARSKI, M. (Eds). Academic Press, London. 1988.

POLIZEI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577–591, 2005.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues: a review. **Resources Conservation and Recycling**, v. 50, p. 1–39, 2007.

QUERIDO, A. L. S.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; CHAVES-ALVES, V. M. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 475-480, 2006.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998.

RAMIREZ, P.; COHA, J. M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de La actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 67-77, 2003.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª Ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROWELL, M. R.; PETTERSEN, R.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M. A. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. Chapter 3: Cell wall chemistry. CRC Press. 487p., 2005.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1871–1876, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro, Ed. Eventos, 121p., 2004.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; LINHARES, A. A.; DUARTE, G. F.; NASCIMENTO, R. P.; ROSADO, A. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R.; SILVA, K. R. A.; ALVIANO, C. S.; MANFIO, G. P.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic Evolutionary and Microbiology**, v. 54, p. 1323–1328, 2004.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, n. 2, p. 115-119, 2005.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

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

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S.; PEREZ, J. O. Production of Streptomyces inoculum in sterilized rice. **Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)**, v. 64, n. 6, p. 641-644, 2007.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD A.; SHAKEEL A.K. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.

SOUZA, D. F.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarisii* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 835-838, 2001.

STUZENBERGER, F. J.; BODINE, A. B. Thermostable beta-Xylosidase from *Thermomonospora curvata*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 55-60, 1998.

STUZENBERGER, F. J.; BODINE, A. B. Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 504-511, 1992.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

SZIJÁRTÓ, N.; FAIGL, Z.; RÉCZEY, K.; MÉZES, M.; BERSÉNYI, A. Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p.49-57, 2004.

TECHAPUN, C., POOSARAN, N., WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p.1327-1340, 2003.

THEATER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.

THOMSON, J. A. Molecular biology of xylan degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 65–82, 1993.

TUNCER, M.; BALL, A. S.; ROB, A.; WILSON, M. T. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD 25. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 38-47, 1999.

VOBIS, G. **Morphology of actinomycetes**. In: *Atlas of Actinomycetes*. HAMADA, M., HOTTA, K., KUDO, T., SEINO, A., VOBIS, G. e YOKOTO, A. (Eds.) p. 178–191. Asakura Publishing Co. Itda. Tokyo, 1997.

VYAS, A.; VYAS, D.; VYAS, K. M. Microbial cellulases for industrial application. **Everyman's Science**, v. 40, n. 6, p. 411-416, 2006.

WANG, P.; MASON, C.; BRODA, P. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1987-1993, 1993.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. Applications of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries. In: **Hemicelluloses and Hemicellulases**. COUGHLAN, M. P. e HAZLEWOOD, G. P. (Eds), p. 127–143. Portland Press, London. 1993.

XU, L.; LI, Q.; JIANG, C. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 244-248, 1996.

YU, H.; ZENG, G.; HUANG, H.; XI, X.; WANG, R.; HUANG, D.; HUANG, G.; LI, J. Microbial community succession and lignocelluloses degradation during agricultural waste composting. **Biodegradation**, v. 18, p. 793–802, 2007.

ZHANG, Y. -H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R.; Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452–481, 2006.